



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 340 755**

(21) Número de solicitud: **201000006**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO

B2

(22) Fecha de presentación: **29.12.2009**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2010**

Fecha de la concesión: **17.01.2011**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **27.01.2011**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:
27.01.2011

(73) Titular/es: **Universidad de Málaga
c/ Severo Ochoa, 4 (PTA)
29590 Campanillas, Málaga, ES**

(72) Inventor/es: **Ariza Corbo, María José;
González Santos, Pedro;
Valdivielso Felices, Pedro;
Sánchez Chaparro, Miguel Ángel y
Rioja Villodres, José**

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL.**

(57) Resumen:

Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL.

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores, sonda, procedimiento y kit para genotipado de polimorfismos genéticos, y más concretamente para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL mediante la amplificación mediante PCR de una muestra de ADN usando el conjunto de cebadores reivindicado, y la detección mediante fluorescencia y genotipado del polimorfismo genético usando el conjunto de sondas reivindicado. Las principales ventajas de la presente invención son: gran rapidez que permite el genotipado a gran escala ya que la reacción de PCR y la detección de la señal fluorescente son simultáneas, asignación de genotipos automatizada y obtenible de forma inmediata al finalizar la reacción, gran sensibilidad que permite genotipar muestras empleando concentraciones muy bajas de ADN, y menor riesgo de contaminación al tratarse de un ensayo homogéneo.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL.

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores, sonda, procedimiento y kit para genotipado de polimorfismos genéticos, y más concretamente para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL.

10 Técnica anterior

Los polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (en inglés “single nucleotide polymorphisms” o “SNPs”) son la forma más frecuente de variación que se puede encontrar en el genoma humano. El estudio de la variabilidad genética tiene repercusión biosanitaria puesto que el papel que se atribuye a los SNPs es, junto con distintos factores ambientales, de moduladores de la susceptibilidad individual a padecer la mayoría de las enfermedades comunes (hipertensión, diabetes, obesidad, arteriosclerosis...). De este modo, el desarrollo de las técnicas de genotipado es un tema en auge actualmente y es el campo en el que se encuadra la invención.

El enzima LPL (lipasa lipoprotéica) juega un papel clave en el metabolismo lipídico ya que hidroliza el grueso de triglicéridos presentes en el corazón de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que circulan en plasma. Diferentes estudios han demostrado la implicación del gen que codifica para el enzima en el desarrollo de la arteriosclerosis y la aparición de distintas dislipemias de base genética. De las numerosas variantes descritas en el gen, el polimorfismo (SNP) S447X provoca una terminación prematura de la proteína (faltan los aminoácidos del extremo C-terminal serina y glicina) que produce un aumento de su actividad hidrolítica. De esta forma esta variante se ha asociado a menores niveles de triglicéridos y mayores concentraciones de colesterol HDL y por tanto a un efecto protector frente a arteriosclerosis y síndrome metabólico. Es de especial interés señalar que se han desarrollado sistemas de terapia génica para tratar a pacientes con hipertrigliceridemia grave causada por déficits del enzima LPL, expresando de forma constitutiva la variante 447X con mayor actividad, de ahí la importancia de identificar a las personas portadoras o no de tal polimorfismo.

El método descrito inicialmente para el genotipado de este polimorfismo, S447X, está basado en el sistema de PCR-RFLP, o genotipado por PCR y restricción, que es el que se utiliza de forma más común para el análisis individual de la mayoría de los SNPs conocidos. En este sistema se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa los fragmentos polimórficos del gen o genes en estudio, el fragmento amplificado se digiere, con un enzima de restricción concreto pues el polimorfismo suele causar la aparición o eliminación de un sitio de restricción y el perfil de bandas específico de cada genotipo se visualiza empleando geles de agarosa o acrilamida.

Las principales ventajas de la presente invención en relación al método convencional (PCR-RFLP) son: a. una mayor rapidez que permite el genotipado a mayor escala (mayor número de muestras) ya que la reacción de PCR y la detección de la señal fluorescente son simultáneas, la asignación de genotipos está automatizada y se obtiene inmediatamente al finalizar la reacción, b. mayor sensibilidad, debido al empleo de una señal fluorescente, por lo que se pueden genotipar muestras empleando concentraciones muy bajas de ADN genómico, c. menor riesgo de contaminación, al tratarse de un ensayo homogéneo, es decir el procedimiento se realiza en una sola etapa.

Para este polimorfismo hemos encontrado descritos en la literatura dos ensayos semejantes al que propone la invención (Brousseau *et al*, 2004, Komurcu-Bayrak *et al* 2007). En el primer caso sólo se conocen las secuencias específicas de cebadores y no las de las sondas. Como se describe más abajo, los cebadores propuestos en la presente invención permiten el genotipado de las muestras en un rango de temperaturas muy amplio siendo por lo tanto más versátil que el publicado por estos otros autores. Por otra parte, en los casos publicados la aplicación de los ensayos depende del uso de los kits y aparatos de la empresa que ha desarrollado los métodos (Applied Biosystems) mientras que el ensayo propuesto en la presente invención puede llevarse a cabo en cualquier máquina de PCR en tiempo real que detecte al menos dos colores (longitudes de onda) de fluorescencia y empleando reactivos de cualquier marca comercial.

También es posible genotipar los polimorfismos de interés mediante secuenciación directa, sin embargo este sistema no se utiliza rutinariamente para el genotipado de un gran número de muestras sino para la detección de nuevos polimorfismos en los genes de interés.

60 Divulgación de la invención

Definiciones

Polimorfismo S447X: A lo largo de la descripción este término hace referencia a la variante nucleotídica del gen LPL definida por la aparición de un cambio C por G en la posición 1595 de la región codificante (exón 9).

Ensayo: A lo largo de la descripción este término hace referencia al conjunto de procedimientos que permiten llevar a cabo el genotipado del polimorfismo.

ES 2 340 755 B2

Sondas lineales fluorogénicas: A lo largo de la descripción este término hace referencia a las secuencias nucleotídicas, complementarias de la región polimórfica de la variante, que llevan acoplado un fluorocromo en el extremo 5' y una molécula extintora en el extremo 3' de dicha secuencia.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores, sonda, procedimiento y kit para genotipado de polimorfismos genéticos, y más concretamente para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL.

- 10 El procedimiento, representado esquemáticamente en la figura 1, consiste en una única reacción de PCR en la que se aprovecha la actividad 5' exonucleasa del enzima Taq polimerasa. En la reacción de PCR están presentes cuatro oligonucleótidos: dos cebadores específicos que flaquean el polimorfismo de interés y dos sondas lineales fluorogénicas específicas de cada alelo. Estas sondas están marcadas en el extremo 5' con un fluorocromo de referencia, distinto para cada sonda, y una molécula extintora en el 3'. Cuando las sondas están intactas, la señal emitida por la excitación del fluorocromo de referencia es captada por la molécula extintora, debido a la proximidad física entre ambas, y por tanto no se detecta (figura 1a). La señal fluorescente, diferente para cada alelo, sí se detecta cuando la sonda híbrida con el alelo totalmente complementario y se libera el fluorocromo de referencia, por la actividad 5'→3' exonucleasa de la polimerasa, durante los ciclos de la reacción de PCR (figura 1b y 1c).
- 20 De este modo, constituye un primer objeto de la presente invención un conjunto de cebadores para el genotipado de polimorfismos genéticos, y más concretamente para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL, en el cual al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO 1 y SED ID NO 2. Preferentemente, dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 2. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 1 y la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 2.

30 Constituye un segundo objeto de la presente invención un conjunto de sondas para el genotipado de polimorfismos genéticos, y más concretamente para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL, en el cual al menos dos de las sondas de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO 3 y SED ID NO 4. Preferentemente, dicho conjunto está formado por una primera sonda específica del alelo más frecuente (447S), cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 3, y por una segunda sonda, específica del alelo menos frecuente (447X), cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 4. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos de la primera sonda es idéntica a la SEQ ID NO 3, y la secuencia de nucleótidos de la segunda sonda es idéntica a la SEQ ID NO 4. Dicha primera sonda, específica del alelo más frecuente, se marca por fluorescencia en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína (Fam) y en el extremo 3' con carboxitetrametilrodamina (Tamra); y dicha segunda sonda, específica para el alelo menos frecuente, se marca por fluorescencia en el extremo 5' con hexaclorofluoresceína (Hex) y en el extremo 3' con carboxitetrametilrodamina (Tamra).

35 Constituye un tercer objeto de la presente invención un procedimiento para el genotipado de polimorfismos genéticos, y más concretamente para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL, que comprende la amplificación mediante PCR de una muestra de ADN usando el conjunto de cebadores anteriormente referido, y la detección mediante fluorescencia y genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL usando el conjunto de sondas anteriormente referido.

40 Constituye un cuarto objeto de la presente invención un kit para genotipado de polimorfismos genéticos, y más concretamente para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL, que comprende al menos un conjunto de cebadores y un conjunto de sondas tal y como los anteriormente referidos.

45 Preferentemente, el kit comprende:

- a. dos cebadores con secuencias de nucleótidos idénticas a las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, y
- 55 b. dos sondas con secuencias de nucleótidos idénticas a las SEQ ID NO 3 y SED ID NO 4, para la detección del alelo más frecuente y del alelo menos frecuente, respectivamente; y marcadas por fluorescencia en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína (Fam) y con hexaclorofluoresceína (Hex), respectivamente, y en el extremo 3' con carboxitetrametilrodamina (Tamra).

60 **Descripción de las figuras**

Figura 1. Representación gráfica del principio teórico que soporta la presente la invención. Las sondas en solución, es decir, sin hibridar con su alelo específico, no se detectan, pues la fluorescencia que emite el fluorocromo al ser excitado es captada por el extintor (a). Cuando una de las sondas, específica de uno de los alelos, híbrida con la secuencia del ADN molde complementaria, la actividad exonucleasa 5'→3' del enzima Taq polimerasa libera el fluoróforo, que emite una señal fluorescente detectable (b y c).

ES 2 340 755 B2

Figura 2. Visualización en geles de agarosa al 3% de la reacción de amplificación del fragmento polimórfico de la variante S447X del gen LPL. Las temperaturas del gradiente aplicado se indican en la parte de superior de la figura para cada calle del gel. Los tamaños de las bandas correspondientes al marcador de peso molecular (PM) y el tamaño de fragmento esperado, en pares de bases, se indican a la izquierda y a la derecha, respectivamente.

Figura 3A. Curvas de amplificación generadas por la emisión de fluorescencia de cada una de las sondas diseñadas (corresponde a la lectura de fluorescencia Fam) en un ensayo realizado a 60°C. Las curvas numeradas como (1) corresponden a la mezcla que sólo contiene la sonda Fam 447S, las numeradas como (2) corresponden a la mezcla sólo con Hex 447WK, las curvas numeradas como (3) a las muestras ensayadas con la mezcla con las dos sondas. Junto a cada curva se indica el genotipo de la muestra empleada.

Figura 3B. Curvas de amplificación generadas por la emisión de fluorescencia de cada una de las sondas diseñadas (corresponde a la lectura de fluorescencia Hex) en un ensayo realizado a 60°C. Las curvas numeradas como (1) corresponden a la mezcla que sólo contiene la sonda Fam 447S, las numeradas como (2) corresponden a la mezcla sólo con Hex 447W, las curvas numeradas como (3) a las muestras ensayadas con la mezcla con las dos sondas. Junto a cada curva se indica el genotipo de la muestra empleada.

Figura 3C. Gráfica de discriminación alélica y la asignación de los genotipos realizada por la aplicación informática de la máquina de PCR para los umbrales de fluorescencia seleccionados. Se representan los datos de fluorescencia obtenidos en el ciclo 35 para dos réplicas de las muestras de ADN de genotipo conocido ensayadas con la mezcla que contenía las dos sondas. Las unidades relativas de fluorescencia correspondientes a la sonda Fam aparecen en el eje X y las de las sondas Hex en el eje Y. La línea vertical representa el valor umbral de fluorescencia de la sonda Fam a partir del cual se considera la presencia del alelo específico, es decir, el más frecuente (“Allele 1”). La línea horizontal es el umbral de fluorescencia de la sonda Hex y, por tanto, los valores de fluorescencia que superen dicho umbral indican la presencia del alelo menos frecuente (“Allele 2”). Los símbolos empleados por la aplicación informática se observan en la parte superior del panel. En la gráfica mostrada, el círculo corresponde a Homo S o “Allele 1”, el triángulo corresponde a Het o “heterozygote”, el cuadrado corresponde al Homo M o “Allele 2” y rombo corresponde al blanco o “none”.

Figura 3D. Tabla con la asignación automática de genotipos realizada por la aplicación informática de la máquina de PCR para los umbrales de fluorescencia seleccionados. “ID 1” e “ID 2” indican el genotipo conocido de las muestras. “Call” indica el genotipo asignado por la aplicación informática.

Figura 4A. Gráfica de discriminación alélica para las muestras del gradiente de temperatura realizado con un ensayo S447X. Se representan los datos de fluorescencia obtenidos en el ciclo 34. Las muestras de genotipo conocido (Hornos S, Het y Hornos M) se representan unidas por líneas para cada temperatura del gradiente, indicadas al lado de dichas líneas. La asignación automática de genotipos, considerando los umbrales de fluorescencia seleccionados, se identifica mediante los símbolos empleados por la aplicación informática de la máquina de PCR. En la gráfica mostrada, el círculo corresponde a Homo S o “Allele 1”, el triángulo corresponde a Het o “heterozygote”, el cuadrado corresponde al Homo M o “Allele 2” y rombo corresponde al blanco o “none”.

Figura 4B. Tabla con la asignación automática de genotipos realizada por la aplicación informática de la máquina de PCR para los umbrales de fluorescencia seleccionados. “ID 1” e “ID 2” indican el genotipo conocido de las muestras. “Call” indica el genotipo asignado por la aplicación informática. Las muestras nombradas como C, D, E, F y H corresponden a las temperaturas del gradiente 68, 66, 64, 62 y 60°C, respectivamente.

Figura 5A. Gráfica de discriminación alélica para un ensayo S447X realizado para un conjunto de 88 muestras de ADN extraído a partir de sangre entera de personas no emparentadas. Se incluyen réplicas de muestras de ADN de genotipo conocido: 2 Homo S, 2 Het y 3 Homo M, y un blanco sin ADN. Se representan los datos de fluorescencia correspondientes al ciclo 35.

Figura 5B. Vista parcial de la ventana de asignación automática de genotipos que realiza la aplicación informática de la máquina de PCR.

55 Maneras de realización de la invención

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos sin carácter limitativo y cuyo objeto es facilitar su mejor comprensión.

60 Diseño de cebadores y sondas

Para la obtención de las secuencias oligonucleotídicas comprendidas en la presente invención se realizaron los oportunos estudios bioinformáticos para el análisis de parámetros claves, relacionados a continuación:

- 65 • Se deben seleccionar secuencias que impidan la formación de horquillas estables, dímeros o heterodímeros.
- Los cebadores deben diseñarse para amplificar un fragmento pequeño, entre 60 y 150 pb, y así propiciar que la reacción de PCR sea eficaz.

ES 2 340 755 B2

- La temperatura de fusión de los cebadores no debe ser muy alta, recomendándose un rango entre 55 y 60°C. En el caso de las sondas, debe ser varios grados superior para favorecer que hibriden con su secuencia totalmente homologa antes que los cebadores, ya que el proceso de amplificación es tan rápido que de no ser así no se detectarían dichas secuencias.
- 5
- La diferencia de temperatura de fusión entre las dos sondas específicas de cada alelo no debe superar los dos grados.
- 10
- Deben evitarse las repeticiones de más de cuatro nucleótidos, especialmente Gs y Cs. Esto favorece la formación de estructuras secundarias y el aumento de las temperaturas de fusión en oligonucleótidos cortos.
- 15
- La proporción de Gs y Cs de las sondas no debe superar el 80%.
 - Las sondas no pueden tener ninguna G en el extremo 5' ya que esta base dificulta la emisión de fluorescencia. Por el mismo motivo es preferible que las sondas tengan la secuencia de la hebra del ADN molde que contenga la menor proporción de Gs.
- 20
- Debe priorizarse la proximidad entre el cebador y la sonda.
 - Las sondas no pueden ser muy largas, lo que aumentaría la estabilidad de la hibridación con los alelos no específicos y habría más distancia entre el fluoróforo de referencia y la molécula extintora. Se recomienda un máximo de 33 nucleótidos y el nucleótido polimórfico debe situarse lo más centrado posible.

Las secuencias nucleotídicas específicas comprendidas en la presente invención y objeto de una realización preferida (SEQ ID NO 1-4) aparecen en la tabla 1.

Optimización de los ensayos. Desarrollo de un kit de genotipado

Durante el proceso de optimización se comprobó, como se describe a continuación, la especificidad de las secuencias de cebadores y sondas, se seleccionó la temperatura más adecuada de la etapa de hibridación/extensión de la reacción de PCR que tiene lugar en los ensayos, y también la proporción de los cebadores y de las sondas específicas de cada alelo presentes en la mezcla de reacción.

35

TABLA 1

Secuencias nucleotídicas objeto de la invención

40

Polimorfismo	Secuencia (5'→3')	bases	%	Tf *
			G/C	
S447X				
Cebador directo (SEQ ID NO1)	AGGAAAGGCACCTGCGGTA	19	57.9	58.8
Cebador reverso (SEQ ID NO 2)	CAGGATGCCAGTCAGCTT	20	55.0	59.4
Sonda específica del alelo más frecuente (SEQ ID NO 3)	ATGCTCACCAGCCTGACTTCTTATTCA -Fam- -Tamra	27	44.4	63.4
Sonda específica del alelo menos frecuente (SEQ ID NO 4)	ATGCTCACCAGCCTCACCTCTTATTCA- Hex- Tamra	27	44.4	63.4

65

* Temperaturas de fusión teóricas (°C) indicadas por el fabricante

ES 2 340 755 B2

Amplificación del fragmento polimórfico. Especificidad de los cebadores

El primer conjunto de análisis llevado a cabo para la optimización de los ensayos consistió en la realización de una serie de reacciones de PCR, empleando los cebadores directo y reverso y las condiciones de reacción necesarias, con 5 objeto de verificar la obtención de un único producto de amplificación así como el rango de temperaturas en el que es posible obtenerlo.

Las reacciones se realizaron en placas multipicillo, en un volumen de 15 μ L con 50 ng de ADN genómico, además 10 de controles sin ADN, utilizando, diluida a la mitad, la mezcla de reacción iQTM SYBR Green Supermix (SYBR Green I y fluoresceína 20 nM, KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM, pH 8.4, dATP, dCTP, dGTP y dTTP todos 0.4 mM, 50 U/mL de iTaq ADN polimerasa, MgCl₂ 6 mM, y estabilizadores) y los cebadores directo y reverso en una concentración 300 nM.

El protocolo térmico consistió en un paso inicial de desnaturación del ADN y activación del enzima iTaq ADN 15 polimerasa de 5 minutos a 95°C. A continuación, transcurrieron 40 ciclos con dos pasos, uno de desnaturación de 30 segundos a 95°C y otro de 45 segundos de hibridación y extensión en el que se aplicó un gradiente de temperatura.

Los tamaños e intensidad de los fragmentos obtenidos para cada temperatura se visualizaron haciendo migrar una 20 alícuota de la reacción de amplificación en geles de agarosa (figura 2). Los resultados muestran que la amplificación tiene lugar para todas las temperaturas del gradiente ensayadas y obteniéndose un único fragmento del tamaño esperado.

Detección de la señal fluorescente. Especificidad de las sondas

Una vez comprobada la especificidad y eficacia de las parejas de cebadores se realizó un primer ensayo con las 25 sondas fluorogénicas diseñadas para comprobar si era posible detectar la señal fluorescente emitida durante la reacción de PCR.

El primer ensayo con las sondas lineales fluorogénicas se realizó con la misma mezcla de reacción anterior pero 30 sin SYBR green ni fluoresceína, aplicando un protocolo térmico consistente en un paso de 5 minutos a 95°C y 40 ciclos de dos pasos: 30 segundos de desnaturación a 95°C y 45 segundos de hibridación/extensión a la temperatura menos restrictiva del gradiente del experimento anterior, concretamente a 60°C.

Se utilizaron como controles muestras de ADN de sujetos con el genotipo previamente determinado mediante 35 amplificación por PCR y restricción: homocigotos para los alelos más frecuentes (Homo S), heterocigotos (Het) y homocigotos para los alelos menos frecuentes o mutantes (Homo M).

Se prepararon tres mezclas de reacción diferentes: una con cada sonda, Fam 447S (100 nM) o Hex 447X (200 nM) 40 por separado, y otra con las dos juntas: Fam 447S a 100 nM y Hex 447X a 200 nM, en los tres casos con 300 nM de los cebadores directo y reverso. Cada mezcla se ensayó con 50 ng del ADN de cada genotipo por duplicado y con blancos sin ADN.

Los datos de fluorescencia generados por la eliminación del fluoróforo del extremo 5' de las sondas fueron recogidos 45 durante la etapa de hibridación/extensión. El análisis de estos datos se llevó a cabo estudiando las curvas de amplificación (figuras 3A y 3B) y, en el caso de la mezcla que contenía las dos sondas, también mediante la modalidad de discriminación alélica de la máquina de PCR (figuras 3C y 3D).

Se comprobó que ambas sondas generan una señal fluorescente que permite monitorizar la reacción de PCR, tanto 50 cuando se utilizan individualmente [figuras 3A (1) y 3B (2)] como cuando se utilizan las dos a la vez [figuras 3A (3) y 3B (3)].

Optimización de los protocolos térmicos. Temperatura óptima de la etapa de hibridación/extensión

Para optimizar la temperatura de la etapa de hibridación/extensión de los ensayos se realizaron experimentos en 55 gradiente con la mezcla de reacción que contiene las parejas de cebadores y sondas específicas de cada polimorfismo.

Las reacciones de PCR se realizaron empleando 50 ng de muestras de ADN de sujetos con genotipo conocido, por 60 duplicado, y aplicando un protocolo térmico consistente en un paso de 5 minutos a 95°C y 40 ciclos de dos pasos: 30 segundos de desnaturación a 95°C y 45 segundos de hibridación/extensión en gradiente entre 60 y 68°C.

Se realizó el análisis de los datos mediante la modalidad de discriminación alélica de la aplicación informática que controla la máquina de PCR para valorar el comportamiento de las sondas Fam y Hex simultáneamente.

Como se muestra en las figuras 4A y 4B se comprueba que la asignación de genotipos es correcta para las muestras 65 ensayadas a todas las temperaturas del gradiente. Del grupo de temperaturas que permiten la asignación correcta de genotipos para cada polimorfismo se seleccionan como temperaturas de ensayo aquellas en las se produce la máxima

ES 2 340 755 B2

señal fluorescente en ausencia de fluorescencia inespecífica (ruido de fondo) y se mantiene la mejor proporcionalidad en la fluorescencia emitida por cada sonda para los tres genotipos posibles. De esta forma, se establece en 64°C la temperatura de ensayo preferida para el polimorfismo S447X.

5 Optimización de otras variables

Se realizaron diversos ensayos empleando distintas concentraciones de sonda Hex (100, 200 y 300 nM) así como diferentes concentraciones de cebadores (200, 300 y 500 nM) y la separación en dos pasos de la etapa de hibridación y extensión (hibridación a 64°C 30 segundos más extensión a 72°C 30 segundos). En todos los casos fue posible asignar 10 los genotipos de forma correcta. Se decidió escoger la concentración intermedia de sonda Hex (200 nM) pues puede garantizar mejor que la de 100 nM la discriminación de genotipos en muestras de baja concentración de ADN e implica un coste menor del ensayo que la de 300 nM. Finalmente no se incluyó una etapa de extensión que alargaría el tiempo de ensayo.

15 Se realizaron también diversos ensayos empleando distintas cantidades de ADN molde (5, 10, 25 y 50 ng de cada genotipo por duplicado). El análisis de los datos, por grupo de muestras correspondientes a cada cantidad de ADN, mediante la modalidad de discriminación alélica, demostró que es posible distinguir de forma específica los tres genotipos para todas las cantidades de ADN ensayadas.

20 Aplicación en muestras amplias de genotipo desconocido

En un ejemplo de aplicación del procedimiento sobre un conjunto de muestras amplio (88 muestras) se distribuyeron alícuotas de 2.5 µL del ADN genómico, con un rango de concentración en ng/µL de 34,94 ± 12,30, en placas multipocillo. En cada placa, además de las muestras a genotipar, se incluyeron 50 ng de los correspondientes controles 25 de ADN con genotipo conocido (Homo S, Het y Homo M), y un blanco sin ADN. Las condiciones de ensayo fueron las siguientes:

Mezcla de reacción (15 µL de volumen final):

- 30 • ADN molde (muestras homogéneas entre 5 y 50 ng)
- KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8.4; dATP, dCTP, dGTP y dTTP, todos 0.2 mM; 0.375 U de iTaq ADN polimerasa, MgCl₂ 3 mM
- 35 • Cebadores directo y reverso (SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, respectivamente; tabla 1) 300 nM
- Sonda Fam (SEQ ID NO 3, tabla 1) 100 nM
- 40 • Sonda Hex (SEQ ID NO 4, tabla 1) 200 nM

Protocolo térmico:

- 45 • 1 ciclo de desnaturación y activación de la polimerasa de 5 minutos
- 40 ciclos con dos pasos: 30 segundos de desnaturación a 95°C y 45 segundos de hibridación/extensión a 64°C.

50 Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 5A y 5B. En el ejemplo descrito se obtuvieron 68 muestras 447SS (homocigotos para el alelo más frecuente), 19 muestras 447SX (heterocigotas), y una muestra 447XX (homocigota para el alelo menos frecuente). Para todas las muestras de la placa se verificó el genotipado mediante el método convencional de PCR y restricción, siendo la concordancia entre los dos métodos del 100%.

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Conjunto de cebadores para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL **caracterizado** porque al menos dos de los cebadores de dicho conjunto presentan secuencias que comprenden a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO1 y SED ID NO 2.
- 10 2. Conjunto de cebadores para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación anterior **caracterizado** porque dicho conjunto está formado por un primer cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 y por un segundo cebador cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 2.
- 15 3. Conjunto de cebadores para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la secuencia de nucleótidos del primer cebador es idéntica a la SEQ ID NO 1 y la secuencia de nucleótidos del segundo cebador es idéntica a la SEQ ID NO 2.
- 20 4. Conjunto de sondas para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL **caracterizado** porque al menos dos de las sondas de dicho conjunto, una de ellas específica del alelo más frecuente (447S) y la otra específica del alelo menos frecuente (447X), presentan, respectivamente, secuencias que comprenden a las secuencias mostradas en las SEQ ID NO 3 y SED ID NO 4.
- 25 5. Conjunto de sondas para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación anterior **caracterizado** porque dicho conjunto está formado por una primera sonda, específica del alelo más frecuente, cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 3, y por una segunda sonda, específica del alelo menos frecuente, cuya secuencia comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 4.
- 30 6. Conjunto de sondas para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la secuencia de nucleótidos de la primera sonda es idéntica a la SEQ ID NO 3, y la secuencia de nucleótidos de la segunda sonda es idéntica a la SEQ ID NO 4.
- 35 7. Conjunto de sondas para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 **caracterizado** porque tanto la sonda específica del alelo más frecuente como la sonda específica del alelo menos frecuente están marcadas por fluorocromos de referencia distintos en el extremo 5' y en el extremo 3' con una molécula extintora.
- 40 8. Conjunto de sondas para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la sonda específica del alelo más frecuente está marcada por fluorescencia en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína (Fam) y en el extremo 3' con carboxitetrametilrodamina (Tamra); y la sonda específica para el alelo menos frecuente está marcada por fluorescencia en el extremo 5' con hexaclorofluoresceína (Hex) y en el extremo 3' con carboxitetrametilrodamina (Tamra).
- 45 9. Procedimiento para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL **caracterizado** porque comprende:
- 50 a. la amplificación mediante PCR de una muestra de ADN usando un conjunto de cebadores descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y
- 55 b. la detección mediante fluorescencia y genotipado usando un conjunto de sondas descrito según la reivindicación 7.
- 60 10. Procedimiento para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL **caracterizado** porque comprende:
- 65 a. la amplificación mediante PCR de una muestra de ADN usando un conjunto de cebadores descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y
- 70 b. la detección mediante fluorescencia y genotipado usando un conjunto de sondas descrito según la reivindicación 8.
- 75 11. Procedimiento para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación anterior **caracterizado** porque las sondas para la detección mediante fluorescencia y genotipado pueden utilizarse conjuntamente o por separado.

ES 2 340 755 B2

12. Procedimiento para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la detección mediante fluorescencia y genotipado se realiza usando las sondas descritas según la reivindicación 8 de forma que, en la mezcla de reacción, la sonda específica del alelo más frecuente se encuentra a una concentración de 100 nM, y la sonda específica del alelo menos frecuente se encuentra a una concentración en el rango de 100 a 300 nM.
13. Procedimiento para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación anterior **caracterizado** porque, en la mezcla de reacción, la sonda específica del alelo menos frecuente se encuentra a una concentración de 200 nM.
14. Procedimiento para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13 **caracterizado** porque la amplificación mediante PCR comprende un paso inicial de desnaturización del ADN y activación de la polimerasa de 5 minutos a 95°C, y 40 ciclos con dos pasos: uno de desnaturización de 30 segundos a 95°C, y otro de hibridación y extensión.
15. Procedimiento para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación anterior **caracterizado** porque el paso de hibridación y extensión se realiza 45 segundos a una temperatura comprendida en el rango de 60 a 68°C.
16. Procedimiento para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación anterior **caracterizado** porque el paso de hibridación y extensión se realiza a una temperatura de 64°C.
17. Procedimiento para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación 14 **caracterizado** porque el paso de hibridación y extensión se realiza separadamente: hibridación 30 segundos a una temperatura comprendida en el rango de 60 a 68°C, y extensión 30 segundos a 72°C.
18. Procedimiento para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la hibridación se realiza a una temperatura de 64°C.
19. Kit para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL que comprende al menos un conjunto de cebadores descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y al menos una de las sondas del conjunto de sondas descrito según la reivindicación 7.
20. Kit para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL que comprende al menos un conjunto de cebadores descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y al menos una de las sondas del conjunto de sondas descrito según la reivindicación 8.

40

45

50

55

60

65

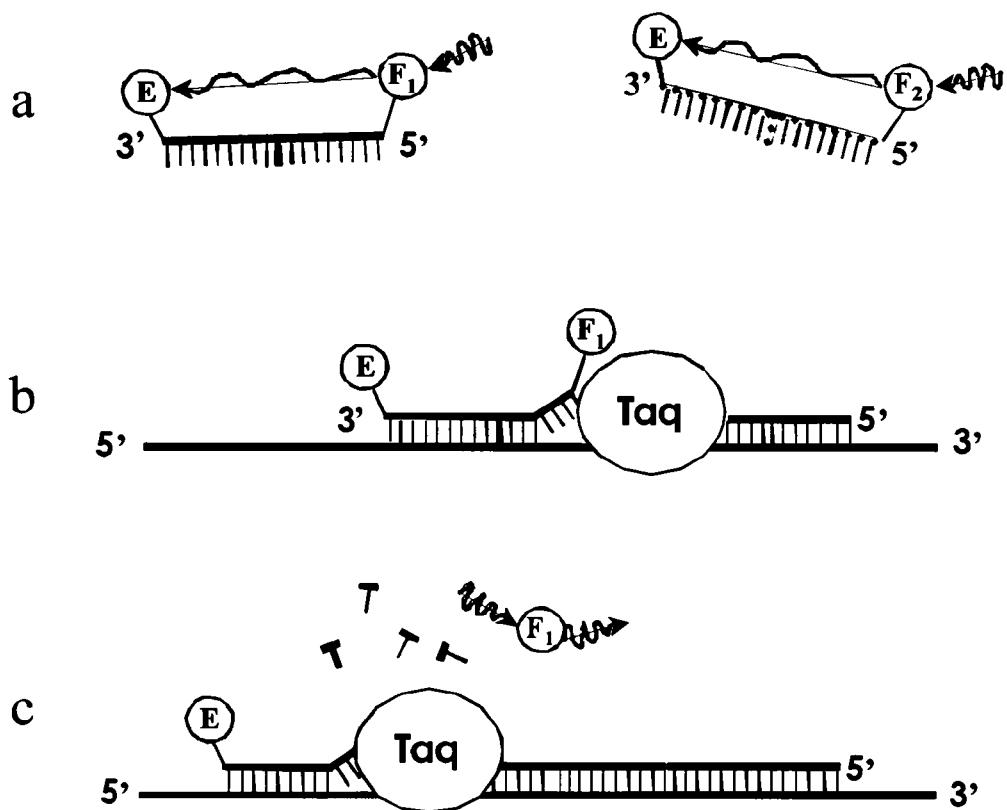


Figura 1

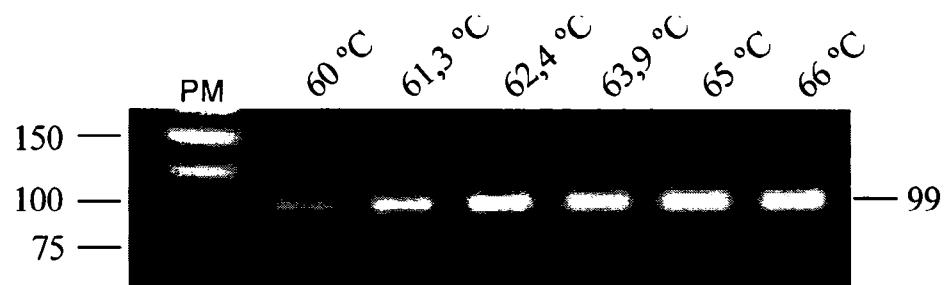


Figura 2

ES 2 340 755 B2

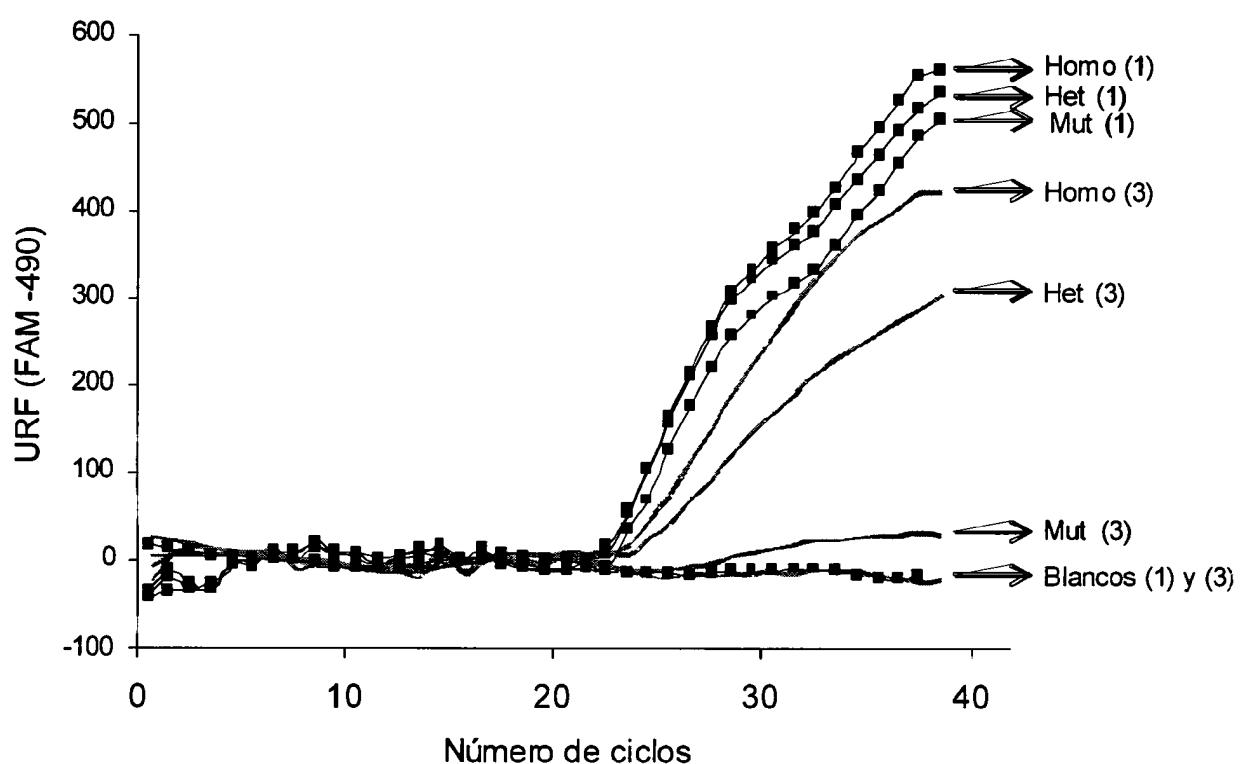


Figura 3A

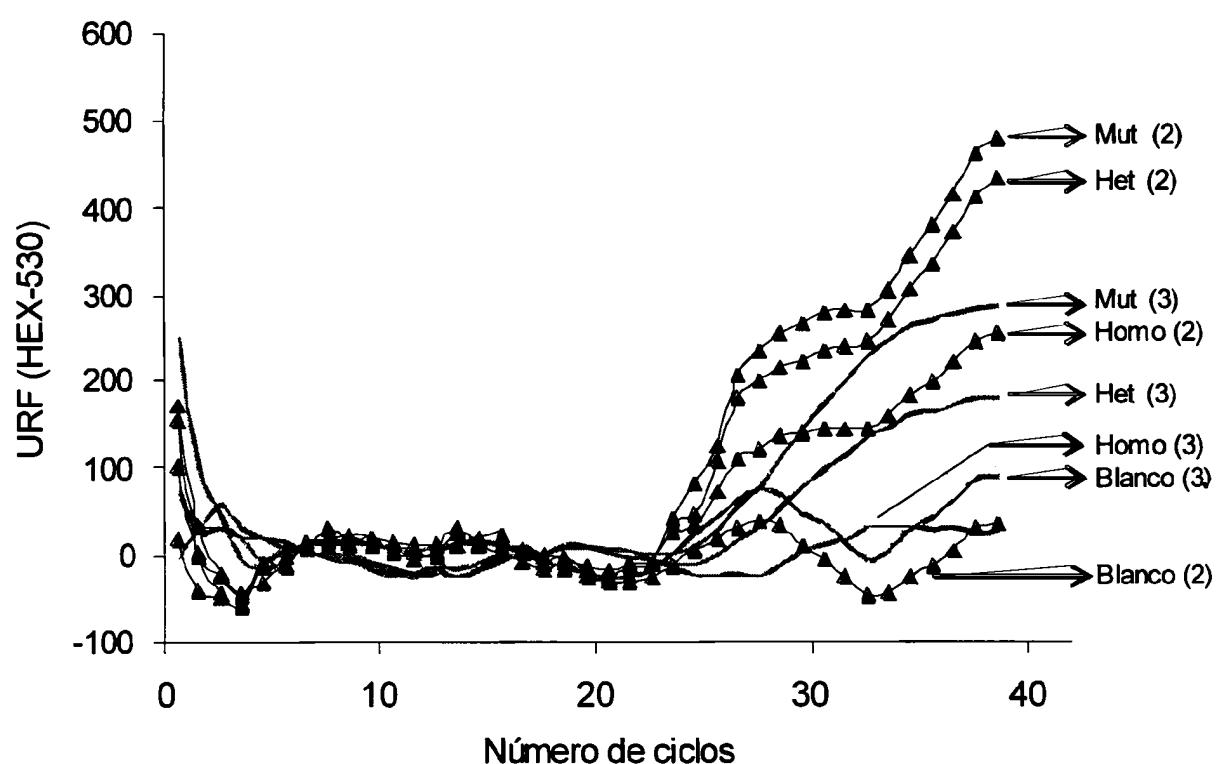


Figura 3B

ES 2 340 755 B2

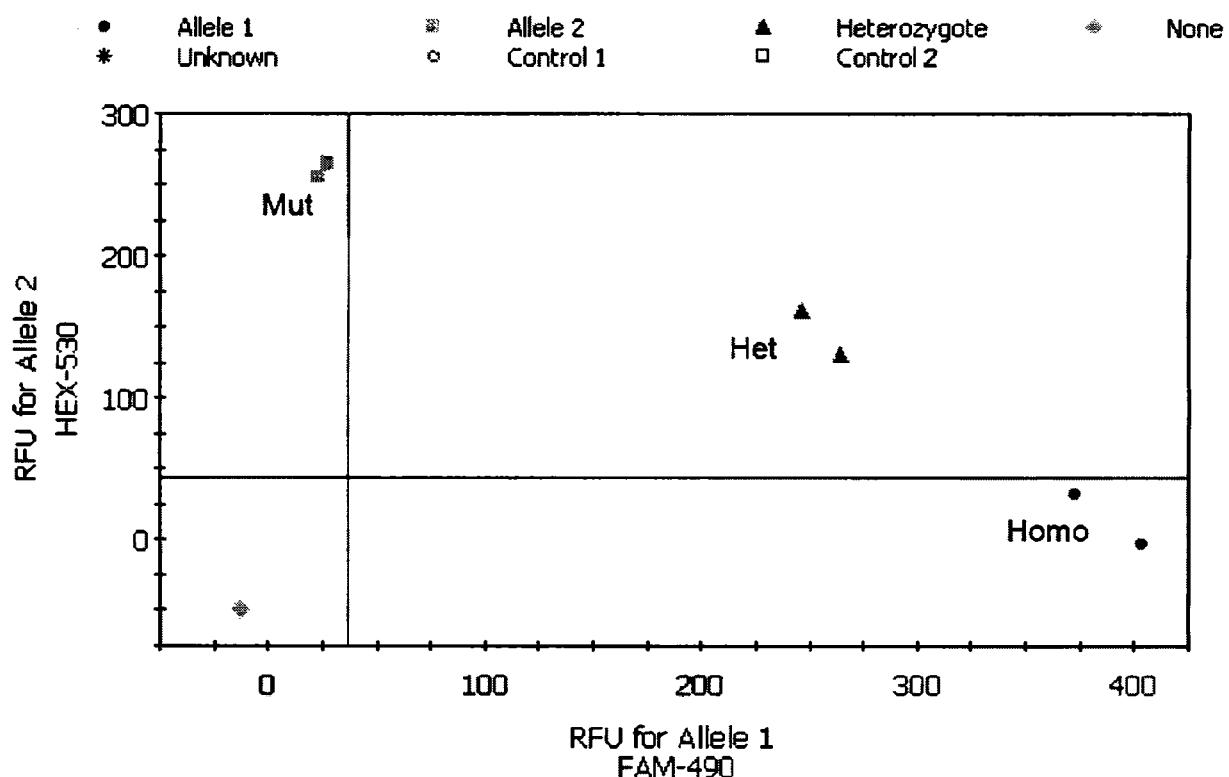


Figura 3C

		RFU 1	Call
H1	homo	372.21	33.63 Allele 1
H2	homo	402.57	-2.05 Allele 1
H3	het	246.36	161.91 Heterozygote
H4	het	264.71	131.50 Heterozygote
H5	mut	27.55	264.33 Allele 2
H6	mut	22.71	254.64 Allele 2
H7	blanco	-13.18	-48.63 None

Figura 3D

ES 2 340 755 B2

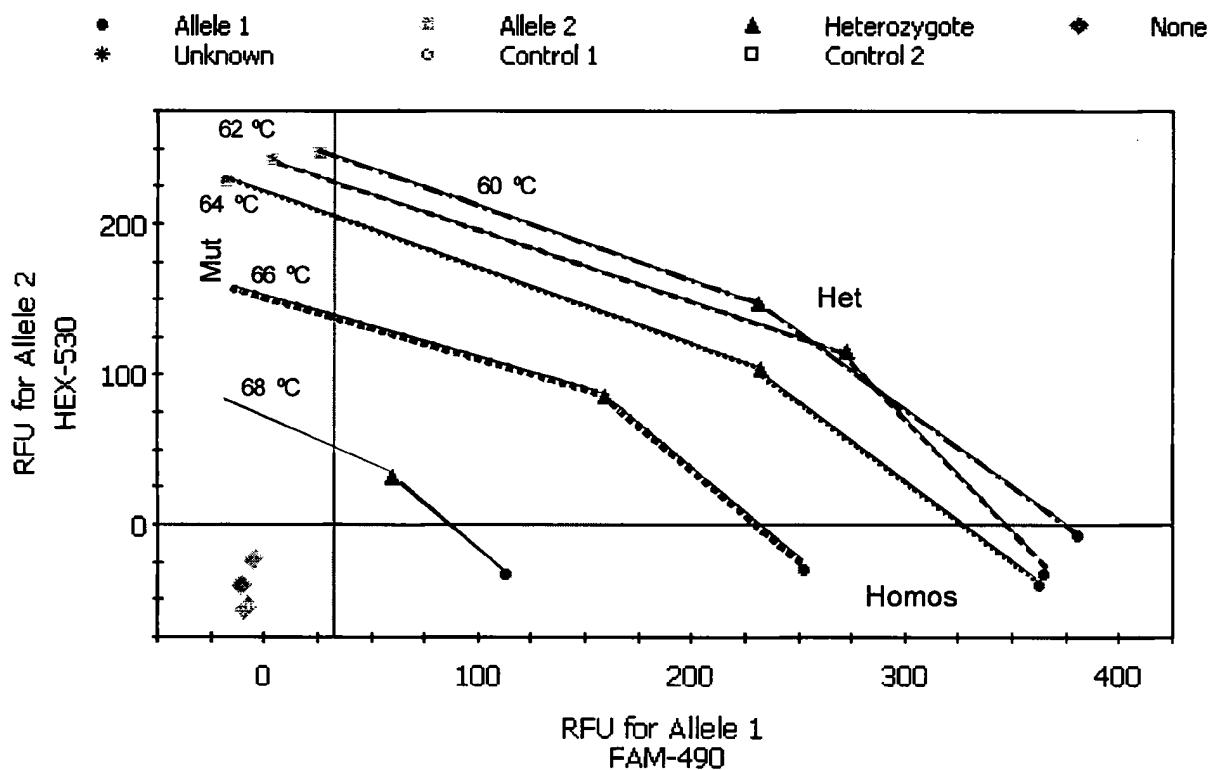


Figura 4A

ID	Call	RFU 1	RFU 2	Call	
C1	Allele 1	Homo	112.65	-33.40	Allele 1
C3	Heterozygote	het	60.32	31.81	Allele 2
C5	Allele 2	mut	-21.13	85.69	Allele 2
C7	None	blanco	-5.47	-23.23	None
D1	Allele 1	homo	252.32	-29.85	Allele 1
D3	Heterozygote	het	159.97	85.75	Heterozygote
D5	Allele 2	mut	-17.58	157.19	Allele 2
D7	None	blanco	-7.92	-53.25	None
E1	Allele 1	homo	362.31	-39.71	Allele 1
E4	Heterozygote	het	232.45	103.34	Heterozygote
E5	Allele 2	mut	-17.00	227.89	Allele 2
E7	None	blanco	-4.55	-23.14	None
F1	Allele 1	homo	364.49	-33.51	Allele 1
F4	Heterozygote	het	272.20	115.35	Heterozygote
F5	Allele 2	mut	3.99	241.24	Allele 2
F7	None	blanco	-10.27	-57.07	None
H2	Allele 1	homo	380.98	-6.69	Allele 1
H3	Heterozygote	het	231.44	146.95	Heterozygote
H5	Allele 2	mut	26.31	246.52	Allele 2
H7	None	blanco	-11.28	-40.16	None

Figura 4B

ES 2 340 755 B2

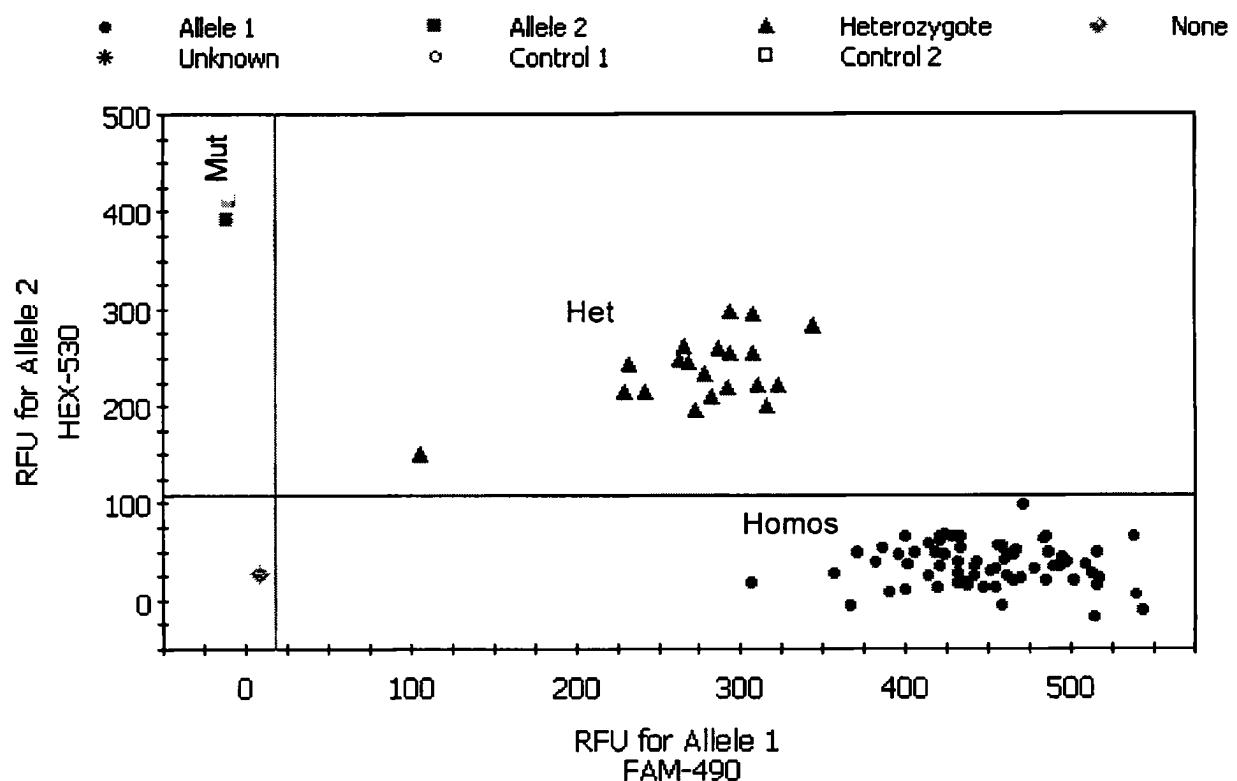


Figura 5A

	RFU F1*	RFU F2*	Call
E11	477.93	31.76	Allele 1
E12	het	292.42	217.98 Heterozygote
F1	229.74	214.59	Heterozygote
F2	513.01	28.82	Allele 1
F3	344.14	281.79	Heterozygote
F4	543.35	-10.38	Allele 1
F5	536.86	64.80	Allele 1
F6	316.14	200.20	Heterozygote
F7	431.14	26.73	Allele 1
F8	278.15	232.15	Heterozygote
F9	442.48	38.61	Allele 1
F10	242.25	214.37	Heterozygote
F11	432.64	19.39	Allele 1
F12	Mut	-10.58	390.61 Allele 2
G1		-13.28	424.06 Allele 2
G2		282.23	208.85 Heterozygote
G3		538.78	6.64 Allele 1
G4		515.88	23.45 Allele 1
G5		323.48	222.40 Heterozygote
G6		441.09	24.51 Allele 1

Figura 5B

ES 2 340 755 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110>	Universidad de Málaga	
5	<120> Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen LPL	
	<130> MJ Ariza <i>et al</i> (1)	
10	<160> 4	
	<170> PatentIn versión 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 19	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<223> Secuencia cebador directo	
25	<400> 1	
	agggaaaggca cctgcggta	19
30	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<223> Secuencia cebador reverso	
	<400> 2	
40	caggatgcc agtcagttt	20
	<210> 3	
45	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<223> Secuencia sonda específica del alelo más frecuente o sonda Fam 447S	
	<400> 3	
55	atgctcacca gcctgacttc ttattca	27
	<210> 4	
	<211> 27	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Secuencia sonda específica del alelo menos frecuente o sonda Hex 447X	
65		

ES 2 340 755 B2

<400> 4

atgctcacca gcctcactc ttattca

27

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(11) ES 2 340 755
(21) Nº de solicitud: 201000006
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 29.12.2009
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BROUSSEAU, M.E. et al., "Polymorphisms in the gene encoding lipoprotein lipase in men with low HDL-C and coronary heart disease: the Veterans Affairs HDL Intervention Trial.", JOURNAL OF LIPID RESEARCH, 2004, Vol. 45, No. 10, páginas 1885-1891, todo el documento, en particular, Métodos: 'DNA analysis'.	1-20
X	KOMURCU-BAYRAK, E. et al., "The S447X variant of lipoprotein lipase gene is associated with metabolic syndrome and lipid levels among Turks.", CLINICA CHIMICA ACTA, 2007, Vol. 383, Nos 1-2, páginas 110-115, todo el documento, en particular, Métodos: 'Determination of the LPL S447X genotypes'.	1-20
X	JENSEN, M.K. et al., "S447X variant of the lipoprotein lipase gene, lipids, and risk of coronary heart disease in 3 prospective cohort studies.", AMERICAN HEART JOURNAL, 2009 Feb, Vol. 157, No. 2, páginas 384-390, todo el documento, en particular, Métodos: 'Laboratory analysis'.	1-20
A	HUMPHRIES, S.E. et al., "Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and postprandial plasma triglycerides: the European Atherosclerosis Research Study (EARS).", ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY, 1998, Vol. 18, No. 4, páginas 526-534, todo el documento.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

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

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

A: refleja el estado de la técnica

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 19.05.2010	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/5
--	---------------------------------	---------------

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 201000006

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, BIOSIS, MEDLINE, EBI

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 201000006

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.05.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones Reivindicaciones	4-20 1-3	SÍ NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones Reivindicaciones	4-20	SÍ 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 ha sido publicada.

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	Brousseau, M.E. et al., J. Lipid Res., (2004), 45(10): 1885-91	2004
D02	Komurcu-Bayrak, E. et al., Clin. Chim. Acta, (2007), 383(1-2): 110-5	2007
D03	Jensen, M.K. et al., Am. Heart J., (2009 Feb), 157(2): 384-90	2009
D04	Humphries, S.E. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., (1998), 18(4): 526-34	1998

Observaciones sobre documentos:

D1 y D2 describen un procedimiento de genotipado del polimorfismo S447X del gen LPL basado en un ensayo TaqMan de discriminación alélica.

D3 describe la aplicación del procedimiento de genotipado del polimorfismo S447X del gen LPL basado en un ensayo TaqMan.

D4 describen un procedimiento de genotipado del polimorfismo S447X del gen LPL basado en una reacción PCR-RFLP.

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).

1.1. Reivindicación 1.

1.1.1. En el documento D1 se describe un procedimiento de genotipado del polimorfismo S447X del gen LPL basado en un ensayo TaqMan de discriminación alélica. Dicho procedimiento comprende una reacción de amplificación PCR en la que las secuencias de los cebadores directo y reverso empleados son idénticas respectivamente a las secuencias SEQ ID No1 y SEQ ID No 2 de la invención (cf. D1: Métodos, 'DNA analysis').

El objeto de la reivindicación independiente 1 consiste en 'un conjunto de cebadores para el genotipado del polimorfismo S447X del gen LPL caracterizado porque las secuencias de al menos dos de los cebadores de dicho conjunto comprenden a SEQ ID No 1 y SEQ ID No 2'. Por consiguiente, los cebadores del procedimiento divulgado en D1 forman parte del ámbito de protección de la reivindicación 1.

Por todo ello, el objeto de las reivindicación independiente 1 y el de las dependientes 2 y 3 no es nuevo sobre la base del documento D1 (Art. 4.1. de la Ley de Patentes).

1.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la misma, definido en las reivindicaciones 1-3, no es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicación 4.

2.1.1. En los documentos D1 y D2 se describe un procedimiento de genotipado del polimorfismo S447X del gen LPL basado en un ensayo TaqMan de discriminación alélica, caracterizado por el uso de una sonda específica para cada uno de los dos alelos analizados. Las sondas empleadas en el procedimiento descrito en D1 se caracterizan por ser una complementaria a la secuencia del alelo silvestre (447S) y la otra a la del alelo mutado (447X) (cf. D1: Métodos, 'DNA analysis'). (cf. D2: Métodos, 'Determination of the LPL S447X genotypes'). Las secuencias de las sondas descritas en D2 están comprendidas íntegramente en las secuencias de las sondas SEQ ID No 3 y SEQ ID No 4 de la invención.

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 4 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevas sondas para el genotipado del polimorfismo S447X del gen LPL.

Hoja adicional

2.1.3. La solución propuesta es el par de sondas SEQ ID No 3 y SEQ ID No 4 de la reivindicación 4. Para valorar adecuadamente la actividad inventiva de esta solución es necesario considerar si, a la fecha de presentación de la solicitud, partiendo del estado de la técnica más próximo, el experto en la materia intentaría aplicar dicha solución con una expectativa razonable de éxito.

Las sondas de identificación del procedimiento descrito en D2 consisten en dos secuencias de 14 nucleótidos, complementarias a las secuencias del alelo silvestre (447S) y del alelo mutado (447X), están incluidas íntegramente en las de las sondas SEQ ID No 3 y SEQ ID No 4 de la invención (cf. D1: Métodos, 'DNA analysis'). Además , en D1 se caracterizan las sondas empleados por la complementariedad de sus secuencias con las de los alelos silvestre y mutado.

Por consiguiente, la única diferencia técnica apreciable entre las sondas de la invención y las de D2 es la diferente longitud de las mismas. Puesto que en la solicitud no se especifica el supuesto efecto sorprendente e inesperado derivado de dicha diferencia que se traduciría en una mejora del procedimiento de genotipado de la invención frente a los descritos en D1 y D2, se considera que la solución propuesta por el objeto de las reivindicación 4 al problema técnico planteado es una alternativa no inventiva a la solución existente en el estado de la técnica que no requeriría de la aplicación de conocimientos técnicos inventivos por parte del experto en la materia. Sobre la base de lo expuesto anteriormente, se concluye que el objeto de la reivindicación independiente 4 y el de las dependientes 5-8 no es inventivo.

2.2. Reivindicación 9.

2.2.1. Se considera que los documentos D1 y D2 constituyen el estado de la técnica más próximo. En ambos documentos se describe un procedimiento de genotipado del polimorfismo S447X del gen LPL basado en un ensayo TaqMan de discriminación alélica.

2.2.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 9 puede ser considerado como la provisión de un nuevo procedimiento de genotipado del polimorfismo S447X del gen LPL.

2.2.3. Sobre la base del estado de la técnica más próximo, representado por D1 y D2, se concluye que la solución propuesta por la reivindicación 9 al problema técnico planteado sería evidente para el experto en la materia. Por esta razón, se concluye que el objeto de la reivindicación independiente 9 y el de las dependientes 10-18 no es inventivo.

2.3. Reivindicación 19.

2.3.1. Se considera que el documento D1 constituye el estado de la técnica más próximo. En D1 se describe un procedimiento de genotipado del polimorfismo -250G/A del gen LIPC basado en un ensayo TaqMan de discriminación alélica.

2.3.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 19 puede ser considerado como la provisión de un nuevo kit de genotipado del polimorfismo S447X del gen LPL.

2.4.3. Sobre la base del estado de la técnica más próximo, representado por D1 y D2, se concluye que la solución propuesta por la solicitud al problema técnico planteado sería evidente para el experto en la materia. Por esta razón, se concluye que el objeto de la reivindicación independiente 19 y el de la dependiente 20 no es inventivo.

2.4. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 4-20, no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.