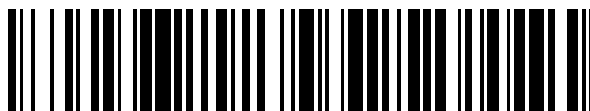


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 974**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2011** **E 11158518 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014** **EP 2385113**

54 Título: **Prueba genética para predisposición genética de hemofilia B en perro crestado rodesiano**

30 Prioridad:

17.03.2010 EP 10156797

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

11.07.2014

73 Titular/es:

LABOKLIN GMBH & CO. KG (100.0%)
Steubenstrasse 4
97688 Bad Kissingen, DE

72 Inventor/es:

MÜLLER, ELISABETH, DR.;
KÜHNLEIN, PETRA, DR. y
KEHL, ALEXANDRA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 475 974 T3

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

DESCRIPCIÓN

Prueba genética para predisposición genética de hemofilia B en perro crestado rodesiano

La invención se refiere a una prueba genética para predisposición genética de hemofilia B en perro crestado rodesiano genotipando el gen del factor IX canino.

5 **Introducción**

La hemofilia B es una afección que afecta el proceso de coagulación de la sangre por falta de factor de coagulación IX biológicamente activo. El factor IX es una glucoproteína plasmática de 56 kDa que se requiere para activación de Factor X en la cascada de coagulación. La hemofilia canina B representa una coagulopatía hereditaria que se da en la naturaleza con un intervalo de gravedad de signos clínicos y actividad coagulante en diferentes variantes de cría. Se ha informado de casos en muchas razas. En perros crestados rodesianos, una forma grave de hemofilia B con signos clínicos pronunciados se describió por primera vez por Lutze et al. (2000). Actualmente es la forma de hemofilia canina más importante en Alemania.

Bottema C D K et al.: "Missense mutations and evolutionary conservation of amino acids: evidence that many of the amino acids in factor IX function as spacer elements", American Journal of Human Genetics, American Society of Human Genetics, Chicago, IL, EE.UU., vol.: 49, n.º: 4, 1 de enero de 1991 (1-1-1991), páginas 820-838, XP009007557, ISSN: 0002-9297. Bottema C D K et al. desvela que en el factor IX humano mutaciones de sentido alterado en residuos específicos en el factor IX (es decir, aquellos conservados en factor IX de ser humano, vaca, perro y ratón pero no en proteasas relacionadas) es seis veces menos probable que causen la enfermedad. La posición 244 del factor IX del perro, corresponde a la posición 207 en factor IX humano y en un residuo G conservado. Dicho documento también se refiere a esta posición en seres humanos como una mutación de sentido alterado comunicada.

GIANNELLI F. et al. "Haemophilia B: Database of point mutations and short additions and deletions-cuarta edición, 1993", Nucleic Acids Research, vol. 21, n.º: 13, 1993, páginas 3075-3087, XP002659955, ISSN: 0305-1048. Giannelli F. et al. desvela varias mutaciones de Factor IX humano que causan hemofilia. Una de ellas es una mutación G->A en el nucleótido, dando como resultado un cambio de aminoácidos en la posición 253, G253->E; esto corresponde a la posición 244 en factor IX canino (de perro), donde se sitúa la misma mutación identificada en la solicitud.

F. Giannelli et al.: "Haemophilia B (sixth edition): a database of point mutations and short additions and deletions", Nucleic Acids Research, vol. 24, n.º: 1, 1 de enero de 1996 (1-1-1996), páginas 103-118, XP55036054, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/24.1.103. F. Giannelli et al. desvela adicionalmente una lista larga de mutaciones en el factor IX humano tres de las cuales están en la posición 207, a saber: G207->R, G207->detención y G207->E.

Se han identificado diferentes mutaciones en el gen que codifica el factor IX en diferentes razas de perro, incluyendo, labrador, lhasa apso, pit bull terrier y airedale terrier dando como resultado los síntomas clínicos típicos para hemofilia B (Evans et al., 1989; Mauser et al., 1996; Brooks et al., 1997; Gu et al., 1999; Tabla 11). Según el mejor conocimiento del autor, el origen genético de hemofilia B en perros crestados rodesianos es desconocido. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar si un defecto genético podría identificarse como causa subyacente de hemofilia en perros crestados rodesianos. Una prueba genética ayudaría a diagnosticar perros enfermos y a identificar genéticamente perros afectados y portadores.

Es el objeto de la presente invención proporcionar una prueba genética para el análisis de un genotipo de un perro, preferentemente un crestado rodesiano con respecto a la hemofilia B.

Este objetivo se logra por las invenciones según se reivindica en las reivindicaciones independientes. Se describen realizaciones ventajosas en las reivindicaciones dependientes.

El problema se resuelve proporcionando un factor IX de acuerdo con la Sec ID N.º: 1 que tiene una mutación puntual, en la que el nucleótido 752 es A en vez de G.

Se ha encontrado que una única mutación puntual en el factor IX canino conduce a una reducción muy fuerte en la actividad del factor y podría asignarse a hemofilia B en el perro, preferentemente en los perros crestados rodesianos.

En la Sec ID N.º: 1 el nucleótido en la posición 752 está mutado de G a A. Esta mutación da como resultado un intercambio de glicina (GGA) a ácido glutámico (GAA) en la posición 244 en el dominio catalítico del factor XI hemofílico (Sec ID N.º: 3; Sec ID N.º: 2 de tipo silvestre).

La invención se refiere por lo tanto a una prueba genética para identificación de al menos una mutación puntual en la Sec ID N.º: 1 del genoma del perro, en el que al menos una mutación puntual conduce a un intercambio de aminoácidos en posición 244 de factor canino IX.

La mutación puntual es una mutación puntual en el nucleótido 752 de la Sec ID N.º: 1, en la que el nucleótido 752 es A en vez de G.

El análisis se puede usar también para detectar mutaciones adicionales en la secuencia Sec ID N.º: 1, por ejemplo

mutaciones que no están relacionadas con hemofilia B.

En una realización de la invención el procedimiento para el análisis de un genotipo de un perro con respecto a hemofilia B comprende la identificación de una mutación puntual en la Sec ID N.º: 1 del genoma del perro, en el que una mutación puntual es una mutación puntual en la que el nucleótido 752 es A en vez de G.

- 5 Mediante esta prueba es posible identificar el genotipo del perro crestado rodesiano con respecto a hemofilia B y especialmente si la perra es una portadora heterocigota de la mutación.

Los procedimientos para detectar una mutación puntual en un genoma se conocen por el experto en la técnica. Los procedimientos posibles son secuenciar la región del genoma, donde la mutación está localizada, con cebadores específicos y comparar después la secuencia con la secuencia de tipo silvestre. La secuenciación se puede hacer
10 directamente con el ADN genómico o por amplificación de la región seleccionada y después secuenciando la secuencia amplificada.

Otros procedimientos posibles comprenden reacción en cadena de la ligasa (LCR), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), espectroscopía de masas (MALDI-TOF), SSCP, DGGE, pirosecuenciación, dHPLC, hibridación de alelos específicos, balizas moleculares, micromatrices, endonucleasa Flap (FEN), PCR en tiempo real,
15 PCR específica de alelos, ensayo de Taqman.

Por ejemplo se puede usar PCR para la amplificación de la región de la mutación puntual, la región de Sec ID N.º: 1, que contiene al menos un de las mutaciones puntuales en la Sec ID N.º: 1 del genoma del perro, en la que el nucleótido 752 es A en vez de G.

En una realización preferida el perro es un crestado rodesiano.

- 20 Otra realización de la invención es un procedimiento para la determinación de la predisposición genética para hemofilia B de un perro mediante el uso del gen del factor IX canino del perro de acuerdo con la Sec ID N.º: 1 que tiene al menos una mutación puntual en la Sec ID N.º: 1 del genoma del perro, en la que al menos una mutación puntual conduce a un intercambio de aminoácidos en posición 244 del factor IX canino.

La mutación puntual es una mutación puntual en el nucleótido 752, en la que este nucleótido es A en vez de G.

- 25 En una realización preferida el perro es un crestado rodesiano.

En otra realización de la invención este procedimiento se pueden usar para la selección de un perro crestado rodesiano para cría.

Incluso si no se recogen referencias de apoyo múltiples, se desvelarán en las reivindicaciones todas las combinaciones razonables de las características.

- 30 Tabla 1. Supervivencia en la bibliografía de mutaciones en gen del factor IX canino en perros con hemofilia;

Tabla 2. Resultados de análisis de secuencia del ADN del factor IX canino y ensayo de genotipado TaqMan para una mutación G-A de sentido alterado en el exón 7 en perros crestados rodesianos con estatus de hemofilia B diferente (Señalamiento, linaje: Portadora confirmada, madres de los números 4 y 5; signos clínicos: Sangrado grave después de intervenciones quirúrgicas menores; Análisis de secuencia: n = normal c = portadora a = afectado) y daños,
35 sangrado espontáneo ocasional (+/-));

Fig. 1. Alineamiento de secuencia aminoácido de dominio proteasa de factor IX canino (CFIX) con factor IX humano (HFIX), tripsina bovina (TRYP), elastasa porcina (ELAS), quimiotripsina bovina (CHYM) y calicreína porcina (KALL);

Fig. 2. Composición de dominios del factor IX: características detectadas de acuerdo con ProSite y SMART. Los dominios clave del factor IX incluyen gamma-carboxiglutamato N-terminal (GLA, véase flecha gris) que contiene dominio (hexágono), el dominio EGF de unión a calcio (pentágono, enlaces disulfuro indicados en gris) y dominio serina proteasa similar a tripsina (elipse, C-terminal). Los tres residuos de sitios activos (H258, D306 y S402) de este dominio se muestran como diamantes pequeños así como los enlaces disulfuro (líneas rectangulares grises). Una lista detallada de las características de este dominio y posiciones se muestra en la Tabla 3;

Figura 3, Figura 3A: Vista interior de la proteína mutada: disulfuros (esferas), sitio activo y aminoácidos mutados (lazo);
45 Comparación de la estructura de factor IX canino mutado y de factor XI de tipo silvestre. Ilustración de los residuos afectados de factor IX desde el interior; Figura 3A es tipo silvestre; Figura 3B es proteína mutada. Forma esférica: puente disulfuro; forma de lazo: aminoácido mutado. La vista incluye el sitio activo; la Figura 3C muestra una Superposición de las Figuras 3A y 3B (regiones gris oscuro: Figura 3A; gris claro: Figura 3B); Nótese como el cambio de residuo 244 condice a un cambio en geometría de la proteína general. Especialmente se afecta el puente disulfuro.
50

Fig. 4. Modelo de los residuos afectados de las moléculas del factor IX desde el exterior; Figura 4A muestra la proteína mutada; Figura 4B el tipo silvestre; Forma esférica: puente disulfuro; forma de lazo: aminoácido mutado; superficie oscura alrededor del círculo blanco: sitio activo; los puentes disulfuro y los sitios activos son claramente visibles. Es

claramente visible, que el aminoácido mutado causa un cambio en la estructura espacial en el puente disulfuro y así también en el sitio activo (círculo blanco; gris oscuro). Ello causa también un cambio en la periferia de las estructuras (esquina derecha inferior, rectángulo blanco) con el efecto de que un enlace adicional está formando un bucle. Ambos pueden verse en la superposición de la Figura 4A y la Figura 4B mostradas en la Figura 4C (gris oscuro: figura 4A; gris claro: figura 4B).

Descripción detallada de la invención

Materiales y procedimientos

Diseño de estudio

El estudio incluyó seis perros macho fenotípicamente afectados, cuatro portadoras sospechadas y 12 perros sanos. De todos los perros con estatus de hemofilia B conocida o sospechada, la actividad del factor IX se midió para verificar el estatus para hemofilia B. De todos estos perros, se aisló ADN a partir de sangre en EDTA y la región codificante de factor IX canino se amplificó y se secuenció. La secuencia de ADN obtenida se comparó con el ADN del factor IX canino de tipo silvestre (número de acceso del banco de genes: NM_001003323). Además, se llevó a cabo un ensayo de genotipado TaqMan específico para la mutación detectada en todos estos perros. Con el fin de demostrar la relevancia funcional de la mutación detectada, se llevaron a cabo estudios de alineamiento de aminoácidos así como los análisis de modelización de estructura. Para investigar, si la mutación es un polimorfismo de solo un nucleótido (SNP) no relacionado con hemofilia B, se llevaron a cabo ensayos de genotipado específicos para la mutación en muestras de ADN de 30 perros crestados rodesianos con estado de hemofilia B indefinido y muestras de otras tres razas de perro (doberman pinscher: n = 20; perro apuntador alemán de pelo de alambre: n = 20; labrador: n = 25).

Animales y material de muestra

Los perros crestados rodesianos con estatus conocido de hemofilia B estuvieron presentes como pacientes o para diagnóstico de hemofilia para la Clínica de Animales Pequeños, Universidad de Medicina Veterinaria de Hannover. Los seis perros crestados rodesianos machos tienen un historial de sangrado conocido y actividades de factor IX sustancialmente reducidas de aproximadamente el 1 % (Tabla 2). Las señales clínicas incluyeron principalmente sangrado grave después de intervenciones quirúrgicas y heridas menores y sangrado espontáneo ocasional. Entre las cuatro perras con estatus de portadora sospechada debido a actividad moderadamente reducida de factor IX (48-69 %), una se confirmó por hermanos de camada afectados. Doce perros crestados rodesianos sanos tuvieron una actividad de factor IX en el intervalo de referencia y no hubo en su historial ningún indicio para un sangrado excesivo.

Recogida de muestras de sangre

Se obtuvo sangre citrada para medidas de actividad de factor IX de una vena cefálica o vena safena usando jeringuillas disponibles estériles (1,1 x 30 mm) y solo se usó presión ligera para elevar la vena. La sangre citrada se recogió en tubos de plástico que contienen una parte (1 ml) de solución de citrato de sodio a 0,11 mol/l por nueve partes (9 ml) de sangre y se mezclan inmediatamente por balanceo cuidadoso. Se obtuvo por centrifugación plasma citrado pobre en plaquetas para medidas de factor IX por centrifugación dos veces durante 10 minutos a 2000 g. El sobrenadante final se recogió después y se almacenó en alícuotas a -70 °C. Además, se recogieron 5 ml de sangre en EDTA para las pruebas genéticas.

Medidas de actividad del factor IX

Las actividades del factor de coagulación IX se midieron automáticamente usando una prueba coagulométrica de rutina, que se optimizó para material de muestra canino y está basado en plasma deficiente de ser humano comercial (Mischke, 2001). Las medidas se llevaron a cabo en un analizador de coagulación AMAX Destiny (Trinity Biotech). Se incubó una mezcla de 20 µl de plasma citrado diluido (diluido 1:40 con tampón de imidazol, Siemens Healthcare Diagnostics), 20 µl de plasma deficiente en factor IX (Siemens Healthcare Diagnostics) y 20 µl de reactivo de activación (reactivo PTT®, Diagnostica Stago) y exactamente después de 3 minutos se añadieron 20 µl de solución de CaCl₂ a 25 mmol/l (Diagnostica Stago) como reactivo de partida. Una curva de calibración se preparó con diluciones diferentes de un plasma acumulado que corresponden al 200 % (1:20), 150 % (1:26,7), 125 % (1:32), 100 % (1:40), 75 % (1:53,3), 50 % (1:80), 25 % (1:160), 10 % (1:400), 5 % (1:800) y 1 % (1:4000) que se usaron en vez de la mezcla diluida. El plasma acumulado canino se preparó mezclando alícuotas de plasma citrado idénticas a partir de 100 perros clínicamente sanos con perfil hematológico y bioquímico irrelevante y su actividad del factor IX se definió como el 100 %. Todos los resultados son valores promedio de medidas por duplicado. El intervalo de referencia para esta prueba es del 75-140 %.

Aislamiento y amplificación de ADN

El ADN genómico se extrajo con 200 µl de sangre entera de EDTA usando un kit comercialmente disponible Kit de Sangre de ADN Biosprint 15 (Qiagen) siguiendo las instrucciones de fabricantes. La secuencia de ADNc de factor IX canina se utilizó para buscar la base de datos del genoma del perro en NCBI y se determinaron los ocho exones del gen del factor IX canino. Nueve pares de cebadores oligonucleotídicos (las secuencias y las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 4) se usaron para amplificar la región codificante y los límites exón-intrón del factor IX canino

usando ADN genómico de los perros. Las secuencias objetivo se amplificaron en mezclas de reacción de 50 µl en condiciones de reacción convencionales que contienen aproximadamente 50 ng de ADN genómico y 0,2 µmol/l de cada cebador.

Secuenciación de ADN

- 5 Los productos de PCR se purificaron antes de secuenciación usando kit de purificación de PCR MinElute (Qiagen). Se hizo la secuenciación por secuenciación cíclica usando Terminadores DyeDeoxy (Applied Biosystems) en un secuenciador automatizado Analizador Genético ABI 3130 (Applied Biosystems). Se llevó a cabo comparación de secuencias entre grupos diferentes de perros crestados rodesianos con estatus de hemofilia B definido usando alineamiento de BLAD ClustalW.

Cribado rápido de la mutación de sentido alterado

- 10 Se diseñó un ensayo de genotipado TaqMan para la mutación usando File Builder Software Versión 3.1 (Applied Biosystems). La región que flanquea el SNP se amplificó en presencia de dos sondas fluorescentes específicas de alelos. Una sonda marcada con tinción VIC, detectó la secuencia del alelo de tipo silvestre y una sonda marcada con tinción FAM detectó la secuencia de alelo mutante. La amplificación de PCR y la discriminación alélica se llevó a cabo usando Rotor-Gene 6000 (Corbett).

Alineamiento de secuencia de aminoácidos y análisis de dominios

- 15 El alineamiento de la estructura primaria del dominio de proteasa del factor IX canino con aquellas del factor IX humano, tripsina bovina, quimiotripsina bovina, elastasa porcina y calicreína porcina estaba basado en la identidad de secuencia y la equivalencia topológica estructural y usó el programa Clustal (Larkin et al., 2007). Los análisis de dominio aplicaron SMART (Letunic et al., 2009) y ProSite (Sigrist et al., 2009), se han descrito previamente los procedimientos detallados (Gaudermann et al., 2006).

Modelización proteica estructural

La modelización proteica estructural aplicó modelos CPH (Lund et al., 2002) para generar un modelo estructural y usó PyMol (DeLano, 2002) para análisis gráficos.

Resultados

Identificación y cribado rápido de la mutación de sentido alterado

- 25 La comparación de la región codificante completa de la secuencia de ADN del factor IX canino y de las uniones exón-intrón de seis perros hemofílicos con deficiencia de factor IX grave (N.ºs: 1-6) con el ADN del factor IX canino de tipo silvestre reveló una mutación de sentido alterado G-A en el nucleótido 752 en el exón 7 del gen del factor IX hemofílico. Esta mutación da como resultado una glicina (GGA) para intercambio de ácido glutámico (GAA) en el dominio catalítico del factor XI hemofílico. Todos los perros afectados eran hemocigotos para la mutación detectada en el exón 7 (Tabla 2). Se encontró que cuatro perras (N.ºs: 7-10), que eran sospechosas de ser portadoras o portadoras demostradas, eran heterocigotas para la mutación G-A y ninguno de los perros crestados rodesianos sanos estaban afectados por la mutación. No se pudo observar ninguna alteración adicional en las secuencias entre perros afectados y el grupo control sano. En todos los casos de perros crestados rodesianos con estatus de hemofilia B definido, el resultado del ensayo de genotipado TaqMan confirmó el estatus de hemofilia B y por lo tanto los resultados de análisis de secuenciación. El análisis con ensayo de genotipado TaqMan no reveló la presencia de la mutación de sentido alterado G-A en el exón 7 del ADN del factor IX canino en 30 perros crestados rodesianos con estatus de hemofilia B indefinido y 65 animales de otras tres razas de perros.

Alineamiento de secuencia de aminoácidos y análisis de dominios

- 40 El dominio catalítico de proteasas de serina similares a tripsina está altamente conservado a lo largo de la evolución. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los miembros de esta familia de proteasas demostró que ciertos aminoácidos son homólogos entre mamíferos. La Fig. 1 mostró el alineamiento de secuencias de aminoácidos de la cadena pesada del factor IX canino con la región correspondiente de varias otras serina proteasas (factor IX humano, tripsina bovina, elastasa porcina, quimiotripsina bovina, calicreína porcina). La Fig. 1 demostró que la mutación en el factor XI canino afecta a uno de los aminoácidos altamente conservados, sustituyendo un residuo cargado negativamente (ácido glutámico) por un aminoácido que no está cargado y que no tiene ninguna cadena lateral (glicina). El análisis de dominios muestra, que la mutación del aminoácido 244 de G a E está localizada en el dominio de tripsina del factor IX (Fig. 2). También está directamente contigua a un puente disulfuro (residuos 243 y 259).

Modelización proteica estructural

- 50 El análisis de estructura muestra que un cambio en la conformación es más probable que ocurra dentro de la parte interna de la proteína localizada cerca del centro activo debido al hecho de que la mutación a ácido glutámico conduce a una cadena lateral larga que necesita más espacio y perturba la estructura incluso más debido a su carga (Figs. 3 y 4). La mutación de residuo 244 conduce a un cambio en la estructura del sitio activo con forma de bolsillo del dominio de tripsina. La proximidad estructural es evidente. La mutación se encuentra directamente adyacente a un puente

disulfuro que estabiliza el sitio activo y causa, debido a la estructura cambiada del aminoácido mutado, un cambio en la geometría del enlace disulfuro y así también en el sitio activo.

Discusión

Los resultados del presente estudio revelan con certidumbre suficiente que la mutación de sentido alterado G-A en el exón 7 es la mutación responsable de hemofilia B grave en perros crestados rodesianos. La presencia de mutación se confirmó por dos técnicas diferentes en 22 perros con estatus de hemofilia B definido. Además, una cohorte de muestras de diferentes razas no mostró la mutación observada. Los últimos resultados sugieren fuertemente que la mutación detectada no puede ser una mutación común y no importante.

El alineamiento de secuencias de aminoácidos y el análisis de modelización estructural de proteínas demuestra que en los perros crestados rodesianos hemofílicos una sustitución aminoacídica no conservada causada por la mutación conduce a un cambio principal en estructura y actividad. En base al análisis estructural de la proteína creada por modelización proteica, la mutación detectada da como resultado más probablemente una reducción de actividad de factor IX, bien de acuerdo con la actividad de factor XI residual baja valorada en la prueba coagulométrica funcional de aproximadamente el 1 % y con los signos clínicos graves correspondientes. Esto respalda adicionalmente la hipótesis de que la mutación detectada es responsable de la hemofilia B en perros crestados rodesianos. Además, un cambio similar en el ADN canino da como resultado una afección clínica similar (Evans et al., 1989; Tabla 1).

Las actividades de IX medidas en los perros hemofílicos fueron más bajas que en la comunicación anterior de un perro crestado rodesiano hemofílico (al 4 %) (Lutze et al., 2000). En base a los criterios clínicos aplicados a seres humanos, la actividad de factor IX residual corresponde a un grado de gravedad de hemofilia grave (< 1 %) o moderadamente grave (1-5 %) (Rizza, 1977) y en general, los perros parecen tener una clínica más grave a un grado definido de reducción de actividades de factores debido a su comportamiento discrepante (Mischke et al., 1996; Lutze et al., 2000). Además, la anomalía estructural principal de la molécula de factor IX está bien de acuerdo con el hecho de que un anticuerpo heterólogo contra el factor IX humano, que reacciona de forma cruzada con la molécula de factor canino normal IX, mostró actividad reducida para unir en el dominio respectivo en la molécula de factor IX defectuosa en perros crestados rodesianos afectados (Lutze et al., 2000). En el estudio citado, el perro crestado rodesiano hemofílico (actividad del factor IX: al 4 %) tuvo una concentración de antígeno del 25 % y una portadora (actividad del factor IX: al 56 %) una concentración de antígeno del 53 % de un plasma de reserva canino. El hecho de que un ELISA con un anticuerpo heterólogo se usase en este estudio puede haber potenciado este fenómeno.

Sin un origen genético conocido, el diagnóstico de portadoras hembra de un defecto es difícil. Aparte de análisis sobre hermanos de camada ello se basa principalmente en mediciones de factores. El presente estudio demuestra que la actividad de factor IX en portadoras confirmada por análisis genéticos (valor máximo 69 %) puede alcanzar el límite inferior del intervalo de referencia (el 75 %). Es por lo tanto probable que en condiciones menos óptimas (por ejemplo, consignación de muestras para el laboratorio, prueba calibrada menos óptimamente), la detección de vehículo en base a medidas de actividad del factor IX es poco fiable. El ensayo de genotipado TaqMan desarrollado específico para la mutación detectada es por lo tanto una herramienta valiosa para detección fiable de vehículos, que es esencial para programas de higiene de cría efectivos. A menos que ninguno de los 30 perros crestados rodesianos se probara positivo para la mutación, la investigación de números mayores de perros de esta raza parece valiosa para definir la prevalencia real de la enfermedad.

Conclusiones

Una mutación G-A de sentido alterado en el exón 7 del factor IX canino se identificó como la mutación probablemente responsable de hemofilia B grave en perros crestados rodesianos. Esta mutación da como resultado una glicina (GGA) para intercambio de ácido glutámico (GAA) en el dominio catalítico del factor XI hemofílico.

Mientras las presentes invenciones se han descrito e ilustrado junto con un número de realizaciones específicas, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden hacer variaciones y modificaciones sin apartarse de los principios de las invenciones como se ilustran en el presente documento, según se reivindica. Se considera a todos los aspectos que las realizaciones descritas son ilustrativas y no restrictivas. El alcance de las invenciones está, por lo tanto, indicado por las reivindicaciones adjuntas, en vez de por la descripción precedente. Todos los cambios que entran dentro del significado y el intervalo de equivalencia de las reivindicaciones están englobados en su alcance.

Referencias citadas

Brooks, M.B., Gu, W., Ray, K., 1997. Complete deletion of the factor IX gene and inhibition of factor IX activity in a Labrador retriever with hemophilia B. *Journal of American Veterinary Medical Association* 211, 1418-1421.

DeLano, W.L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, EE.UU.

Evans, J.P., Brinkhous, K.M., Brayer, G.D., Reisner, H.M., High, K.A., 1989. Canine hemophilia B resulting from a point mutation with unusual consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU.* 86, 10095-10099.

Gaudermann, P., Vogl, I., Zientz, E., Silva, F.J., Moya, A., Gross, R., Dandekar, T., 2006. Analysis of and function

predictions for previously conserved hypothetical or putative proteins in *Blochmannia floridanus*. *BMC Microbiology* 6, 1-10.

Gu, W., Brooks, M., Catalfamo, J., Ray, J., Ray, K., 1999. Two distinct mutations cause severe hemophilia B in two related canine pedigrees. *Thrombosis Haemostasis* 82, 1270-1275.

- 5 Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., López, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W y Clustal X versión 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948).

Letunic, I., Doerks, T., Bork, P., 2009. SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research* 37, D229-D232.

- 10 Lund, O., Nielsen, M., Lundegaard, C., Worning, P., 2002. CPHmodels 2.0: X3M a computer program to extract 3D models. In: *CASP5: Proceedings of the 5th Meeting on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction*. 1-5 de diciembre de 2002, Asilomar, California, EE.UU., Resumen A102.

Lutze, G., Kutschmann, K., Lutze Jr., G., Lichtenfeld, W., 2000. Diagnostic aspects of haemophilia B in dogs. *Tierärztliche Praxis* 28, 369-373 (en alemán).

- 15 Mauser, A.E., Whitlark, J., Whitney, K.M., Lothrop, C.D., 1996. A deletion mutation causes hemophilia B in Lhasa Apso dogs. *Blood* 88; 3451-3455.

Mischke, R., 2001. Optimization of coagulometric tests that incorporate human plasma for determination of coagulation factor activities in canine plasma. *American Journal of Veterinary Research* 62, 625-629.

- 20 Mischke, R., Rivera Ramírez, P.A., Deniz, A., Hänies, R., Otto, K., 1996. Haemophilia A in the dog: symptoms, blood coagulation analysis and therapy. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 109, 279-287.

Rizza, C.R., 1977. Clinical management of haemophilia. *British Medical Bulletin* 33, 225-230.

Sigrist, C.J., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Bulliard, V., Bairoch, A., Hulo, N., 2009. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Research* (Epub).

Tabla 1

Raza	Mutación en gen del factor IX canino	Referencias
Raza mezclada, originalmente cairn terrier y beagle (colonia de Chapel Hill)	Una transición G → A en el nucleótido 1477 en la región que codifica el dominio catalítico (sustitución de ácido glutámico por glicina)	Evans et al. (1989)
Lhasa Apso	La deleción incluye nucleótidos 772-776 y una transición C → T en el nucleótido 777	Mauser et al. (1996)
Labrador	Deleción completa del gen del factor IX	Brooks et al. (1997)
Pit bull terrier	Mutación de deleción grande que va desde la región 5' completa del factor IX prolongándose hasta el exón 6	Gu et al (1999)
Airedale terrier	Inserción de 5 kb en el exón 8, que codifica con el exón 7 la región catalítica del factor XI.	Gu et al. (1999)

25 Tabla 2

Número de perro	Número interno	Señalamiento, linaje ^a ,	Signos clínicos ^b	Actividad del factor IX	Análisis de secuencia ^c	TaqMan ^c
1	P 1549	Macho, 3 meses	-	1	a	a
2	P 1551	Macho, 2 años 5 meses	-	<1	a	a
3	P 1554	Macho, 1 año, 2 meses	-	3	a	a
4	P 1615	Macho, 6 meses (hermano del número 4, hijo del número: 10)	-	1	a	a

Número de perro	Número interno	Señalamiento, linaje ^a ,	Signos clínicos ^b	Actividad del factor IX	Análisis de secuencia ^c	TaqMan ^c
5	P 1621	Macho, 6 meses (hermano del número: 4, hijo del número: 10)	-	1	a	a
6	P 1867	Macho, 2 años, 8 meses	-	1	a	a
7	N 983	Hembra, 2 años, 2 meses	-	48	c	c
8	P 1520	Hembra, 2 años, 7 meses	-	62	c	c
9	P 1552	Hembra, 5 meses	-	69	c	c
10	P 1616	Hembra, 3 años, 2 meses	-	65	c	c
11	N 909	Hembra, 1 año, 7 meses	-	84	n	n
12	N 910	Hembra, 1 año, 6 meses	-	92	n	n
13	N 988	Macho, 3 años, 4 meses	-	104	n	n
14	N 989	Macho, 5 años, 1 mes	-	100	n	n
15	156834	Macho, 7 años, 11 meses	-	154	n	n
16	156854	Hembra, 2 meses	-	109	n	n
17	P 1519	Hembra, 4 meses		77	n	n
18	105960	Macho, 2 años, 2 meses	-	127	n	n
19	Txxx	Macho castrado, 2 años, 6 meses	-	110	n	n
20	P 1943	Macho, 1 año, 1 mes	-	87	n	n
21	158120	Macho castrado, 1 año, 9 meses	-	98	n	n
22	148756	Macho, 7 años, 4 meses	-	150	n	n

^a Portadora confirmada, madre de los números 4 y 5

^b Sangrado grave después de intervenciones quirúrgicas y heridas menores, sangrado espontáneo ocasional.

^c n = normal, c = portadora, a = afectado.

Tabla 3

Características predichas por ProSite para dominio de tripsina:

DISULFID 243 259 Por similitud [condición: C-x*-C]

ACT_SITE 258 Sistema de reguladores de cargas (por similitud) [condición: H]
[grupo: 1]

ACT_SITE 306 Sistema de reguladores de cargas (por similitud) [condición: D]
[grupo: 1]

DISULFID 373 387 Por similitud [condición: C-x*-C]

DISULFID 398 426 Por similitud [condición: C-x*-C]

ACT_SITE 402 Sistema de reguladores de cargas (por similitud) [condición: S]
[grupo: 1]

Característica ausente: DISULFID 342 408 Por similitud [condición no cierta:
C-x*-C]

Tabla 4

Cebador	Sec ID N.º:	Secuencia (5'→3')	Unión	Temperatura de fusión
cFIXg-for-1	4	TGTGTCACTTCCGGCTTCAG	Intrón 1	58 °C
cFIXg-rev-1	5	TCTACAGCTAGAAGACAAGCATAC	Intrón 2	
cFIXg-for-2	6	GATAAATTGGCTTTGGGATTACTTGG	Intrón 2	58 °C
cFIXg-rev-2	7	GTACTTTGCATCTGAAGAACATTACG	Intrón 3	
cFIXg-for-3	8	GCAGTTTTGAAGAAGCACGGG	Exón 2	58 °C
cFIXg-rev-3	9	ACACAGAGAAAAGATACCTAATTCTCA	Intrón 4	
cFIXg-for-4	10	AAGACAGGGGCATCCCATAATC	Intrón 4	58 °C
cFIXg-rev-4	11	CTTCCATTAAGTGTTCTTACCAC	Intrón 5	
cFIXg-for-5	12	CTCCCAAGCCTCTTTCCATG	Intrón 5	58 °C
cFIXg-rev-5	13	CAAACAGGGTTTATGAAAGTATGTGAAC	Intrón 6	
cfix-g-6-for	14	CCGCTTGCCAATGAAAAATA	Intrón 6	58 °C
cfix-g-6-rev	15	CTCTGGGCTCCAGTTTGTAC	Intrón 7	
cFIXg-for-7	16	ACACCCCTGCCTATCAACAG	Intrón 7	58 °C
cFIXg-rev-7	17	GCTCCTCTAGCATTAGCCC	Intrón 8	
cFIXg-for-8	18	CCTTGGCAAATACGTTTATGTGTAAG	Intrón 8	58 °C
cFIXg-rev-8	19	TCATGGAAGCCAGCACAGAAC	Exón 8	
cfix-g-9-for	20	TTCCTCAAATTTGGGTCTGG	Exón 8	58 °C
cfix-g-9-rev	21	CCTAAACGTGTCAACCTTGA	Exón 8	

Listado de secuencias

<110> LABOKLIN GmbH & Co. KG

<120> Prueba genética para predisposición genética de hemofilia B en perro crestado rodesiano

5 <130> Documento W/LAO-006-EP-2

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3080

10 <212> ADN

<213> Canis familiaris

<220>

<221> gen

<222> (1)..(3080)

15 <223> F9

factor de coagulación IX

ID de gen: 404015

<220>

<221> CDS

5 <222> (22)..(1380)

<223> /protein_id="NP_001003323.1" /db_xref="GI:50979168"

/db_xref="GeneID:404015"

<220>

<221> mutación

10 <222> (752)..(752)

<223> G= tipo silvestre; A= hemofilia B

<400> 1

aagcagcgcc tgaataggat c	atg gca gaa gca tcg ggc ctc gtc acc gtc	51
	Met Ala Glu Ala Ser Gly Leu Val Thr Val	10
	1	
tgc ctt tta gga tat cta ctc agt gcc gaa tgt gca gtt ttt ctt gat	99	
Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Ala Val Phe Leu Asp	20	
	15	25
cgt gaa aat gcc acc aaa att ctg agt cgg cca aag agg tat aat tca	147	
Arg Glu Asn Ala Thr Lys Ile Leu Ser Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser	30	
	35	40
ggt aaa ctg gaa gag ttt gtt cga ggg aac ctt gag aga gaa tgt ata	195	
Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Arg Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Ile	45	
	50	55
gaa gaa aag tgc agt ttt gaa gaa gca cgg gaa gtt ttt gaa aac act	243	
Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr	60	
	65	70
gaa aaa acc act gaa ttt tgg aag caa tat gtt gat gga gat caa tgt	291	
Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys	75	
	80	85
gaa tcc aat cca tgt tta aat gac ggt gta tgc aag gat gac att aat	339	
Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Asp Gly Val Cys Lys Asp Asp Ile Asn		

ES 2 475 974 T3

95								100								105	
tcc	tat	gaa	tgt	tgg	tgt	cga	gct	gga	ttt	gaa	gga	aag	aac	tgt	gaa	387	
Ser	Tyr	Glu	Cys 110	Trp	Cys	Arg	Ala	Gly 115	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn 120	Cys	Glu		
tta	gat	gta	aca	tgc	aac	att	aag	aat	ggc	aga	tgc	aag	cag	ttt	tgt	435	
Leu	Asp	Val 125	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys 130	Asn	Gly	Arg	Cys	Lys 135	Gln	Phe	Cys		
aaa	ttg	ggc	ccc	gat	aac	aag	gtg	ggt	tgt	tcc	tgt	act	acg	gga	tac	483	
Lys	Leu 140	Gly	Pro	Asp	Asn	Lys 145	Val	Val	Cys	Ser	Cys 150	Thr	Thr	Gly	Tyr		
caa	ctt	gcg	gaa	gac	caa	agg	tcc	tgt	gaa	cca	gca	gtg	cca	ttt	cca	531	
Gln 155	Leu	Ala	Glu	Asp	Gln 160	Arg	Ser	Cys	Glu	Pro 165	Ala	Val	Pro	Phe	Pro 170		
tgt	gga	aga	gtt	tct	gtc	cct	cac	att	tct	atg	aca	cgc	acc	cgt	gct	579	
Cys	Gly	Arg	Val	Ser 175	Val	Pro	His	Ile	Ser 180	Met	Thr	Arg	Thr	Arg 185	Ala		
gaa	act	ctt	ttt	tcc	aat	atg	gac	tat	gaa	aat	tca	act	gaa	gtg	gaa	627	
Glu	Thr	Leu	Phe 190	Ser	Asn	Met	Asp	Tyr 195	Glu	Asn	Ser	Thr	Glu 200	Val	Glu		
aaa	att	ttg	gat	aac	gtc	acc	caa	ccg	ctt	aac	gac	ttc	act	cga	gtt	675	
Lys	Ile	Leu 205	Asp	Asn	Val	Thr	Gln 210	Pro	Leu	Asn	Asp	Phe 215	Thr	Arg	Val		
gtt	ggt	gga	aaa	gat	gcc	aaa	cca	ggt	caa	ttc	cct	tggt	cag	gtc	ctt	723	
Val	Gly 220	Gly	Lys	Asp	Ala 225	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro 230	Trp	Gln	Val	Leu		
ttg	aat	ggg	aaa	gtt	gat	gca	ttc	tgc	gga	ggt	tcc	atc	atc	aat	gaa	771	
Leu 235	Asn	Gly	Lys	Val	Asp 240	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly 245	Ser	Ile	Ile	Asn	Glu 250		
aaa	tgg	gtg	gta	act	gca	gcc	cac	tgt	att	gag	cct	gat	gtt	aaa	att	819	
Lys	Trp	Val	Val	Thr 255	Ala	Ala	His	Cys	Ile 260	Glu	Pro	Asp	Val	Lys 265	Ile		
acc	ata	gtt	gca	ggt	gag	cat	aac	acc	gag	aag	agg	gaa	cat	aca	gag	867	
Thr	Ile	Val	Ala 270	Gly	Glu	His	Asn	Thr 275	Glu	Lys	Arg	Glu	His 280	Thr	Glu		
cag	aag	cga	aac	gtg	att	cgc	act	att	ctt	cac	cac	agc	tat	aat	gca	915	
Gln	Lys	Arg 285	Asn	Val	Ile	Arg	Thr 290	Ile	Leu	His	His	Ser 295	Tyr	Asn	Ala		
act	att	aat	aag	tac	aac	cat	gac	atc	gcc	ctt	ctg	gaa	ctg	gat	gag	963	
Thr	Ile 300	Asn	Lys	Tyr	Asn	His 305	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu 310	Glu	Leu	Asp	Glu		
ccc	tta	acg	ctg	aac	agc	tat	gta	aca	cct	att	tgc	att	gct	gac	agg	1011	
Pro 315	Leu	Thr	Leu	Asn	Ser 320	Tyr	Val	Thr	Pro	Ile 325	Cys	Ile	Ala	Asp	Arg 330		
gaa	tac	tcg	aac	atc	ttc	ctc	aaa	ttt	ggg	tct	ggc	tat	gtg	agt	ggc	1059	
Glu	Tyr	Ser	Asn	Ile 335	Phe	Leu	Lys	Phe	Gly 340	Ser	Gly	Tyr	Val	Ser 345	Gly		
tgg	ggg	aga	gtc	ttc	aac	aaa	ggg	cga	tgc	gct	tca	att	ctt	caa	tac	1107	
Trp	Gly	Arg	Val 350	Phe	Asn	Lys	Gly	Arg 355	Ser	Ala	Ser	Ile	Leu 360	Gln	Tyr		
ctt	aaa	gtt	cca	ctt	gtt	gac	cga	gcc	acg	tgc	ctt	cgg	tcc	acg	aag	1155	
Leu	Lys	Val 365	Pro	Leu	Val	Asp	Arg 370	Ala	Thr	Cys	Leu	Arg 375	Ser	Thr	Lys		

ttc acc att tat aac aac atg ttc tgt gct ggc ttc cat gag gga ggt Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly 380 385 390	1203
aaa gat tca tgc cag ggc gat agt ggg gga ccc cat gtc acc gaa gta Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val 395 400 405 410	1251
gaa ggc ata agt ttc tta act ggg att att agc tgg ggt gaa gag tgt Glu Gly Ile Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys 415 420 425	1299
gcg atg aaa ggg aag tat gga ata tat acc aag gtg tcc cgg tat gtc Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val 430 435 440	1347
aac tgg att aaa gaa aag acg aag ctc acc taa agaataatgt atttccaagg Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr 445 450	1400
ttgacacgtt tagggtagaa aatggacaag gtcctttact aactaatcac tttttttatc	1460
tcttttagatt tgcactatat acattctctg catactgctt tttctctttc tggggagaaa	1520
tctatctaga attcctatatt tactagacta agtgaattag aaaatgtaat cactacggga	1580
atgtactgtg atgggacttg tgaccactcc cacaggtcta gcccttggca ccattgtgag	1640
gtaggttat tcctccgtcc cgtcagtgtt aagtttctcc actggggcaa ctccctgatt	1700
ctccctcctt ggcagcattc catgttccag acctttctta cttttcccat ggaaagcatc	1760
atcaaaatgt gtagatcta catccaggat atttgatcta gttcagaaca agtctaacac	1820
ctcacttggt aaggaagaac acaggagcaa ctgacagggt gcaactcacc agaaaacact	1880
atttcctttt ctgtatgctt attcctgctt ctttatctct tctgtttcct aatcctgaaa	1940
tcagtgtctc tctttctctt tctctctctc tttttctac agaggtttaa aggagggaag	2000
ggacacatca tgctgtttta ctactgtcca cagttataca tgtctatcaa acccagactt	2060
gctttcagtt tggctcttga cttgcttttc ggagcatagg gatgaagcca ggtgcctgaa	2120
gaccttcagg aaaatttgtc tgaaagagtc atgttactga aatacatggc atcgtggaag	2180
gaatgaccga cccatcagaa tacgtccaat aagcatttgt aattgtgttg tgatagaggt	2240
aactaagaag agtgacatca actcctgcgt ctcaccccc atgtgaaaaa actgtgaact	2300
aaaagagaac agccagtgtg caacgtagaa ctagtagagt ctttaaggaag aattcattgg	2360
tgggtctcca gtactggccg gagctaagga agaagttgcc ctcgaccaa gaacatgagc	2420
accctgtctc ttaaaactagc atgtccccac agtggagaag gatgtactgg tggcttaaag	2480
gcatgagtca ggggtgtctg ggtggctcag tggttgagcc tttggctcag ggcattgatcc	2540
cagcgtcctg ggattgagtc ccgcatcagg cttcctgcag ggggcctgct tctccctctg	2600
cttatgtctc tgcttctctg tgtgtgtgtg tgtgtctctc atgaaaaaaaa taaataaaat	2660
ctttaaaaaa aaaaaaggta tgagtcattc cagtgaacca tctcactccc ctttttctgg	2720
tttcagggttc tctaggcaac cttttgatta taattaggcc ttccatattg aattttctaa	2780
agagttgctg accaacctct gcatgtactt tagtgtgtta ggctggctcc ctttatgaat	2840

taataaactg ttgttctggt tgatactgta gctttttgtg aatgtggctg atgtgaatca 2900
gtcatcccac atgttgttat atatgagact actgacaaaa tcatgtttgg gaccactttg 2960
acctgaccaa gctgctgcct tcacctcacc cccagccagg catttacttt agtccttcaa 3020
atattaagta ccaataaatg tcttttcaaa tttcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3080

<210>2

<211> 452

<212> PRT

5 <213> Canis familiaris

<400> 2

Met Ala Glu Ala Ser Gly Leu Val Thr Val Cys Leu Leu Gly Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Ser Ala Glu Cys Ala Val Phe Leu Asp Arg Glu Asn Ala Thr Lys
20 25 30
Ile Leu Ser Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe
35 40 45
Val Arg Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Ile Glu Glu Lys Cys Ser Phe
50 55 60
Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe
65 70 75 80
Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu
85 90 95
Asn Asp Gly Val Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys
100 105 110
Arg Ala Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn
115 120 125
Ile Lys Asn Gly Arg Cys Lys Gln Phe Cys Lys Leu Gly Pro Asp Asn
130 135 140
Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Thr Gly Tyr Gln Leu Ala Glu Asp Gln
145 150 155 160
Arg Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val
165 170 175
Pro His Ile Ser Met Thr Arg Thr Arg Ala Glu Thr Leu Phe Ser Asn
180 185 190
Met Asp Tyr Glu Asn Ser Thr Glu Val Glu Lys Ile Leu Asp Asn Val
195 200 205
Thr Gln Pro Leu Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Lys Asp Ala

ES 2 475 974 T3

210	215	220
Lys 225	Pro Gly Gln Phe 230	Pro Trp Gln Val Leu 235
Ala Phe Cys Gly 245	Gly Ser Ile Ile Asn 250	Lys Trp Val Val Thr 255
Ala His Cys Ile 260	Glu Pro Asp Val Lys 265	Ile Thr Ile Val Ala 270
His Asn Thr 275	Glu Lys Arg Glu His 280	Thr Glu Gln Lys Arg 285
Arg Thr Ile 290	Leu His His Ser 295	Tyr Asn Ala Thr Ile 300
His Asp Ile 305	Ala Leu Leu Glu 310	Leu Asp Glu Pro 315
Tyr Val Thr 325	Pro Ile Cys Ile Ala 330	Asp Arg Glu Tyr Ser 335
Leu Lys Phe 340	Gly Ser Gly Tyr Val 345	Ser Gly Trp Gly Arg 350
Lys Gly Arg 355	Ser Ala Ser Ile Leu 360	Gln Tyr Leu Lys Val 365
Asp Arg 370	Ala Thr Cys Leu Arg 375	Ser Thr Lys Phe Thr 380
Met Phe Cys 385	Ala Gly Phe His 390	Glu Gly Gly Lys 395
Asp Ser Gly 405	Gly Pro His Val Thr 410	Glu Val Glu Gly Ile 415
Thr Gly Ile 420	Ile Ser Trp Gly Glu 425	Gln Cys Ala Met Lys 430
Gly Ile Tyr 435	Thr Lys Val Ser Arg 440	Tyr Val Asn Trp Ile 445
Thr Lys 450	Leu Thr	

<210>3

<211> 452

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<220>

<221> mutación

<222> (244)..(244)

5 <223> G = tipo silvestre; E = hemofilia B

<400> 3

```

Met Ala Glu Ala Ser Gly Leu Val Thr Val Cys Leu Leu Gly Tyr Leu
 1      5      10      15
Leu Ser Ala Glu Cys Ala Val Phe Leu Asp Arg Glu Asn Ala Thr Lys
      20      25      30
Ile Leu Ser Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe
      35      40      45
Val Arg Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Ile Glu Glu Lys Cys Ser Phe
      50      55      60
Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe
65      70      75      80
Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu
      85      90      95
Asn Asp Gly Val Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys
      100      105      110
Arg Ala Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn
      115      120      125
Ile Lys Asn Gly Arg Cys Lys Gln Phe Cys Lys Leu Gly Pro Asp Asn
      130      135      140
Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Thr Gly Tyr Gln Leu Ala Glu Asp Gln
145      150      155      160
Arg Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val
      165      170      175
Pro His Ile Ser Met Thr Arg Thr Arg Ala Glu Thr Leu Phe Ser Asn
      180      185      190
Met Asp Tyr Glu Asn Ser Thr Glu Val Glu Lys Ile Leu Asp Asn Val
      195      200      205
Thr Gln Pro Leu Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Lys Asp Ala
      210      215      220
Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Asn Gly Lys Val Asp
225      230      235      240
Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Ile Asn Glu Lys Trp Val Val Thr Ala
      245      250      255

```

ES 2 475 974 T3

Ala His Cys Ile Glu Pro Asp Val Lys Ile Thr Ile Val Ala Gly Glu
260 265 270

His Asn Thr Glu Lys Arg Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile
275 280 285

Arg Thr Ile Leu His His Ser Tyr Asn Ala Thr Ile Asn Lys Tyr Asn
290 295 300

His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Thr Leu Asn Ser
305 310 315 320

Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Arg Glu Tyr Ser Asn Ile Phe
325 330 335

Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe Asn
340 345 350

Lys Gly Arg Ser Ala Ser Ile Leu Gln Tyr Leu Lys Val Pro Leu Val
355 360 365

Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn
370 375 380

Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly
385 390 395 400

Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Ile Ser Phe Leu
405 410 415

Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr
420 425 430

Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys
435 440 445

Thr Lys Leu Thr
450

<210>4

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador cFlxg-for-1

<400> 4

tgtgtcactt ccggcttcag 20

10 <210> 5

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador cFIXg-rev-1
 <400> 5
 tctacagcta gaagacaagc atac 24
 <210> 6
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador cFIXg-for-2
 <400> 6
 15 gataaattgg cttgggatt acttgg 26
 <210> 7
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador cFIXg-rev-2
 <400> 7
 gtactttgca tctgaagaac attacg 26
 <210> 8
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador cFIXg-for-3
 30 <400> 8
 gcagttttga agaagcacgg g 21
 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador cFIXg-rev-3

<400> 9
 acacagagaa aagataccta attctca 27
 <210> 10
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador cFIXg-for-4
 <400> 10
 10 aagacagggg catcccataa tc 22
 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador cFlxg-rev-4
 <400> 11
 ctccattaa gtgttcotta ccac 24
 <210> 12
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador cFlxg-for-5
 25 <400> 12
 ctccaagcc tcttccatg 20
 <210> 13
 <211> 28
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador cFIXg-rev-5
 <400> 13
 caaacagggt ttatgaaagt atgtgaac 28
 35 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador cfix-g-6-for
 <400> 14
 5 ccgcttgcca atgaaaaata 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador cfix-g-6-rev
 <400> 15
 ctctgggctc cagttttgac 20
 <210> 16
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador cFIXg-for-7
 20 <400> 16
 acaccctgc ctatcaacag 20
 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador cFIXg-rev-7
 <400> 17
 gctcctctag cattagccc 19
 30 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador cFIXg-for-8
 <400> 18
 ccttgcaaa tacgtttatg tgtaag 26

<210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador cFlxg-rev-8
 <400> 19
 tcatggaagc cagcacagaa c 21
 <210> 20
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador cfix-g-9-for
 15 <400> 20
 ttctctaaat ttgggtctgg 20
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador cfix-g-9-rev
 <400> 21
 cctaaacgtg tcaaccttgg a 21
 25

REIVINDICACIONES

1. El gen de factor IX canino aislado de acuerdo con la Sec ID N.º: 1 que tiene una mutación puntual, en el que el nucleótido 752 es A en vez de G.
- 5 2. Procedimiento de análisis de un genotipo de un perro con respecto de hemofilia B por un ensayo genético para identificación de al menos una mutación puntual en la Sec ID N.º: 1 del genoma del perro, en el que al menos una mutación puntual conduce a un intercambio aminoacídico en la posición 244 de factor IX canino, en el que una mutación puntual es una mutación puntual en nucleótido 752 y en el que la mutación puntual en nucleótido 752 es una mutación puntual, donde el nucleótido 752 es A en vez de G y en el que al menos esta mutación puntual define el genotipo del perro con respecto a hemofilia B.
- 10 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la PCR se usa para amplificación de una región de Sec ID N.º: 1, que contiene la mutación puntual del nucleótido 752.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 o 3, en el que el perro es un crestado rodesiano.
- 15 5. Procedimiento para la determinación de la predisposición genética para hemofilia B de un perro, **caracterizado por** el uso del gen del factor IX canino del perro de acuerdo con la Sec ID N.º: 1 que tiene una mutación puntual en Sec ID N.º: 1 del genoma del perro, en la que al menos una mutación puntual conduce a un intercambio aminoacídico en la posición 244 del factor XI canino y en la que una mutación en un punto es una mutación puntual, en la que el nucleótido 752 es A en vez de G y en la que al menos esta mutación puntual determina la predisposición genética para hemofilia B del perro.
- 20 6. Uso del procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 para la selección de un perro crestado rodesiano para reproducción.

```

216 CPTX --TRVV G GDAKPGQFPWQVLNRYV---DAF CGG SLINERWVVT AAHC LEPDVK---ITIVAGEHNTEKRETEQKR 285
225 HPTX --TRVV G GDAKPGQFPWQVLNRYV---DAF CGG SLINERWVVT AAHC VETGVK---ITVAGEHNTEKRETEQKR 294
22 TYRP --DRIV G GYCAENSVFYQVSLN-----AGYHF CGG SLINDQWVS AAHC Y--QYH-----IQVGLGEYNIDVLEGSEQFT 88
25 ELAS --ARVV G GTEAQRNSWESQISLQVSGSSMAHT CGG TLIRQWVMT AAHC VDRELT-----FTVVGGEHNINQDGTQYV 88
32 CHYM --SRIVN G EDVAFQSWFWQVSLQISS-----GEHF CGG SLISEDWVVT AAHC GVRKQH-----LVVAGVSDQOSEEAGQVL 101
395 KALL ANTRIV G GTSDFLGENFWQVSLQAKL-RAQHNL CGG SLIGHQWVLT AAHC FD-GLSLPDIWRIYGGILNISEITKTEFS 472

286 CPTX NVIRTIIL-HHSY---NATINKYNH D IA L LEIDEPVLNRY V TP-----ICLADREYSNIFLFTSGSYVS G WGRVF N--KGRSASIL 360
295 HPTX NVIRAIIPHHNY---NAINKYNH D IA L LEIDEPVLNRY V TP-----ICLADREYTNIFLFTSGSYVS G WARVF H--KGRSALVL 370
89 TYRP DASKIIR-HPKYSSTWLD-----N D IL L IKLSTRAVINAR V STLLPRA-----CASAGTECLISGNGNTLSSGVNYPDL 158
99 ELAS GVQKIVV-HPY---WNTDEVANGY D IA L LRLGQEVTLNRY V QL-----GVLPRA--GTILANNSPCYIT G WGLTR T--NQQLAQTL 171
102 CHYM RVAEVFE-HPQW-----DLRAVEN D VA L LKLAAPARLSAA V AFVCLPRAD--TSFPTGSLCTVTCWGTGKTRYNADTPDKL 173
473 KALL QVKEIIL-HQNT-----KILESSH D IA L LKLETPMLNYDQKPICLPSRDTNVV--YTMENVTGCGFTEKQ-EIQNIL 543

361 CPTX QYLRVPLVDRATCLR--STKFTIYNN M FCA G FHENGKNS C Q GDSGSGP HVTEVEGISFLT G II S WEG--E C AM-KGKYGIYT 436
371 HPTX QYLRVPLVDRATCLR--STKFTIYNN M FCA G FHENGKNS C Q GDSGSGP HVTEVEGTGFLT G II S WEG--E C AMKGKYGIYT 446
159 TYRP QCLVAPLLSHADGERS--YFGQITNN M ICA G FLEGKDS C Q GDSGSGP VACH-----GQLQ G IV S WGY--G C AQKQKPGVYT 230
172 ELAS QQAYLPTVDYALSSSSYNGSTVKN S M VCA G G-DGVRSQ C Q GDSGSGP LHCLVNGQYAVH G VT S FVSRIG C NV-TRKPTVYT 250
174 CHYM QQATLPILSNADCREP--WGSKITDV M ICA G --ASGISS C M GDSGSGP LVCQKDGAWILA G IV S WGS--E C S-PFLPGVIA 247
544 KALL QKVNIPLVSNNECQKS-YRDHEISXQ M ICA G YKEGKDA C K GESGSGP LVCKYNGINHLV G TT S WEG--G C ARREQPGVYT 620

437 CPTX KVSRYV-NWIKETKLT-. 452
447 HPTX KVSRYV-NWIKETKLT----- 462
231 TYRP KVCNVDWIQETIANS----- 247
251 ELAS KVSAYI-SWINNVIASN----- 266
248 CHYM KVTKEFLEWLELENN----- 263
621 KALL KVEYMDWILEKTQDIDGQSWMK 643

```

Figura 1

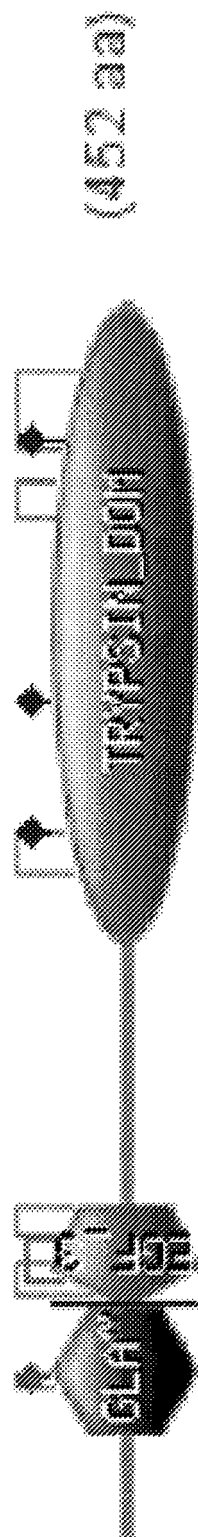


Figura 2

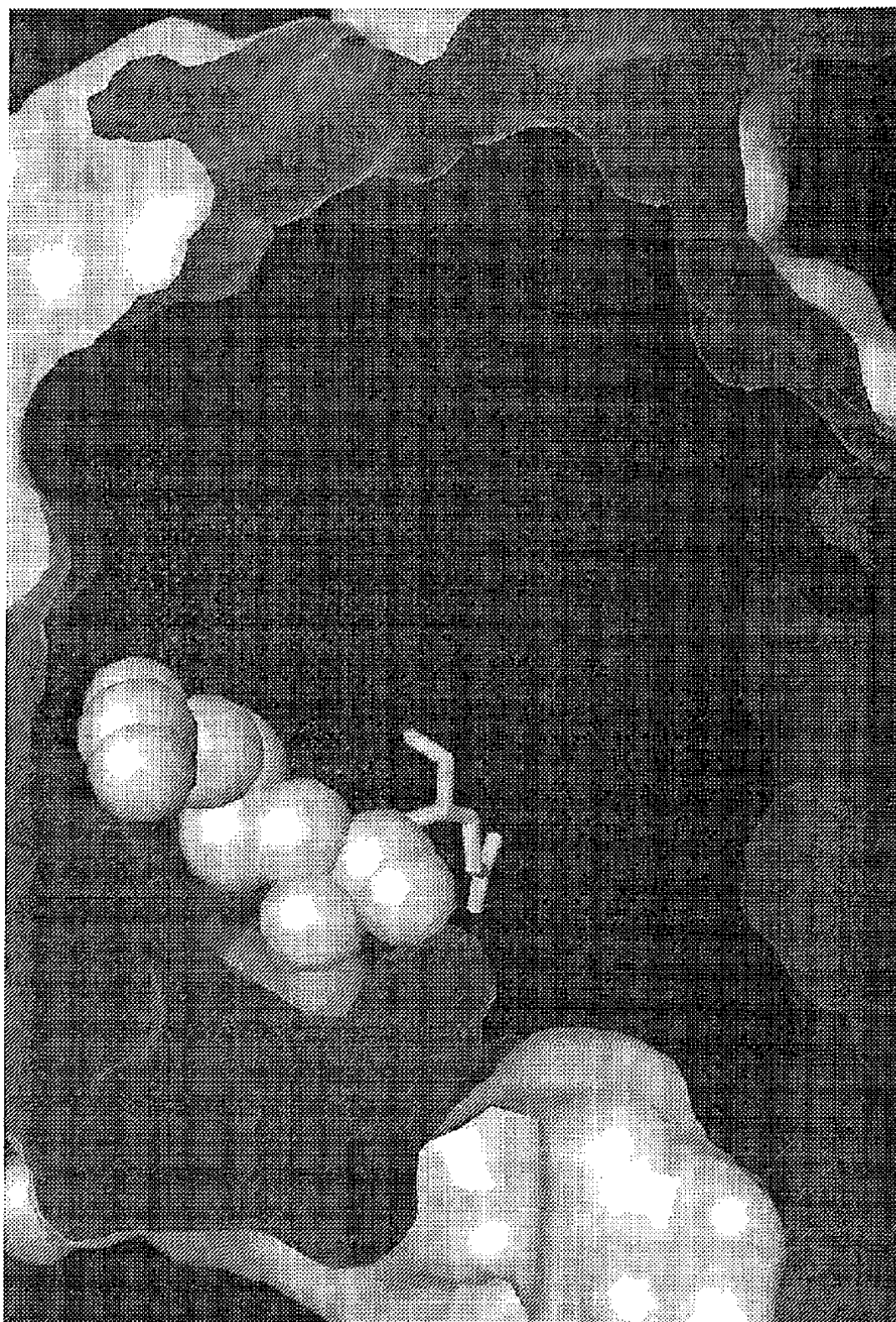


Figura 3A

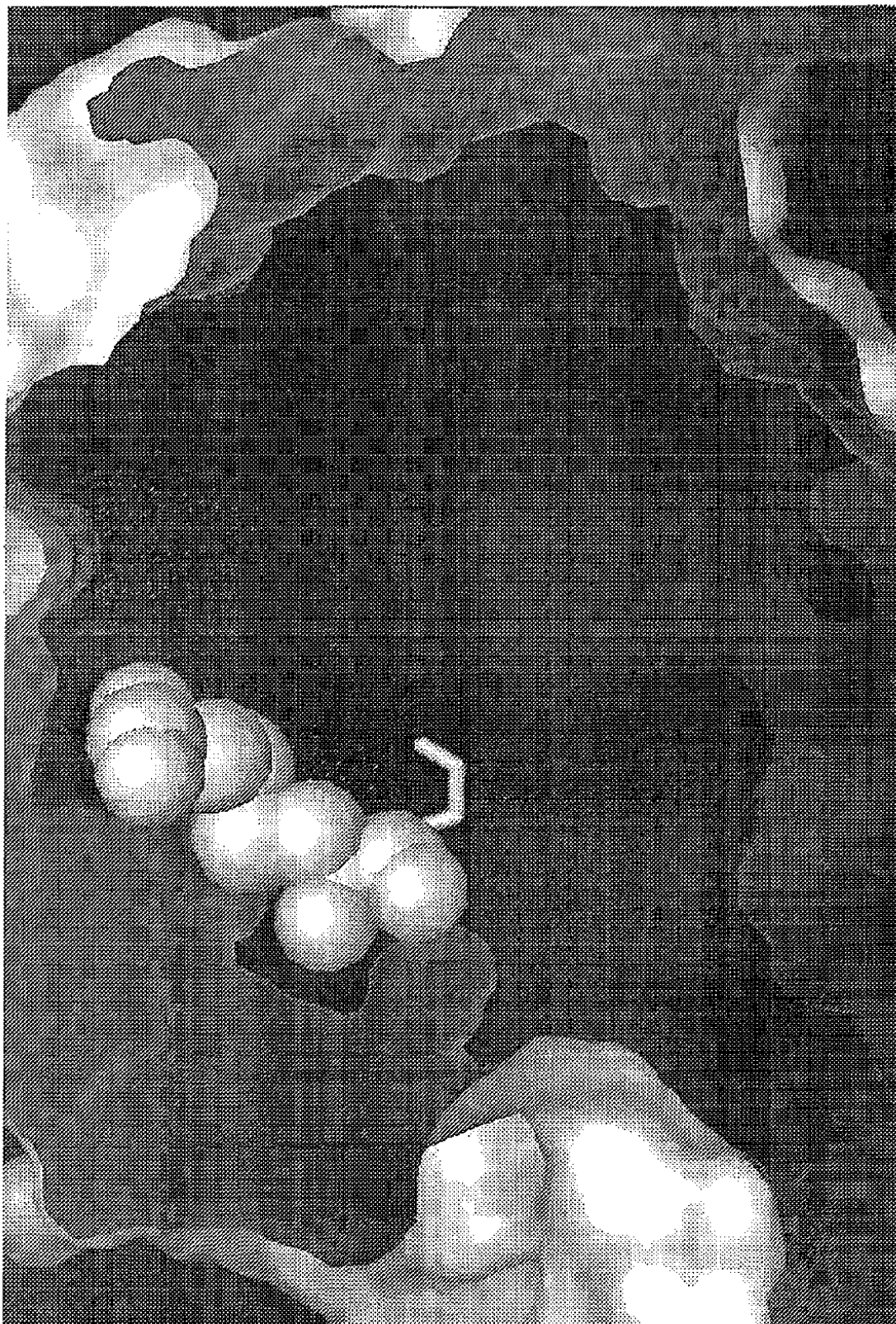


Figura 3B

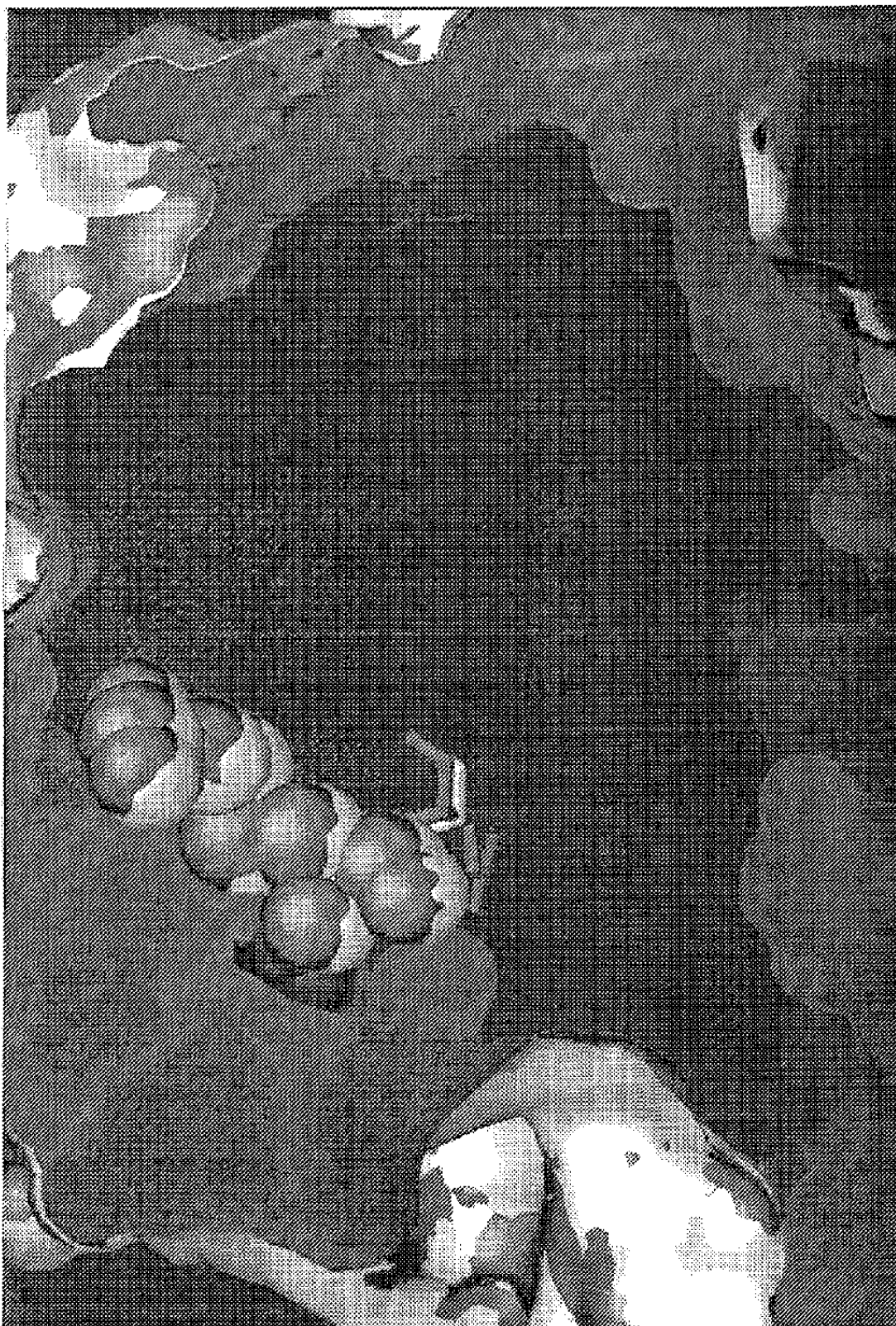


Figura 3C

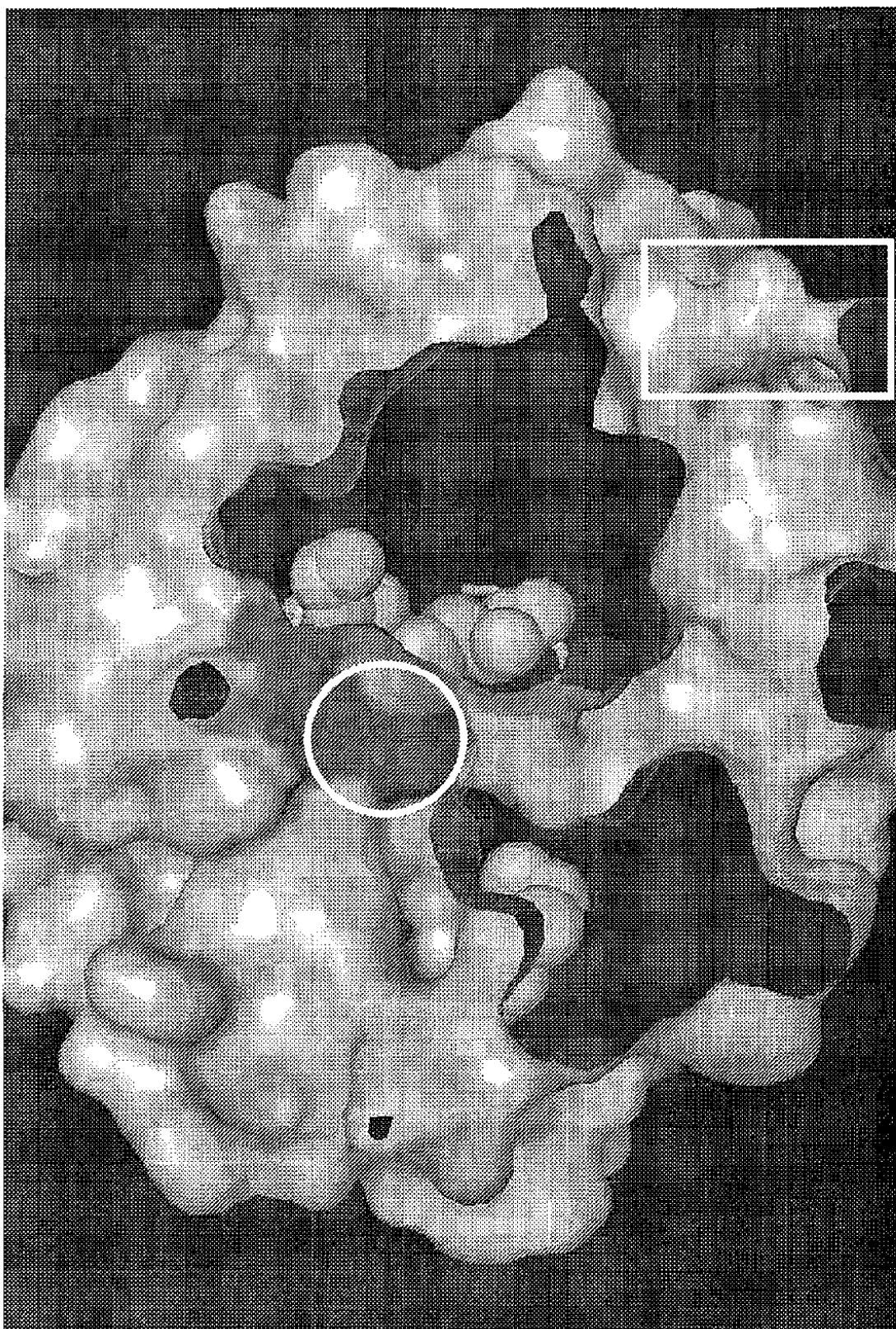


Figura 4A

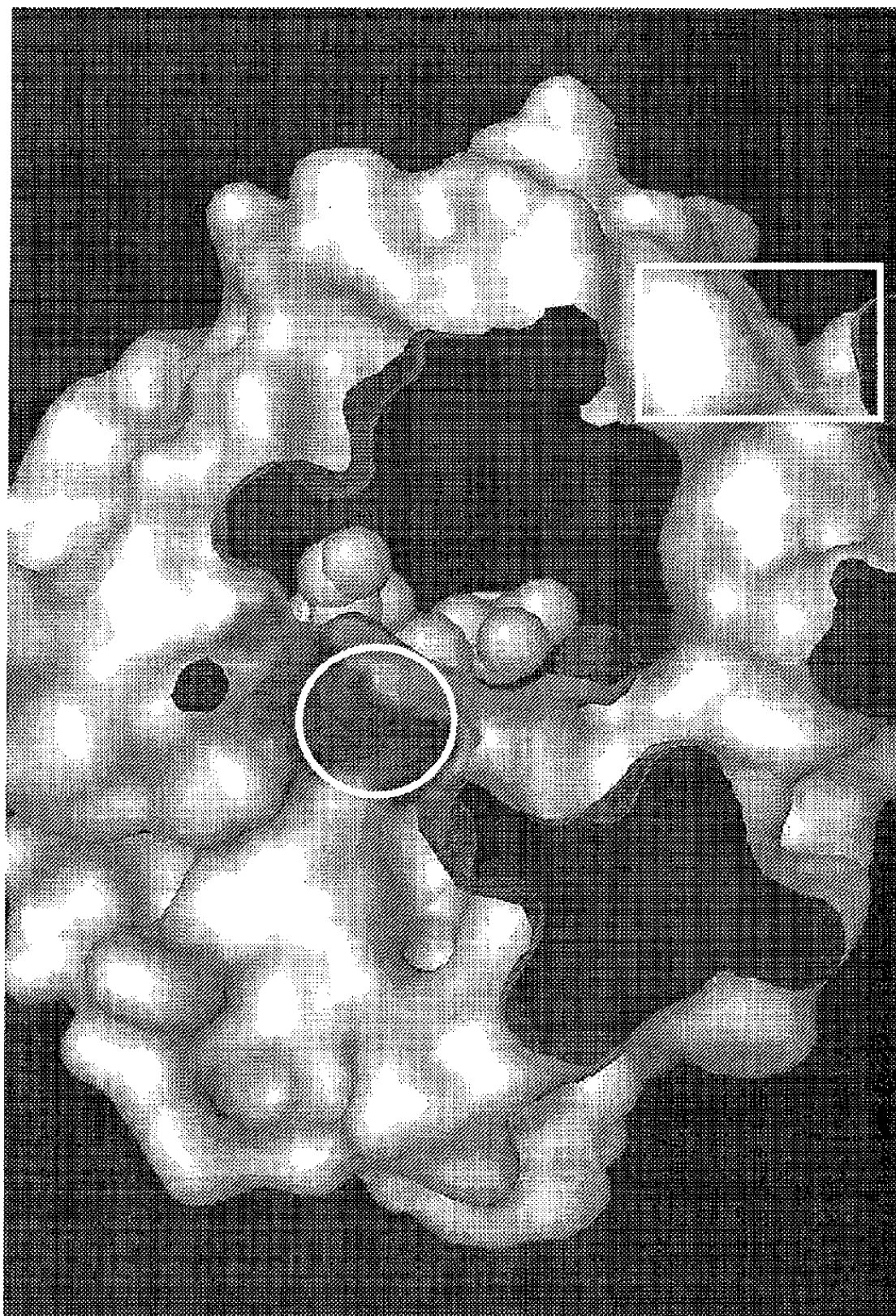


Figura 4B

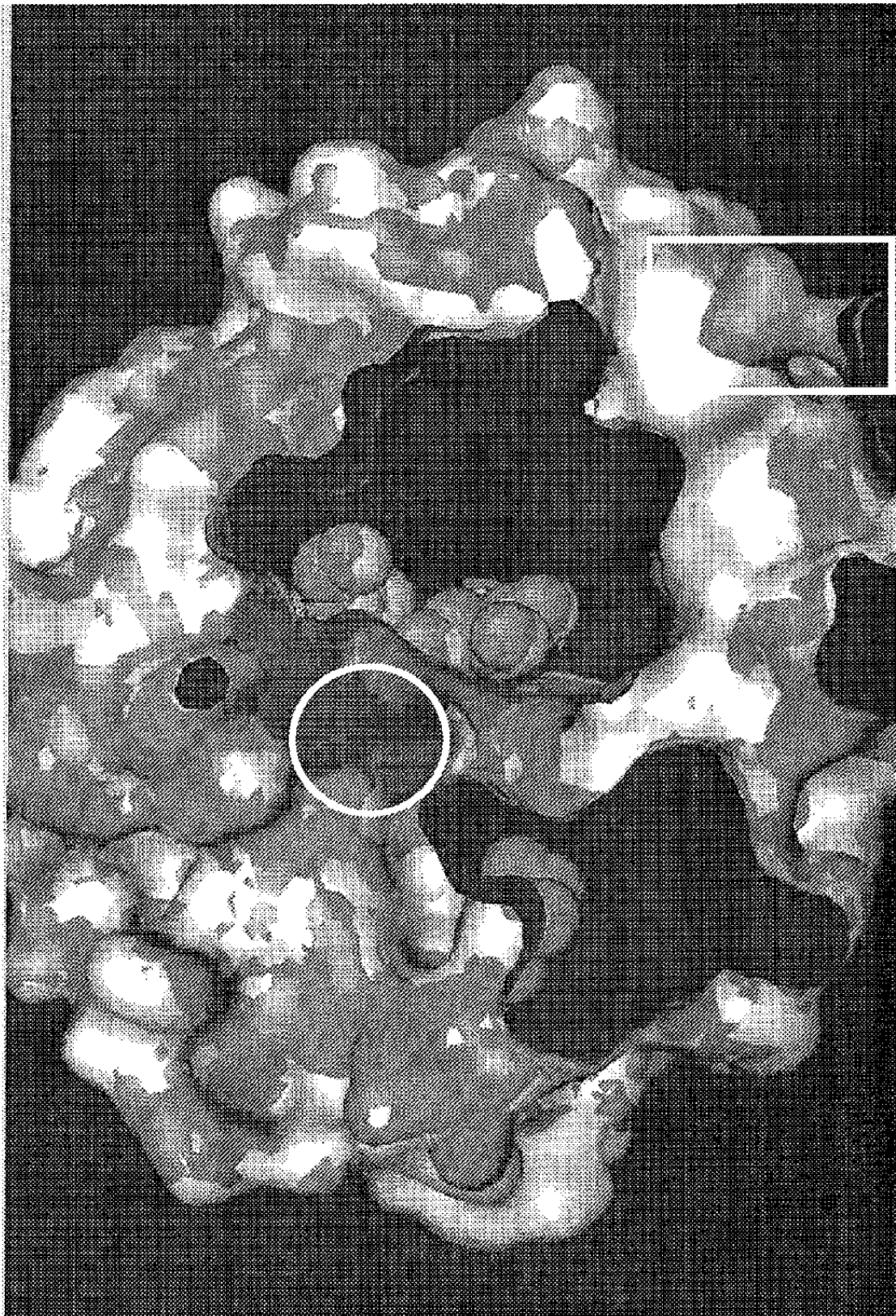


Figura 4C