

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
9 de marzo de 2017 (09.03.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2017/037324 A1**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
*C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2016/070624
- (22) Fecha de presentación internacional:  
5 de septiembre de 2016 (05.09.2016)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P201531271  
4 de septiembre de 2015 (04.09.2015) ES
- (71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES). **FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD** [ES/ES]; Avda. Américo Vespucio, 5, 41092 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias s/n, 41013 Sevilla (ES).
- (72) Inventores: **MÁRQUEZ INFANTE, Celedonio**; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES). **ROODVELDT CATELLANI, Cintia**; Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud, Avda. Américo Vespucio, 5, 41092 Sevilla (ES). **POZO PÉREZ, David**; Universidad de Sevilla, Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias s/n, 41013 Sevilla (ES). **CEJUDO GUILLÉN, Marta**; Universidad de Sevilla, Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias s/n, 41013 Sevilla (ES). **LÓPEZ ENRÍQUEZ, Soledad**; Universidad de Sevilla, Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias s/n, 41013 Sevilla (ES).
- (74) Mandatario: **FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo**; Hoffmann Eitle, Paseo de la Castellana, 140, 3º planta. Edificio LIMA, 28046 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: BIOMARKERS FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS)

(54) Título : BIOMARCADORES PARA LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

(57) Abstract: The invention relates to the use of the gene(s) *MyD88* and/or *TL3* for the diagnosis, prognosis and/or monitoring of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), to a method for obtaining useful data for the diagnosis, prognosis and/or monitoring of ALS, and to a kit or device and uses thereof.

(57) Resumen: La presente invención está dirigida al uso de los gen/es *MyD88* y/o *TL3* para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la ELA, kit o dispositivo y usos.



WO 2017/037324 A1

## Biomarcadores para la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina y la biotecnología, y específicamente se refiere a un método para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Dicho diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento se realiza cuantificando el producto de expresión de los genes *MyD88* y/o *TL3*.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa mortal, caracterizada por la pérdida selectiva y progresiva de las neuronas motoras en la médula espinal, el tallo cerebral, y la corteza motora, causando parálisis muscular y la muerte (Rizzo *et al.*, 2014. *CMLS* 71: 999-1015). Se considera que la ELA surge esporádicamente en el 90% de los casos, mientras que el 10% restante tiene origen genético, donde los casos más frecuentes son mutaciones en el gen de la enzima superóxido dismutasa-1 (SOD1) (Hovden *et al.*, 2013. *Acta Neurol. Scand.* 128: 287-296). A pesar de que no se han dilucidado las causas exactas y los mecanismos subyacentes de la enfermedad, los datos acumulados apoyan claramente la participación activa del sistema inmunológico en la patogenia de la enfermedad, donde la activación de la microglía y los astrocitos, vinculados a la neuroinflamación, se aceptan como un aspecto central del proceso patológico (Hovden *et al.*, 2013. *Acta Neurol. Scand.* 128: 287-296).

En los últimos años, se ha demostrado que la infiltración de monocitos/macrófagos y subpoblaciones de linfocitos T de la periferia también juega un papel relevante en la reacción neuroinflamatoria -que podría contribuir alternativamente a la pérdida de células neuronales o la neuroprotección- como consecuencia de su interacción con astrocitos y microglía (Zhao *et al.*, 2013. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8: 888-899; Chiu *et al.*, 2008. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 17913-17918). De hecho, varias evidencias han demostrado la presencia de monocitos/macrófagos infiltrados en la médula espinal de modelos de ratones con ELA (Zhao *et al.*, 2013. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8: 888-899; Chiu *et al.*, 2008. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 17913-17918), y han descrito un aumento de los niveles de células T CD4+ y CD8+ en la médula espinal de ratones mSOD1 y en el parénquima cerebral de pacientes con ELA (Glass *et al.*, 2010. *Cell* 140: 918-934). La infiltración de células inmunes periféricas podría contribuir a la inmunoprotección, la inflamación y, en última instancia, a la neurodegeneración, dependiendo del curso de la enfermedad (Zhao *et al.*, 2013. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8: 888-899; Chiu *et al.*, 2008. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 17913-

17918). Sorprendentemente, se ha demostrado que el reclutamiento del SNC de los linfocitos T CD8 específicos para una infección vírica es capaz de desencadenar neuropatogénesis en ratones (Matullo *et al.*, 2011. *PLoS pathogens* 7: e1002462.). Esto podría ser muy relevante, ya que los estudios serológicos sugieren una posible participación de agentes virales en la etiología de la ELA y de otros procesos neurodegenerativos (Cermelli *et al.*, 2003. *European journal of epidemiology* 18: 123-127).

Los receptores tipo Toll (TLRs) están considerados como el sistema receptor de patógeno arquetípico o de detección de daños a través de reconocimiento de patrones, que alertan al sistema inmune de la presencia de infecciones microbianas, iniciando procesos inflamatorios. Los TLRs se expresan por los monocitos, DC, células NK, y otras células del sistema inmunológico innato, así como en linfocitos B y T (Medzhitov, 2001. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135-145; Takeda *et al.*, 2003. *Annual review of immunology* 21: 335-376). Además, la mayoría de los tipos de células inmunes de la sangre son moduladas por la estimulación mediada por TLR. Células inmunocompetentes innatas, como los monocitos/macrófagos, y también de los miembros del sistema inmunológico adaptativo, en particular los linfocitos T (Reynolds y Dong, 2013. *Trends in immunology* 34: 511-519; Miyake y Kaisho, 2014. *Current opinion in immunology* 30C: 85-90; Oberg *et al.*, 2011. *European journal of cell biology* 90: 582-592). Sin embargo, todavía queda por resolver la cuestión de si las células inmunocompetentes circulantes responden de manera diferencial a la estimulación mediada por TLR en un ambiente "sano" en comparación con un contexto relacionado con la ELA. En este trabajo, se ha comparado la respuesta a la estimulación mediada por TLR en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con ELA y sujetos sanos, así como entre ratones SOD1 transgénicos frente a los animales control.

Actualmente no existe cura o un buen tratamiento para la ELA, pero la detección temprana y el manejo de la enfermedad conducen a la reducción del coste del tratamiento y a una mayor calidad de vida. Además, pueden producirse largas demoras entre la aparición de los síntomas y el establecimiento de un diagnóstico formal, puesto que en las primeras etapas puede ser difícil discernir la ELA de otras enfermedades de la neurona motora (*motor neuron diseases* o MNDS). Hay por tanto una necesidad crítica de biomarcadores no invasivos, de bajo coste y confiables.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un **primer aspecto** de la invención, se refiere al uso de los genes *MyD88* y/o *TL3*, para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la ELA.

5 Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

a) cuantificar el producto de expresión del gen *MyD88*, del gen *TL3*, o de ambos simultáneamente en la muestra del paso a),

10 En una realización preferida, el primer método de la invención además comprende:

b) comparar las cantidades obtenidas el paso a) con una cantidad de referencia, donde la cantidad de referencia para cada gen son los niveles medios de producto de expresión de dichos genes en individuos sanos.

15 Así pues, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada del paso a) es sangre, y aún más preferiblemente células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a otro método de diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la ELA, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a)-(b) del primer método de la invención, y además comprende:

20 c) asignar al individuo al grupo de individuos que presentan ELA, cuando se detectan niveles de producto de expresión del gen *MyD88* al menos un 20% mayor, preferiblemente un 30% mayor, y aún más preferiblemente un 50% veces mayor a la cantidad de referencia para dicho gen, y

25 d) asignar al individuo al grupo de individuos que presentan ELA, cuando se detectan niveles de producto de expresión del gen *TL3* al menos un 20% mayor, preferiblemente un 30% mayor, y aún más preferiblemente un 50% mayor a la cantidad de referencia para dicho gen.

30 Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo, kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para cuantificar el producto de expresión del gen *MyD88* y/o del gen *TL3*.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión del gen *MyD88* y/o del gen *TL3*, y donde:

5 - los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de  
10 las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 ó SEQ ID NO: 13 (*MyD88*) y/o la SEQ ID NO: 15 (*TL3*);

15 - las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 ó SEQ ID NO: 13 (*MyD88*) y/o la SEQ  
20 ID NO: 15 (*TL3*);

- los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a una región formada por cualquiera de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 ó SEQ ID NO: 14 (*MyD88*) y/o SEQ ID NO: 16 (*TL3*).

25 En otra realización preferida, el kit o dispositivo de la invención comprende los primers o cebadores de secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y/o SEQ ID NO: 20, recogidas en la tabla 1, o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los cebadores, sondas o anticuerpos están modificados.

30 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención además comprende todos aquellos elementos necesarios para llevar a cabo un procedimiento PCR.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere al kit o dispositivo de la invención, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la ELA.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1.** Medidas de la liberación de citoquinas a partir de la estimulación de TLR en PBMC aisladas de pacientes con ELA, en diferentes etapas de progresión de la enfermedad, y de controles sanos. Se calcularon los factores de cambio en relación con la respuesta basal. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon aplicando el test no paramétrico de U de Mann-Whitney para dos  
10 grupos independientes ( $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,005$ ;  $***p \leq 0,001$ ), en relación al control no estimulado con el ligando TLR. (#) Denota un resultado que es significativamente diferente entre los diferentes grupos de pacientes/etapas de la progresión de la enfermedad.

**Figura 2.** Medidas de la liberación de citoquinas a partir de la estimulación de TLR de esplenocitos aislados de ratones SOD1\*G93A y *wild type*. Se calcularon los factores de  
15 cambio en relación con la respuesta basal. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon aplicando el test no paramétrico de U de Mann-Whitney para dos grupos independientes ( $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,005$ ;  $***p \leq 0,001$ ), comparando los ratones SOD1\*G93A y *wild type* de la misma edad. El estudio se realizó en tres puntos de edad usando ratones B6SJL-Tg (SOD\*G93A) 1Gur/J:  
20 presintomático (8 semanas de edad), sintomáticos (12 semanas de edad) y en fase o etapa avanzada (16 semanas de edad).

**Figura 3.** Niveles de expresión de los genes TLR 2, 3, 4 y MyD88. El estudio se realizó en tres momentos o puntos de edad usando ratones B6SJL-Tg (SOD\*G93A) 1Gur/J:  
25 presintomático (8 semanas de edad), sintomáticos (12 semanas de edad) y en la fase o etapa avanzada (16 semanas de edad). Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon aplicando el test no paramétrico de U de Mann-Whitney para dos grupos independientes ( $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,005$ ;  $***p \leq 0,001$ ), comparando los ratones SOD1\*G93A y *wild type* de la misma edad. (#) Denota un resultado que es significativamente diferente entre las diferentes etapas de la progresión  
30 de la enfermedad en ratones SOD\*G93A.

**Figura 4.** Niveles de expresión de los genes TLR 2, 3 y MyD88. El estudio se realizó utilizando los pacientes con ELA, en diferentes etapas de progresión de la enfermedad, y en controles sanos. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias

estadísticamente significativas se calcularon aplicando el test no paramétrico de U de Mann-Whitney para dos grupos independientes (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ), entre diferentes grupos de pacientes.

**Figura 5.** Esquema que resume las características de la respuesta a TLRs y la expresión de *TLR3* y *MyD88* en modelos animales y en pacientes de ELA a lo largo del desarrollo de la enfermedad.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han encontrado que los genes *MyD88* y *TL3* pueden emplearse como biomarcadores en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención, se refiere al uso de los genes *MyD88* y/o *TL3*, para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la ELA.

Los genes *MyD88* y *TL3* pueden usarse simultáneamente o por separado para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la ELA.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la ELA, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo,

b) cuantificar el producto de expresión del gen *MyD88*, del gen *TL3*, o de ambos simultáneamente en la muestra del paso a),

En una realización preferida, el primer método de la invención además comprende:

c) comparar las cantidades obtenidas el paso b) con una cantidad de referencia, donde la cantidad de referencia para cada gen son los niveles medios de producto de expresión de dichos genes en individuos sanos.

Una "muestra biológica", como se define aquí, es una pequeña parte de un sujeto, representativa del conjunto y puede estar constituido por una biopsia o una muestra de fluido corporal. Las biopsias son pequeñas piezas de tejido y pueden ser frescas, congeladas o fijadas, como fijada con formalina y embebidas en parafina (*formalin-fixed and paraffin embedded* FFPE). Muestras de fluidos corporales puede ser sangre, plasma, suero, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, leche o muestras de fluido ductal y pueden asimismo

ser frescos, congelados o fijadas. Las muestras se pueden extirpar quirúrgicamente, mediante extracción es decir, por agujas hipodérmicas o de otro tipo, por microdissección o captura láser. La muestra debe contener cualquier material biológico adecuado para detectar el biomarcador o biomarcadores deseado/s, por lo tanto, dicha muestra debe, comprender ventajosamente material de las células del sujeto. Por lo tanto, en una realización particular, la muestra es una muestra de fluido corporal tal como una muestra de sangre; Preferiblemente, la muestra comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Así pues, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada del paso a) es sangre, y aún más preferiblemente células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

En esta memoria, una “célula mononuclear de sangre periférica” (PBMC) se refiere a una célula sanguínea caracterizada por poseer un único núcleo redondeado, que incluyen linfocitos o monocitos. Su función es combatir infecciones. Estas células se obtienen normalmente de la sangre usando ficoll, un polisacárido hidrofílico que separa poblaciones celulares de la sangre en función de su punto isopícnico frente a un gradiente de densidad, con monocitos y linfocitos formando un *buffy coat* bajo la capa del plasma. Este *buffy* contiene las PBMCs.

En esta memoria se entiende por “ELA”, esclerosis lateral amiotrófica, a la enfermedad que afecta a las neuronas en el cerebro y la médula espinal que controlan el movimiento de los músculos voluntarios. Esta enfermedad también es conocida como la enfermedad de Lou Gehrig. Esta enfermedad se debe a un defecto genético en el 10% de los casos y se desconoce la causa en el 90% restante. La ELA afecta aproximadamente a 5 de cada 100.000 personas en todo el mundo.

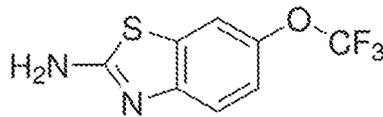
En la esclerosis lateral amiotrófica, las células nerviosas (neuronas) motoras se atrofian o mueren afectándose la función motora en diversos puntos de la anatomía. Con el tiempo, esto lleva a debilitamiento muscular, espasmos e incapacidad para mover los brazos, las piernas y el cuerpo. La afección empeora lentamente. Cuando los músculos en la zona torácica dejan de trabajar, se vuelve difícil o imposible respirar.

Los síntomas generalmente no se presentan sino hasta después de los 50 años, pero pueden empezar en personas más jóvenes. Las personas que padecen esta afección tienen una pérdida de la fuerza muscular y la coordinación que con el tiempo empeora y les hace imposible la realización de actividades rutinarias, como subir escaleras, levantarse de una

silla o deglutir. La debilidad puede afectar primero los brazos o las piernas, o la capacidad de respirar o deglutir. A medida que la enfermedad empeora, más grupos musculares desarrollan problemas. La esclerosis lateral amiotrófica no afecta los sentidos (vista, olfato, gusto, oído y tacto). La mayoría de los pacientes es capaz de pensar como lo hace normalmente, si bien una pequeña cantidad presenta demencia, lo que provoca problemas con la memoria.

Los síntomas incluyen: depresión, dificultad para respirar, dificultad para deglutir (tragar: ahogarse fácilmente, babear, arcadas), caída de la cabeza debido a la debilidad en los músculos del cuello, calambres musculares, espasticidad, contracciones musculares (fasciculaciones), debilidad muscular que comienza en una parte del cuerpo, como el brazo o la mano y empeora lentamente hasta llevar a dificultad para levantar cosas, subir escaleras y caminar, parálisis, problemas en el lenguaje, como patrón de habla lento o anormal (mala articulación de las palabras), cambios en la voz, ronquera, pérdida de peso,

En la actualidad no se conoce una cura para la esclerosis lateral amiotrófica. Existe un fármaco llamado "riluzol" (fórmula I) que ayuda a retardar los síntomas y ayuda a las personas a tener una vida ligeramente más larga.



Fórmula I

El término "fármaco", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

Otros tratamientos, no para la cura, pero usados para controlar otros síntomas incluyen: Baclofeno o diazepam para controlar la espasticidad que interfiere con las actividades cotidianas y Trihexifenidil o amitriptilina para personas con problemas para deglutir su propia saliva. Por otro lado, la fisioterapia, la rehabilitación y el uso de dispositivos ortopédicos o silla de ruedas, u otras medidas ortopédicas pueden ser necesarios para maximizar la función muscular y la salud en general.

Una "muestra de referencia", como se usa aquí, significa una muestra obtenida de los individuos, preferiblemente dos o más individuos, de los que se sabe que están libres de la enfermedad (ELA) o, alternativamente, de la población general. Los niveles adecuados de expresión de referencia de los genes se pueden determinar mediante la medición de los

niveles de expresión de dichos genes en varios individuos adecuados, y tales niveles de referencia se pueden ajustar para poblaciones de individuos o sujetos específicos. En una realización preferida, la muestra de referencia se obtiene de un grupo de individuos o sujetos sanos o de sujetos sin historia previa de ELA. El perfil de expresión de los genes en la muestra de referencia puede, preferiblemente, generarse a partir de una población de dos o más individuos; por ejemplo, la población puede comprender 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más individuos o sujetos.

Un "individuo" o "sujeto", como se usa aquí, se refiere a un mamífero, humano o no humano, en observación, y más preferiblemente un ser humano. El individuo puede ser cualquiera, un individuo predispuesto a una enfermedad (por ejemplo, ELA) o un individuo que padece dicha enfermedad.

El término "producto de expresión", también denominado "producto génico" se refiere al material bioquímico, ya sea ARN o proteína, resultado de la expresión de un gen. Algunas veces se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen.

Como se ha indicado, la cuantificación del paso b) y/o la comparación del paso c) pueden realizarse para ambos genes o sólo para alguno de ellos.

Los pasos (b) y/o (c), del método descrito anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la cuantificación en el paso b) o la comparación en el paso (c).

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación del resultado de la amplificación de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una amplificación de una o varias muestras de referencia deseable. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Las comparaciones descritas en los métodos de la presente invención pueden ser realizadas manualmente o asistida por ordenador.

En la presente invención "pronóstico" se entiende como la evolución esperada de una enfermedad y se refiere a la valoración de la probabilidad según la cual un sujeto padece una enfermedad así como a la valoración de su inicio, estado de desarrollo, evolución, o de su regresión, y/o el pronóstico del curso de la enfermedad en el futuro. Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a diagnosticar. El término, sin embargo,

requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valores p, prueba *t* de *Student*, prueba de *Mann-Whitney*, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1, 0,05.

A su vez, atendiendo al método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos o tratamiento adecuados. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación P, test de *Student* o funciones discriminantes de *Fisher*, medidas no paramétricas de *Mann Whitney*, correlación de *Spearman*, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60%, más preferiblemente en al menos el 70%, mucho más preferiblemente en al menos el 80%, o aún mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a otro método de diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la ELA, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a)-(c) del primer método de la invención, y además comprende:

d) asignar al individuo del paso a) al grupo de individuos que presentan ELA, cuando se detectan niveles de producto de expresión del gen *MyD88* al menos un 20% mayor, preferiblemente un 30% mayor, y aún más preferiblemente un 50% veces mayor a la cantidad de referencia para dicho gen, y

e) asignar al individuo del paso a) al grupo de individuos que presentan ELA, cuando se detectan niveles de producto de expresión del gen *TL3* al menos un 20% mayor, preferiblemente un 30% mayor, y aún más preferiblemente un 50% mayor a la cantidad de referencia para dicho gen.

- 5 La asignación del individuo del paso a) al grupo de individuos que presentan ELA puede realizarse ejecutando los pasos d) y/o e) del segundo método de la invención.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo, kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para cuantificar el producto de expresión del gen *MyD88* y/o del gen *TL3*.

- 10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión del gen *MyD88* y/o del gen *TL3*, y donde:

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 ó SEQ ID NO: 13 (*MyD88*) y/o la SEQ ID NO: 15 (*TL3*);

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 ó SEQ ID NO: 13 (*MyD88*) y/o la SEQ ID NO: 15 (*TL3*);

- los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a una región formada por cualquiera de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 ó SEQ ID NO: 14 (*MyD88*) y/o SEQ ID NO: 16 (*TL3*).

En otra realización preferida, el kit o dispositivo de la invención comprende los primers o cebadores de secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y/o SEQ ID NO: 20, recogidas en la tabla 1, o cualquier combinación de los mismos.

5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los cebadores, sondas o anticuerpos están modificados, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante un marcaje radiactivo o inmunológico.

10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los oligonucleótidos presentan modificaciones en alguno de sus nucleótidos, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, nucleótidos que tengan alguno de sus átomos con un isótopo radiactivo, normalmente <sup>32</sup>P o tritio, nucleótidos marcados inmunológicamente, como por ejemplo con una molécula de digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.

15 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo es humano, humanizado o sintético. En otra realización preferida, el anticuerpo es monoclonal y/o se encuentra marcado con un fluorocromo. Preferiblemente, el fluorocromo se selecciona de la lista que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, alofococianina, o cualquiera de sus combinaciones.

20 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención además comprende todos aquellos elementos necesarios para llevar a cabo un procedimiento PCR.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

25 Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

**Tabla 1.** Secuencias de la invención

Nombre del Gen	Descripción	Gen ID	Secuencias nucleotídicas	Secuencias aminoacídicas
<i>MYD88</i>	Respuesta primaria diferenciación mielóide	4615	SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5,

			7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 ó SEQ ID NO: 13.	SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 ó SEQ ID NO: 14.
<i>TLR3</i>	receptor <i>toll-like</i> 3	7098	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
<i>MYD88</i>	Cebador o Primer Forward 5'-3'		SEQ ID NO: 17	
<i>MYD88</i>	Cebador o Primer Reverse 5'-3'		SEQ ID NO: 18	
<i>TLR3</i>	Cebador o Primer Forward 5'-3'		SEQ ID NO: 19	
<i>TLR3</i>	Cebador o Primer Reverse 5'-3'		SEQ ID NO: 20	

El gen *MYD88* codifica una proteína adaptadora citosólica que juega un papel central en la respuesta inmune innata y adaptativa. Esta proteína funciona como un transductor de señal esencial en las vías de señalización de diversas vías de carácter inmunoregulatorio. Estas vías regulan la activación de numerosos genes proinflamatorios. Los pacientes con defectos en este gen tienen una mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas piógenas.

El gen *TLR3* codifica una proteína que es miembro de la familia del receptor *Toll-like* (TLR), que desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata. Los TLRs están altamente conservados desde *Drosophila* hasta los seres humanos y comparten similitudes estructurales y funcionales. Reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que se expresan en los agentes infecciosos, y median la producción de citoquinas necesarias para el desarrollo de la inmunidad eficaz. Los diversos TLRs exhiben diferentes patrones de expresión. Reconoce dsARN asociado con la infección viral, e induce la activación de NF-kappaB y la producción de interferones de tipo I. Puede así desempeñar un papel en la defensa del huésped contra los virus. Se destacan el uso de sitios de poliadenilación alternativos para generar diferentes longitudes de transcripción.

En el contexto de la presente invención, los genes *MYD88* y *TLR3* se definen también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de las proteínas recogidas respectivamente en la Tabla 1, siendo dichas proteínas el producto de expresión de cada uno de los genes identificados en la tabla. Adicionalmente la presente invención comprende diversas variantes procedentes de cada una de las secuencias identificadas en la tabla 1.

En este sentido, variantes de las secuencias asociadas al gen *MYD88* comprenden:

- a) molécula de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoácida de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 ó SEQ ID NO: 14 recogidas en la Tabla 1,
- 5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la  
10 secuencia aminoácida con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 ó SEQ ID NO: 14 recogidas en la Tabla 1, respectivamente, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína MYD88. Entre  
15 dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 ó SEQ ID NO: 13 indicadas en la Tabla 1.

En este sentido, variantes de las secuencias asociadas al gen *TLR3* comprenden:

- a) molécula de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la  
20 secuencia aminoácida de la SEQ ID NO: 16 recogida en la Tabla 1,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la  
25 secuencia aminoácida con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 16 recogida en la Tabla 1, respectivamente, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína. Entre dichas moléculas de ácido nucleico  
30 se encuentra la recogida en la SEQ ID NO: 15 indicada en la Tabla 1.

Las secuencias SEQ ID NO: 1–SEQ ID NO: 20 son la siguientes:

SEQ ID NO: 1:

AGATTCCTACTTCTTACGCCCCCCACATCACCCGCCTCGAGACCTCAAGGGTAGAGGTG  
GGCACCCCCGCCTCCGCACTTTTGTCTCGGGGCTCCAGATTGTAGGGCAGGGCGGGCGC  
TTCTCGGAAAGCGAAAGCCGGCGGGGCGGGGCGGGTGCCGCAGGAGAAAGAGGAAG  
5 CGCTGGCAGACAATGCGACCCGACCGCGCTGAGGCTCCAGGACCGCCCGCCATGGCT  
GCAGGAGGTCCC GGCGCGGGGTCTGCGGCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCCTTCCC  
CTGGCTGCTCTCAACATGCGAGTGCGGCGCCGCCTGTCTCTGTTCTTGAACGTGCGGA  
CACAGGTGGCGGCCGACTGGACCGCGCTGGCGGAGGAGATGGACTTTGAGTACTTGG  
AGATCCGGCAACTGGAGACACAAGCGGACCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGC  
10 AGGGACGCCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCTCGAGCTGCTTACCAAGCTGGGCC  
GCGACGACGTGCTGCTGGAGCTGGGACCCAGCATTGAGGAGGATTGCCAAAAGTATAT  
CTTGAAGCAGCAGCAGGAGGAGGCTGAGAAGCCTTTACAGGTGGCCGCTGTAGACAGC  
AGTGTCCCACGGACAGCAGAGCTGGCGGGCATCACCACACTTGATGACCCCCTGGGG  
CATATGCCTGAGCGTTTCGATGCCTTCATCTGCTATTGCCCCAGCGACATCCAGTTTGT  
15 GCAGGAGATGATCCGGCAACTGGAACAGACAACTATCGACTGAAGTTGTGTGTGTCTG  
ACCGCGATGTCTGCTGGCACCTGTGTCTGGTCTATTGCTAGTGAGCTCATCGAAAAG  
AGGTTGGCTAGAAGGCCACGGGGTGGGTGCCGCCGATGGTGGTGGTTGTCTCTGAT  
GATTACCTGCAGAGCAAGGAATGTGACTTCCAGACCAAATTTGCACTCAGCCTCTCTCC  
AGGTGCCCATCAGAAGCGACTGATCCCCATCAAGTACAAGGCAATGAAGAAAGAGTTCC  
20 CCAGCATCCTGAGGTTCACTGTCTGCGACTACACCAACCCCTGCACCAAATCTTGG  
TTCTGGACTCGCCTTGCCAAGGCCTTGTCCCTGCCCTGAAGACTGTTCTGAGGCCCTG  
GGTGTGTGTGTATCTGTCTGCCTGTCCATGTACTTCTGCCCTGCCTCCTCCTTTTCGTTGT  
AGGAGGAATCTGTGCTCTACTTACCTCTCAATTCCTGGAGATGCCAACTTCACAGACAC  
GTCTGCAGCAGCTGGACATCACATTTTCATGTCCTGCATGGAACCAGTGGCTGTGAGTG  
25 GCATGTCCACTTGCTGGATTATCAGCCAGGACACTATAGAACAGGACCAGCTGAGACTA  
AGAAGGACCAGCAGAGCCAGCTCAGCTCTGAGCCATTCACACATCTTCACCCTCAGTTT  
CCTCACTTGAGGAGTGGGATGGGGAGAACAGAGAGTAGCTGTGTTTGAATCCCTGTAG  
GAAATGGTGAAGCATAGCTCTGGGTCTCCTGGGGGAGACCAGGCTTGGCTGCGGGAG  
AGCTGGCTGTTGCTGGACTACATGCTGGCCACTGCTGTGACCACGACACTGCTGGGGC  
30 AGCTTCTTCCACAGTGATGCCTACTGATGCTTCAGTGCCTCTGCACACCGCCATTCCA  
CTTCTCCTTCCCCACAGGGCAGGTGGGGAAGCAGTTTGGCCCAGCCCAAGGAGACCC  
CACCTTGAGCCTTATTTCTAATGGGTCCACCTCTCATCTGCATCTTTCACACCTCCCAG  
CTTCTGCCCAACCTTCAGCAGTGACAAGTCCCCAAGAGACTCGCCTGAGCAGCTTGGG  
CTGCTTTTCATTTCCACCTGTCAGGATGCCTGTGGTCATGCTCTCAGCTCCACCTGGCA  
35 TGAGAAGGGATCCTGGCCTCTGGCATATTCATCAAGTATGAGTTCTGGGGATGAGTCAC

TGTAATGATGTGAGCAGGGAGCCTTCCTCCCTGGGCCACCTGCAGAGAGCTTTCCCAC  
CAACTTTGTACCTTGATTGCCTTACAAAGTTATTTGTTTACAAACAGCGACCATATAAAAG  
CCTCCTGCCCCAAAGCTTGTGGGCACATGGGCACATACAGACTCACATACAGACACACA  
CATATATGTACAGACATGTACTCTCACACACACAGGCACCAGCATAACACACGTTTTTCTA  
5 GGTACAGCTCCCAGGAACAGCTAGGTGGGAAAGTCCCATCACTGAGGGAGCCTAACCA  
TGTCCTGAACAAAAATTGGGCACTCATCTATTCCTTTTCTCTTGTGTCCCTACTCATTGA  
AACCAAACCTCTGGAAAGGACCCAATGTACCAGTATTTATACCTCTAATGAAGCACAGAGA  
GAGGAAGAGAGCTGCTTAAACTCACACAACAATGAACTGCAGACACAGCTGTTCTCTCC  
CTCTCTCCTTCCCAGAGCAATTTATACTTTACCCTCAGGCTGTCTCTGGGGAGAAGGT  
10 GCCATGGTCTTAGGTGTCTGTGCCCCAGGACAGACCCTAGGACCCTAAATCCAATAGAA  
AATGCATATCTTTGCTCCACTTTCAGCCAGGCTGGAGCAAGGTACCTTTTCTTAGGATCT  
TGGGAGGGAATGGATGCCCTCTCTGCATGATCTTGTGAGGCATTTAGCTGCCATGCA  
CCTGTCCCCCTTTAATACTGGGCATTTTAAAGCCATCTCAAGAGGCATCTTCTACATGTT  
TTGTACGCATTAATAAATTTCAAAGATATCTGAGAAAAGCCGATATTTGCCATTCTTCC  
15 ATATCCTGGAATATATCTTGCATCCTGAGTTTATAATAATAAATAATATTCTACCTTGAA  
AAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 2:

MRPDRAEAPGPPAMAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAAD  
WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLELGP  
20 SIEEDCQKYILKQQEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCPS  
DIQFVQEMIRQLEQTNYRLKLCVSDRDVLPGTCVWSIASIELIEKRLARRPRGGCRRMVVV  
SDDYLQSKECDFQTKFALSLSPGAHQKRLIPIKYKAMKKEFPSILRFITVCDYTNPCTKSWFW  
TRLAKALSLP

SEQ ID NO: 3:

AGATTCCTACTTCTTACGCCCCCACATCACCCGCCTCGAGACCTCAAGGGTAGAGGTG  
GGCACCCCCGCCTCCGCACTTTTGTCTCGGGGCTCCAGATTGTAGGGCAGGGCGGGCGC  
TTCTCGGAAAGCGAAAGCCGGCGGGGCGGGGCGGGTGCCGCAGGAGAAAGAGGAAG  
CGCTGGCAGACAATGCGACCCGACCGCGCTGAGGCTCCAGGACCGCCCGCCATGGCT  
GCAGGAGGTCCCGGCGCGGGGTCTGCGGCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCCTTCCC  
30 CTGGCTGCTCTCAACATGCGAGTGC GGCGCCGCCTGTCTCTGTTCTTGAACGTGCGGA  
CACAGGTGGCGGCCGACTGGACCGCGCTGGCGGAGGAGATGGACTTTGAGTACTTGG  
AGATCCGGCAACTGGAGACACAAGCGGACCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGC  
AGGGACGCCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCTCGAGCTGCTTACCAAGCTGGGCC  
GCGACGACGTGCTGCTGGAGCTGGGACCCAGCATTGAGGAGGATTGCCAAAAGTATAT

CTTGAAGCAGCAGCAGGAGGAGGCTGAGAAGCCTTTACAGGTGGCCGCTGTAGACAGC  
AGTGTCCCACGGACAGCAGAGCTGGCGGGCATCACCACACTTGATGACCCCCTGGGG  
CATATGCCTGAGCGTTTCGATGCCTTCATCTGCTATTGCCCCAGCGACATCCAGTTTGT  
GCAGGAGATGATCCGGCAACTGGAACAGACAACTATCGACTGAAGTTGTGTGTGTCTG  
5 ACCGCGATGTCCTGCCTGGCACCTGTGTCTGGTCTATTGCTAGTGAGCTCATCGAAAAG  
AGGTGCCGCGGATGGTGGTGGTTGTCTCTGATGATTACCTGCAGAGCAAGGAATGTG  
ACTTCCAGACCAAATTTGCACTCAGCCTCTCTCCAGGTGCCCATCAGAAGCGACTGATC  
CCCATCAAGTACAAGGCAATGAAGAAAGAGTTCCCCAGCATCCTGAGGTTCACTACTGT  
CTGCGACTACACCAACCCCTGCACCAAATCTTGGTTCTGGACTCGCCTTGCCAAGGCCT  
10 TGTCCCTGCCCTGAAGACTGTTCTGAGGCCCTGGGTGTGTGTGTATCTGTCTGCCTGTC  
CATGTACTTCTGCCCTGCCTCCTCCTTTTCGTTGTAGGAGGAATCTGTGCTCTACTTACCT  
CTCAATTCCTGGAGATGCCAACTTCACAGACACGTCTGCAGCAGCTGGACATCACATTT  
CATGTCCTGCATGGAACCAGTGGCTGTGAGTGGCATGTCCACTTGCTGGATTATCAGCC  
AGGACACTATAGAACAGGACCAGCTGAGACTAAGAAGGACCAGCAGAGCCAGCTCAGC  
15 TCTGAGCCATTCACACATCTTCACCCTCAGTTTCCTCACTTGAGGAGTGGGATGGGGAG  
AACAGAGAGTAGCTGTGTTTGAATCCCTGTAGGAAATGGTGAAGCATAGCTCTGGGTCT  
CCTGGGGGAGACCAGGCTTGGCTGCGGGAGAGCTGGCTGTTGCTGGACTACATGCTG  
GCCACTGCTGTGACCACGACACTGCTGGGGCAGCTTCTCCACAGTGATGCCTACTGA  
TGCTTCAGTGCCCTCTGCACACCGCCATTCCACTTCCTCCTTCCCCACAGGGCAGGTG  
20 GGAAGCAGTTTGGCCCAGCCCAAGGAGACCCACCTTGAGCCTTATTTCCCTAATGGG  
TCCACCTCTCATCTGCATCTTTCACACCTCCCAGCTTCTGCCCAACCTTCAGCAGTGACA  
AGTCCCCAAGAGACTCGCCTGAGCAGCTTGGGCTGCTTTTCATTTCCACCTGTCAGGAT  
GCCTGTGGTCATGCTCTCAGCTCCACCTGGCATGAGAAGGGATCCTGGCCTCTGGCAT  
ATTCATCAAGTATGAGTTCTGGGGATGAGTCACTGTAATGATGTGAGCAGGGAGCCTTC  
25 CTCCCTGGGCCACCTGCAGAGAGCTTTCCACCAACTTTGTACCTTGATTGCCTTACAA  
AGTTATTTGTTTACAAACAGCGACCATATAAAAGCCTCCTGCCCAAAGCTTGTGGGCA  
CATGGGCACATACAGACTCACATACAGACACACACATATATGTACAGACATGTA CTCTCA  
CACACACAGGCACCAGCATAACACACGTTTTTCTAGGTACAGCTCCCAGGAACAGCTAGG  
TGGGAAAGTCCCATCACTGAGGGAGCCTAACCATGTCCCTGAACAAAAATTGGGCACTC  
30 ATCTATTCCTTTTCTCTTGTGTCCCTACTCATTGAAACCAA CTCTGGAAAGGACCCAAT  
GTACCAGTATTTATACCTCTAATGAAGCACAGAGAGAGGAAGAGAGCTGCTTAAACTCA  
CACAACAATGAACTGCAGACACAGCTGTTCTCTCCCTCTCTCCTTCCCAGAGCAATTTAT  
ACTTTACCCTCAGGCTGTCCCTCTGGGGAGAAGGTGCCATGGTCTTAGGTGTCTGTGCC  
CCAGGACAGACCCTAGGACCCTAAATCCAATAGAAAATGCATATCTTTGCTCCACTTTCA  
35 GCCAGGCTGGAGCAAGGTACCTTTTCTTAGGATCTTGGGAGGGAATGGATGCCCTCT  
CTGCATGATCTTGTTGAGGCATTTAGCTGCCATGCACCTGTCCCCCTTTAATACTGGGC

ATTTTAAAGCCATCTCAAGAGGCATCTTCTACATGTTTTGTACGCATTAATAAATAATTTCAA  
AGATATCTGAGAAAAGCCGATATTTGCCATTCTTCCTATATCCTGGAATATATCTTGCATC  
CTGAGTTTATAATAATAATAATATTCTACCTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 4:

5 MRPDRAEAPGPPAMAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAAD  
WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLELGP  
SIEEDCQKYILKQQQEEAEKPLQVAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCPS  
DIQFVQEMIRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPGTVCVWSIASELIEKRCRRMVVVVSDDYLSKE  
CDFQTKFALSLSPGAHQKRLIPIKYKAMKKEFPSILRFITVCDYTNPCTKSWFWTRLAKALS  
10 P

SEQ ID NO: 5:

AGATTCCTACTTCTTACGCCCCCACATCACCCGCCTCGAGACCTCAAGGGTAGAGGTG  
GGCACCCCCGCCTCCGCACTTTTGCTCGGGGCTCCAGATTGTAGGGCAGGGCGGGCGC  
TTCTCGGAAAGCGAAAGCCGGCGGGGCGGGGCGGGTGCCGCAGGAGAAAGAGGAAG  
15 CGCTGGCAGACAATGCGACCCGACCGCGCTGAGGCTCCAGGACCGCCCGCCATGGCT  
GCAGGAGGTCCCGGCGCGGGGTCTGCGGCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCCTTCCC  
CTGGCTGCTCTCAACATGCGAGTGC GGCGCCCGCTGTCTCTGTTCTTGAACGTGCGGA  
CACAGGTGGCGGCCGACTGGACCGCGCTGGCGGAGGAGATGGACTTTGAGTACTTGG  
AGATCCGGCAACTGGAGACACAAGCGGACCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGC  
20 AGGGACGCCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCTCGAGCTGCTTACCAAGCTGGGCC  
GCGACGACGTGCTGCTGGAGCTGGGACCCAGCATTGAGGAGGATTGCCAAAAGTATAT  
CTTGAAGCAGCAGCAGGAGGAGGCTGAGAAGCCTTTACAGGTGGCCGCTGTAGACAGC  
AGTGTCCCACGGACAGCAGAGCTGGCGGGCATCACCACTTGATGACCCCTGGGTG  
CCGCCGATGGTGGTGGTTGTCTCTGATGATTACCTGCAGAGCAAGGAATGTGACTTC  
25 CAGACCAAATTTGCACTCAGCCTCTCTCCAGGTGCCCATCAGAAGCGACTGATCCCCAT  
CAAGTACAAGGCAATGAAGAAAGAGTTCCCAGCATCCTGAGGTTCACTGTCTGCG  
ACTACACCAACCCTGCACCAAATCTTGGTTCTGGACTCGCCTTGCCAAGGCCTTGTCC  
CTGCCCTGAAGACTGTTCTGAGGCCCTGGGTGTGTGTGTATCTGTCTGCCTGTCCATGT  
ACTTCTGCCCTGCCTCCTCTTTCGTTGTAGGAGGAATCTGTGCTCTACTTACCTCTCAA  
30 TTCCTGGAGATGCCAACTTCACAGACACGTCTGCAGCAGCTGGACATCACATTTTATGT  
CCTGCATGGAACCAGTGGCTGTGAGTGGCATGTCCACTTGCTGGATTATCAGCCAGGA  
CACTATAGAACAGGACCAGCTGAGACTAAGAAGGACCAGCAGAGCCAGCTCAGCTCTG  
AGCCATTCACACATCTTACCCTCAGTTTCCTCACTTGAGGAGTGGGATGGGGAGAACA  
GAGAGTAGCTGTGTTTGAATCCCTGTAGGAAATGGTGAAGCATAGCTCTGGGTCTCCTG

GGGGAGACCAGGCTTGGCTGCGGGAGAGCTGGCTGTTGCTGGACTACATGCTGGCCA  
 CTGCTGTGACCACGACACTGCTGGGGCAGCTTCTTCCACAGTGATGCCTACTGATGCTT  
 CAGTGCCTCTGCACACCGCCCATTCCAATTCTCCTTCCCCACAGGGCAGGTGGGGAA  
 GCAGTTTGGCCAGCCCAAGGAGACCCACCTTGAGCCTTATTTCTAATGGGTCCACC  
 5 TCTCATCTGCATCTTTCACACCTCCCAGCTTCTGCCAACCTTCAGCAGTGACAAGTCC  
 CCAAGAGACTCGCCTGAGCAGCTTGGGCTGCTTTTCATTTCCACCTGTCAGGATGCCTG  
 TGGTCATGCTCTCAGCTCCACCTGGCATGAGAAGGGATCCTGGCCTCTGGCATATTCAT  
 CAAGTATGAGTTCTGGGGATGAGTCACTGTAATGATGTGAGCAGGGAGCCTTCTCCCT  
 GGGCCACCTGCAGAGAGCTTTCCACCAACTTTGTACCTTGATTGCCTTACAAAGTTATT  
 10 TGTTTACAAACAGCGACCATATAAAAGCCTCCTGCCCAAAGCTTGTGGGCACATGGGC  
 ACATACAGACTCACATACAGACACACATATATGTACAGACATGTACTCTCACACACAC  
 AGGCACCAGCATAACACGTTTTTCTAGGTACAGCTCCAGGAACAGCTAGGTGGGAAA  
 GTCCCATCACTGAGGGAGCCTAACCATGTCCCTGAACAAAAATTGGGCACTCATCTATT  
 CCTTTTCTTTGTGTCCCTACTCATTGAAACCAAACCTCTGGAAAGGACCCAATGTACCAG  
 15 TATTTATACCTCTAATGAAGCACAGAGAGAGGAAGAGAGCTGCTTAAACTCACACAACAA  
 TGAAGTGCAGACACAGCTGTTCTCTCCCTCTCTCCTTCCCAGAGCAATTTATACTTTACC  
 CTCAGGCTGTCTCTGGGGAGAAGGTGCCATGGTCTTAGGTGTCTGTGCCCCAGGACA  
 GACCCTAGGACCCTAAATCCAATAGAAAATGCATATCTTTGCTCCACTTTCAGCCAGGCT  
 GGAGCAAGGTACCTTTTCTTAGGATCTTGGGAGGGAATGGATGCCCTCTCTGCATGAT  
 20 CTTGTTGAGGCATTTAGCTGCCATGCACCTGTCCCCCTTAATACTGGGCATTTTAAAGC  
 CATCTCAAGAGGCATCTTCTACATGTTTTGTACGCATTAATAAATAATTTCAAAGATATCTGA  
 GAAAAGCCGATATTTGCCATTCTTCTATATCCTGGAATATATCTTGCATCCTGAGTTTAT  
 AATAATAAATAATATTCTACCTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 6:

25 MRPDRAEAPGPPAMAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAAD  
 WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLELGP  
 SIEEDCQKYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGAAGWWWLSLMITCR  
 ARNVTSRPNLHSASLQVPIRSD

SEQ ID NO: 7:

30 AGATTCCTACTTCTTACGCCCCCACATCACCCGCCTCGAGACCTCAAGGGTAGAGGTG  
 GGCACCCCCGCCTCCGCACTTTTGTCTCGGGGCTCCAGATTGTAGGGCAGGGCGGGCGC  
 TTCTCGGAAAGCGAAAGCCGGCGGGGCGGGGCGGGTGCCGCAGGAGAAAGAGGAAG  
 CGCTGGCAGACAATGCGACCCGACCGCGCTGAGGCTCCAGGACCGCCCGCCATGGCT  
 GCAGGAGGTCCCGGCGCGGGGTCTGCGGCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCCTTCCC

CTGGCTGCTCTCAACATGCGAGTGCGGCGCCGCCTGTCTCTGTTCTTGAACGTGCGGA  
CACAGGTGGCGGCCGACTGGACCGCGCTGGCGGAGGAGATGGACTTTGAGTACTTGG  
AGATCCGGCAACTGGAGACACAAGCGGACCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGC  
AGGGACGCCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCTCGAGCTGCTTACCAAGCTGGGCC  
5 GCGACGACGTGCTGCTGGAGCTGGGACCCAGCATTGGGCATATGCCTGAGCGTTTCGA  
TGCCTTCATCTGCTATTGCCCCAGCGACATCCAGTTTGTGCAGGAGATGATCCGGCAAC  
TGGAACAGACAACTATCGACTGAAGTTGTGTGTGTCTGACCGCGATGTCCTGCCTGGC  
ACCTGTGTCTGGTCTATTGCTAGTGAGCTCATCGAAAAGAGGTGCCGCCGGATGGTGG  
TGGTTGTCTCTGATGATTACCTGCAGAGCAAGGAATGTGACTTCCAGACCAAATTTGCA  
10 CTCAGCCTCTCTCCAGGTGCCCATCAGAAGCGACTGATCCCCATCAAGTACAAGGCAAT  
GAAGAAAGAGTTCCCCAGCATCCTGAGGTTCACTGTCTGCGACTACACCAACCCCT  
GCACCAAATCTTGGTTCTGGACTCGCCTTGCCAAGGCCTTGTCCCTGCCCTGAAGACTG  
TTCTGAGGCCCTGGGTGTGTGTGTATCTGTCTGCCTGTCCATGTACTTCTGCCCTGCCT  
CCTCCTTTCGTTGTAGGAGGAATCTGTGCTCTACTTACCTCTCAATTCCTGGAGATGCCA  
15 ACTTCACAGACACGTCTGCAGCAGCTGGACATCACATTTTCATGTCCTGCATGGAACCAG  
TGGCTGTGAGTGGCATGTCCACTTGCTGGATTATCAGCCAGGACACTATAGAACAGGAC  
CAGCTGAGACTAAGAAGGACCAGCAGAGCCAGCTCAGCTCTGAGCCATTACACATCTT  
CACCCCTCAGTTTCTCACTTGAGGAGTGGGATGGGGAGAACAGAGAGTAGCTGTGTTT  
GAATCCCTGTAGGAAATGGTGAAGCATAGCTCTGGGTCTCCTGGGGGAGACCAGGCTT  
20 GGCTGCGGGAGAGCTGGCTGTTGCTGGACTACATGCTGGCCACTGCTGTGACCACGAC  
ACTGCTGGGGCAGCTTCTTCCACAGTGATGCCTACTGATGCTTCAGTGCCTCTGCACAC  
CGCCCATTCCACTTCTCCTTCCCCACAGGGCAGGTGGGGAAGCAGTTTGGCCCAGCC  
CAAGGAGACCCACCTTGAGCCTTATTTCTAATGGGTCCACCTCTCATCTGCATCTTTC  
ACACCTCCCAGCTTCTGCCAACCTTCAGCAGTGACAAGTCCCCAAGAGACTCGCCTGA  
25 GCAGCTTGGGCTGCTTTTCATTTCCACCTGTCAGGATGCCTGTGGTCATGCTCTCAGCT  
CCACCTGGCATGAGAAGGGATCCTGGCCTCTGGCATAATTCATCAAGTATGAGTTCTGGG  
GATGAGTCACTGTAATGATGTGAGCAGGGAGCCTTCTCCTGGGCCACCTGCAGAGA  
GCTTTCCACCAACTTTGTACCTTGATTGCCTTACAAAGTTATTTGTTTACAAACAGCGA  
CCATATAAAAGCCTCCTGCCCCAAAGCTTGTGGGCACATGGGCACATACAGACTCACAT  
30 ACAGACACACACATATATGTACAGACATGTA CTCTCACACACACAGGCACCAGCATA  
CACGTTTTTCTAGGTACAGCTCCCAGGAACAGCTAGGTGGGAAAGTCCCATCACTGAGG  
GAGCCTAACCATGTCCCTGAACAAAATTGGGCACTCATCTATTCTTTTCTTTGTGTC  
CCTACTCATTGAAACCAAACCTCTGGAAAGGACCCAATGTACCAGTATTTATACCTCTAAT  
GAAGCACAGAGAGAGGAAGAGAGCTGCTTAACTCACACAACAATGAACTGCAGACAC  
35 AGCTGTTCTCTCCCTCTCTCCTTCCCAGAGCAATTTATACTTTACCCTCAGGCTGTCCTC  
TGGGGAGAAGGTGCCATGGTCTTAGGTGTCTGTGCCCCAGGACAGACCCTAGGACCCT

AAATCCAATAGAAAATGCATATCTTTGCTCCACTTTCAGCCAGGCTGGAGCAAGGTACCT  
TTTCTTAGGATCTTGGGAGGGAATGGATGCCCTCTCTGCATGATCTTGTGAGGCATT  
TAGCTGCCATGCACCTGTCCCCCTTTAATACTGGGCATTTTAAAGCCATCTCAAGAGGC  
ATCTTCTACATGTTTTGTACGCATTAATAAATTTCAAAGATATCTGAGAAAAGCCGATAT  
5 TTGCCATTCTTCTATATCCTGGAATATATCTTGCATCCTGAGTTTATAATAATAATAATA  
TTCTACCTTGGAATAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 8:

MRPDRAEAPGPPAMAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAAD  
WTALAEEMDFEYLEIRQLQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLLELLTKLGRDDVLELGP  
10 SIGHMPERFADFICYCPSDIQFVQEMIRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPGTCVWSIASSELIEKR  
CRRMVVVVSDDYLQSKECDFQTKFALSLSPGAHQKRLIPIKYKAMKKEFPSILRFITVCDYTN  
PCTKSWFWTRLAKALSLP

SEQ ID NO: 9:

AGATTCCTACTTCTTACGCCCCCACATCACCCGCCTCGAGACCTCAAGGGTAGAGGTG  
15 GGCACCCCGCCTCCGCACCTTTTGTCTCGGGGCTCCAGATTGTAGGGCAGGGCGGGCGC  
TTCTCGGAAAGCGAAAGCCGGCGGGGCGGGGCGGGTGCCGCAGGAGAAAGAGGAAG  
CGCTGGCAGACAATGCGACCCGACCGCGCTGAGGCTCCAGGACCGCCCGCCATGGCT  
GCAGGAGGTCCCGGCGCGGGGTCTGCGGCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCCTTCCC  
CTGGCTGCTCTCAACATGCGAGTGCGGCGCCGCCTGTCTCTGTTCTTGAACGTGCGGA  
20 CACAGGTGGCGGCCGACTGGACCGCGCTGGCGGAGGAGATGGACTTTGAGTACTTGG  
AGATCCGGCAACTGGAGACACAAGCGGACCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGC  
AGGGACGCCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCTCGAGCTGCTTACCAAGCTGGGCC  
GCGACGACGTGCTGCTGGAGCTGGGACCCAGCATTGGTGCCGCCGGATGGTGGTGGT  
TGTCTCTGATGATTACCTGCAGAGCAAGGAATGTGACTTCCAGACCAAATTTGCACTCA  
25 GCCTCTCTCCAGGTGCCCATCAGAAGCGACTGATCCCCATCAAGTACAAGGCAATGAA  
GAAAGAGTTCCCAGCATCCTGAGGTTCACTGTCTGCGACTACACCAACCCCTGCA  
CCAAATCTTGGTTCTGGACTCGCCTTGCCAAGGCCTTGTCCCTGCCCTGAAGACTGTTC  
TGAGGCCCTGGGTGTGTGTGTATCTGTCTGCCTGTCCATGTACTTCTGCCCTGCCTCCT  
CCTTTGTTGTAGGAGGAATCTGTGCTCTACTTACCTCTCAATTCCTGGAGATGCCAACT  
30 TCACAGACACGTCTGCAGCAGCTGGACATCACATTTTCATGTCCTGCATGGAACCAGTGG  
CTGTGAGTGGCATGTCCACTTGCTGGATTATCAGCCAGGACACTATAGAACAGGACCAG  
CTGAGACTAAGAAGGACCAGCAGAGCCAGCTCAGCTCTGAGCCATTACACATCTTCAC  
CCTCAGTTTCCTCACTTGGAGAGTGGGATGGGGAGAACAGAGAGTAGCTGTGTTTGAAT  
CCCTGTAGGAAATGGTGAAGCATAGCTCTGGGTCTCCTGGGGGAGACCAGGCTTGGCT

GCGGGAGAGCTGGCTGTTGCTGGACTACATGCTGGCCACTGCTGTGACCACGACACTG  
CTGGGGCAGCTTCTTCCACAGTGATGCCTACTGATGCTTCAGTGCCTCTGCACACCGCC  
CATTCCACTTCCTCCTTCCCCACAGGGCAGGTGGGGAAGCAGTTTGGCCCAGCCCAAG  
GAGACCCACCTTGAGCCTTATTTCTAATGGGTCCACCTCTCATCTGCATCTTTACAC  
5 CTCCCAGCTTCTGCCAACCTTCAGCAGTGACAAGTCCCCAAGAGACTCGCCTGAGCA  
GCTTGGGCTGCTTTTCATTTCCACCTGTCAGGATGCCTGTGGTCATGCTCTCAGCTCCA  
CCTGGCATGAGAAGGGATCCTGGCCTCTGGCATAATTCATCAAGTATGAGTTCTGGGGAT  
GAGTCACTGTAATGATGTGAGCAGGGAGCCTTCCCTGGGCCACCTGCAGAGAGCT  
TTCCCACCAACTTTGTACCTTGATTGCCTTACAAAGTTATTTGTTTACAAACAGCGACCAT  
10 ATAAAAGCCTCCTGCCCCAAAGCTTGTGGGCACATGGGCACATACAGACTCACATACAG  
ACACACACATATATGTACAGACATGTA CTCTCACACACACAGGCACCAGCATAACACAG  
TTTTTCTAGGTACAGCTCCCAGGAACAGCTAGGTGGGAAAGTCCCATCACTGAGGGAG  
CCTAACCATGTCCCTGAACAAAAATTGGGCACTCATCTATTCCTTTTCTTTGTGTCCCT  
ACTCATTGAAACCAAACCTCTGGAAAGGACCCAATGTACCAGTATTTATACCTCTAATGAA  
15 GCACAGAGAGAGGAAGAGAGCTGCTTAAACTCACACAACAATGAACTGCAGACACAGC  
TGTTCTCTCCCTCTCTCCTTCCCAGAGCAATTTATACTTTACCCTCAGGCTGTCCTCTGG  
GGAGAAGGTGCCATGGTCTTAGGTGTCTGTGCCCCAGGACAGACCCTAGGACCCTAAA  
TCCAATAGAAAATGCATATCTTTGCTCCACTTTCAGCCAGGCTGGAGCAAGGTACCTTTT  
CTTAGGATCTTGGGAGGGAATGGATGCCCTCTCTGCATGATCTTGTTGAGGCATTTAG  
20 CTGCCATGCACCTGTCCCCCTTTAATACTGGGCATTTTAAAGCCATCTCAAGAGGCATCT  
TCTACATGTTTTGTACGCATTAATAAATTTCAAAGATATCTGAGAAAAGCCGATATTTGC  
CATTCTTCCTATATCCTGGAATATATCTTGCATCCTGAGTTTATAATAATAAATAATTTCT  
ACCTTGGA AAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 10:

25 MRPDRAEAPGPPAMAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAAD  
WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLELGP  
SIGAAGWWWLSLMITCRARNVTSRPNLHSASLQVPIRS

SEQ ID NO: 11:

30 CCTACTTCTTACGCCCCCACATCACCCGCCTCGAGACCTCAAGGGTAGAGGTGGGCA  
CCCCGCCTCCGCACTTTTGTCTCGGGGCTCCAGATTGTAGGGCAGGGCGGCGCTTCTC  
GGAAAGCGAAAGCCGGCGGGGCGGGGCGGGTGCCGCAGGAGAAAGAGGAAGCGCTG  
GCAGACAATGCGACCCGACCGCGCTGAGGCTCCAGGACCGCCCGCCATGGCTGCAGG  
AGGTCCCGGCGCGGGGTCTGCGGCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCCTTCCCCTGGC  
TGCTCTCAACATGCGAGTGCGGCGCCGCCTGTCTCTGTTCTTGAACGTGCGGACACAG

GTGGCGGCCGACTGGACCGCGCTGGCGGAGGAGATGGACTTTGAGTACTTGGAGATC  
CGGCAACTGGAGACACAAGCGGACCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGCAGGGA  
CGCCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCTCGAGCTGCTTACCAAGCTGGGCCGCGAC  
GACGTGCTGCTGGAGCTGGGACCCAGCATTGAGGAGGATTGCCAAAAGTATATCTTGA  
5 AGCAGCAGCAGGAGGAGGCTGAGAAGCCTTTACAGGTGGCCGCTGTAGACAGCAGTG  
TCCCACGGACAGCAGAGCTGGCGGGCATCACCACACTTGATGACCCCTGGGGCATAT  
GCCTGAGCGTTTTGATGCCTTCATCTGCTATTGCCCCAGCGACATCCAGTTTGTGCAGG  
AGATGATCCGGCAACTGGAACAGACAACTATCGACTGAAGTTGTGTGTGTCTGACCGC  
GATGTCCTGCCTGGCACCTGTGTCTGGTCTATTGCTAGTGCCGCCGGATGGTGGTGGT  
10 TGTCTCTGATGATTACCTGCAGAGCAAGGAATGTGACTTCCAGACCAAATTTGCACTCA  
GCCTCTCTCCAGGTGCCCATCAGAAGCGACTGATCCCCATCAAGTACAAGGCAATGAA  
GAAAGAGTTCCCCAGCATCCTGAGGTTCACTGTCTGCGACTACACCAACCCCTGCA  
CCAAATCTTGGTTCTGGACTCGCCTTGCCAAGGCCTTGTCCCTGCCCTGAAGACTGTTC  
TGAGGCCCTGGGTGTGTGTGTATCTGTCTGCCTGTCCATGTACTTCTGCCCTGCCTCCT  
15 CCTTTCGTTGTAGGAGGAATCTGTGCTCTACTTACCTCTCAATTCCTGGAGATGCCAACT  
TCACAGACACGTCTGCAGCAGCTGGACATCACATTTTCATGTCCTGCATGGAACCACTGG  
CTGTGAGTGGCATGTCCACTTGCTGGATTATCAGCCAGGACACTATAGAACAGGACCAG  
CTGAGACTAAGAAGGACCAGCAGAGCCAGCTCAGCTCTGAGCCATTCACACATCTTCAC  
CCTCAGTTTCCTCACTTGAGGAGTGGGATGGGGAGAACAGAGAGTAGCTGTGTTTGAAT  
20 CCCTGTAGGAAATGGTGAAGCATAGCTCTGGGTCTCCTGGGGGAGACCAGGCTTGGCT  
GCGGGAGAGCTGGCTGTTGCTGGACTACATGCTGGCCACTGCTGTGACCACGACACTG  
CTGGGGCAGCTTCTTCCACAGTGATGCCTACTGATGCTTCAGTGCCTCTGCACACCGCC  
CATTCCACTTCCTCCTTCCCCACAGGGCAGGTGGGGAAGCAGTTTGGCCCAGCCCAAG  
GAGACCCACCTTGAGCCTTATTTCTAATGGGTCCACCTCTCATCTGCATCTTTCACAC  
25 CTCCCAGCTTCTGCCCAACCTTCAGCAGTGACAAGTCCCCAAGAGACTCGCCTGAGCA  
GCTTGGGCTGCTTTTCATTTCCACCTGTCAGGATGCCTGTGGTCATGCTCTCAGCTCCA  
CCTGGCATGAGAAGGGATCCTGGCCTCTGGCATATTCATCAAGTATGAGTTCTGGGGAT  
GAGTCACTGTAATGATGTGAGCAGGGAGCCTTCCCTCCCTGGGCCACCTGCAGAGAGCT  
TTCCCACCAACTTTGTACCTTGATTGCCTTACAAAGTTATTTGTTTACAAACAGCGACCAT  
30 ATAAAAGCCTCCTGCCCAAAGCTTGTGGGCACATGGGCACATACAGACTCACATACAG  
ACACACACATATATGTACAGACATGTA CTCTCACACACACAGGCACCAGCATAACACAG  
TTTTTCTAGGTACAGCTCCCAGGAACAGCTAGGTGGGAAAGTCCCATCACTGAGGGAG  
CCTAACCATGTCCCTGAACAAAATTGGGCACTCATCTATTCTTTCTCTTGTGTCCCT  
ACTCATTGAAACCAA ACTCTGGAAAGGACCCAATGTACCAGTATTTATACCTCTAATGAA  
35 GCACAGAGAGAGGAAGAGAGCTGCTTAAACTCACACAACAATGAACTGCAGACACAGC  
TGTTCTCTCCCTCTCTCCTTCCCAGAGCAATTTATACTTTACCCTCAGGCTGTCCTCTGG

GGAGAAGGTGCCATGGTCTTAGGTGTCTGTGCCCCAGGACAGACCCTAGGACCCTAAA  
 TCCAATAGAAAATGCATATCTTTGCTCCACTTTCAGCCAGGCTGGAGCAAGGTACCTTTT  
 CTTAGGATCTTGGGAGGGAATGGATGCCCTCTCTGCATGATCTTGTTGAGGCATTTAG  
 CTGCCATGCACCTGTCCCCCTTTAATACTGGGCATTTTAAAGCCATCTCAAGAGGCATCT  
 5 TCTACATGTTTTGTACGCATTAATAAATTTCAAAGATATCTGAGAAAAGCCGATATTTGC  
 CATTCTTCCTATATCCTGGAATATATCTTGCATCCTGAGTTTATAATAATAAATAATTCT  
 ACCTTGAAA

SEQ ID NO: 12:

MRPDRAEAPGPPAMAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAAD  
 10 WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLELLTKLGRDDVLELGP  
 SIEEDCQKYILKQQEAEKPLQVAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCPS  
 DIQFVQEMIRQLEQTNYRLKLCVSDRDVLPGTCVWSIASAAGWWWLSLMITCRARNVTSRP  
 NLHSASLQVPIRS

SEQ ID NO: 13:

AGACAATGCGACCCGACCGCGCTGAGGCTCCAGGACCGCCCGCCATGGCTGCAGGAG  
 15 GTCCCGGCGCGGGGTCTGCGGCCCGGTCTCCTCCACATCCTCCCTTCCCCTGGCTG  
 CTCTCAACATGCGAGTGCGGCGCCGCTGTCTCTGTTCTTGAACGTGCGGACACAGGT  
 GGCGGCCGACTGGACCGCGCTGGCGGAGGAGATGGACTTTGAGTACTTGGAGATCCG  
 GCAACTGGAGACACAAGCGGACCCCACTGGCAGGCTGCTGGACGCCTGGCAGGGACG  
 20 CCCTGGCGCCTCTGTAGGCCGACTGCTCGAGCTGCTTACCAAGCTGGGCCGCGACGA  
 CGTGCTGCTGGAGCTGGGACCCAGCATTGGGCATATGCCTGAGCGTTTTCGATGCCTTC  
 ATCTGCTATTGCCCCAGCGACATCCAGTTTGTGCAGGAGATGATCCGGCAACTGGAACA  
 GACAACTATCGACTGAAGTTGTGTGTGTCTGACCGCGATGCCTGCCTGGCACCTGTG  
 TCTGGTCTATTGCTAGTGCCGCCGGATGGTGGTGGTTGTCTCTGATGATTACCTGCAGA  
 25 GCAAGGAATGTGACTTCCAGACCAAATTTGCACTCAGCCTCTCTCCAGGTGCCCATCAG  
 AAGCGACTGATCCCCATCAAGTACAAGGCAATGAAGAAAGAGTTCCCCAGCATCCTGAG  
 GTTCATCACTGTCTGCGACTACACCAACCCCTGCACCAAATCTTGGTTCTGGACTCGCC  
 TTGCCAAGGCCTTGTCCCTGCCCTGAAGACTGTTCTGAGGCCCTGGGTGTGTGTGTATC  
 TGTCTGCCTGTCCATGTACTTCTGCCCTGCCTCCTCTTTCGTTGTAGGAGGAATCTGT  
 30 GCTCTACTTACCTCTCAATTCCTGGAGATGCCAACTTCACAGACACGTCTGCAGCAGCT  
 GGACATCACATTTTCATGTCCTGCATGGAACCAGTGGCTGTGAGTGGCATGTCCAATTGC  
 TGGATTATCAGCCAGGACACTATAGAACAGGACCAGCTGAGACTAAGAAGGACCAGCA  
 GAGCCAGCTCAGCTCTGAGCCATTCACACATCTTCACCCTCAGTTTCTCACTTGAGGA  
 GTGGGATGGGAGAACAGAGAGTAGCTGTGTTTGAATCCCTGTAGGAAATGGTGAAGC

ATAGCTCTGGGTCTCCTGGGGGAGACCAGGCTTGGCTGCGGGAGAGCTGGCTGTTGC  
TGGACTACATGCTGGCCACTGCTGTGACCACGACACTGCTGGGGCAGCTTCTTCCACA  
GTGATGCCTACTGATGCTTCAGTGCCTCTGCACACCGCCCATTCCACTTCCTCCTTCCC  
CACAGGGCAGGTGGGGAAGCAGTTTGGCCAGCCCAAGGAGACCCACCTTGAGCCT  
5 TATTTCCCTAATGGGTCCACCTCTCATCTGCATCTTTCACACCTCCCAGCTTCTGCCAAC  
CTTCAGCAGTGACAAGTCCCAAGAGACTCGCCTGAGCAGCTTGGGCTGCTTTTCATTT  
CCACCTGTCAGGATGCCTGTGGTCATGCTCTCAGCTCCACCTGGCATGAGAAGGGATC  
CTGGCCTCTGGCATATTCATCAAGTATGAGTTCTGGGGATGAGTCACTGTAATGATGTG  
AGCAGGGAGCCTTCCCTCCCTGGGCCACCTGCAGAGAGCTTTCCACCAACTTTGTACC  
10 TTGATTGCCTTACAAAGTTATTTGTTTACAAACAGCGACCATATAAAAGCCTCCTGCCCC  
AAAGCTTGTGGGCACATGGGCACATACAGACTCACATACAGACACACATATATGTAC  
AGACATGTA CTCTCACACACACAGGCACCAGCATAACACACGTTTTTCTAGGTACAGCTC  
CCAGGAACAGCTAGGTGGGAAAGTCCCATCACTGAGGGAGCCTAACCATGTCCCTGAA  
CAAAAATTGGGCACTCATCTATTCTTTTCTCTTGTGTCCCTACTCATTGAAACCAAACCTC  
15 TGGAAAGGACCCAATGTACCAGTATTTATACCTCTAATGAAGCACAGAGAGAGGAAGAG  
AGCTGCTTAAACTCACACAACAATGAACTGCAGACACAGCTGTTCTCTCCCTCTCTCCTT  
CCCAGAGCAATTTATACTTTACCCTCAGGCTGTCCTCTGGGGAGAAGGTGCCATGGTCT  
TAGGTGTCTGTGCCCCAGGACAGACCCTAGGACCCTAAATCCAATAGAAAATGCATATC  
TTTGCTCCACTTTCAGCCAGGCTGGAGCAAGGTACCTTTTCTTAGGATCTTGGGAGGGA  
20 ATGGATGCCCTCTCTGCATGATCTTGTTGAGGCATTTAGCTGCCATGCACCTGTCCCC  
CTTTAATACTGGGCATTTTAAAGCCATCTCAAGAGGCATCTTCTACATGTTTTGTACGCA  
TTAAAATAATTTCAAAGATATCTGAGAAAAGCCGATATTTGCCATTCTTCCTATATCCTGG  
AATATATCTTGCATCCTGAGTTTATAATAATAAATAATATTCTACCTTGAAA

SEQ ID NO: 14:

25 MRPDRAEAPGPPAMAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAAD  
WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLELGP  
SIGHMPERFDAFICYCPSDIQFVQEMIRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPGTCVWSIASAAGW  
WWLSLMITCRARNVTSRPNLHSASLQVPIRSD

SEQ ID NO: 15:

30 CACTTTCGAGAGTGCCGTCTATTTGCCACACACTTCCCTGATGAAATGTCTGGATTTGGA  
CTAAAGAAAAAAGGAAAGGCTAGCAGTCATCCAACAGAATCATGAGACAGACTTTGCCT  
TGTATCTACTTTTGGGGGGCCTTTTGCCCTTTGGGATGCTGTGTGCATCCTCCACCAC  
CAAGTGCCTGTTAGCCATGAAGTTGCTGACTGCAGCCACCTGAAGTTGACTCAGGTAC  
CCGATGATCTACCCACAAACATAACAGTGTTGAACCTTACCCATAATCAACTCAGAAGAT

TACCAGCCGCCAACTTCACAAGGTATAGCCAGCTAACTAGCTTGGATGTAGGATTTAAC  
ACCATCTCAAACCTGGAGCCAGAATTGTGCCAGAACTTCCCATGTTAAAAGTTTTGAAC  
CTCCAGCACAATGAGCTATCTCAACTTTCTGATAAAACCTTTGCCTTCTGCACGAATTTG  
ACTGAACTCCATCTCATGTCCAACCTCAATCCAGAAAATTAATAATCCCTTTGTCAAG  
5 CAGAAGAATTTAATCACATTAGATCTGTCTCATAATGGCTTGTCTACATAAAAATTAGGAA  
CTCAGGTTTCCAGCTGGAAAATCTCCAAGAGCTTCTATTATCAAACAATAAAAATTCAAGCGC  
TAAAAGTGAAGAACTGGATATCTTTGCCAATTCATCTTTAAAAAAATTAGAGTTGTCTATC  
GAATCAAATTAAGAGTTTTCTCCAGGGTGTTCACGCAATTGGAAGATTATTTGGCCT  
CTTTCTGAACAATGTCCAGCTGGGTCCAGCCTTACAGAGAAGCTATGTTTGGAAATTAG  
10 CAAACACAAGCATTCCGAATCTGTCTCTGAGTAACAGCCAGCTGTCCACCACCAGCAAT  
ACAACCTTTCTTGGGACTAAAGTGGACAAATCTCACTATGCTCGATCTTTCCTACAACAAC  
TTAAATGTGGTTGGTAACGATTCCTTTGCTTGGCTTCCACAACCTAGAATATTTCTTCTAG  
AGTATAATAATATACAGCATTGTTTTCTCACTCTTTGCACGGGCTTTTCAATGTGAGGTA  
CCTGAATTTGAAACGGTCTTTTACTAAACAAAGTATTTCCCTTGCCTCACTCCCCAAGAT  
15 TGATGATTTTTCTTTTTCAGTGGCTAAAATGTTTGGAGCACCTTAACATGGAAGATAATGAT  
ATTCCAGGCATAAAAAGCAATATGTTTACAGGATTGATAAACCTGAAATACTTAAGTCTA  
TCCAACCTCTTTACAAGTTTGCGAACCTTTGACAAATGAAACATTTGTATCACTTGCTCATT  
CTCCCTTACACATACTCAACCTAACCAAGAATAAAAATCTCAAAAATAGAGAGTGATGCTT  
TCTCTTGGTTGGGCCACCTAGAAAGTACTTGACCTGGGCTTAATGAAATTGGGCAAGAA  
20 CTCACAGGCCAGGAATGGAGAGGTCTAGAAAATATTTTCGAAATCTATCTTTCTACAAC  
AAGTACCTGCAGCTGACTAGGAACTCCTTTGCCTTGGTCCCAAGCCTTCAACGACTGAT  
GCTCCGAAGGGTGGCCCTTAAAAATGTGGATAGCTCTCCTTACCATTCCAGCCTCTTC  
GTAACCTGACCATTCTGGATCTAAGCAACAACAACATAGCCAACATAAATGATGACATGT  
TGGAGGGTCTTGAGAACTAGAAATTCTCGATTTGCAGCATAACAACCTTAGCACGGCTC  
25 TGAAACACGCAAACCCTGGTGGTCCCATTTATTTCTAAAGGGTCTGTCTCACCTCCA  
CATCCTTAACTTGGAGTCCAACGGCTTTGACGAGATCCAGTTGAGGTCTTCAAGGATT  
TATTTGAACTAAAGATCATCGATTTAGGATTGAATAATTTAAACACACTTCCAGCATCTGT  
CTTTAATAATCAGGTGTCTCTAAAGTCATTGAACCTTCAAGAAGATCTCATAACATCCGTT  
GAGAAGAAGGTTTTCGGGCCAGCTTTTCCAGAACCTGACTGAGTTAGATATGCGCTTTAA  
30 TCCCTTTGATTGCACGTGTGAAAGTATTGCCTGGTTTTGTTAATTGGATTAACGAGACCCA  
TACCAACATCCCTGAGCTGTCAAGCCACTACCTTTGCAACACTCCACCTCACTATCATG  
GGTCCCAGTGAGACT

TTTTGATACATCATCTTGCAAAGACAGTGCCCCCTTTGAACTCTTTTTTCATGATCAATACC  
AGTATCCTGTTGATTTTTATCTTTATTGTAATTCTCATCCACTTTGAGGGCTGGAGGATAT  
35 CTTTTTATTGGAATGTTTTCAGTACATCGAGTTCTTGGTTTTCAAAGAATAGACAGACAGA

CAGAACAGTTTGAATATGCAGCATATATAATTCATGCCTATAAAGATAAGGATTGGGTCT  
 GGAACATTTCTCTTCAATGGAAAAGGAAGACCAATCTCTCAAATTTTGTCTGGAAGAAA  
 GGGACTTTGAGGCGGGTGTTTTTGAACTAGAAGCAATTGTTAACAGCATCAAAAAGAAGC  
 AGAAAAATTATTTTTGTTATAACACACCATCTATTAAGACCCATTATGCAAAAGATTCA  
 5 AGGTACATCATGCAGTTCAACAAGCTATTGAACAAAATCTGGATTCCATTATATTGGTTTT  
 CCTTGAGGAGATTCCAGATTATAAACTGAACCATGCACTCTGTTTGCGAAGAGGAATGTT  
 TAAATCTCACTGCATCTTGAAGTGGCCAGTTCAGAAAGAACGGATAGGTGCCTTTTCGTC  
 ATAAATTGCAAGTAGCACTTGGATCCAAAACTCTGTACATTAATTTATTTAAATATTCA  
 ATTAGCAAAGGAGAACTTTCTCAATTTAAAAAGTTCTATGGCAAATTTAAGTTTTCCATA  
 10 AAGGTGTTATAATTTGTTTATTCATATTTGTAATGATTATATTCTATCACAATTACATCTC  
 TTCTAGGAAAATGTGTCTCCTTATTTGAGGCCTATTTTTGACAATTGACTTAATTTTACCC  
 AAAATAAACATATAAGCACGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 16:

MRQTLPCIYFWGGLLPFGMLCASSTTKCTVSHEVADCSHLKLTQVPDDLPTNITVLNLTHNQ  
 15 LRRLPANFTRYSQLTSLDVGFNTISKLEPELCQKLPMLKVLNLQHNELSQLSDKTFACFCTNL  
 TELHLMSNSIQKIKNNPFVKQKNLITLDLSHNGLSSTKLGTVQVLENLQELLSNNKIQALKSE  
 ELDIFANSSLKKLELSSNQIKEFSPGCFHAIGRLFGLFLNNVQLGPSLTEKLCLELANTSIRNL  
 SLSNSQLSTTSNTTFLGLKWTNLTMLDLSYNNLNVVGNDSFAWLPQLEYFFLEYNNIQHLFS  
 HSLHGLFNVRYLNLKRSFTKQSLASLPKIDDFSFQWLKCLEHLNEMEDNDIPGIKSNMFTGL  
 20 INLKYSLSNSFTSLRTLNETFVSLAHSPLHILNLTKNKISKIESDAFSWLGHLEVLDLGLNEI  
 GQELTGQEWRGLENIFEIYLSYNKYQLTRNSFALVPSLQRLMLRRVALKNVDSSPSPFQPL  
 RNLTILDLSNNNIANINDDMLEGLEKLEILDQLHNNLARLWKHANPGGPIYFLKGLSHLHILNL  
 ESNGFDEIPVEVFKDLFELKIIDLGLNNLNTLPASVFNNQVSLKSLNLQKNLITSVEKKVFGPA  
 FRNLTELDMRFPDCTCESIAWFVNWNETHTNIPELSSHLYCNTPPHYHGFPVRLFDTSS  
 25 CKDSAPFELFFMINTSILLIFIVLLIHFEGWRISFYWNVSVHRVLGFKEDRQTEQFEYAAAYII  
 HAYKDKDWWWEHFSSMEKEDQSLKFCLEERDFEAGVFELEAIVNSIKRSRKIIFVITHLLKD  
 PLCKRFKVVHAVVQQAIEQNLDLSIILVFLEEIPDYKLNHALCLRRGMFKSHCILNWPVQKERIG  
 AFRHKLQVALGSKNSVH

SEQ ID NO: 17:

30 GACGACGTGCTGCTGGAG

SEQ ID NO: 18:

GAAGGCATCGAAACGCTCAGG

SEQ ID NO: 19:

AGAGTGCCGTCTATTTGCCA

SEQ ID NO: 20:

GTGGTGGAGGATGCACACAG

- 5 Un **quinto aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la ELA.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de una secuencia conocida o ARNm de los genes *MYD88* y *TLR3*. Más  
10 preferiblemente las secuencias de los genes *MYD88* y *TLR3* son las secuencias nucleotídicas correspondientes indicadas en la tabla 1.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos pueden ser construidas en la superficie un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3'  
15 mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

Así, las sondas de oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30  
20 nucleótidos.

La síntesis *in situ* sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse a, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda  
25 es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: ARN mensajero, ARN total, un fragmento de PCR, etc.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray de la invención presenta oligonucleótidos modificados, como se han descrito anteriormente en el cuarto aspecto de la invención..

- 30 Otro **aspecto** de la invención se refiere a un microarray de proteínas, de ahora en adelante microarray de proteínas de la invención, que comprende anticuerpos o fragmentos de los

mismos específicos frente a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 y/o SEQ ID NO: 16 o frente a secuencias aminoacídicas que presenten un grado de identidad con dichas secuencias aminoacídicas de, al menos del 85%, típicamente de, al menos del 90%,  
5 preferiblemente de, al menos del 95%, más preferiblemente de, al menos del 98%, aún más preferiblemente de, al menos del 99%. Las sondas son anticuerpos fijados a portaobjetos de vidrio y los blancos son muestras de suero o tejido.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray de proteínas de la invención presenta anticuerpos modificados, como se han descrito anteriormente en el  
10 cuarto aspecto de la invención.

Otro **aspecto** de la invención se refiere al uso del microarray de la invención, para la obtención de datos útiles diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la ELA.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el procedimiento  
15 de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar constituida  
20 por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor,  
25 una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

30 La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier

otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN ó DNA).

Una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base modificados, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N<sup>6</sup>-metil-adenina, N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N<sup>6</sup>-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido

nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

En la presente invención se entiende por variante o fragmento biológicamente activo, aquellas variantes o fragmentos de los péptidos indicados que tienen un efecto fisiológico, metabólico o inmunológico igual, o presentan la misma utilidad que los descritos. Esto es, son funcionalmente equivalentes. Dichos efectos se pueden determinar mediante métodos convencionales.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25

## EJEMPLO DE LA INVENCION

### ***Materiales y métodos***

#### *Ligandos TLR*

El lipopolisacárido de *Escherichia coli* serotipo 0127: B (LPS) se obtuvo de Sigma Aldrich (St. Louis, EE.UU.). Los demás ligandos de TLR se adquirieron de InvivoGen (San Diego, EE.UU.) y se prepararon de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los ligandos de TLR fueron: oligonucleótido tipo CpG B ODN 1688 (CpG), poli-inosina/acido policitidílico

de bajo peso molecular (poli (I:C-LMW)) (Poli I:C), ácido lipoteicoico de *B. subtilis* (LTA), lipoproteína sintética bacteriana Pam3Csk4 (Pam3), lipoproteína sintética derivada de *Mycoplasma* (FSL-1), peptidoglicano de *B. subtilis* (PGN), e imiquimod (Imiq).

#### *Preparación de cultivos de PBMC humanas y estimulación de TLR*

- 5 La sangre periférica se obtuvo por punción venosa de cada paciente y cada control sano. La sangre se extrajo y se recogió en el Tubo para Preparación Celular Vacutainer® CPT™ (BD, Bioscience, San Diego, CA, EE.UU.) con heparina sódica; las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, por centrifugación a 18.500 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. El número de
- 10 células PBMCs se determinó haciendo un recuento en un hemocitómetro y se sembraron 10<sup>6</sup> células / pocillo en un volumen final de 1.000 µl de medio RPMI-1640 completo con 10% de FBS inactivado, en placas de 12 pocillos. Las PBMCs se trataron durante 24 h con el ligando específico de TLR en concentraciones ya utilizadas previamente (Roodveldt *et al.*, 2013. *PLoS One* 8: e79160), y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>.
- 15 Las concentraciones finales de los ligandos de TLR fueron: LPS: 1 µg/ml de CpG: 1 µg/ml, y Pam3: 300 ng/ml.

#### *Cría y mantenimiento de ratones*

- Los ratones B6SJL-Tg (SOD-G93A) 1Gur/J, se obtuvieron del Laboratorio Jackson (código del stock 002726). La colonia se inició y se mantuvo en instalaciones para animales de
- 20 CABIMER facilitando el apareamiento de los machos hemicigotos con hembras híbridas B6SJL/F1, también adquiridas en Jackson Labs (código del stock 100012). Los animales se mantuvieron en SPF con agua y comida *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados en los animales se aprobaron por el Comité de Ética para experimentación animal de CABIMER (CEEA-CABIMER) con número CEEA 25-2010 ELA.

#### *Genotipado de ratón*

- Para buscar los animales que contaban con la presencia del transgén hSOD1, se realizó PCR multiplex para el ADN genómico extraído de la cola de los ratones por el método de fenol-cloroformo. Los cebadores específicos usados para la amplificación del transgén hSOD1 fueron G93A (*forward* 5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA - 3' y *reverse*, 5'-CGC
- 30 GAC TAA CAA TCA TGA AAG - 3') y para el control interno IL-2 (*forward* 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT - 3', *reverse* 5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C - 3'). La polimerasa Mytaq (Bioline, Londres, Reino Unido) se utilizó para la amplificación, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR se visualizaron con

bromuro de etidio en geles de agarosa y se documentaron mediante fotografía. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95 °C durante 3' y 35 ciclos de 95 °C durante 15 seg, 55 °C durante 15 seg, 72 °C durante 10 seg.

#### *Evaluación del número de copias del Transgén*

5 Teniendo en cuenta que en el modelo de SOD1-G93A, las variaciones en el número de copias tienen un impacto directo en el tiempo de inicio de la enfermedad y la progresión, para cada animal empleado se averiguó el número de copias hSOD1. Se realizaron PCR cuantitativas siguiendo un protocolo modificado a partir de los descritos por Jackson Labs y (Alexander et al., 2004. *Brain research. Molecular brain research* 130: 7-15). El conjunto de  
10 primers fueron los mismos que los utilizados para una PCR convencional. Los controles comparativos consistieron en ADN genómico a partir de animales con tiempos de inicio de la enfermedad y de supervivencia conocidas, se utilizaron para comparar frente a las muestras desconocidas. El ADN genómico de animales G93A positivos se cuantificó en Nanodrop. La amplificación se realizó utilizando el kit SYBR SensiFAST Lo-ROX. Las condiciones de PCR  
15 fueron las siguientes: 95 °C durante 10' y 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 35 seg, 72 °C durante 32 seg, en un termociclador FAST Real-Time PCR S7500 de *Applied Biosystems*.

#### *Preparación y estimulación de TLR de cultivos celulares de esplenocitos*

El estudio se realizó en tres momentos o puntos de edad utilizando ratones B6SJL-TG  
20 (SOD-G93A)1Gur A/J: pre-sintomático (8 semanas de edad), sintomático (12 semanas de edad) y avanzado (16 semanas de edad). Los ratones control utilizados fueron animales no portadores (NC) de la misma colonia. Se utilizaron cinco ratones por grupo experimental (N = 5). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical anterior inyectando una dosis *pre-mortem* de anestesia. Los esplenocitos se aislaron del bazo de los ratones siguiendo un  
25 protocolo de perfusión estándar, como se ha descrito previamente (Labrador-Garrido *et al.*, 2015. In *Immun. Inflamm. Dis.* 226-238). El número total de células se determinó mediante recuento con un hemocitómetro y  $10^6$  células se sembraron en placas de 24 pocillos en un volumen final de 1.000 µl de medio RPMI-1640 completo con 10% de FBS inactivado, en cada pocillo. Los esplenocitos se trataron durante 24 h con los ligandos específicos de TLR.  
30 Los ligandos de TLR se utilizaron a concentraciones finales estándar (Roodveldt *et al.*, 2013. *PLoS One* 8: e79160) y fueron las siguientes: LPS: 1 µg/ml, CpG: 1 µg/ml, Poly I: C: 50 µg/ml, LTA: 10 µg/ml, Pam3: 300 ng/ml FSL-1: 1 µg/ml PGN: 10 µg/ml, y Imiq: 1 µg/ml.

#### *Medidas de liberación de citoquinas*

Los sobrenadantes de células PBMCs y los esplenocitos se recogieron y se centrifugaron a 500 g durante 5 min, 24 h después del tratamiento. Las muestras se almacenaron a -80 °C antes de medir los niveles de citoquinas. La producción de IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  se determinaron por ELISA mediante el uso de OptEIA de ratón IL-6, IL-10 y sets IFN- $\gamma$  de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.).

#### *Determinación de los niveles de expresión de TLR y del gen MyD88 en ratones SOD1\*G93A*

Los niveles de expresión de los genes de ratón TLRs 2, 3, 4 y MyD88, y para hipoxantina-fosforibosiltransferasa (HPRT), se determinaron mediante el uso de un método de PCR (qRT-PCR) cuantitativa en tiempo real. El estudio se realizó en tres momentos de edad usando ratones B6SJL-Tg (SOD\*G93A)1Gur/J: presintomático (8 semanas de edad), sintomáticos (12 semanas de edad) y la etapa avanzada (16 semanas de edad). Los ratones *wild-type* utilizados fueron animales no portadores (NC) de la misma colonia. El ARN total de esplenocitos se extrajo utilizando el *Easy Blue™ Total RNA Extraction Kit* (iNtRON Biotechnology Kyungki-Do, Corea) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN (1  $\mu$ g) se transcribió de manera inversa utilizando el *kit Quantitect Reverse Transcription* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La QRT-PCR se realizó con el kit SensiFAST™ SYBR Lo-ROX (Bioline, Londres, Reino Unido) en un ABI Prism 7500 Real Time PCR System. Los pares de primer fueron diseñados para hibridar en diferentes exones, y fueron: HPRTex3\_For: 5'-GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC-3'; HPRTex7 Rev: 5'-CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA-3'. TLR4 y MyD88 que fueron adquiridos de Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y fueron los siguientes: Para TLR4: 5'-ACCAGGAAGCTTGAATCCCT-3' (exón 1); TLR4 Rev: 5'-TCCAGCCACTGAAGTTCTGA-3' (exón 2); MyD88\_For: 5'-AGAGCTGCTGGCCTTGTTAG-3' (exón 1); MyD88\_Rev: 5'-TCATCTCCTGCACAAACTCG-3' (exón 3). Los cebadores TLR2 y TLR3 se adquirieron de Qiagen (Hilden, Alemania) y fueron: TLR2 (exón 2/3) Cat. No.: QT00129752; TLR3 (exón 4/5) Cat. No.: QT00122983. Las transcripciones múltiples fueron analizadas simultáneamente durante 40 ciclos utilizando un perfil térmico de QRT-PCR. El procesamiento optimizado de los datos se realizó con el software 7500 Real Time PCR Software v2.0.6 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Los cambios en la expresión génica se determinaron utilizando el valor  $\Delta$ Ct tomando *hpert* como control endógeno. Los valores  $\Delta\Delta$ Ct se calcularon restando la media de  $\Delta$ Ct de muestras de ratones *wild-type* de las muestras de ratones  $\Delta$ Ct de SOD1\*G93A en cada momento de edad.

#### *Determinación de la expresión génica de TLR y MyD88 en PBMCs humanas de pacientes con ELA*

Los niveles de expresión de los genes para TLR 2, 3 y MyD88, y para ciclofilina B, se determinaron mediante usando un método de PCR (qRT-PCR) cuantitativa en tiempo real. El estudio se realizó en 5 pacientes con ELA avanzada, 4 pacientes con ELA temprana (como se detalla más arriba), y 5 controles sanos emparejados por edad. El ARN total de PBMCs fue extraído utilizando el Easy Blue™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology Kyungki-Do, COREA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN (1µg) se transcribió de manera reversa utilizando el Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El QRT-PCR se realizó con el kit SensiFAST™ SYBR Lo-ROX (Bioline, Londres, Reino Unido) en un ABI Prism 7500 Real Time PCR System. Los pares de cebadores se diseñaron para hibridarse en diferentes exones, y fueron: ciclofilina B For: 5'-CTTCCCCGATGAGAACTTCA-3' (exón 4), ciclofilina B\_Rev: 5'-TCTTGGTGCTCTCCACCTTC-3' (exón 5). Los cebadores TLR2, TLR3 y MyD88 se adquirieron de Sigma (Sigma-Aldrich, St Louis, EE.UU.) y fueron: TLR2\_For: 5'-CTCGGAGTTCTCCCAGTGTT-3' (exón 1), TLR2\_Rev: 5'-CAAGACCCACACCATCCACA-3' (exón 3), TLR3\_For: 5'-AGAGTGCCGTCTATTTGCCA-3' (exón 1), TLR3\_Rev: 5'-GTGGTGGAGGATGCACACAG-3' (exón 2), MyD88e\_For: 5'-GACGACGTGCTGCTGGAG-3' (exón 1), MyD88\_Rev: 5'-GAAGGCATCGAAACGCTCAGG-3' (exón 3). Las transcripciones múltiples fueron analizadas simultáneamente durante 40 ciclos utilizando un perfil térmico de QRT-PCR. El procesamiento optimizado de los datos se realizó con el software 7500 Real Time PCR Software v2.0.6 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Los cambios en la expresión génica se determinaron utilizando el valor  $\Delta Ct$  teniendo ciclofilina B como control endógeno. Los valores  $\Delta\Delta Ct$  se calcularon restando la media  $\Delta Ct$  de sujetos sanos de la  $\Delta Ct$  de pacientes con ELA.

#### *Análisis estadístico*

Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. La evaluación estadística se realizó utilizando el paquete de software de IBM SPSS Statistics (v20). Con el fin de determinar las diferencias entre los grupos y para obtener los valores de  $p$  se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para dos grupos independientes/muestras (\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.005$ ).

#### **Resultados**

*Las PBMCs de pacientes con ELA en "fase avanzada" son hiposensibles a estimulación de TLR2/4/9*

Con el objetivo de evaluar la respuesta de las células inmunes periféricas a la estimulación de TLR en el contexto de la ELA, se comparó la respuesta de citoquinas de PBMCs humanas de pacientes con ELA 'temprano' o 'avanzado' frente a los controles sanos, después de la estimulación *in vitro* de las células con ligandos de TLR. Existen estudios  
5 previos que han descrito niveles sobrerregulados de señalización de genes asociados a TLR4 en PBMCs en pacientes con ELA (Zhang *et al.*, 2011. *J. Neuroimmunol.* 230: 114-123.) y el aumento de los niveles de expresión de TLR2 en médulas espinales de ratones transgénicos (G93A SOD1; Lincecum *et al.*, 2010. *Nature genetics* 42: 392-399), lo que sugiere una posible implicación de TLR4 y TLR2 en la inmunidad innata periférica asociada  
10 a la ELA. Por tanto, se eligieron para realizar los test al LPS y Pam3Csk4 que imitan a la infección bacteriana como agonistas específicos de los receptores de la superficie celular TLR4 y TLR2/1, respectivamente, y CpG, un sustituto de virus, como un ligando específico para el receptor de TLR9 intracelular.

Después de aislar PBMCs de pacientes humanos con ELA y de controles sanos  
15 emparejados por edad, se estimularon las células cultivadas, alternativamente, con cada agonista de TLR y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Los sobrenadantes clarificados procedentes de estos cultivos se recuperaron para ensayar cuantitativamente por ELISA los niveles de tres citoquinas secretadas claves de la inmunidad periférica asociados al ELA. Los sobrenadantes de las células incubadas en ausencia de agonista de TLR añadido se  
20 utilizaron para cuantificar los niveles de citoquinas basales para cada individuo. De acuerdo con estudios anteriores, se encontró un aumento de los niveles IL-6 en la sangre de los pacientes con "ELA avanzado" en etapas tardías de la enfermedad. Se observó una tendencia mayor en los niveles de secreción de IL-6 e IL-10 en pacientes con 'ELA avanzado' de 1,2- y 1,4 veces en comparación con los pacientes con "ELA temprano", y con  
25 los controles sanos, respectivamente, que no alcanzaron significación estadística. Curiosamente, se midió una tendencia de aumento de la secreción de 2 veces en el IFN- $\gamma$  de PBMC p "ELA temprana" en comparación con ambos grupos "ELA avanzado" y sanos, que no alcanzaron significación estadística.

Con el fin de estudiar la respuesta inmune periférica a la estimulación de TLR en el contexto  
30 de ELA temprano y en progresión, se utilizó como referencia el nivel basal de citoquina para cada grupo experimental para determinar los "factores de cambio" en la secreción de citoquinas después de la estimulación de TLR de las células cultivadas (Figura 1). Mientras que la estimulación de PBMCs con ligandos LPS y Pam3 produjo respuestas significativas de IL-6 para grupos sanos y con "ELA temprana" de ca. 2,0-2,5 veces, respectivamente, se  
35 obtuvo una respuesta menor a la estimulación TLR para PBMCs de pacientes con "ELA

avanzada" (aproximadamente 1.6 a 1.7 veces). Un perfil similar pero más claro se obtuvo para IFN- $\gamma$ , donde el ca. 1,9- a 2,7 veces se midieron los niveles más altos de células estimuladas con LPS, Pam3- o CpG de individuos sanos y "ELA temprana", mientras que no se observó respuesta significativa para ninguno de los agonistas de TLR en el caso del grupo de pacientes con "ELA avanzada" (Figura 1). Además, mientras que los incrementos fueron significativos en los niveles secretados de IL-10 medidos en las células de sujetos "sanos" (ca. 3.0- y 2.6 veces) y con "ELA temprana" (ca. de 3,5 y 2,8 veces) como resultado de la estimulación con LPS y pAM3, no se observó respuesta en PBMCs de pacientes con "ELA avanzada" (Figura 1). En conjunto, nuestros resultados indican que, a pesar de la tendencia observada hacia niveles secretores basales más altos de IL-6 e IL-10 en células PBMCs de fases avanzadas de ELA, las células PBMCs de pacientes en fase avanzada de la enfermedad son hiposensibles a la estimulación de TLR con ligandos de LPS (TLR4), Pam3 (TLR2/1), o CpG (TLR9), en comparación con las células periféricas de sujetos sanos o pacientes en fase temprana de la enfermedad de ELA.

15 *Las PBMCs de pacientes con ELA "fase avanzada" son hiposensibles a la estimulación de TLR dependiente de MyD88*

A continuación se estudió el perfil de secreción de citoquinas por estimulación de TLR de esplenocitos aislados de ratones (SOD1 G93A) Tg como un modelo estándar de la ELA. Se midieron los niveles secretados de IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-10 a partir de los esplenocitos cultivados de ratones con ELA (o controles NC) a las 8 semanas (pre-sintomática), 12 semanas (sintomática), y 16 semanas de edad (última etapa). De acuerdo con nuestros hallazgos en humanos, las medidas de los niveles basales de secreción de IL-6 e IFN- $\gamma$  (pero no IL-10) mostraron una tendencia de aumento no significativa en los ratones Tg en comparación con los controles NC, a las 12 y 16 semanas de edad (Tabla II). Sobre la base de las diferencias observadas en este estudio entre la respuesta de TLR2/4/9 de las células PMBC en etapas avanzadas de la ELA en los seres humanos, se realizó un análisis de la respuesta de las citoquinas como resultado de la estimulación de TLR de esplenocitos cultivados, con un conjunto más amplio de agonistas de TLR: ligandos bacterianos de receptores TLR de superficie celular, LPS (TLR4), Pam3 (TLR 2/1), LTA (TLR2), PGN (TLR2), y FSL-1 (TLR 2 y 25 TLR6) (Figura 2A-E), e IMIQ (TLR7), CpG (TLR9), y polyI:C (TLR3) ligandos víricos de los receptores TLR intracelulares (Figura 2F-H).

Los resultados del estudio usando agonistas de TLRs de la superficie celular (Figura 2A-E) mostraron que mientras que la estimulación con el ligando FSL-1 como *Mycoplasma* no produjo diferencias significativas en la respuesta de citoquinas de los esplenocitos de

ratones Tg entre los grupos y NC (tal como se mide por el cambio de respuesta relativa a las células no estimuladas), la estimulación de los ratones Tg con LPS produjo respuestas más bajas que los ratones NC para IFN- $\gamma$  ( $14,5 \pm 1,6$  vs.  $21,4 \pm 2,1$  veces a las 8 semanas y  $13,9 \pm 3,75$  vs.  $41,6 \pm 13,8$  veces a las 12 semanas), mientras que Pam3 produce perfiles similares a IFN- $\gamma$  ( $1,4 \pm 0,36$  vs.  $6,5 \pm 1,2$  veces a las 16 semanas), en consonancia con los resultados observados en las células humanas de pacientes con ELA en el etapa avanzada de la enfermedad. Además, PGN también produjo respuestas más bajas en los ratones Tg, medida por IL-6 ( $17 \pm 0,3$  vs.  $22,2 \pm 0,4$  veces, a las 16 semanas) e IFN- $\gamma$  ( $0,5 \pm 0,03$  vs.  $1,2 \pm 0,3$  veces, a las 16 semanas). Por otro lado, LTA produjo respuestas más bajas de IFN- $\gamma$  ( $0,4 \pm 0,01$  vs.  $1,1 \pm 0,06$  veces a las 16 semanas) e IL-10 ( $1,1 \pm 0,05$  vs.  $1,4 \pm 0,05$  veces a las 8 semanas).

Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de ensayos realizados con ligandos de TLR intracelulares similares a virus (Figura 3) mostraron cambios insignificantes en la respuesta de citoquinas de ratones Tg vs. NC para IMIQ, y una reducción significativa de la IL-6 ( $82 \pm 7$  vs.  $125 \pm 17$  veces a las 12 semanas, y  $63 \pm 2$  vs.  $93 \pm 9$  veces a las 16 semanas) e IFN- $\gamma$  ( $0,6 \pm 0,1$  vs.  $1,5 \pm 0,1$  veces a las 12 semanas, y  $0,6 \pm 0,1$  vs.  $1,5 \pm 0,2$  veces a las 16 semanas) después de la estimulación con CpG, siendo de nuevo consistente con los resultados obtenidos con células PBMC humanas. Sorprendentemente, la estimulación con ligando polyI:C (TLR3) provocó una respuesta mayor en las células de los ratones Tg que en los controles NC, medido por IFN- $\gamma$  ( $1,5 \pm 0,1$  vs.  $0,7 \pm 0,1$  veces a las 8 semanas) e IL-10 ( $2,3 \pm 0,5$  vs.  $0,9 \pm 0,05$  veces a las 8 semanas, y  $1,6 \pm 0,1$  vs.  $0,8 \pm 0,1$  veces a las 16 semanas).

*Cambios en la expresión de genes de TLR asociado a la ELA en ratones Tg y humanos*  
Dada la reducción general observada en nuestro estudio en la respuesta periférica de TLR asociada a la ELA, y el aumento único en la respuesta siguiente por estimulación de TLR3, hemos tratado de analizar los perfiles de expresión de genes TLR para los diferentes grupos experimentales. Como la activación de TLR, con la única excepción de la activación TLR3, es dependiente de MyD88, hemos tratado de analizar la eficiencia de expresión génica de mTLR3, mMyD88, mTLR2 y mTLR4 por QRT-PCR en esplenocitos aislados (Figura 3). Curiosamente, nuestros resultados mostraron que, mientras que los niveles de expresión génica de TLR2 y TLR4 no se alteran significativamente en los ratones Tg vs. los controles NC en cualquier fase de la enfermedad, los genes MyD88 y TLR3 se infrarregulan en ratones Tg a las 8 semanas (aproximadamente de 0,5 y 0,6 veces, respectivamente, frente a NC) para recuperar los niveles normales a las 12 a 16 semanas de edad. A continuación realizaron ensayos de expresión de genes similares QRT-PCR para hTLR2, hMyD88 y

hTLR3 en PBMCs aisladas humana (Figura 4). En este caso, nuestros resultados no revelaron cambios aparentes en los niveles de expresión de los genes hTLR2, pero niveles de ARNm significativamente más altos de hMyD88 y hTLR3 en la fase temprana de la ELA (ca. 1,3- y 1,4 veces, respectivamente), que se restauran en las etapas tardías de la enfermedad (ca. 0,9 y 0.6 veces el cambio frente a los controles sanos).

Por tanto, se podría concluir que:

Las células inmunes periféricas de los sujetos con ELA tienen una respuesta diferencial a la estimulación con ligandos de TLR frente a los sujetos sanos, tanto en ratones como en humanos con ELA.

- 10 Las PBMCs de sujetos con ELA presentan hiporrespuesta a estimulación de TLR dependiente de MyD88, en oposición a la estimulación MyD88 independiente (TLR3).

No se han detectado cambios significativos en los niveles de ARNm de TLR2 y TLR4, mientras que la expresión de los genes *Myd88* y *TLR3* se altera en sujetos con ELA, en comparación con los controles sanos, tanto en ratones y seres humanos.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de los genes *MyD88* y *TL3* para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
- 2.- Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento  
5 de un individuo o sujeto que potencialmente sufra de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que comprende:
  - a) cuantificar el producto de expresión del gen *MyD88* y del gen *TL3* en una muestra biológica aislada de dicho individuo.
- 3.- El método según la reivindicación anterior, que además comprende:
  - 10 b) comparar las cantidades obtenidas en el paso a) con una cantidad de referencia, donde la cantidad de referencia para cada gen son los niveles medios de producto de expresión de dichos genes en individuos sanos.
- 4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, donde la muestra biológica aislada del paso a) es sangre.
- 15 5- El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde la muestra biológica aislada del paso a) son células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).
- 6.- Un método de diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que comprende los pasos (a)-(b) según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, que además comprende:
  - 20 c) asignar al individuo del paso a) al grupo de individuos que presentan ELA, cuando se detectan niveles de producto de expresión del gen *MyD88* al menos un 20% mayor, preferiblemente un 30% mayor, y aún más preferiblemente un 50% mayor a la cantidad de referencia para dicho gen, y
  - d) asignar al individuo del paso a) al grupo de individuos que presentan ELA, cuando  
25 se detectan niveles de producto de expresión del gen *TL3* al menos un 20% mayor, preferiblemente un 30% mayor, y aún más preferiblemente un 50% mayor a la cantidad de referencia para dicho gen.
- 7.- Un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para cuantificar el producto de expresión del gen *MyD88* y/o del gen *TL3*.

8.- Un kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión del gen *MyD88* y/o del gen *TL3*, y donde:

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 ó SEQ ID NO: 13 (*MyD88*) y/o la SEQ ID NO: 15 (*TL3*);

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 80 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 ó SEQ ID NO: 13 (*MyD88*) y/o la SEQ ID NO: 15 (*TL3*); y

- los anticuerpos son capaces de unirse a una región formada por cualquiera de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 ó SEQ ID NO: 14 (*MyD88*) y/o SEQ ID NO: 16 (*TL3*).

9.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, que comprende los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y/o SEQ ID NO: 20

10.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde los cebadores, sondas o anticuerpos están modificados.

11.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que además comprende todos aquellos elementos necesarios para llevar a cabo un procedimiento PCR.

12.- Uso del kit o dispositivo tal y como se define en las reivindicaciones 6-10, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

FIGURAS

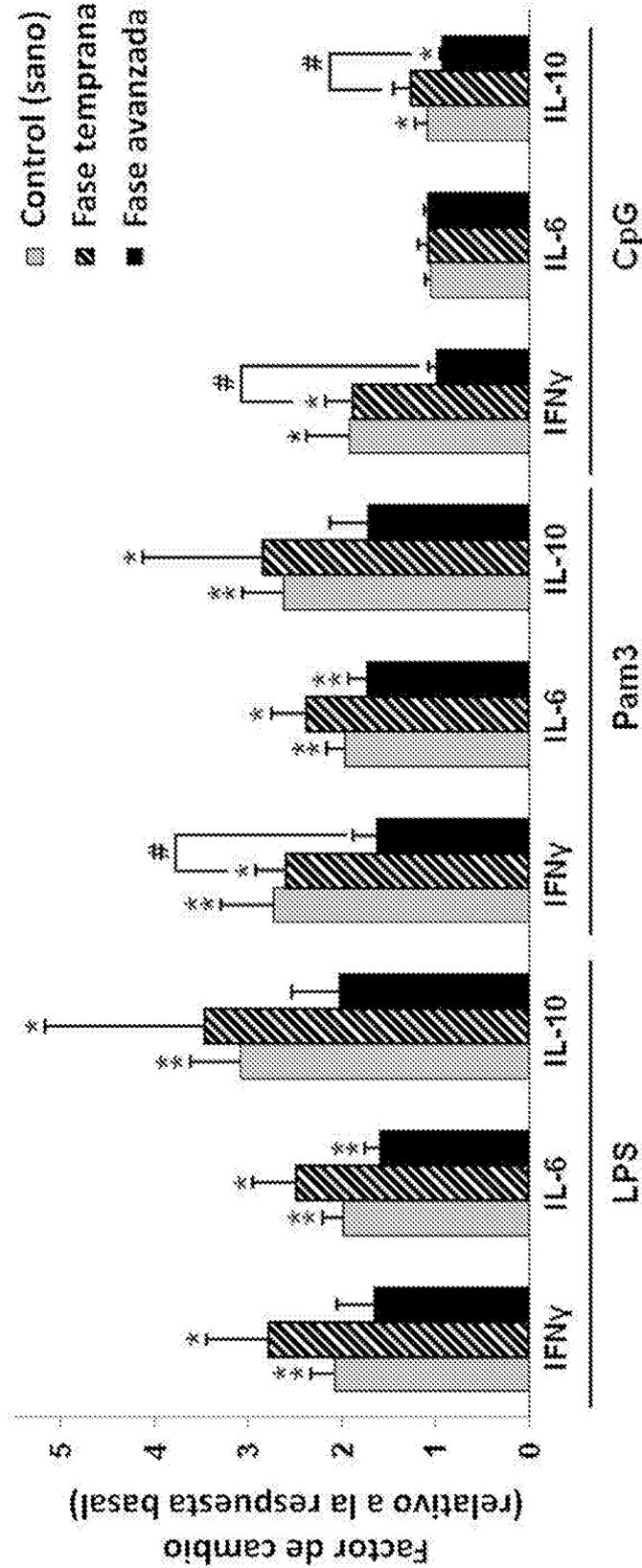


Fig. 1

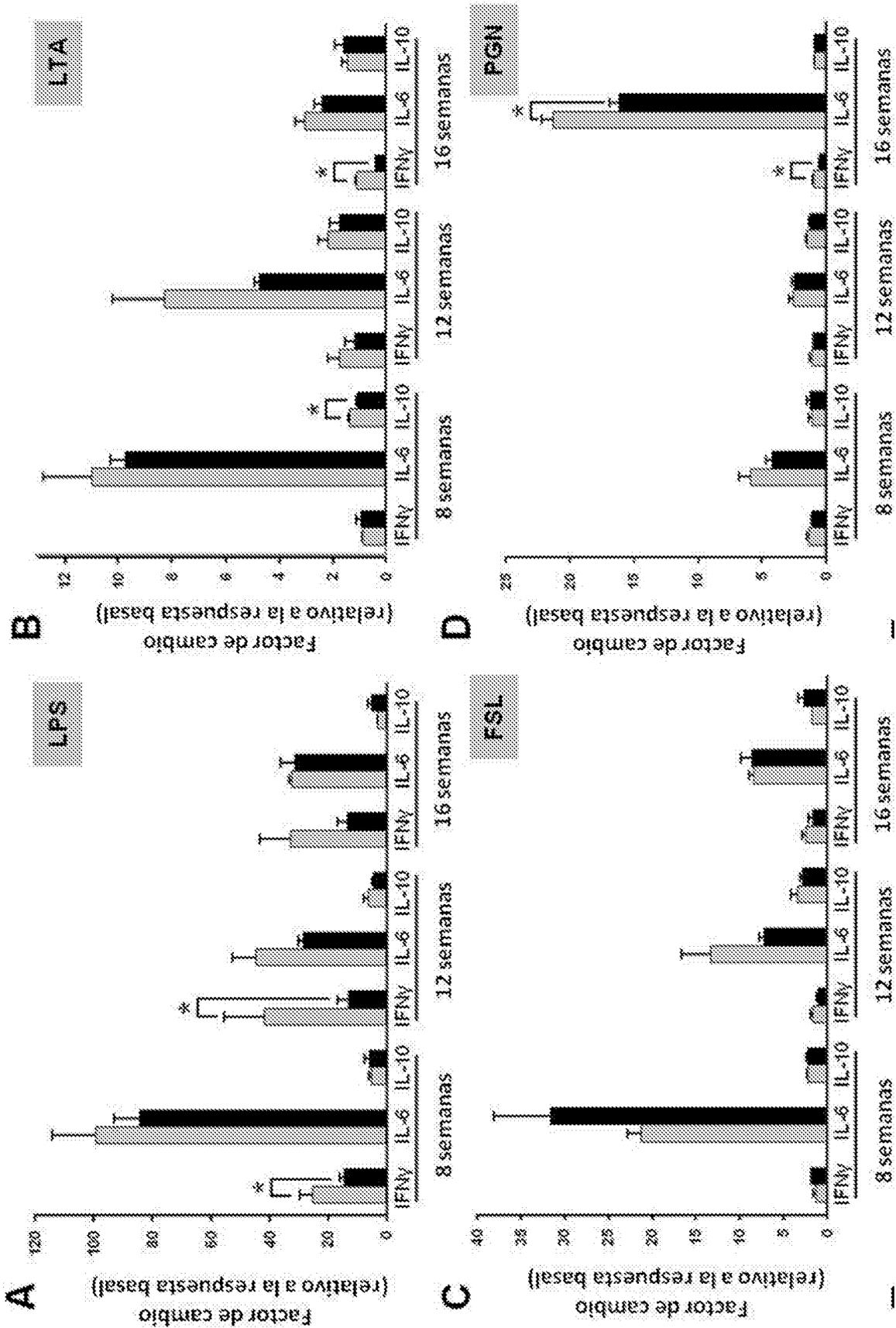


Fig. 2

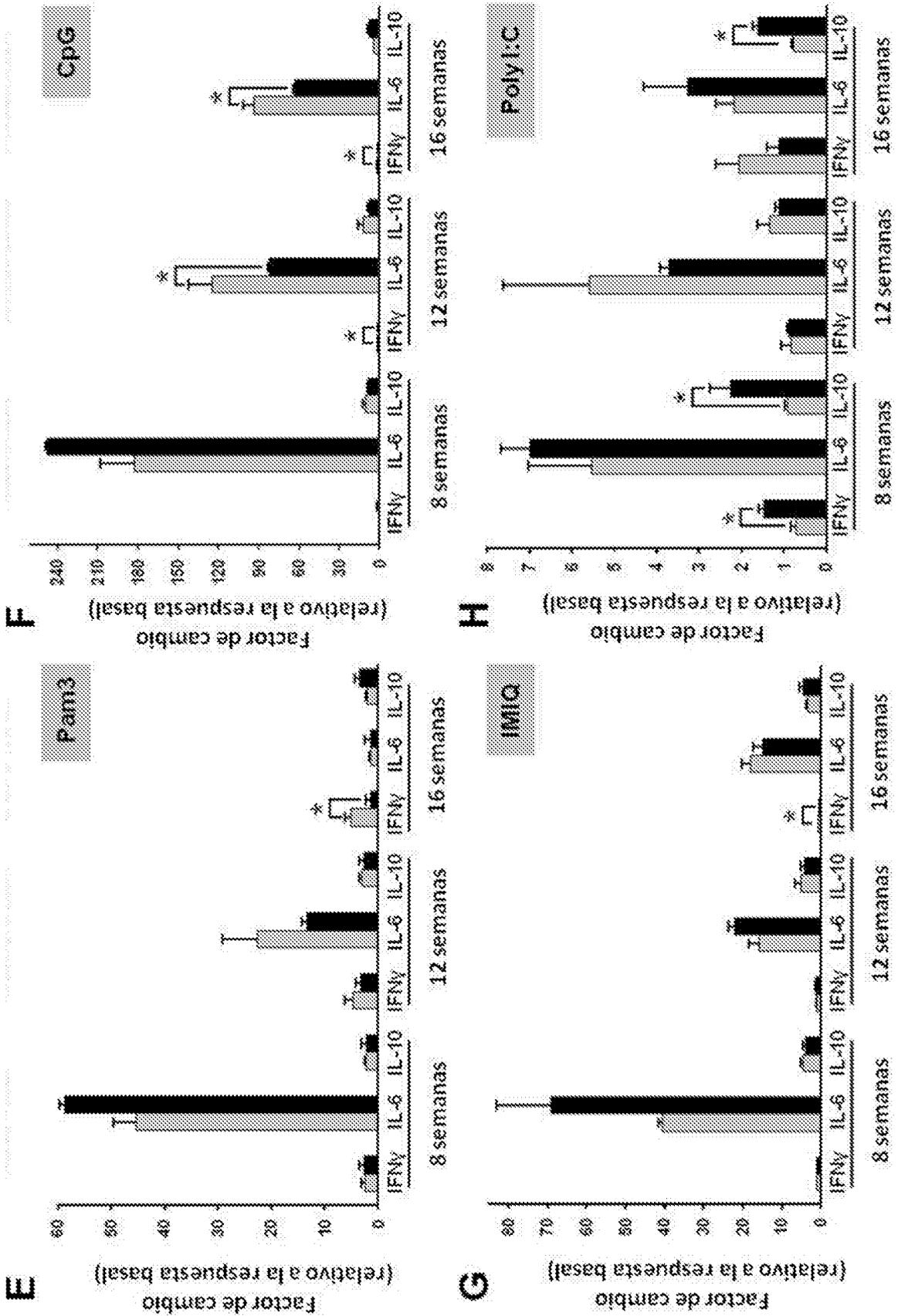


Fig. 2 (cont.)

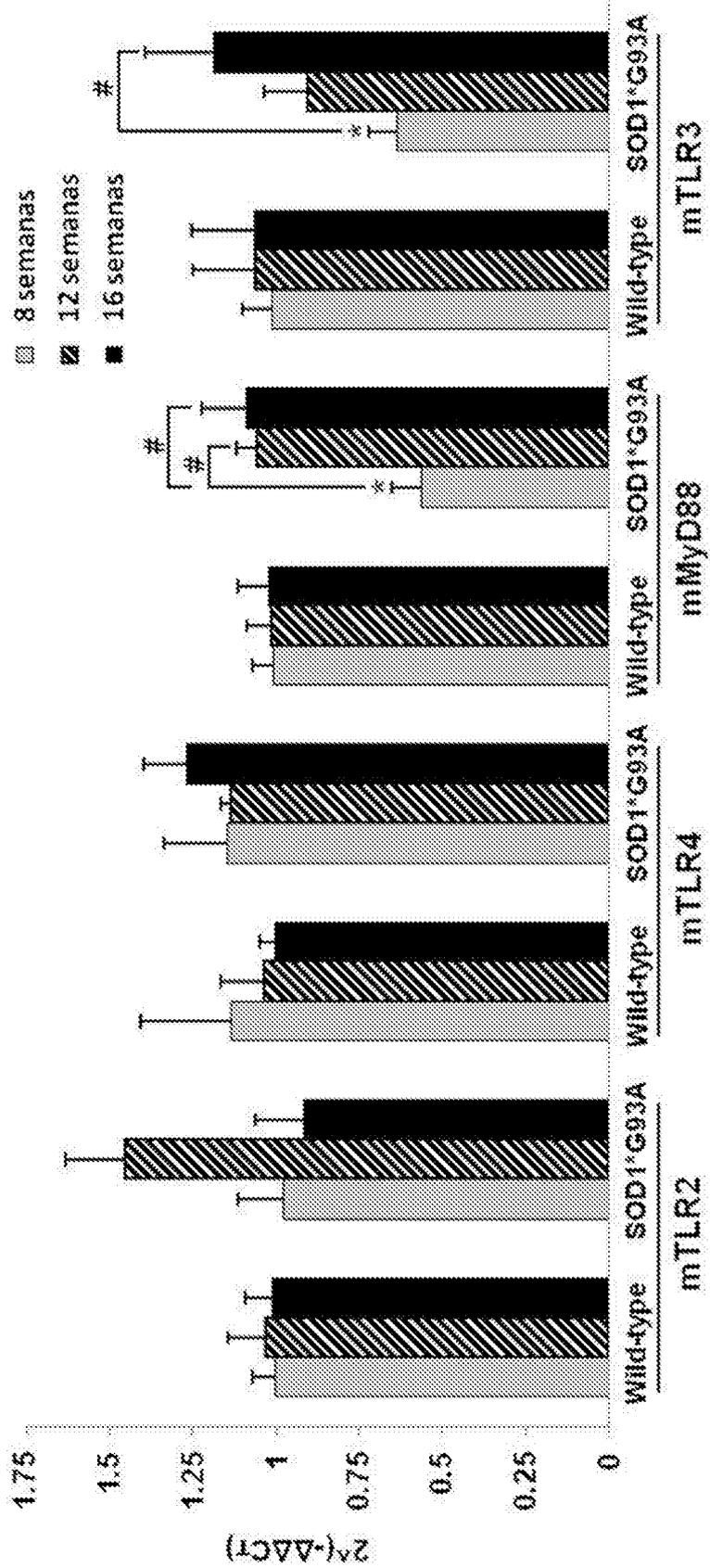


Fig. 3

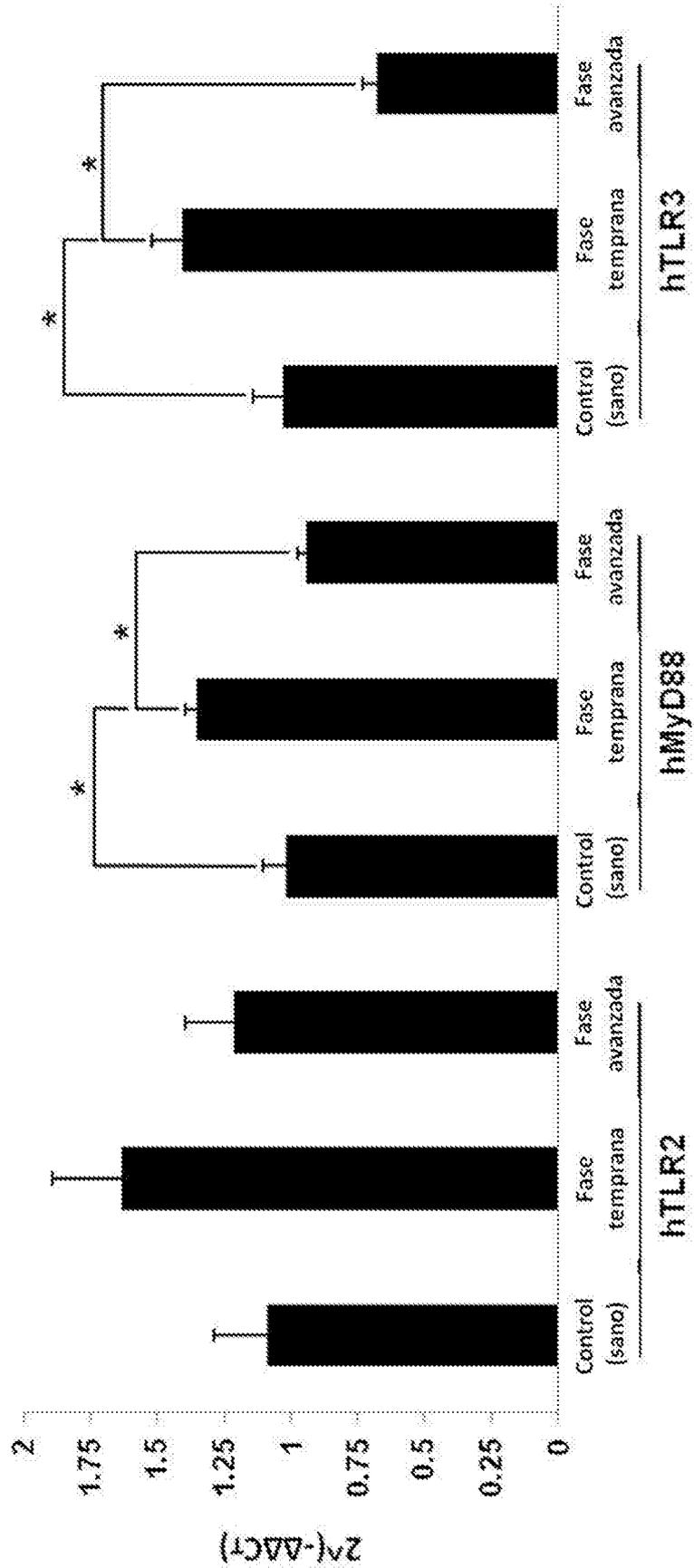


Fig. 4

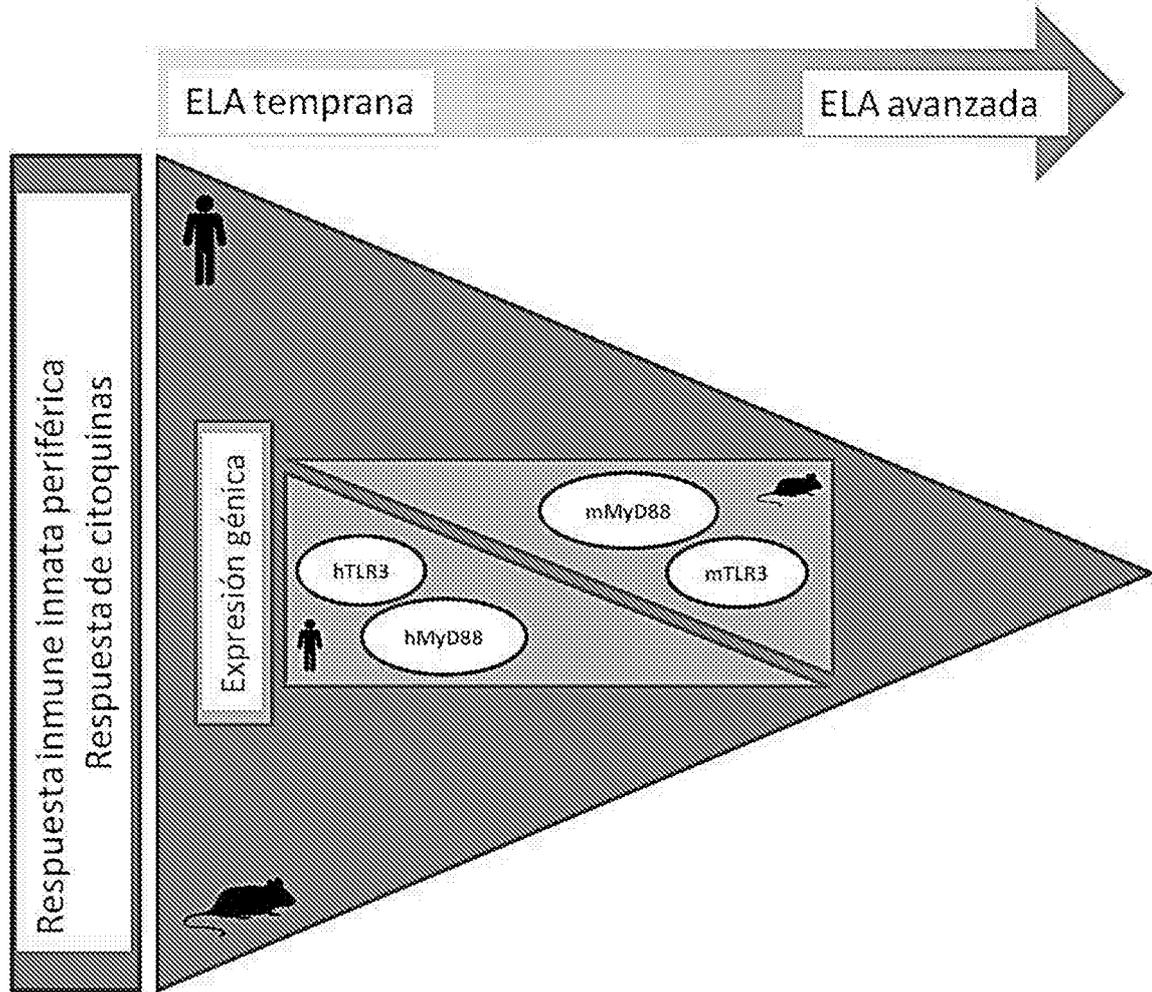


Fig. 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2016/070624

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12Q1/68** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**C12Q**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, EM\_REL, EMNEW, NRNL1, REGISTRY

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KANG, J. et al. MyD88-deficient bone marrow cells accelerate onset and reduce survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. <i>Journal of Cell Biology</i> . December 2007, Vol. 179, N° 6, pages: 1219-1230. ISSN 0021-9525 <Doi:10.1083/jcb.200705046>. Especially: Introduction, page 1221; Discussion, pages 1225, 1227 (first paragraph), page 1228 (last paragraph).	1-12
Y	LETIEMBRE, M. et al. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: A similar pattern. <i>Neurobiology of Aging</i> . May 2009, Vol. 30, N° 5, pages: 759 - 768. ISSN 0197-4580 <Doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.018>. Especially: Results, paragraph 3.1; figure 1c.	1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  
**25/10/2016**

Date of mailing of the international search report  
**(07/11/2016)**

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer  
E. Relaño Reyes

Telephone No. 91 3498504

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2016/070624

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
- 2.  Claims Nos.: 1-5, 7-12 (all in part)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see extra sheet

- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2016/070624

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JACKSON, A. C. et al. Expression of Toll-like receptor 3 in the human cerebellar cortex in rabies, herpes simplex encephalitis, and other neurological diseases. Journal of Neurovirology. June 2006, Vol. 12, N° 3, pages: 229-234. ISSN 1355-0284. <Doi:10.1080/13550280600848399> Especially page 232 “Immunohistochemical staining of TLR-3 in amyotrophic lateral sclerosis...”; page 233, last paragraph.	1-12
A	WO 2014111588 A2 (OREAL) 24/07/2014, page 35, line 20 - page 36, line 6; table 2; SEQ ID NO: 13.	7-11
A	WO 2012118911 A1 (QUARK PHARMACEUTICALS INC ET AL.) 07/09/2012, SEQ ID NO: 13685, SEQ ID NO: 13741, SEQ ID NO: 15946, SEQ ID NO: 16223.	7-11

Box II.2

1-5, 7-12 (all in part)

Claims 1-5 are unclear (PCT Article 6) since they do not indicate which gene alteration is associated with the diagnosis, prognosis and/or monitoring of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Consequently, for the purpose of the search, it is the increase in the expression of MyD88 and TLR3 that is considered to be associated with having the disease.

Claims 7-12 are not adequately supported by the description (PCT Article 6) since it is inferred from the application that the expression of the two genes is measured in the diagnosis, prognosis and/or monitoring of ALS. Consequently, for the purpose of the search, it is understood that the subject matter of these claims is a kit or device comprising the elements required to quantify the expression product of the MyD88 gene and the TLR3 gene (claims 7 to 11), as well as the use thereof (claim 12).

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2016/070624

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014111588 A2	24.07.2014	FR 3001143 A1 FR 3001143 B1	25.07.2014 31.07.2015
-----	-----	-----	-----
WO 2012118911 A1	07.09.2012	SG10201604479Y A NZ 614712 A US 2014329878 A1 JP 2014509511 A AU 2012223366 A1 CN1 03562387 A SG 193280 A1 CA 2828544 A1 EP 2681315 A1	28.07.2016 25.09.2015 06.11.2014 21.04.2014 20.02.2014 05.02.2014 30.10.2013 07.09.2012 08.01.2014
-----	-----	-----	-----

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES2016/070624

**A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD**  
**C12Q1/68** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

**B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA**

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)  
EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, EM\_REL, EMNEW, NRNL1, REGISTRY

**C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	KANG, J. et al. MyD88-deficient bone marrow cells accelerate onset and reduce survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. <i>Journal of Cell Biology</i> . Diciembre 2007, Vol. 179, Nº 6, páginas: 1219-1230. ISSN 0021-9525 <Doi:10.1083/jcb.200705046>. Especialmente: Introducción, página 1221; Discusión, páginas 1225, 1227 (primer párrafo), 1228 (último párrafo).	1-12
Y	LETIEMBRE, M. et al. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: A similar pattern. <i>Neurobiology of Aging</i> . Mayo 2009, Vol. 30, Nº 5, páginas: 759 - 768. ISSN 0197-4580 <Doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.018> Especialmente: Resultados, apartado 3.1; figura 1c.	1-12

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. **25/10/2016** Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional. **07 de Noviembre de 2016 07/112016)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
E. Relaño Reyes  
Nº de teléfono 91 3498504

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070624

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	<p>JACKSON, A. C. et al. Expression of Toll-like receptor 3 in the human cerebellar cortex in rabies, herpes simplex encephalitis, and other neurological diseases. <i>Journal of Neurovirology</i>. Junio 2006, Vol. 12, Nº 3, páginas: 229-234. ISSN 1355-0284. &lt;Doi:10.1080/13550280600848399&gt;</p> <p>Especialmente: página 232 “Immunohistochemical staining of TLR-3 in amyotrophic lateral sclerosis...”; página 233, último párrafo.</p>	1-12
A	<p>WO 2014111588 A2 (OREAL) 24/07/2014, página 35, línea 20 - página 36, línea 6; tabla 2; SEQ ID NO: 13.</p>	7-11
A	<p>WO 2012118911 A1 (QUARK PHARMACEUTICALS INC et al.) 07/09/2012, SEQ ID NO: 13685, SEQ ID NO: 13741, SEQ ID NO: 15946, SEQ ID NO: 16223.</p>	7-11

**Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones n°s:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
  
2.  Las reivindicaciones n°s: **1-5, 7-12 (todas parcialmente)**  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
  - **Las reivindicaciones 1-5 no son claras (Art. 6 PCT), ya que no se indica qué alteración del gen está relacionada con el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En consecuencia, a efectos de la búsqueda, se ha considerado que es el incremento de la expresión de *MyD88* y *TLR3* el que está relacionado con el padecimiento de la enfermedad.**
  
  - **Las reivindicaciones 7-12 no están fundadas adecuadamente en la descripción (Art. 6 PCT). Esto es debido a que de la solicitud se deduce que se mide la expresión de los dos genes en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de la ELA. En consecuencia, al objeto de la búsqueda, se entiende que el objeto de estas reivindicaciones, es un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para cuantificar el producto de expresión del gen *MyD88* y del gen *TLR3* (reivindicaciones de la 7 a la 11) así como el uso del mismo (reivindicación 12).**
  
3.  Las reivindicaciones n°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

**Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)**

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
  
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
  
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
  
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

**Indicación en cuanto a la protesta**

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2016/070624

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2014111588 A2	24.07.2014	FR 3001143 A1 FR 3001143 B1	25.07.2014 31.07.2015
-----	-----	-----	-----
WO 2012118911 A1	07.09.2012	SG10201604479Y A NZ 614712 A US 2014329878 A1 JP 2014509511 A AU 2012223366 A1 CN1 03562387 A SG 193280 A1 CA 2828544 A1 EP 2681315 A1	28.07.2016 25.09.2015 06.11.2014 21.04.2014 20.02.2014 05.02.2014 30.10.2013 07.09.2012 08.01.2014
-----	-----	-----	-----