

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 395**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/55** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 9/16** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12P 19/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06809100 .8**  
96 Fecha de presentación: **23.10.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1954810**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2008**

54 Título: **Variantes genéticas de inositol polifosfato-4-fosfatasa humana tipo I (INPP4A) útiles para la predicción y la terapia de trastornos inmunológicos**

30 Prioridad:  
**25.10.2005 IN DE15362005**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.04.2012**

73 Titular/es:  
**COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL  
RESEARCH  
RAFI MARG  
NEW DELHI 110 001, IN**

72 Inventor/es:  
**GHOSH, Balam; SHARMA, Mamta y  
BATRA, Jyotsna**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

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

ES 2 378 395 T3

## DESCRIPCIÓN

Variantes genéticas de inositol polifosfato-4-fosfatasa humana tipo I (INPP4A) útiles para la predicción y la terapia de trastornos inmunológicos

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a variantes genéticas que incluyen variantes de corte y empalme del gen humano de inositol polifosfato 4-fosfatasa (INPP4A) útiles para la predicción de susceptibilidad al asma. Más particularmente, la invención proporciona cebadores y procedimientos adecuados para la detección de haplotipos de variantes alélicas del gen de INPP4A para la predicción de la susceptibilidad de un individuo al asma.

**Antecedentes y referencias de la técnica anterior de la presente invención**

- 10 El asma es una enfermedad de las vías respiratorias crónica común con considerable heterogeneidad tanto en su fenotipo como en la patofisiología subyacente. Afecta al 15-18% de la población mundial. Se conocen casos tanto intrínsecos como extrínsecos de asma. El asma intrínseco es principalmente un trastorno de la infancia, aunque la edad de aparición puede variar y se observa que es 35-45 años en la población general; mientras que el asma extrínseco se observa cuando la edad de aparición es superior a los 45 años y es principalmente debido a los cambios inducidos por la edad en la función pulmonar. Estudios recientes han demostrado que la inflamación de las vías respiratorias es una característica principal en la patofisiología del asma (Gem y col. 1999). El trastorno es multifactorial (en tanto la iniciación como la progresión) debido a la participación de numerosas células inflamatorias residentes y reclutadas. Se sabe que las respuestas mediadas por linfocitos T e IgE son un factor clave en la respuesta alérgica (Elias y col. 2003). El asma es un trastorno mediado por linfocitos T colaboradores de tipo 2 (Th2) con citocinas tales como interleucina 4, interleucina 5, interleucina 13 implicadas en la desviación del sistema inmunitario hacia atopicidad. El aumento de los niveles de estas citocinas conduce a elevados niveles de IgE en suero totales, reclutamiento de eosinófilos e hiperreceptividad bronquial que por último culminan en la patogénesis del asma. También se sabe que estas interleucinas interactúan y estimulan las células alveolares y las células bronquiales del músculo liso produciendo los fenotipos clínicos de hiperreceptividad bronquial (Barnes P. J., *Respir. Res.* 2:64-5, 1999). Las interacciones gen-gen y gen-entorno participan en el desarrollo del asma (Tay y col., *Asian Pac J Allergy Immunol* 17:239-42, 1999; Bleecker ER, *Am J Respir Crit Care Med* 156:S113-6,1997; Cookson W, *Nature* 402:B5-11, 1999).

- La inflamación y la remodelación de las vías respiratorias son rasgos característicos del asma atópico. Diversos tipos de células, a saber: eosinófilos, mastocitos y linfocitos T migran a los pulmones y median en el proceso de inflamación en el sitio (Barnes PJ, 1992). Además de estas células, las plaquetas desempeñan una función clave en este proceso inflamatorio alérgico debido a que son una rica fuente de una amplia gama de materiales biológicamente activos que pueden inducir o aumentar las respuestas inflamatorias alérgicas (Herd CM, 1994, Klinger, 1995). Se ha demostrado que tales materiales son mediadores preformados guardados en a-gránulos que son quimiocinas tales como el factor plaquetario 4 (PF4) y se regulan tras la activación en linfocitos T normales expresados y supuestamente secretados (RANTES) (Herd CM, 1994, Klinger, 1995). Estas quimiocinas son liberadas de plaquetas después de la estimulación con potentes mediadores anafilácticos tales como factor activador de plaquetas (PAF) (Herd CM, 1994, Kameyoshi Y, 1992) y producen quimiotaxia eosinofílica (Kameyoshi Y, 1992), proporcionando pruebas adicionales de una contribución de las plaquetas al asma bronquial. Estudios en modelo de ratón de inflamación alérgica sugieren la función de las plaquetas en la remodelación de las vías respiratorias (Simon C y col., 1994). Se ha encontrado que la activación de plaquetas está asociada a la inactivación de una enzima independiente de magnesio, la inositol polifosfato 4-fosfatasa (INPP4A, EC 3.1.3.66) (Norris FA, 1997). La estimulación de plaquetas humanas con trombina o ionóforo de calcio produce la inactivación de la INPP4A por escisión proteolítica por la proteasa calpaína dependiente del calcio (Norris FA y col., 1997). La enzima INPP4A cataliza la hidrólisis del fosfato en la posición 4 del inositol 3,4-bisfosfato y del inositol 1,3,4-trisfosfato. También cataliza, a una velocidad mucho mayor, la hidrólisis del fosfato en la posición 4 del fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato generado por la fosforilación en la posición D-3 de lípidos de inositol por fosfoinositida 3-cinasas (PI3K). Por tanto, la inactivación de INPP4A está asociada a calcio/acumulación dependiente de la agregación de PtdIns(3,4)P2 característica de plaquetas humanas estimuladas. Norris y col. (1995) observaron que la INPP4A también participa en mitogénesis mediada por el receptor de PDGF, rotura oxidativa de neutrófilos, translocalización del transportador de la glucosa a la membrana plasmática. Vyas P y col. 2000 encontraron que la INPP4A regula la proliferación celular en la dirección 3' del factor de transcripción GATA-1. Se encontró que los megacariocitos de GATA-1<sup>-</sup> (precursor de plaquetas) carecían de esta enzima y mostraron hiperproliferación. La reintroducción de INPP4A en los megacariocitos de GATA-1<sup>-</sup> retrasó significativamente el crecimiento celular, sugiriendo la función de esta enzima en la proliferación celular. Cuando se comparó la expresión génica diferencial entre pulmones de ratones A/J sensibilizados/expuestos a albúmina de huevo frente a ratones de control se encontraron diversos genes que se expresaban de forma diferente (Base de datos Gene Expression Omnibus (GEO), GDS 349). Entre estos genes que se expresan de forma diferente también se encontró que la INPP4A se modulaba en los pulmones de ratones sensibilizados.

- 60 El gen de INPP4A codifica dos isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de proteínas variables en su extremo carboxi y también se conocen diversas variantes de corte y empalme en la región del exón 17, 18 y 19 de este gen (NT022171), anteriormente

designado exón 15, 16 y 17 (Shearn CT y col., 2001). Se han anotado dos exones más que codifican 5' UTR en el cóntigo NT022171. Hay 3 formas de corte y empalme, a saber;  $\alpha$  1, 2 y 3 informadas en la región del exón 17-19 como se muestra en la Figura 1A.

5 INPP4  $\alpha$  1 codifica una forma de 106 kDa de la enzima principal expresada en cerebro humano, de rata y de ratón (Norris FA y col., 1995; Vyas P y col., 2000). INPP4  $\alpha$  2 codifica una forma de 102 kDa que se expresa en especies menores en cerebro de rata y ratón (Norris FA y col., 1995). La isoforma  $\alpha$  3 resulta del uso de un sitio donante de corte y empalme de 5'- GU alternativo durante la escisión del intrón 17 y extiende el exón 17 120 pb y codifica una proteína de 110 kDa expresada como la forma principal en plaquetas humanas (Shearn CT y col., 2001). Esta región del exón 17 extendido contiene tres repeticiones separadas siete bases con la secuencia de nucleótidos  
10 CCCCTYCW en la que Y representa C o T y W representa A o T. El exón 18 también contiene una secuencia con este consenso. Estos elementos ricos en pirimidina consenso representan sitios de reconocimiento para factores de corte y empalme que regulan el corte y el empalme alternativo específico de tejido de los exones 17 y 18. El exón 17 extendido codifica un dominio de 40 aminoácidos que contiene la secuencia PEST. Las secuencias PEST son ricas en residuos de prolina, serina, glutamato/aspartato y treonina y las proteínas que contienen tales secuencias son  
15 rápidamente degradadas por la familia calpaína de proteasas (Rogers S y col., 1986; Rechsteiner M y Rogers S 1996).

La enzima INPP4A que contiene secuencias PEST también es rápidamente degradada por la familia calpaína de proteasas que actúa sobre proteínas que contienen secuencias PEST (Norris FA y col., 1997). Como la estimulación de plaquetas está asociada al asma, que a su vez guarda relación con la inactivación de la enzima *INPP4A*, los inventores plantearon como hipótesis que las variantes de genes de *INPP4A* podrían asociarse a trastornos inmunológicos que incluyen asma. Sin embargo, hasta la fecha no se han hecho estudios para estudiar la función genética de INPP4A en trastornos inmunológicos que incluyen asma atópico.  
20

#### **Novedad de la invención:**

Los inventores han identificado por primera vez variantes del gen de INPP4A asociadas a asma en seres humanos que incluyen los polimorfismos de un único nucleótido +92031 A/T (S1), +92344 C/T (S2), +92817 C/T (S3), +110832 A/G (S4), +131237 C/T (S5) y la repetición D2S2311 (M1), D2S2187 (M2) y +99095 CA (M3) en las regiones intrónicas y exónicas y flanqueantes del gen.  
25

Por tanto, en un aspecto de la invención se proporciona un procedimiento *in vitro* de predecir la susceptibilidad de un individuo al asma que comprende determinar si dicho individuo posee o no un haplotipo de variantes genéticas, seleccionándose dichas variantes de variantes genéticas del gen humano de inositol polifosfato 4-fosfatasa (INPP4A) y la repetición del dinucleótido CA en el sitio M1 localizado 44,7 kb en la dirección 5' del sitio de iniciación de dicho gen, en el que dicho haplotipo está positivamente asociado o negativamente asociado a la aparición de asma.  
30

También se proporcionan cebadores específicos para la detección de polimorfismos de un único nucleótido y secuencias repetitivas específicas en y alrededor del gen de INPP4A como se define por SEC ID N° 7-23.  
35

#### **Resumen de la invención**

El asma atópico es una enfermedad pulmonar inflamatoria crónica caracterizada por problemas de respiración recurrentes en respuesta a un alérgeno. Las plaquetas desempeñan una función importante en este proceso inflamatorio alérgico liberando mediadores preformados como el factor plaquetario 4 (PF4) y se regulan tras la activación en linfocitos T normales expresados y se secretan (RANTES) tras la activación causando quimiotaxia de eosinófilos. La presente invención se refiere a variantes alélicas del gen humano de *inositol polifosfato 4-fosfatasa (INPP4A)* y a variantes de corte y empalme de la secuencia codificante que codifica la enzima *INPP4A* conocida por ser un regulador importante de la activación de plaquetas; y proporciona cebadores y procedimientos adecuados para la detección de estas variantes alélicas como se observa anteriormente para la predicción de la susceptibilidad de un individuo a asma.  
40  
45

#### **Descripción detallada de la invención**

La INPP4A se ha identificado como un gen candidato para encontrar la asociación a trastornos inmunológicos, particularmente asma, ya que se encontró que varios polimorfismos en este gen se asociaban a asma atópico en estudios de casos y controles y genealógicos.

50 El gen de INPP4A codifica una enzima independiente del magnesio, la inositol polifosfato 4-fosfatasa, que cataliza la hidrólisis del fosfato de la posición 4 del inositol 3,4-bisfosfato y del inositol 1,3,4-trisfosfato. También cataliza, a una velocidad mucho mayor, la hidrólisis del fosfato en la posición 4 del fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato generado por la fosforilación en la posición D-3 de lípidos de inositol por fosfoinositida 3-cinasas (PI3K). El gen de INPP4A se expresa en seres humanos en diversos tejidos, a saber, vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, cuello del útero, colon, ojo, corazón, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, glándula mamaria, músculo, ovario, páncreas, placenta, próstata, piel, tejido blando, bazo, estómago, testículos, timo, útero (Perfil de expresión del conjunto de UniGene Hs. 469386). Norris y col. (1995) observaron que la última actividad de INPP4A participaba en mitogénesis  
55

mediada por el receptor PDGF, rotura oxidativa de neutrófilos, translocalización del transportador de la glucosa a la membrana plasmática y agregación de plaquetas. La estimulación de plaquetas humanas con trombina o ionóforo del calcio produce la inactivación de INPP4A por escisión proteolítica por la proteasa calpaína dependiente del calcio (Norris FA y col., 1997). Esta inactivación de INPP4A está asociada a calcio/acumulación dependiente de la agregación de PtdIns(3,4)P2 característica de plaquetas humanas estimuladas. Por tanto, INPP4A es una enzima importante que participa en la regulación de este segundo mensajero de lípidos en plaquetas. Se sabe que las plaquetas son actores importantes en la patogénesis del asma; muchos estudios en los años noventa han mostrado la importancia de estas células en el asma. Se encontró que las plaquetas eran necesarias para la remodelación de las vías respiratorias en el modelo de ratón de asma (Simon C y col., 2004) y promueven la adhesión de eosinófilos a endotelio en individuos asmáticos (Ulfman LH y col., 2003).

La presente solicitud trata de D2S2311; un marcador de microsatélite, 44,7 kb en la dirección 5' del gen, repetición polimórfica de dinucleótidos en el nucleótido 99095 a 99127, que está en el intrón 11 del gen de *INPP4A* (nº de acceso de GenBank NT\_022171). Los tres primeros SNP (rs3769712, rs3769710, rs2278208), como se muestra en la Figura 1B, tienen 92031 pb, 92344 pb y 92817 pb en la dirección 3' del sitio de iniciación del gen respectivamente y se encuentran en el intrón 7 del gen. El cuarto SNP no sinónimo (rs2278206) está situado 110832 pb en la dirección 3' del gen humano de *INPP4A* en el exón 17 alternativamente cortado y empalmado y representa una transición A a G (Thr a Ala). El quinto SNP rs10201079 es una transición C a T situada 131237 bases en la dirección 3' del sitio de iniciación del gen de *INPP4A* en el intrón 24.

Los resultados del presente estudio proporcionan resultados únicos. Además de identificar, genotipar y establecer una asociación positiva del microsatélite D2S2311, 44,7 kb en la dirección 5' del gen con asma, los inventores han encontrado una asociación de los conocidos polimorfismos de un único nucleótido +92031 A/T, +110832 A/G, +131237 C/T y una repetición de dinucleótidos en +99095 en la población india. Todos los SNP y las repeticiones de microsatélites se han validado por primera vez en la población india.

La presente invención ha identificado las variantes genéticas que existen en cualquier tipo de población en el mundo independientemente de su origen, comunidad, color, localización geográfica o etnia. Los inventores han comparado frecuencias de alelos y de genotipos del polimorfismo de repetición D2S2311 de 44,7 kb en la dirección 5' del promotor, D2S2187 en el intrón 1 en la posición +43987, SNP +92031 A/T, +92344 C/T, +92817 C/T en el intrón 7, repetición de CA en +99095 en el intrón 11, +110832 A/G en el exón 17 de la variante de corte y empalme y +131237 C/T en el intrón 24 y los haplotipos generados usando cuatro loci en población india. En el presente estudio se llevaron a cabo estudios de asociación basados tanto en casos y controles como en familias para estos polimorfismos. Además, la invención define claramente que las variantes identificadas serían útiles para cualquier tipo de población de cualquier origen geográfico.

La presente invención también ha identificado la función funcional del polimorfismo +110832 A/G en el exón 17 de la variante de corte y empalme expresado en plaquetas. El exón extendido contiene la posible secuencia PEST del aminoácido 584 - 607 con la puntuación de PESTfind de +7,49 ([www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/pestfind/](http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/pestfind/)). El polimorfismo +110832 A/G (rs2278206) produce una sustitución de treonina por alanina en la posición 604 en la secuencia de proteínas produciendo una secuencia PEST deficiente (puntuación de PESTfind +4,95). Por tanto, una sustitución de base de A por G en este locus particular puede hacer que la enzima INPP4 sea resistente a las proteasas calpaínas como se muestra por experimentos de transferencia Western de plaquetas humanas.

La presente invención también informa de la identificación de variantes de corte y empalme novedosas en individuos asmáticos. Una de las variantes de corte y empalme ha delecionado el exón 16 de 219 pares de bases. Esto produce la delección de 73 aminoácidos de la proteína codificada. Esta variante de corte y empalme puede producir proteína con función alterada.

Los inventores también han mostrado menor expresión de la proteína de INPP4A en el modelo de ratón inducido por alérgeno de asma que en los ratones normales tratados con solución salina y su restablecimiento después del tratamiento con fármacos antiinflamatorios tales como esteroide.

Por consiguiente, la presente invención proporciona variantes genéticas del gen humano de *inositol polifosfato 4-fosfatasa (INPP4A)* útiles para la predicción de asma, incluyendo dichas variantes:

(a) La variante del gen de SEC ID Nº 1 que tiene 1-230 nucleótidos contiguos que contiene el grupo de dinucleótidos CA del locus M1 presentes 44,7 kb en la dirección 5' del sitio de iniciación del gen.

(b) La variante del gen de SEC ID Nº 2 que tiene 1-400 nucleótidos contiguos que contiene los dinucleótidos GT en el locus M2.

(c) La variante del gen de SEC ID Nº 3 que tiene 1-159 nucleótidos contiguos que contiene el polimorfismo de repetición de CA en el nucleótido 229 del locus M3.

(d) La variante del gen de SEC ID Nº 4 que tiene 1-1036 nucleótidos contiguos que contiene el polimorfismo A/T en el nucleótido 75 del locus S1, el polimorfismo C/T en el nucleótido 388 del locus S2 y el polimorfismo C/T en el nucleótido 861 del locus S3.

(e) La variante del gen de SEC ID Nº 5 que tiene 1-961 nucleótidos contiguos que contiene el polimorfismo G/A en el nucleótido 147 del locus S4.

(f) La variante del gen de SEC ID N° 6 que tiene 1-1707 nucleótidos contiguos que contiene el polimorfismo C/T en el nucleótido 1221 del locus S5.

(g) La variante de corte y empalme de SEC ID N° 24 que tiene 1-817 nucleótidos contiguos que contiene una región de variante de corte y empalme.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de detectar y predecir la predisposición a asma por cribado para haplotipos y variantes de corte y empalme de INPP4A y su expresión en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

[a] aislar ADN de muestras seleccionadas de sangre completa, semen, saliva, lágrimas, orina, materia fecal, sudor, de la boca, piel o pelo;

10 [b] proporcionar cebadores que tienen SEC ID N° 7-18;

[c] amplificar y secuenciar extensiones de ADN genómico usando cebadores de SEC ID N° 7-18, en el que los cebadores de SEC ID N° 7, 9, 11, 13, 15, 17 son cebadores directos y los cebadores de SEC ID N° 8, 10, 12, 14, 16, 18 son cebadores inversos;

15 [d] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 1 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 7 y 8, conteniendo SEC ID N°1 la secuencia correspondiente a la repetición de microsatélites en el locus M1 D2S2311;

[e] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 2 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 9 y 10, conteniendo SEC ID N° 2 la secuencia correspondiente a la repetición de microsatélites en el locus M2 D2S2187 en la posición +43987 en el intrón 1;

20 [f] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 3 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 11 y 12, conteniendo SEC ID N° 3 la secuencia correspondiente a la repetición de microsatélites en el locus M3 +99095;

[g] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 4 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 13 y 14, conteniendo SEC ID N° 4 el locus S1 +92031A/T, el locus S2 +92344 C/T y el locus S3 +92817C/T de sitios de polimorfismo de un único nucleótido (SNP);

25 [h] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 5 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 15 y 16, conteniendo SEC ID N° 5 el sitio de SNP en el locus S4 en la posición +110832A/G en el exón 17 de la variante de corte y empalme;

[i] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 6 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 17 y 18, conteniendo SEC ID N° 6 el sitio de SNP en el locus S5 en la posición +131237 C/T, y

30 [j] validar e identificar las variantes del gen de INPP4A específicas computacionalmente comparando con las secuencias del gen de INPP4A naturales conocidas; y

[k] aislar ARN de muestras de sangre completa; y

35 [l] aislar e identificar variantes de corte y empalme de SEC ID N° 24 usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 25 y 26.

Otros y más aspectos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones presentemente preferidas de la invención facilitadas con el fin de divulgación.

40 En otro aspecto de la invención se proporcionan marcadores farmacogenéticos correspondientes a variantes de genes del gen de *INPP4A* para predecir y detectar seres humanos susceptibles a asma: SEC ID N° 1 asociada al locus D2S2311, SEC ID N° 2 asociada al locus D2S2187, SEC ID N° 3 asociada a la repetición de CA en +99095, SEC ID N° 4 asociada al locus +92031 A/T, +92344 C/T, +92817 C/T, SEC ID N° 5 asociada a +110832 A/G, SEC ID N° 6 asociada a +131237 C/T y SEC ID N° 24 asociada a variantes de corte y empalme.

Los inventores han identificado las siguientes asociaciones entre variantes del gen de INPP4A y asma:

45 - la variante alélica del microsatélite D2S2311 en el locus M1 está asociada a susceptibilidad al asma  $\chi^2 = 43,441128$ , DF = 9, valor de  $p < 0,0001$  y su asociación se confirma en estudios basados en familias ( $p = 0,0007$ ).

- se encontró que el alelo 402 del microsatélite D2S2311 era un alelo de riesgo con OR-2,289, IC del 95% [1,5443 - 3,3929] y se confirmó en estudios basados en familias con  $\chi^2 = 3,96$ ,  $p = 0,0464$ .

50 - se encontró que el alelo 400 del microsatélite D2S2311 era un alelo protector con razón de posibilidades 0,575, IC del 95% [0,4098 - 0,8068] y se confirmó en estudios basados en familias con  $\chi^2 = 11,306$ ,  $p = 0,0008$ .

- se ha encontrado que las variantes alélicas de repetición de CA en el locus M3 se asocian a susceptibilidad al asma  $\chi^2 = 11,467334$ ,  $p = 0,000600$  y se ha confirmado en estudios basados en familias ( $p = 0,008$ ).

- la variante alélica 154 de repetición de CA en el locus M3 tiene una frecuencia del 81% en pacientes.

55 - la repetición de CA en el locus M3 en la que la variante alélica 152 tiene una frecuencia del 19% en pacientes.

- se ha encontrado que la variante alélica 154 de repetición de CA es un alelo de riesgo en un estudio de casos y controles con OR 1,734, IC del 95% [1,249 - 2,407]; esta observación también se confirmó en un estudio basado en familias  $\chi^2 = 7,078$ , valor de  $p = 0,008$ .

- el polimorfismo +92031 A/T en el sitio S1 en el que el alelo T está en el sitio S1 tiene una frecuencia del 19 % en pacientes.

60 - el polimorfismo +92031 A/T en el sitio S1 en el que el alelo A está en el sitio S1 tiene una frecuencia del 81 %

en pacientes.

- el polimorfismo +92031 A/T en el sitio S1 está asociado a susceptibilidad al asma con  $\chi^2 = 7,05$ ,  $p = 0,00791$  como se ha confirmado en una estudio basado en familias  $\chi^2 = 9$ , valor de  $p = 0,0027$ .
- +110832 A/G (rs2278206), un polimorfismo no sinónimo funcionalmente importante en el locus S4, cuando se encontró que el alelo A estaba transmitido en exceso a la cría afectada en un estudio basado en familias ( $\chi^2 = 11,504$ ,  $p = 0,0007$ ); el polimorfismo +110832 A/G produce una sustitución de treonina por alanina en la posición 604 produciendo una secuencia PEST deficiente, haciendo la proteína más estable.
- el polimorfismo +131237 C/T en el locus S5 cuando se encontró que el alelo T estaba transmitido en exceso a la cría afectada en un estudio basado en familias ( $\chi^2 = 4,545$ ,  $p = 0,03$ ).

Una realización de la presente invención se refiere a la determinación de un haplotipo de cuatro loci seleccionado de los treinta y seis haplotipos de cuatro loci novedosos generados usando loci M1, S1, M3 y S4 en un estudio de casos y controles. Dichos haplotipos novedosos son 396\_T\_154\_G, 398\_A\_152\_A, 400\_T\_152\_A, 400\_A\_152\_A, 406\_T\_152\_A, 406\_A\_156\_T, 412\_A\_154\_A, 400\_T\_154\_A, 402\_T\_152\_A, 404\_A\_156\_T, 410\_A\_154\_A, 404\_A\_152\_G, 406\_A\_152\_A, 404\_A\_152\_A, 406\_T\_152\_G, 396\_A\_152\_G, 400\_A\_154\_G, 402\_T\_154\_A, 402\_A\_152\_A, 404\_T\_154\_A, 400\_T\_154\_G, 396\_T\_152\_G, 404\_T\_152\_A, 398\_A\_152\_G, 386\_A\_154\_A, 402\_T\_152\_G, 398\_T\_152\_G, 404\_A\_154\_G, 408\_A\_154\_A, 406\_A\_154\_A, 398\_A\_154\_A, 404\_T\_152\_G, 400\_A\_154\_A, 400\_T\_152\_G, 402\_A\_154\_A, 404\_A\_154\_A.

Todavía otra realización de la presente invención se refiere a la confirmación de veintiocho haplotipos de cuatro loci novedosos en familias, concretamente 396\_T\_154\_G, 398\_A\_152\_A, 400\_T\_152\_A, 400\_A\_152\_A, 406\_T\_152\_A, 406\_A\_156\_T, 412\_A\_154\_A, 400\_T\_154\_A, 402\_T\_152\_A, 404\_A\_156\_T, 410\_A\_154\_A, 404\_A\_152\_G, 406\_A\_152\_A, 404\_A\_152\_A, 406\_T\_152\_G, 396\_A\_152\_G, 400\_A\_154\_G, 402\_T\_154\_A, 402\_A\_152\_A, 404\_T\_154\_A, 400\_T\_154\_G, 396\_T\_152\_G, 404\_T\_152\_A, 398\_A\_152\_G, 386\_A\_154\_A, 402\_T\_152\_G, 398\_T\_152\_G, 404\_A\_154\_G, 408\_A\_154\_A, 406\_A\_154\_A, 398\_A\_154\_A, 404\_T\_152\_G, 400\_A\_154\_A, 400\_T\_152\_G, 402\_A\_154\_A, 404\_A\_154\_A.

En otra realización más de la invención, el haplotipo novedoso 402\_A\_154\_A (loci M1\_S1\_M3\_S4) se detecta como un factor de riesgo para asma. Se encontró que tenía frecuencia en porcentaje del 16,14% en pacientes en el estudio de casos y controles.

El haplotipo 402\_A\_154\_A estuvo fuertemente asociado a la aparición de asma (razón de posibilidades 3,68 con IC del 95%: 2,2977, 5,916, valor de  $p < 0,0001$ ) que indica alto riesgo en un estudio de casos y controles. Además, el haplotipo de riesgo 402\_A\_154\_A también se encontró que estaba transmitido en exceso a la cría afectada en un estudio basado en familias ( $\chi^2 = 4,2714$ ,  $DF = 1$ , valor de  $p = 0,038$ ).

Se encontró que el haplotipo de los loci M1\_S1\_M3\_S4 400\_A\_154\_A tenía frecuencia en porcentaje del 7,29% en pacientes.

Se encontró que los haplotipos 400\_T\_152\_G y 400\_A\_154\_A estaban negativamente asociados a la aparición de asma atópico que indica haplotipos protectores. La confirmación de asociación negativa del haplotipo 400\_T\_152\_G a la aparición de asma atópico se obtuvo en un estudio basado en familias ( $\chi^2 = 8,065$ ,  $DF = 1$ , valor de  $p = 0,0045$ ).

Adicionalmente se han identificado variantes de corte y empalme del gen de INPP4A en sujetos asmáticos atópicos.

La expresión de proteínas de INPP4A se reduce en ratones sensibilizados con y expuestos a albúmina de huevo en comparación con controles tratados con solución salina; hay restablecimiento después del tratamiento con un agente esteroideo antiinflamatorio conocido tal como dexametasona.

Todavía otro aspecto de la invención se refiere a un kit de diagnóstico que comprende marcadores farmacogenéticos que tienen los nucleótidos de SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 junto con un manual de instrucciones para detectar y predecir la predisposición a asma en un sujeto. Componentes adicionales opcionales del kit incluyen, por ejemplo, enzimas de restricción, transcriptasa inversa o polimerasa y el sustrato.

#### 45 **Metodología detallada**

##### **Aislamiento de ADN genómico de leucocitos de sangre periférica de pacientes asmáticos atópicos y los individuos de control normales:**

Se aisló ADN genómico de la sangre periférica de pacientes e individuos de control usando un procedimiento de precipitación por sales modificado (Nagarkatti R y col., 2002). Brevemente, se obtuvieron 10 ml de sangre de pacientes e individuos de control sin parentesco usando ACD Vacutainers (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.). Se añadió igual volumen de tampón C1 helado (4X) y luego se añadieron 30 ml de agua estéril helada para producir la lisis de la membrana celular (Promega genomic DNA Isolation Handbook). Tras esto, los núcleos se sedimentaron a 1300 x g durante 15 min a 4°C. El sedimento se lavó de nuevo con 1X tampón C1. Se añadieron 12 ml de tampón de lisis nuclear con 0,8 ml de 10% de SDS. Se añadieron 50 µl de una disolución 20 µg/µl de proteinasa K y el sedimento se resuspendió agitando brevemente con vórtex. Después de la incubación a 65°C durante 2-3 h, el material proteináceo se precipitó con la adición de 4 ml de NaCl 6 M. Después de la centrifugación

5 durante 15 min a 2500 rpm, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se usaron dos volúmenes de etanol absoluto (a temperatura ambiente) para precipitar el ADN (Miller y col., 1988). Entonces, el ADN precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%, se secó al aire y se disolvió en tampón TE. Se usaron diluciones apropiadas (1:100, en tampón TE) para determinar la DO a 260 nm y 280 nm. La calidad del ADN se evaluó usando la relación 260 nm/280 nm. La disolución madre de ADN se diluyó a 50 ng/μl y se usó para la amplificación por PCR y los experimentos de genotipado. La disolución madre de ADN se almacenó a -20°C.

#### **Identificación de repeticiones putativas en y alrededor del gen de INPP4A usando el software RepeatMasker™:**

10 Además de los dos microsatélites conocidos, concretamente D2S2311, D2S2187, se identificaron cinco secuencias repetitivas en el gen de INPP4A en el estudio población usando el software RepeatMasker™, pero se encontró que sólo la repetición de CT en el intrón 11 era polimórfica y se estudió en detalle (Figura 1B).

#### **Diseño y síntesis de cebadores de oligonucleótidos para amplificación por PCR de variantes del gen de INPP4A:**

15 Se diseñaron cebadores usando el software DNASTAR Primer Select SEC ID: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25 y 26. Los cebadores inversos para los polimorfismos de repetición se marcaron con 6-FAM para la detección por análisis de fragmentos en un secuenciador de matrices capilares automatizado 3100.

#### **Condiciones de amplificación por PCR para diferentes conjuntos de cebadores:**

##### **Amplificación por PCR de SEC ID Nº 1 y SEC ID Nº 2:**

**Cebadores:** SEC ID Nº 7, 8 y SEC ID Nº 9, 10

20 Amplificación por PCR de muestras de ADN genómico aisladas de leucocitos de sangre periférica de pacientes asmáticos atópicos e individuos de control normales usando los cebadores anteriormente dichos en una reacción agrupada. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 5 μl que contenía 25 ng de ADN genómico, 1,0 pmol de cada uno de los cebadores inversos marcados con 6-FAM y cebadores directos no marcados, MgCl<sub>2</sub> 1,5 Mm, 0,25 mM de cada dNTP, 0,03 U/μl de Taq ADN polimerasa (Bangalore Genie, India) y el tampón recomendado por el proveedor. Después de la PCR, 1 μl del producto de PCR se cargó con y patrón de tamaño interno (marcado con PET) en el analizador genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Se determinaron las longitudes de fragmentos usando (Genotyper 3.7, Applied Biosystems).

##### **Condiciones de PCR:**

30 Desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, treinta y cinco ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 65°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos; seguido de un periodo de extensión de segmentos de 10 minutos a 72°C.

##### **Amplificación por PCR de SEC ID Nº 3:**

**Cebador:** SEC ID Nº 11 y 12

35 Amplificación por PCR de muestras de ADN genómico aisladas de leucocitos de sangre periférica de pacientes asmáticos atópicos e individuos de control normales usando los cebadores anteriormente dichos. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 5 μl que contenía 25 ng de ADN genómico, 1,0 pmol de cada uno de un cebador directo marcado con 6-FAM y un cebador inverso no marcado, MgCl<sub>2</sub> 1,5 Mm, 0,25 Mm de cada dNTP, 0,03 U/μl de Taq ADN polimerasa (Bangalore Genie, India) y el tampón recomendado por el proveedor. Después de la PCR, 1 μl del producto de PCR se cargó con y patrón de tamaño interno (marcado con PET) en el analizador genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Se determinaron las longitudes de fragmentos usando (Genotyper 3.7, Applied Biosystems).

##### **Condiciones de PCR:**

45 Desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, treinta y cinco ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 68°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos; seguido de un periodo de extensión de segmentos de 10 minutos a 72°C.

##### **Amplificación por PCR de SEC ID Nº 4:**

**Cebador:** SEC ID Nº 13 y 14

50 Amplificación por PCR de muestras de ADN genómico aisladas de leucocitos de sangre periférica de pacientes asmáticos atópicos e individuos de control normales usando los cebadores anteriormente dichos. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20 μl que contenía 50 ng de ADN genómico, 2,0 pmoles de cada uno de un cebador directo e inverso, MgCl<sub>2</sub> 1,5 Mm, 0,25 Mm de cada dNTP, 0,03 U/μl de Taq ADN polimerasa (Bangalore Genie, India)

y el tampón recomendado por el proveedor. El producto de PCR purificado se usó para la reacción Snapshot.

**Condiciones de PCR:**

5 Desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, treinta y cinco ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, hibridación a 66°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 45 segundos; seguido de un periodo de extensión de segmentos de 10 minutos a 72°C.

**Amplificación por PCR de SEC ID Nº 5:**

**Cebador: SEC ID Nº 15 y 16**

10 Amplificación por PCR de muestras de ADN genómico aisladas de leucocitos de sangre periférica de pacientes asmáticos atópicos e individuos de control normales usando los cebadores anteriormente dichos. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl que contenía 50 ng de ADN genómico, 2,0 pmoles de cada uno de un cebador directo e inverso, MgCl<sub>2</sub> 1,5 Mm, 0,25 Mm de cada dNTP, 0,03 U/µl de Taq ADN polimerasa (Bangalore Genie, India) y el tampón recomendado por el proveedor. El producto de PCR purificado se usó para la reacción Snapshot.

**Condiciones de PCR:**

15 Desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, treinta y cinco ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, hibridación a 66°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 45 segundos; seguido de un periodo de extensión de segmentos de 10 minutos a 72°C.

**Amplificación por PCR de SEC ID Nº 6:**

**Cebador: SEC ID Nº 17 y 18**

20 Amplificación por PCR de muestras de ADN genómico aisladas de leucocitos de sangre periférica de pacientes asmáticos atópicos e individuos de control normales usando los cebadores anteriormente dichos. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl que contenía 50 ng de ADN genómico, 2,0 pmoles de cada uno de un cebador directo e inverso, MgCl<sub>2</sub> 1,5 Mm, 0,25 Mm de cada dNTP, 0,03 U/µl de Taq ADN polimerasa (Bangalore Genie, India) y el tampón recomendado por el proveedor. El producto de PCR purificado se usó para la reacción Snapshot.

**Condiciones de PCR:**

25 Desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, treinta y cinco ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, hibridación a 68°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 45 segundos; seguido de un periodo de extensión de segmentos de 10 minutos a 72°C.

**SECUENCIACIÓN DIRECTA DE LOS PRODUCTOS DE PCR PURIFICADOS**

30 La secuenciación directa de los productos de PCR purificados usando química de colorante terminador se llevó a cabo en un secuenciador de ADN automatizado ABI Prism 3100 para segmentos de genes con SEC ID Nº 4, 5 y 6. La secuenciación se llevó a cabo usando cebadores específicos, a saber: 13, 14, 15, 16, 17 y 18 en un secuenciador capilar ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para un mínimo de 20 individuos asmáticos atópicos y 20 de control. El producto de PCR se purificó en gel para la secuenciación. Brevemente, los cebadores de secuenciación, diluidos a 1 pmol por µl, y 75-150 ng/µl de producto de PCR se añadieron a 5 µl de mezcla de reacción, y el volumen se enrasó hasta 10 µl con agua MilliQ esterilizada en autoclave según las instrucciones del kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La PCR se estableció con las siguientes condiciones: 96°C durante 5 segundos, 55°C durante 30 segundos y 60°C durante 4 minutos. Las reacciones de secuenciación se purificaron con lavados con etanol al 70% para eliminar los cebadores sin incorporar y ddNTP fluorescentes. Brevemente, 26 µl de agua MilliQ esterilizada en autoclave se añadieron a la reacción de secuenciación. A los tubos se añadieron sesenta y cuatro microlitros de etanol al 100% enfriado y se agitaron con vórtex. Los tubos se centrifugaron a 16.000 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron con etanol al 70% por centrifugación a 16.000 g durante 5 minutos. Los sedimentos se secaron al aire y se resuspendieron en 10 µl de formamida Hi-Di al 100%. Los tubos se incubaron a 94°C durante 5 minutos y se dispusieron en el secuenciador automatizado 3100. El análisis de secuencias se llevó a cabo usando el software Sequence Navigator (ver 2.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y DNASTar (ver 1.1, DNASTAR). Los alelos homocigóticos y heterocigóticos se puntuaron manualmente.

**Genotipado de polimorfismos +92031 A/T, +92344 C/T, +92817 C/T, +110832 A/G y +131237 C/T:**

50 Los polimorfismos +92031 A/T, +92344 C/T, +92817 C/T, +110832 A/G y +131237 C/T se seleccionaron basándose en el desequilibrio de enlace entre todos los SNP (Figura 2) y se estudiaron usando el kit de extensión de cebadores de ddNTP SNaPshot (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). La PCR en SNaPshot se llevó a cabo usando 50 ng de molde de PCR purificado, 1 pmol de cebador con SE ID 19, 20, 21, 22 y 23 resp. y mezcla de reacción ABI ready y 1X tampón de dilución (como se suministra por el fabricante). La PCR se estableció con las siguientes condiciones: 96°C durante 10 segundos, 58°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos durante un total de 30 ciclos.

Para purificar la reacción de extensión del cebador, 1 U de fosfatasa intestinal bovina (CIP) diluida en 10X NEB3 (New England Biolabs) se añadió a la mezcla de reacción y la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora, seguido de una incubación durante 15 minutos a 72°C para la inactivación de la enzima. Estas muestras se sometieron posteriormente a electroforesis usando el analizador genético ABI Prism 3100 según las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron usando el programa ABI Prism GeneScan™ y Genotyper™ (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.).

**Significancia funcional del polimorfismo +110832 A/G (rs2278206), en la variante de corte y empalme  $\alpha$  3 del exón 17 extendido:**

Las secuencias PEST en la variante de corte y empalme  $\alpha$  3 se identificaron usando la herramienta PESTFIND de la base de datos proteómica ExPASy ([www.at.cmbmt.org/embnet/tools/bio/pestfind/](http://www.at.cmbmt.org/embnet/tools/bio/pestfind/)). La secuencia de proteínas se descargó de NCBI (AAK58870). La forma de corte y empalme de 977 aminoácidos de la proteína contiene aminoácidos adicionales a partir del exón 17 extendido. El polimorfismo +110832 A a G produce una sustitución de treonina por alanina no sinónima en la posición 604 en la secuencia de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos se cambió en la posición 604 de treonina a alanina y esta secuencia se ejecutó de nuevo por PESTFIND para encontrar secuencias PEST. Se aislaron plaquetas de sangre periférica de individuos sanos normales que tenían genotipos AA, GG y AG para el polimorfismo A+110832G y se estimularon con ionomicina 2  $\mu$ M en tampón de suspensión de plaquetas durante 5 y 10 minutos, respectivamente. Se realizó transferencia Western usando anticuerpo policlonal sc-12315 de cabra y anticuerpo anti-HRP de cabra. El barrido por densitometría de las bandas se hizo usando Alphamager (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) (Figura 7).

**Identificación de variantes de corte y empalme novedosas en la región de exón 15 - exón 19 de INPP4A usando cebadores con SEC ID Nº 25 y 26:**

Se aisló ARN de los leucocitos totales de 12 individuos asmáticos atópicos y 6 normales usando el kit de aislamiento EZ-RNA siguiendo las indicaciones del fabricante (Biological Industries). Se preparó ADNc a partir de 10  $\mu$ g de ARN total usando el kit cDNA Archive de Applied Biosystems. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20  $\mu$ l que contenía ADNc correspondiente a 100 ng de ARN de partida, 2,0 pmoles de cada uno de cebador directo e inverso, MgCl<sub>2</sub> 1,5 Mm, 0,25 Mm de cada dNTP, 0,03 U/ $\mu$ l de Taq ADN polimerasa (Bangalore Genie, India) y el tampón recomendado por el proveedor.

**Condiciones de PCR:**

Desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, treinta y ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, hibridación a 65°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 45 segundos; seguido de un periodo de extensión de segmentos de 10 minutos a 72°C.

La variante de corte y empalme de 598 pares de bases (Figura 8) se secuenció como se ha descrito anteriormente y se confirmó la delección del exón 16.

**Cálculo y estimación de la frecuencia de polimorfismos de repetición D2S2311, D2S2187 y de la de +99095 CA, polimorfismos de un único nucleótido +92031 A/T, +92344 C/T, +92817 C/T, +110832 A/G y +131237 C/T:**

Se ha usado el software CLUMP con simulaciones de Monte Carlo para probar la asociación alélica de marcadores multialélicos con fenotipo de enfermedad para polimorfismos de repetición. Se calcularon razones de posibilidades y se realizaron las pruebas de la chi al cuadrado para estudiar la asociación con fenotipo de enfermedad. Las repeticiones se han denotado según la longitud de fragmento en la que el dimensionamiento se hizo usando patrón de tamaño interno durante el barrido de genes. Los SNP se designan S1, S2, S3, S4 y S5.

**Estimación de las frecuencias de haplotipos generadas usando cuatro loci en individuos normales y pacientes asmáticos atópicos para encontrar la asociación entre estos haplotipos y la enfermedad:**

Se han generado haplotipos novedosos para los loci M1, S1, M3 y S4 usando el programa PHASE para grupos de pacientes (N = 192) y de control (N = 272) (Stephens M, Am J Hum Genet. Nov 73:1162-9, 2003). Se usaron parámetros por defecto con 100 iteraciones para generar los haplotipos (<http://archimedes.well.ox.ac.uk/pise/PHASE-simple.html>, PHASE Ver. 2.0.2). Se calcularon chi al cuadrado y razones de posibilidades para asociación con fenotipo.

**Análisis del desequilibrio de transmisión (TDT) de polimorfismos de repetición D2S2311, D2S2187 y del de +99095 CA, polimorfismos de un único nucleótido +92031 A/T, +92344 C/T, +92817 C/T, +110832 A/G y +131237 C/T y sus análisis haplotípicos en familias nucleares:**

En las familias se hizo el análisis TDT entre alelos usando TDT-sTDT (<http://genomics.med.upenn.edu/spielman/TDT.htm>). La transmisión haplotípica al individuo afectado se observó usando TRANSMIT (Transmit, versión 2.5.4).

Entonces, se obtiene la materia en la que las características, ventajas y los objetos de la invención anteriormente

mencionados, además de otros que serán evidentes, y puede entenderse en detalle. Estos dibujos forman una parte de la memoria descriptiva. Debe observarse, sin embargo, que los dibujos adjuntos ilustran realizaciones preferidas de la invención y, por tanto, no deben considerarse limitantes en su alcance.

5 **Desarrollo del modelo de asma de ratón sensibilizado y expuesto a albúmina de huevo y ratones de control tratados con solución salina:**

10 Los ratones BALB/c se sensibilizaron por inyecciones intraperitoneales de 20 µg de albúmina de huevo de gallina (OVA) (calidad V ≥ 98% de pureza, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) en 0,2 ml de solución salina adsorbida sobre 2 mg de alumbre (sensibilizados) o alumbre sola (control) en los días 0, 7 y 14. Entonces, los ratones se expusieron a 3% de albúmina de huevo aerosolizada (sensibilizados) o solución salina aerosolizada (control) 30 minutos por día durante 10 días consecutivos (del día 22 al día 32). La receptividad a metacolina (Sigma-Aldrich) se evaluó en ratones sin limitaciones conscientes por pletismografía barométrica usando protocolo, aparato y software suministrado por BUXCO (Troy, NY, EE.UU.). Los ratones se sacrificaron 16 h después de la última exposición y se tomó tejido de pulmón para la inmunohistoquímica.

15 **Tratamiento del modelo de asma de ratón inducido con albúmina de huevo con esteroide:**

15 Los ratones BALB/c se sensibilizaron por inyecciones intraperitoneales de 20 µg de albúmina de huevo de gallina (OVA) (calidad V ≥ 98% de pureza, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) en 0,2 ml de solución salina adsorbida sobre 2 mg de alumbre en los días 0, 7 y 14. Entonces, los ratones se expusieron a 3% de albúmina de huevo aerosolizada 30 minutos por día durante 10 días consecutivos (del día 22 al día 32). Se administró tratamiento con 1 mg/kg de dexametasona empezando desde el día de la última sensibilización hasta la última exposición (día 14-32). La hiperreceptividad bronquial se midió como se ha descrito previamente usando el pletismógrafo BUXCO (Troy, NY, EE.UU.).

20 Los ratones se sacrificaron 16 h después de la última exposición a OVA y los pulmones se sometieron a inmunohistoquímica.

25 **Inmunohistoquímica de la sección de tejido de pulmón de ratón para proteína de INPP4A:**

25 La inmunohistoquímica de la sección de pulmón de ratón se hizo usando el anticuerpo policlonal sc-12315 de cabra comercial (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; CA, EE.UU.) producido contra un péptido próximo al extremo amino de INPP4A de origen humano y de ratón siguiendo el protocolo convencional con ligeras modificaciones (Ather MH y col., 2004). Se usó gamma globulina de cabra como control de isotipo (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.; PA, EE.UU.).

30 **Breve descripción de los dibujos adjuntos:**

35 La **Figura 1A** muestra la presentación esquemática de las diferentes formas de corte y empalme conocidas de INPP4A, la **Figura 1B** muestra una presentación esquemática de las diferentes regiones polimórficas del gen de INPP4A estudiado. La repetición D2S2311, 44,7 kb en la dirección 5' del promotor, se denota M1. La repetición D2S2187 se denomina en lo sucesivo M2, el polimorfismo de repetición de CA en +99095 se denota M3. Los cinco polimorfismos también se muestran en el contexto de la secuencia debajo del gen.

La **Figura 2** muestra una visión general gráfica del desequilibrio de enlace para los ocho loci estudiados usando GOLD.

40 La **Figura 3** muestra la distribución de alelos de D2S2311 en el grupo de pacientes y de control. La figura representa las frecuencias de alelos en el locus de repetición D2S2311 con los tamaños de fragmento representados en el eje X y sus frecuencias respectivas en el eje Y.

La **Figura 4** muestra la distribución alélica y genotípica de +92031 A/T (S1) en el estudio de casos y controles.

La **Figura 5** muestra la distribución alélica y genotípica del polimorfismo de repetición de CA en el intrón 11 en el estudio de casos y controles.

45 La **Figura 6** muestra la distribución de haplotipos (M1\_S1\_M3\_S4) en pacientes y controles (Np = 192, Nc = 272) (Tabla 2). La figura representa las frecuencias de haplotipos en el eje X y sus frecuencias respectivas en el eje Y.

La **Figura 7** muestra la posible secuencia PEST y su validación experimental en la región de la variante de corte y empalme del exón 17 extendido y la comparación con la variante de sustitución de Thr por Ala.

50 La **Figura 8** muestra la imagen de gel de la variante de corte y empalme α 3 conocida junto con las variantes de corte y empalme novedosas identificadas en pacientes asmáticos atópicos.

La **Figura 9** muestra la inmunohistoquímica de secciones de pulmón de ratón de ratones de control tratados con solución salina, ratones sensibilizados con albúmina de huevo y los ratones sensibilizados y expuestos a albúmina de huevo tratados con esteroide.

55 **Asociación de los loci de repetición a trastornos atópicos tales como asma**

Para demostrar la asociación de los loci de repetición M1 y M2 y M3 a trastornos atópicos tales como asma se

realizó la prueba de la chi al cuadrado usando el software CLUMP. CLUMP es un programa diseñado para evaluar la significancia de la salida de valores observados en una tabla de contingencia de los valores esperados condicionados a los totales marginales. La significancia se evalúa usando un enfoque de Monte Carlo, realizando simulaciones repetidas para generar tablas que tienen los mismos totales marginales que el que se considera, y contando el número de veces que un valor de chi al cuadrado asociado a la tabla real se logra por los datos simulados al azar. Esto significa que los niveles de significancia asignados deberían ser objetivos (con precisión dependiente del número de simulaciones realizadas) y que no necesita tenerse en cuenta las correcciones de continuidad o pequeños valores esperados. El procedimiento se describe en completo en: Sham PC & Curtis D, 1995. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet.* 59: 97-105. Se obtuvo un patrón significativamente diferente de distribución de los alelos entre los dos grupos; para alelos en el locus M1 y encontrados que se asocian a susceptibilidad al asma  $\chi^2 = 43,441128$ , DF = 9, valor de  $p < 0,0001$ . Se encontró que el alelo 402 era un alelo de riesgo con razón de posibilidades 2,289, IC del 95% [1,5443 - 3,3929]. Se encontró que el alelo 400 era un alelo protector con razón de posibilidades 0,575, IC del 95% [0,4098 - 0,8068] como se calcula por la tabla 2x2 (<http://home.clara.net/sisa/twooby2.htm>) (Figura 3). Se obtuvieron resultados similares en estudios de asociación basados en familias (valor de  $p = 0,0007$ ) (Tabla 3a).

No hubo patrón de distribución significativamente diferente de los alelos entre los dos grupos para M2 ( $p = 0,214179$ ) en casos y controles (Tabla 3b).

También se encontró que el locus M3 estaba significativamente asociado a asma ( $p = 0,0006$ ). Se ha encontrado que las variantes alélicas de repetición de CA en el locus M3 se asocian a susceptibilidad al asma  $\chi^2 = 11,467334$ ,  $p = 0,0006$ . Se ha encontrado que la variante alélica de repetición de CA154 es un alelo de riesgo en el estudio de casos y controles con OR 1,734, IC del 95% [1,249 - 2,407] (Figura 5). Esta observación también se confirmó en el estudio basado en familias  $\chi^2 = 7,078$ , valor de  $p = 0,008$  (Tabla 3f).

#### **Demostración de la asociación del polimorfismo +92031 A/T (S1) a asma:**

Para demostrar la asociación del polimorfismo +92031 A/T se realizó la prueba de tendencia de Armitage. El patrón de distribución de los tres genotipos, AA, AT y TT fue significativamente diferente en los dos grupos estudiados ( $\chi^2 = 7,05$ ,  $p = 0,008$ ). El alelo A fue predominante en los casos en comparación con el grupo de control {OR = 1,542, IC del 95% (1,121-2,120),  $p = 0,0075$ } (Figura 4). Similarmente, se encontró que el alelo T estaba transmitido en exceso a crías afectadas en el estudio basado en familias usando el programa TDT-sTDT ( $\chi^2 = 9$ ,  $p = 0,0027$ ) (Tabla 3c).

#### **Demostración de la asociación del polimorfismo +110832 A/G (S4) a asma:**

Para demostrar la asociación del polimorfismo no sinónimo +110832 A/G se realizó la prueba de tendencia de Armitage en el estudio de casos y controles. El alelo de riesgo T mostró una asociación marginal con el fenotipo de enfermedad {razón de probabilidades = 1,324, IC del 95% (0,964 - 1,819),  $\chi^2 = 3,01$ ,  $p = 0,08$ }. Se encontró que el alelo A estaba transmitido en exceso a crías afectadas en el estudio basado en familias usando el programa TDT-sTDT ( $\chi^2 = 11,5$ ,  $p = 0,0007$ ) (Tabla 3g).

#### **Generación de haplotipos:**

Entonces, los inventores usaron el programa PHASE para generar haplotipos para grupos de pacientes y de control. El programa PHASE implementa un nuevo procedimiento estadístico para reconstruir haplotipos de datos de genotipo de población. Los experimentos con el software en datos tanto reales como simulados indican que puede proporcionar una mejora en el algoritmo EM para reconstruir haplotipos. Permite datos de genotipo ausentes y también puede manipular más de un locus independientemente del polimorfismo, por ejemplo, pueden analizarse simultáneamente SNP y repeticiones. Basándose en la salida del software, los valores de probabilidad de los haplotipos también se predicen y pueden utilizarse para diferenciar haplotipos más confiados. El software PHASE es adecuado para distancias genéticas de 100 cM o menores. Similarmente se realizó análisis haplotípico basado en familias usando el programa TRANSMIT. TRANSMIT prueba la asociación entre marcador genético y enfermedad examinando la transmisión de marcadores de padres a la cría afectada. Las pruebas se basan en un vector de puntuación que se promedia de todas las posibles configuraciones de haplotipos y transmisiones parentales de acuerdo con los datos observados.

En el estudio de casos y controles, los haplotipos cuya frecuencia esperada fue superior a 0,025 en cualquiera de los dos grupos se muestran en la Tabla 2 (Figura 6). La posibilidad en favor de pacientes en vez de controles que tienen haplotipo 402\_A\_154\_A fue 3,68 con IC del 95%: 2,2977, 5,916. Las pruebas de  $\chi^2$  de relaciones de probabilidades correspondientes mostraron un valor de  $p$  inferior a 10<sup>-5</sup>. TRANSMIT también mostró resultados similares en el estudio de asociación basado en familias ( $\chi^2 = 4,2714$ , DF = 1, valor de  $p = 0,038$ ). Por tanto, el haplotipo de 4 loci 402\_A\_154\_A estuvo fuertemente asociado a asma. Por otra parte, la posibilidad en favor de pacientes en vez de controles que tienen haplotipo 400\_T\_152\_G y 400\_A\_154\_A fue 0,16, IC del 95%: 0,46-1,09 y 0,12, IC del 95%: 0,33-0,82, respectivamente. También se encontró que el haplotipo 400\_T\_152\_G estaba negativamente asociado a la aparición de asma atópico en el estudio basado en familias ( $\chi^2 = 8,065$ , DF = 1, valor de  $p = 0,0045$ ). Por tanto, se identificó que los haplotipos 402\_A\_154\_A y 400\_T\_152\_G eran haplotipos de riesgo y protectores muy importantes, respectivamente.

**Significancia funcional del polimorfismo +110832 A/G (rs2278206) en la variante de corte y empalme  $\alpha$  3 del exón 17 extendido:**

5 La sustitución de treonina por alanina en el aminoácido 604 en la variante de corte y empalme  $\alpha$  3 del gen de INPP4A produjo un cambio en la puntuación de PESTfind de +7,49 a +4,95 haciendo que fuera una secuencia PEST deficiente. Se encontró que la proteína de plaquetas de individuos con genotipo AA era más susceptible a degradación como se observa por casi el 60% de degradación en el plazo de 10 min desde la estimulación, mientras que la proteína de individuos con genotipo GG era menos susceptible (casi el 31% de degradación). Por tanto, se encontró que los niveles basales de proteína de INPP4A de individuos con genotipos AA eran menores (datos no mostrados), sugiriendo también escasa estabilidad *in vivo* (Figura 7).

10 **Identificación de variantes de corte y empalme novedosas en la región del exón 15 - exón 19 de INPP4A:**

Se identificó la variante de corte y empalme novedosa de 598 pares de bases en pacientes asmáticos. Esta variante tiene deletado el exón 16 (219 bases) como se ha confirmado por secuenciación (Figura 8).

**Disminución significativa en la expresión de proteínas de INPP4A en el modelo de ratón de asma inducido por alérgeno:**

15 Se encontró que la proteína de INPP4A se expresaba a niveles significativamente inferiores en el modelo de ratón de asma inducido con albúmina de huevo con respecto a controles tratados con solución salina (Figura 9).

**Restablecimiento de la proteína de INPP4A en ratones inducidos por albúmina de huevo mediante tratamiento con agente antiinflamatorio:**

20 Se encontró que los niveles de proteína de INPP4A se restablecieron en el caso del modelo de ratón de asma inducido con albúmina de huevo tratado con esteroide. Sensiblemente, se encontró que la expresión de la proteína de INPP4A después del tratamiento con esteroide fue incluso superior que en los ratones de control tratados con solución salina (Figura 9).

**Análisis de polimorfismos:**

A. Preparación de muestras:

25 Los polimorfismos se detectan en un ácido nucleico diana de un individuo que se analiza. Para el ensayo de ADN genómico es adecuada prácticamente cualquier muestra biológica (distinta de glóbulos rojos puros). Por ejemplo, muestras de tejido convenientes incluyen sangre completa, semen, saliva, lágrimas, orina, materia fecal, sudor, de la boca, piel y pelo. Para el ensayo de ADNc o ARNm, la muestra de tejido debe obtenerse de un órgano en el que el ácido nucleico diana se expresa.

30 Muchos de los procedimientos descritos a continuación requieren la amplificación de ADN a partir de muestras diana. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, por PCR. Véase generalmente PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, N.Y., N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. Innis, y col., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Mattila y col., Nucleic Acids Res. 19, 4967 (1991) y la patente de EE.UU. nº 4.683.202 (cada uno de los cuales se incorpora por referencia para todos los fines).

35 Otros procedimientos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase Barringer KJ y col., Gene 89:117-22, 1990; Friedhoff P y col., Anal Biochem 215:9-16, 1993) y Nucleic Acid Based Sequence Amplification (NASBA). Los dos últimos procedimientos de amplificación implican reacciones isotérmicas basadas en transcripción isotérmica que producen tanto ARN monocatenario (ARNmc) como ADN bicatenario (ADNbc) como productos de amplificación en una relación de aproximadamente 30 ó 100 a 1, respectivamente.

40 B. Detección de polimorfismos en ADN diana:

Hay dos tipos distintos de análisis dependiendo de si un polimorfismo en cuestión ya se ha caracterizado o no. El primer tipo de análisis se denomina algunas veces en lo sucesivo caracterización *de novo*. Este análisis compara secuencias diana en diferentes individuos para identificar puntos de variación, es decir, sitios polimórficos. Analizando grupos de individuos que representan la mayor diversidad étnica entre seres humanos y la mayor variedad de razas y especies en plantas y animales pueden identificarse patrones característicos de los alelos/haplotipos más comunes del locus, y las frecuencias de tales poblaciones en la población determinada. Pueden determinarse frecuencias alélicas adicionales para subpoblaciones caracterizadas por criterios tales como geografía, raza o sexo. La identificación *de novo* de los polimorfismos de la invención se describe en la sección de ejemplos. El segundo tipo de análisis está determinando qué forma(s) de un polimorfismo caracterizado está(n) presentes en individuos en prueba. Hay una variedad de procedimientos adecuados que a su vez se tratan.

1. Detección de repeticiones (detección de la variación del tamaño):

El diseño y el uso de cebadores que flanquean la secuencia contienen la secuencia de repetición u otros elementos

polimórficos que conducen a una diferencia de tamaño. La amplificación por PCR de la secuencia conduce a la presencia de un conjunto de productos amplificados que se diferencian por la repetición específica o tamaño de polimorfismo. Estas diferencias de tamaño pueden entonces detectarse usando procedimientos basados en gel, basados en carga. Normalmente, para la detección basada en gel, uno de los cebadores está marcado con un compuesto fluorescente que luego puede excitarse y detectarse usando una cámara CCD u otros procedimientos.

2. Sondas específicas de alelo:

El diseño y el uso de sondas específicas de alelo para analizar polimorfismos se describe, por ejemplo, por Saiki y col., *Nature* 324, 163-166, 1986; Dattagupta, documento EP 235.726, Saiki, documento WO 89/11548. Pueden diseñarse sondas específicas de alelo que se hibridan con un segmento de ADN diana de un individuo, pero que no se hibridan con el segmento correspondiente de otro individuo debido a la presencia de diferentes formas polimórficas en los segmentos respectivos de los dos individuos.

3. Cebadores específicos de alelo:

Un cebador específico de alelo se hibrida con un sitio en ADN diana que se solapa con un polimorfismo y sólo ceba la amplificación de una forma alélica con la que el cebador presenta complementariedad perfecta. Este cebador se usa conjuntamente con un segundo cebador que se hibrida en un sitio distal. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/22456.

4. Secuenciación directa:

El análisis directo de la secuencia de polimorfismos de la presente invención puede llevarse a cabo usando tanto el procedimiento de terminación de la cadena dideoxi como el procedimiento de Maxam Gilbert (véase Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed., CSHP, Nueva York 1989); Zystipio y col., *Recombinant DNA Laboratory Manual*, (Acad. Press, 1988)).

5. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante:

Los productos de amplificación generados usando la reacción en cadena de la polimerasa pueden analizarse usando electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. Pueden identificarse diferentes alelos basándose en las diferentes propiedades de fusión dependientes de secuencia y migración electroforética de ADN en disolución. Erlich, ed., *PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification*, (W.H. Freeman y Co, Nueva York, 1992), Capítulo 7.

6. Análisis de polimorfismos de conformación monocatenaria:

Pueden diferenciarse alelos de secuencias diana usando análisis de polimorfismos de conformación monocatenaria que identifican diferencias de bases por alteración en la migración electroforética de productos de PCR monocatenarios como se describe en Orita y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86, 2766-2770, 1989. Los productos de PCR amplificados pueden generarse como se ha descrito anteriormente, y calentarse o desnaturizarse de otro modo para formar productos de amplificación monocatenarios. Los ácidos nucleicos monocatenarios pueden replegarse o formar estructuras secundarias que son parcialmente dependientes de la secuencia de bases. Las diferentes movilidades electroforéticas de productos de amplificación monocatenarios pueden relacionarse con la diferencia de secuencias de bases entre alelos de secuencias diana.

**Procedimientos de uso:**

Después de determinar la(s) forma(s) polimórfica(s) presente(s) en un individuo en uno o más sitios polimórficos, esta información puede usarse en varios procedimientos.

A. Correlación de polimorfismos con rasgos fenotípicos:

Las enfermedades atópicas son de naturaleza heterogénea y como tales hay muchos subfenotipos y rasgos para los cuales puede observarse la asociación. Los polimorfismos de la invención pueden contribuir al fenotipo de un organismo de diferentes formas. Como se ha descrito anteriormente, los polimorfismos pueden actuar a diversos niveles de organización celular, por lo que los fenotipos de enfermedad se observan como resultado final. Estos polimorfismos pueden proporcionar diferentes ventajas o desventajas de selección. Por ejemplo, una mutación de células falciformes heterocigótica confiere resistencia a malaria, pero una mutación de células falciformes homocigótica es normalmente letal. Un único polimorfismo puede afectar a más de un rasgo fenotípico.

Asimismo, un único rasgo fenotípico puede afectarse por polimorfismos en diferentes genes. Además, algunos polimorfismos predisponen a un individuo a una mutación distinta que está causalmente relacionada con un cierto fenotipo. Los rasgos fenotípicos incluyen enfermedades que tienen componentes genéticos conocidos, pero sin mapear hasta la fecha. Los rasgos fenotípicos también incluyen síntomas de, o susceptibilidad a, enfermedades multifactoriales de las que un componente es o puede ser genético tales como atopia, enfermedades autoinmunitarias, inflamación, cáncer, enfermedades del sistema nervioso e infección por microorganismos patógenos. Algunos ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis

reumatoide, diabetes, esclerosis múltiple (dependiente y no independiente de insulina) y enfermedad de Graves. Algunos ejemplos de cánceres incluyen cánceres de mama, vejiga, colon, cerebro, etc. Como tales, los rasgos fenotípicos también incluyen características, por ejemplo, susceptibilidad o receptividad a fármacos o tratamientos terapéuticos particulares.

- 5 Para realizar el análisis de asociación de los fenotipos de enfermedad y marcadores genéticos, la presencia o ausencia de un conjunto de polimorfismos (es decir, un conjunto polimórfico) se determina para un conjunto/población de individuos, algunos de los cuales presentan un rasgo particular llamado de forma muy diversa caso/ pacientes/ afectados/ individuos enfermos, etc., y algunos de los cuales presentan falta del rasgo llamado de forma muy diversa individuos de control/ normales etc. Entonces se cuentan los alelos de cada polimorfismo del conjunto para determinar si la presencia o ausencia de un alelo particular o un conjunto de alelos o un haplotipo está asociada al rasgo de interés. La prueba para tales asociaciones puede realizarse por procedimientos estadísticos convencionales tales como una prueba de  $\chi^2$ , etc. El valor de significancia se obtiene basándose en los valores obtenidos para la hipótesis probada, por ejemplo, si el alelo X está más presente en pacientes que en controles y si el alelo X no está más presente en pacientes que en controles. Si este valor se encuentra en un intervalo particular, entonces determina el nivel de significancia de las correlaciones. Por ejemplo, podría encontrarse que la presencia del alelo A1 en el sitio polimórfico 1 establece una correlación con enfermedad de fibrosis quística. Como otro ejemplo podría encontrarse que la presencia combinada del alelo A1 en el sitio polimórfico 1 y el alelo B1 en el sitio polimórfico 2 establece una correlación con un aumento de 10 veces en la gravedad de fibrosis quística.

- 20 Tales asociaciones pueden ser de beneficio inmediato si existe una correlación extremadamente fuerte. Por ejemplo, la detección del polimorfismo A1 y B1 de fibrosis quística en un paciente puede permitir el rápido diagnóstico y discriminación de otras enfermedades que presentan fenotipos similares; también puede permitir el tratamiento si está disponible; puede permitir cribar neonatos para la detección y/o para la susceptibilidad y/o la evaluación del riesgo puede permitir la selección de procedimientos de control mejores y mejorados para la enfermedad de aquellos que están disponibles; puede permitir que se administre tratamiento si se determina que el sitio polimórfico también establece una correlación con pautas terapéuticas particulares y que tales fármacos terapéuticos son más beneficiosos para el paciente que otros fármacos.

#### B. Mapeo genético de rasgos fenotípicos:

- 30 La sección previa se refiere a identificar correlaciones entre rasgos fenotípicos y polimorfismos que contribuyen directamente o indirectamente a aquellos rasgos. La presente sección describe la identificación de un enlace físico entre un locus genético asociado a un rasgo de interés y marcadores polimórficos que no están asociados al rasgo, pero que están en proximidad física al locus genético responsable del rasgo y se co-segregan con él. Tal análisis es útil para mapear un locus genético asociado a un rasgo fenotípico para una posición cromosómica, y así clonar gen(es) responsable(s) del rasgo. Por favor, véanse (Altshuler D y col., 1998, N Engl J Med 338:1626; Cargill M y col., 1999, Nat Genet 22:231-8; Chang C, 1988, Proc Natl Acad Sci U S A 85:6856-60; Hacia JG y col., 1999, Nat Genet 22:164-7; Hirschhorn JN y col., 2000, Proc Natl Acad Sci U S A 97:12164-9; Lander ES y Botstein D, 1986, Proc Natl Acad Sci U S A 83:7353-7; Lander ES, 1993, Nat Genet 4:5-6; Reich DE y col., 2001, Nature 411:199-204; Sachidanandam R y col., 2001, Nature 409:928-33). Los genes localizados por enlace pueden clonarse mediante un procedimiento conocido como clonación direccional.

- 40 Están disponibles programas informáticos para el cálculo de puntuaciones de yodo para valores diferentes de theta. Otras referencias sobre el enlace y el mapeo de la enfermedad que usan los enfoques anteriormente mencionados incluyen Kreutz R y col., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A 92:8778-82; de Gouyon B y col., 1993, Proc Natl Acad Sci U S A 90:1877-81; Julier C y col., 1990, Proc Natl Acad Sci U S A 87:4585-9; Oberle I y col., 1986, Proc Natl Acad Sci U S A 83:1016-20; Lathrop GM y col., 1984, Proc Natl Acad Sci U S A 81:3443-6; Cohen D y col., 1984, Proc Natl Acad Sci U S A 81:1774-8.

- 45 El mismo sustrato puede usarse como molde para sondas de oligonucleótidos específicas de alelo para detectar todos los polimorfismos enumerados. Para fines de cribado iniciales, el polimorfismo de repetición D2S2311 encontrado 44,7 kb en la dirección 5' del gen humano de *INPP4A* podría ser útil ya que el alelo 400 de este polimorfismo está negativamente asociado, mientras que el alelo 402 está positivamente asociado a asma. Para este locus, la PCR se llevó a cabo en un volumen total de 5  $\mu$ l que contenía 25 ng de ADN genómico, 1,25 pmoles de cada uno de un cebador directo marcado con 6-FAM y un cebador inverso no marcado,  $MgCl_2$  1,5 Mm, 0,25 Mm de cada dNTP, 0,03 U/ $\mu$ l de Taq ADN polimerasa (Bangalore Genie, India) y el tampón recomendado por el proveedor. Después de la PCR, 1  $\mu$ l del producto de PCR se cargó con un patrón de tamaño interno (marcado con PET) en el analizador genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Se determinaron las longitudes de fragmentos usando el software Genotyper versión 3.7 (Applied Biosystems). Si se requiere, posteriormente también podría llevarse a cabo el genotipado en los otros siete loci, concretamente +92031 A/T, +92344 C/T, +92817 C/T, +110832 A/G, +131237 C/T y la repetición +99095 CA.

El genotipado de los polimorfismos +92031 A/T, +92344 C/T, +92817 C/T, +110832 A/G, +131237 C/T puede llevarse a cabo usando cebadores de SnapShot de SEC ID N° 19, 20, 21, 22, 23, respectivamente.

Adicionalmente, los pares de oligonucleótidos pueden emplearse para detectar variantes de corte y empalme

novedosas del ARNm de INPP4A como se indica anteriormente. Componentes adicionales opcionales de un kit incluyen, por ejemplo, enzimas de restricción, transcriptasa o polimerasa inversa, el sustrato nucleósido-trifosfatos, medios usados para marcar (por ejemplo, un conjugado de avidina-enzima y sustrato de enzima y cromógeno si la marca es biotina) y el tampón apropiado para la transcripción inversa, PCR, o reacciones de hibridación. Normalmente, el kit también contiene instrucciones para llevar a cabo los procedimientos.

Los siguientes ejemplos se facilitan sólo a modo de ilustración y, por tanto, no deben interpretarse que limitan el alcance de la presente invención.

### Ejemplo 1

#### Asociación del locus de repetición D2S2311 a trastornos atópicos tales como asma:

La extensión de ADN de 401 pb de SEC ID N° 1 del gen de INPP4A que tiene el polimorfismo de repetición D2S2311 se amplificó por PCR usando cebadores novedosos de SEC ID N° 7 y 8. La amplificación por PCR de muestras de ADN genómico aisladas de leucocitos de sangre periférica de pacientes asmáticos atópicos e individuos de control normales se hizo usando los cebadores anteriormente dichos en una reacción agrupada. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 5 µl que contenía 25 ng de ADN genómico, 1,0 pmol de cada uno de cebadores inversos marcados con 6-FAM y cebadores directos no marcados, MgCl<sub>2</sub> 1,5 Mm, 0,25 Mm de cada dNTP, 0,03 U/µl de Taq ADN polimerasa (Bangalore Genie, India) y el tampón recomendado por el proveedor. Después de la PCR, 1 µl del producto de PCR se cargó con y el patrón de tamaño interno (marcado con PET) en el analizador genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Se determinaron las longitudes de fragmentos usando (Genotyper 3.7, Applied Biosystems). La PCR se estableció con las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, treinta y cinco ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 65°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos; seguido de un periodo de extensión de segmentos de 10 minutos a 72°C. Para demostrar la asociación del locus de repetición D2S2311 a trastornos atópicos tales como asma se usó el software de análisis CLUMP. CLUMP es un programa diseñado para evaluar la significancia de la salida de valores observados en una tabla de contingencia de los valores esperados condicionados a los totales marginales. La significancia se evalúa usando un enfoque de Monte Carlo, realizando simulaciones repetidas para generar tablas que tienen los mismos totales marginales que el que se considera, y contando el número de veces que un valor de chi al cuadrado asociado a la tabla real se logra por los datos simulados al azar. Esto significa que los niveles de significancia asignados deberían ser objetivos (con precisión dependiente del número de simulaciones realizadas) y que no necesita tenerse en cuenta las correcciones de continuidad o pequeños valores esperados. Este análisis mostró diferencias significativas entre la distribución del recuento de alelos de grupos de pacientes y de control ( $\chi^2 = 43,441128$ , DF = 9, valor de  $p < 0,0001$ ). Los inventores observaron un patrón significativamente diferente de distribución de los alelos entre los dos grupos; los alelos 402 y 404 se representaron en exceso en el grupo de pacientes mientras que los alelos 400 y 406 fueron los principales alelos en el grupo de control. Se encontró que el alelo 402 era un alelo de riesgo con razón de posibilidades 2,289, IC del 95% [1,5443 - 3,3929]. Se encontró que el alelo 400 era un alelo protector con razón de posibilidades 0,575, IC del 95% [0,4098 - 0,8068] como se calcula por la tabla 2x2 (<http://home.clara.net/sisa/twoy2.htm>) (Figura 3). Se obtuvieron resultados similares en el estudio basado en familias (valor de  $p = 0,0007$ ) (Tabla 3a).

### Ejemplo 2

#### Asociación del polimorfismo +92031 A/T a trastornos atópicos tales como asma:

La extensión de ADN de 1036 pb de SEC ID N° 4 del gen de INPP4A que tiene el polimorfismo +92031 A/T se amplificó por PCR usando cebadores novedosos de SEC ID N° 13 y 14. El genotipado se hizo usando el kit de extensión de cebadores de ddNTP SNaPshot (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). La PCR por SNaPshot se llevó a cabo usando 50 ng de molde de PCR purificado, 1 pmol de cebador con SEC ID 19 y mezcla de reacción ABI ready y 1X tampón de dilución (como se suministra por el fabricante). La PCR se estableció con las siguientes condiciones: 96°C durante 10 segundos, 58°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos durante un total de 30 ciclos. Para purificar la reacción de extensión del cebador, 1 U de fosfatasa intestinal bovina (CIP) diluida en 10X NEB3 (New England Biolabs) se añadió a la mezcla de reacción y la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora, seguido de una incubación durante 15 minutos a 72°C para la inactivación de enzimas. Estas muestras se sometieron posteriormente a electroforesis usando el analizador genético ABI Prism 3100 según las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron usando el programa ABI Prism GeneScan™ y Genotyper™ (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). Para demostrar la asociación del polimorfismo +92031 A/T se realizó la prueba de tendencia de Armitage. El patrón de distribución de los tres genotipos, AA, AT y TT fue significativamente diferente en los dos grupos estudiados ( $\chi^2 = 7,05$ ,  $p = 0,008$ ). El alelo A fue predominante en los casos en comparación con el grupo de control {OR = 1,542, IC del 95% (1,121 - 2,120),  $p = 0,0075$ } (Tabla 1, Figura 4). Similarmente, se encontró que el alelo A se transmitía en exceso a crías afectadas en el estudio basado en familias usando el programa TDT-sTDT ( $\chi^2 = 9$ ,  $p = 0,0027$ ) (Tabla 3c).

**Ejemplo 3****Asociación del polimorfismo +110832 A/G a trastornos atópicos tales como asma:**

La extensión de ADN de 961 pb de SEC ID N° 5 del gen de INPP4A que tiene el polimorfismo +110832 A/G se amplificó por PCR usando cebadores novedosos de SEC ID N° 15 y 16. El genotipado se hizo usando el kit de extensión de cebadores de ddNTP SNaPshot (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). La PCR por SnaPshot se llevó a cabo usando 50 ng de molde de PCR purificado, 1 pmol de cebador con SEC ID 22 y mezcla de reacción ABI ready y 1X tampón de dilución (como se suministra por el fabricante). La PCR se estableció con las siguientes condiciones: 96°C durante 10 segundos, 58°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos durante un total de 30 ciclos. Para purificar la reacción de extensión del cebador, 1 U de fosfatasa intestinal bovina (CIP) diluida en 10X NEB3 (New England Biolabs) se añadió a la mezcla de reacción y la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora, seguido de una incubación durante 15 minutos a 72°C para la inactivación de enzimas. Estas muestras se sometieron posteriormente a electroforesis usando el analizador genético ABI Prism 3100 según las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron usando el programa ABI Prism GeneScan™ y Genotyper™ (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). Para demostrar la asociación del polimorfismo +110832 A/G se realizó la prueba de tendencia de Armitage en el estudio de casos y controles. El alelo de riesgo A mostró una asociación marginal con el fenotipo de enfermedad {razón de probabilidades = 1,324, IC del 95% (0,964-1,819),  $\chi^2 = 3,01$ ,  $p = 0,08$ } (Tabla 1). Se encontró que el alelo A se transmitió en exceso a crías afectadas en el estudio basado en familias usando el programa TDT-sTDT ( $\chi^2 = 11,5$ ,  $p = 0,0007$ ) (Tabla 3e).

**Ejemplo 4****Asociación del haplotipo del locus M1\_S1\_M3\_S4 de INPP4A a trastornos atópicos tales como asma:**

Para demostrar la asociación haplotípica se usó el programa PHASE para generar haplotipos para grupos de pacientes y de control. El programa PHASE implementa un nuevo procedimiento estadístico para reconstruir haplotipos de datos de genotipo de población. Los experimentos con el software en datos tanto reales como simulados indican que puede proporcionar una mejora en el algoritmo EM para reconstruir haplotipos. Permite datos de genotipo ausentes y también puede manipular más de un locus independientemente del polimorfismo, por ejemplo, pueden analizarse simultáneamente SNP y repeticiones. Basándose en la salida del software, los valores de probabilidad de los haplotipos también se predicen y pueden utilizarse para diferenciar haplotipos más confiados. El software PHASE es adecuado para distancias genéticas de 100 cM o menores. Similarmente se realizó análisis haplotípico basado en familias usando el programa TRANSMIT. TRANSMIT prueba la asociación entre marcador genético y enfermedad examinando la transmisión de marcadores de padres a la cría afectada. Las pruebas se basan en un vector de puntuación que se promedia de todas las posibles configuraciones de haplotipos y transmisiones parentales de acuerdo con los datos observados.

En el estudio de casos y controles, los haplotipos cuya frecuencia esperada fue superior a 0,025 en cualquiera de los dos grupos se muestran en la Tabla 2 (Figura 6). La posibilidad en favor de pacientes en vez de controles que tienen haplotipo 402\_A\_154\_A fue 3,68 con IC del 95%: 2,2977, 5,916. Las pruebas  $\chi^2$  de relaciones de probabilidades correspondientes mostraron un valor de p inferior a 10<sup>-5</sup>. TRANSMIT también mostró resultados similares en el estudio de asociación basado en familias ( $\chi^2 = 4,2714$ , DF = 1, valor de p = 0,038). Por tanto, el haplotipo de 4 loci que comprende los loci M1\_S1\_M3\_S4, 402\_A\_154\_A estuvo fuertemente asociado a asma. Por otra parte, la posibilidad en favor de pacientes en vez de controles que tienen haplotipo 400\_T\_152\_G y 400\_A\_154\_A fue 0,16, IC del 95%: 0,46-1,09 y 0,12, IC del 95%: 0,33-0,82, respectivamente. También se encontró que el haplotipo 400\_T\_152\_G estaba negativamente asociado a la aparición de asma atópico en el estudio basado en familias. ( $\chi^2 = 8,065$ , DF = 1, valor de p = 0,0045). Por tanto, se identificó que los haplotipos 402\_A\_154\_A y 400\_T\_152\_G eran haplotipos de riesgo y protectores muy importantes, respectivamente.

**Ejemplo 5****Análisis PEST del polimorfismo +110832 A/G:**

Para demostrar la importancia de la sustitución de treonina por alanina en el aminoácido 604 en la variante de corte y empalme  $\alpha$  3 del gen de INPP4A. El exón extendido contiene la posible secuencia PEST del aminoácido 584- 607 con la puntuación PESTfind de +7,49 ([www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/pestfind/](http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/pestfind/)). El polimorfismo +110832 A/G (rs2278206) produce una sustitución de treonina por alanina en la posición 604 en la secuencia de proteínas produciendo una secuencia PEST deficiente (puntuación de PESTfind +4,95). Por tanto, la sustitución de treonina por alanina en este locus particular puede hacer que la enzima de INPP4 sea resistente a proteasas calpaínas (Figura 7 A).

**Ejemplo 6****Validación funcional del polimorfismo +110832 A/G:**

Para confirmar esta hipótesis experimentalmente, las plaquetas de individuos sanos normales de diferentes genotipos en A+110832G (S4) se estimularon con ionomicina y la degradación de INPP4A se comprobó por análisis

de transferencia Western. Se encontró que la proteína de plaquetas de individuos con genotipo AA era más susceptible a degradación como se observa por casi el 60% de degradación en el plazo de 10 min desde la estimulación, mientras que la proteína de individuos con genotipo GG era menos susceptible (casi el 31% de degradación). Por tanto, se encontró que los niveles basales de proteína de INPP4A de individuos con genotipos AA eran menores (datos no mostrados), sugiriendo también escasa estabilidad *in vivo* (Figura 7b, 7c).

### Ejemplo 7

#### Variantes de corte y empalme novedosas del gen de INPP4A:

Para demostrar la presencia de variantes de corte y empalme novedosas del gen de INPP4A expresado en sangre de pacientes asmáticos atópicos. Se llevó a cabo la RT-PCR del ARN de 12 individuos asmáticos atópicos y 4 sanos normales. Se aisló ARN de los leucocitos totales usando el kit de aislamiento EZ-RNA siguiendo las instrucciones del fabricante (Biological, Industries). Se preparó ADNc a partir de 10 µg de ARN total usando el kit cDNA Archive de Applied Biosystems. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl que contenía ADNc correspondiente a 100 ng de ARN de partida, 2,0 pmoles de cada uno de cebador directo e inverso (SEC ID 25 y 26, respectivamente), MgCl<sub>2</sub> 1,5 Mm, 0,25 Mm de cada dNTP, 0,03 U/µl de Taq ADN polimerasa (Bangalore Genie, India) y el tampón recomendado por el proveedor. Condiciones de PCR: desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, hibridación a 65°C durante 45 segundos, extensión a 72°C durante 45 segundos; seguido de un periodo de extensión de segmentos de 10 minutos a 72°C. Para demostrar la presencia de variantes de corte y empalme novedosas del gen de INPP4A expresado en sangre de pacientes asmáticos tópicos. Se llevó a cabo la RT-PCR del ARN de 12 individuos asmáticos atópicos y 4 sanos normales. Se identificaron dos variantes de corte y empalme adicionales, aparte de la α 3 informada, en cuatro individuos asmáticos atópicos, mientras que no se observó variante de corte y empalme en los individuos sanos normales (Figura 8).

### Ejemplo 8

#### Expresión inducida por alérgenos del perfil de proteínas de INPP4A:

Los ratones BALB/c se sensibilizaron por inyecciones intraperitoneales de 20 µg de albúmina de huevo de gallina (OVA) (calidad V ≥ 98% de pureza, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) en 0,2 ml de solución salina adsorbida sobre 2 mg de alumbre (sensibilizados) o alumbre sola (control) en los días 0, 7 y 14. Entonces, los ratones se expusieron a 3% de albúmina de huevo aerosolizada (sensibilizados) o solución salina aerosolizada (control) 30 minutos por día durante 10 días consecutivos (del día 22 al día 32). La receptividad a metacolina (Sigma-Aldrich) se evaluó en ratones sin limitaciones conscientes por pletismografía barométrica usando protocolo, aparato y software suministrado por BUXCO (Troy, NY, EE.UU.). Los ratones se sacrificaron 16 h después de la última exposición y se tomó tejido de pulmón para inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica de la sección de pulmón de ratón se hizo usando el anticuerpo policlonal sc-12315 de cabra comercial (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; CA, EE.UU.) producido contra un péptido próximo al extremo amino de INPP4A de origen humano y de ratón siguiendo el protocolo convencional con ligeras modificaciones (Ather MH y col., 2004). Se usó gamma-globulina de cabra como control de isotipo (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.; PA, EE.UU.).

Se observó que la proteína de INPP4A se expresaba a menores niveles en el modelo de ratón de asma inducido con albúmina de huevo que en los controles tratados con solución salina (Figura 9).

### Ejemplo 9

#### Restablecimiento de la proteína de INPP4A mediante tratamiento con agente antiinflamatorio tal como esteroide:

Los ratones BALB/c se sensibilizaron por inyecciones intraperitoneales de 20 µg de albúmina de huevo de gallina (OVA) (calidad V ≥ 98% de pureza, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) en 0,2 ml de solución salina adsorbida sobre 2 mg de alumbre en los días 0, 7 y 14. Entonces, los ratones se expusieron a 3% de albúmina de huevo aerosolizada 30 minutos por día durante 10 días consecutivos (del día 22 al día 32). Se administró tratamiento con 1 mg/kg de dexametasona empezando desde el día de la última sensibilización hasta la última exposición (día 14-32). La hiperreceptividad bronquial se midió como se ha descrito previamente usando el pletismógrafo BUXCO (Troy, NY, EE.UU.). Los ratones se sacrificaron 16 h después de la última exposición a OVA y los pulmones se sometieron a inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica de la sección de pulmón se hizo usando el anticuerpo policlonal sc-12315 de cabra comercial (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; CA, EE.UU.) producido contra un péptido próximo al extremo amino de INPP4A de origen humano y de ratón siguiendo el protocolo convencional con ligeras modificaciones (Ather MH y col., 2004). Se usó gamma-globulina de cabra como control de isotipo (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.; PA, EE.UU.). Se encontró que los niveles de proteína de INPP4A se restauraron a niveles normales en el caso del modelo de asma de ratón inducido con albúmina de huevo tratado con esteroide (Figura 9).

Tabla 1: Frecuencia (%) de SNP en pacientes y controles.

SNP ID	Genotipo	Pacientes (N = 192)	Controles (N = 272)
+92031 A/T (rs3769712)	TT	3,19	7,78
	AT	32,45	38,15
	AA	64,36	54,07
+92344 C/T (rs3769710)	TT	0,54	1,13
	CT	13,98	19,17
	CC	85,48	79,7
+92817 C/T (rs2278208)	TT	3,51	7,48
	CT	33,92	37,4
	CC	62,57	55,12
+110832 A/G (rs2278206)	GG	3,3	7,58
	AG	34,62	36,74
	AA	62,09	55,68
+131237 (rs10201079)	C/T TT	7,61	6,67
	CT	40,76	32,22
	CC	51,63	61,11

Tabla 2: Frecuencia (%) de haplotipos construidos usando D2S311/rs3769712/repetición de CA/ marcadores de rs2278206 en pacientes y controles estimados por PHASE. Los haplotipos con frecuencias relativas > 0,025 (2,5% de tamaño de muestra) en cualquiera de los grupos se han representado más adelante.

5

SEC Nº	HAPLOTIPO	PACIENTES	CONTROLES
1.	398_A_154_A	2,86	0,91
2.	400_T_152_G	9,11	12,32
3.	400_A_154_A	7,29	13,05
4.	402_T_152_G	1,04	3,49
5.	<b>402_A_154_A</b>	<b>16,14</b>	<b>4,96</b>
6.	404_T_152_G	6,25	5,51
7.	404_A_154_A	45,57	40,26
8.	406_A_154_A	2,60	6,62

Tabla 3: Prueba de desequilibrio de transmisión en familias (N = 158) para los ocho loci estudiados.

Tabla 3 (a): D2S2311 /M1 (p = 0,0007)

Alelo	Transmitidos	No transmitidos	Chi al cuadrado
386	4	0	4
396	3	5	0,5
398	9	11	0,2
400	27	58	11,306
402	36	22	3,379
404	72	50	3,967
406	4	9	1,923
408	5	5	0

10

Tabla 3 (b): D2S2187/M2 (p = 0,19)

Alelo	Transmitidos	No transmitidos	Chi al cuadrado
224	2	1	0,333
226	1	1	0
228	6	5	0,091
230	13	21	1,882
232	34	41	0,653
234	84	62	3,315
236	39	44	0,301
238	15	24	2,077
240	4	2	0,667
244	3	0	3

Tabla 3 (c): rs3769712 / SS1 ( $p = 0,0027$ )

Alelo	Transmitidos	No transmitidos	Chi al cuadrado
A	65	35	9
T	35	65	9

Tabla 3 (d): rs3769710 / SS2 ( $p = 0,058$ )

Alelo	Transmitidos	No transmitidos	Chi al cuadrado
C	30	17	3,596
T	17	30	3,596

5

Tabla 3 (e): rs2278208 / SS3 ( $p = 0,063$ )

Alelo	Transmitidos	No transmitidos	Chi al cuadrado
C	56	38	3,447
T	38	56	3,447

Tabla 3 (f): Repetición de CA ( $p = 0,008$ )

Alelo	Transmitidos	No transmitidos	Chi al cuadrado
152	38	65	7,078
154	65	38	7,078

Tabla 3 (g): rs2278206 / SS4 ( $p = 0,0007$ )

Alelo	Transmitidos	No transmitidos	Chi al cuadrado
A	78	41	11,504
G	41	78	11,504

10

Tabla 3 (h): rs10201079 / SS5 ( $p = 0,03$ )

Alelo	Transmitidos	No transmitidos	Chi al cuadrado
C	34	54	4,545
T	54	34	4,545

**LISTA DE SECUENCIAS:**

**Información general**

SOLICITANTE: CSIR, INDIA

5 TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: Variantes genéticas de *INOSITOL POLIFOSFATO-4-FOSFATASA HUMANA, TIPO I (INPP4A)*, y diagnóstico, predicción y prevención de trastornos inmunológicos que incluyen asma atópico.

NÚMERO DE SECUENCIAS: 26

- 10 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 1**  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** consiste en dinucleótidos CA (D2S2311) en el nucleótido 31-73  
 iii. **LONGITUD:** 401 pb  
 iv. **TIPO:** ADN  
 v.

5'GGGGCAAGTGGCGATAGGGCTTTCTACATACACACACACACACAC  
 ACACACACACACACACACACACACAATGATGGAAGTAAATTAGA  
 GGGACATAGCAACCAACCTGAAAGAGCTCCCAATGGCCAAAACCTGA  
 AGCCATTTGAAAAACAAAATTTTTAAATTTAGTATTAGACTATATCC  
 CAAAGTATAAAAAGTCCATGAGTCTATGCCATAAATGAATGATTGAAT  
 AAATAAATTAATGAGGGAGAAAGGACACATATTTTTACAGAAGGA  
 TTCCAGATCATATATGTAGATTATTTGATACTTTCCACCCCAGGATGT  
 AAAGCCTTATTGATGGATCTTGCACTCAGAAGCTGGAGCCAAGGATCC  
 AGCAGCCTCTACTGCCATGGGGGAACA 3'

- 15 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** N.A  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 1**

- 20 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 2**  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** consiste en dinucleótidos GT (D2S2187) en el nucleótido 116-164  
 iii. **LONGITUD:** 240 bases  
 iv. **TIPO:** ADN  
 v.

5'GGGCTGGAGGGGGTGGAGTAGGGAGTGTGTTGTGAAAGTTTCAAG  
 CACAGAGGACTGAAATGGAAGCCTCACAATGCAACCTAAGGACTTTG  
 GATTCTTGCTTTTGAGTACATGCACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT  
 GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAATGGTGTAGTTTGTGGCTG  
 TCAGCCTTACTAGGAGGCTGGTTTGGAGCCTGTTGCCTTAGCTCTGT  
 GGGGTGAT3'

- 25 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** N.A  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 2**

- 30 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 3**  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** consiste en dinucleótidos CA en el nucleótido 105 a 122  
 iii. **LONGITUD:** 159 bases  
 iv. **TIPO:** ADN  
 v.

5'TCACCCAGTACCAGACCATCATCCTCACATACCAGGAGAACCTGA  
 CCGACCTCCATCAGTACAGAGGTGGGTGCACCCCATGCTGTCACCA  
 CACACGCGTGCGCACACACACACACACTCTCACTCTCACTCAG  
 TCACTCCCTCTGCTTTCCCA3'

- vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
- vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
- viii. **NOMBRE/CLAVE:** N.A
- ix. **SECUENCIA ID Nº 3**

5

- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 4**
- ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** consiste en el polimorfismo 75 A/T (rs3769712), polimorfismo 388 C/T (rs3769710) y 861 C/T (rs2278208) en el nucleótido 229
- iii. **LONGITUD:** 1036 bases
- iv. **TIPO:** ADN
- v.

10

5'TGCAGCAGCCCTTAGTTTGTGTTAGAGAACTTGATTCAGGAAAA  
 AGGAACCATCTTTGGTAAAATGAGAGGGATCATGTAAGGGAAAGGG  
 CTTTGAGAAAAATATTTAGTTACGTCATGTGTCAGAGTTAACTCTAG  
 TTGGGTTAGAGTTAAATGTACAAAATAGACATCATTCTTTTTAAAGG  
 AGCTAAAGGCGGCTGATGATTGAACAGATAGAGCAGGAAAGGACTT  
 CACAGGCACGAGGACAGGGCAAGGAAATCACAAAGGAAATGGTCA  
 GTAGATGGGACCAGACAAAAATTTAGAACCTGATTAAGTGAGACCT  
 TGTAATAGAAAGCCTGAAGTCCAGGGTGTCCCCAGGTTCCCTGGA  
 TGAATCAGATGAGCCCAGGCCACCATCAGCCACCCTTCGGGATGTCA  
 GGGTAAAGCTGACTGAGGCTGGGGTAGCATCAGCTGTGTCATATCA  
 GGATTCAAGGGCTTCAGGAAGCCCTGGCTGGATTCCATTACTTGGAG  
 TCCAGGCTTAGGCCTTGGGCTAATATAAGCCTCAAGGTGGGGTGGGA  
 AGGAACAGAAAAGGGCCCAGGGCCAGAACAAGGTGTTCTGTAGTCC  
 TCACTCTGACACGTGTCCCCCTCACCTCTGGGCAGGGGTGAGCACA  
 GGCCTGGCAGCAGCTCAGGAACAGCATTGGCTCCTCCTCAGGGAG  
 GCCCCCTCTGACTTCACCAGCACGTCCACACTTCCCTGTGGTGCGTG  
 TCCGTTCAGACACAGCCCTCCACTGTGCCCCATGGTTTCCTTGTCTGT  
 CTCGCCTGAGAGGAGCCCTGTGTGCACAGTGAATGCTGACTGACTGG  
 TCAGTCAGCTCGGCCCTGCTGCCCCAGGACCCTGATGACCCAGTAC  
 GGCTAGGGCTTTGTATTTTCAGCAGAAAAGAAGCACAGTTGCAGCAC  
 CACTCATTAAAGCATGTTGTGCATCACAGGTCTGCAGAGAGTGACCG  
 TGTAGGTAACATCACCGTGATTGGCTGGCAGATGGAGGAGAAGTCA  
 GACCAACGGCCCCCT3'

- vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
- vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
- viii. **NOMBRE/CLAVE:** N.A.
- ix. **SECUENCIA ID Nº 4**

15

- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 5**
- ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** consiste en el polimorfismo G/A (rs2278206) en el nucleótido 147
- iii. **LONGITUD:** 961 bases
- iv. **TIPO:** ADN

20

v.

5'ATGGCGAGGGCTGTGAGGATGTCTTCCCCTGTGCAGGCAGCTGCA  
CCAGCAAGAAAGGTAACCCGGACAGCCACGCCTACTGGATCAGACC  
AGAAGACCCCTTCTGTGATGTCCCCTCCTCACCATGCCCTCCACCA  
TGCCCTCCACTGCATGCCATCCTCATCTGACCACACGTGCGTATGCA  
TCCATGCTTCCCATATGCTGCCTCCATTTACCTTGTGCTGCTTCCAT  
TTGTCTGTGTCTCTGACTCCATGCCCTCCTCCCCATGCAGACTGCAG  
GGAGGGCTGCCAGGTGGAGCGGGGGCGTCCCAGTGCATGGAGCAGC  
AGGCAGTGAGAGCGGAGTCTCCGGTTGCCTTTCCATGTAAGTGGAGC  
CCATGTGTGATTCTGCATCTCTGCCAGTCAGAATCTCAGGGTCTCTT  
GAGATACACCACCATGGCTATAAGGGTTGGGCTCCTGGGCTTTTCAG  
GTTTGTAAAGCAATCTGAGAACCTGAAGGAGGCCAGGATGCAGATG  
CCTTTCTGATGTGATTGTCTATGGCATTAGGAATTGGTAGAATGAAA  
GGGGAAAGGGGAATTGTTACAGGGACACAGCTGGATGAGAGATATTG  
GCAGGTCCAGTGGACATGTCTAAAAGCTGGTTGGCATTGGCTGGGCA  
CTCTCTTATGCAGCAGAGGCATGTTGCCTTGGGACTTGGTAACACAG  
AGAATGGGACCCTGTTCTGGGCTTCTGGTGGTCTGAGTCAGGTGGT  
TTGGCAGGACCCTTCAGGGTAGGACACTGGCATGAAGCAGCATGCT  
TCAGAACAGTCTCCTGTCTGCAGAGACACAGCATACCAGGACACTGT  
CCTGCAGATGGCCTTAAAGCTGGGAAACAGTCCCTGCAACTGAGAT  
GTCTCCGCCTTTTCTGTAAAGAGCCATAGAGTTACAAGCTAGGCAGC  
TGAGACTTGCCACAGACCTAGCTTC 3'

vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)

vii. **INMEDIATA:** secuencia natural

5 viii. **NOMBRE/CLAVE:** N.A

ix. **SECUENCIA ID N° 5**

i. **INFORMACIÓN DE SEC ID N°:** 6

ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** consiste en el polimorfismo C/T (rs10201079) en el nucleótido 1221

10 iii. **LONGITUD:** 1707 bases

iv. **TIPO:** ADN

v.

5'CCTTGGCTGCATGGGTTCTCACGTTGTCCACCGAATCCCAGGCA  
 TCCCCTGGGGATAAAGGGTTGTGGGGCAGCAGTGCCAGCCACTCAG  
 GACTGAGTCCTTCCATCCCCAGTTTGAGCAGAGCTGCTCTCCTTTTC  
 AGGCTCTTATTTCTTTTTGTTTGTGTGTATGAATAAAGGGTCCCTGGC  
 TGAATAGCTGGAATATCTTTAGTCAGGTCTAAGCCTATATCTCATGG  
 ATGGGGAGACCCAGCAGTGCACCACAAGTGGCTGGTGTCCCTCTGG  
 GATGGAAGCCTGGCACTGCAGTGCCCTCTTGGGCAAGGATGCATCA  
 CTGGCCATCCCTGCCTGCCTTCCAGAACCTCACGTTAGCTCTGGATG  
 CAGCATCTATGAATTTAAAGCTTTTTGAAACCTATAGTTCCAGCTTCC  
 GTCATGTGTTTGGGTCATGAACTCTACAGCCCACAGAATTTAGTGCA  
 CATACCAAGTTCACCTTGCTTTGTGAGTTACAACCTTACAAATTTGA  
 TTAATTTACTCTCCATTAGCTTAGGGTCTGCTTATCTGCTTAGGGCT  
 GTTATTTTTTTTTCTTTCTTTTTGTTGGTCTGTTCTCAGAAGAAGCCTA  
 TTCTCCTTCTGATTGTCTTGCCGAACATTGGGTCTTTTGTITGTCCTT  
 TCCCTAGACGAGGTTCTTAGCACTGTACCATGTTTCGTGTCTAGTGAT  
 GATCCTGGTAGTGACTGGCATGCTCTTTGGCTTTGCTGGCCTGACAA  
 GCAGGTGTTGTGCCATCTTCAGGAGTTGATGAGACACTGATATTTTT  
 CTGGCATAACAACAGATAACCCGGAGCCCACCATCATATCACTTGGATG  
 ATGTTTCATTAATAACAGCCTTGGTGTGATAGTGACAGTATCTGATA  
 CGGTGCATAGTCCTTTATCTGAAGCCCCTGTGGCCAGATGCTTTGGA  
 ATGCACAGGTTTTTCAGATTTTAGAAAAGTACTGTGGTACACAGTTGGT  
 GTTTACTTATGTAAGTAATATGGTGCCCATCGCATATGTGTACCATG  
 GTATACATAACAGGATTTAACATCCCCGGGGGAGCCTGAGACAGCAC  
 TCTGCAACCAAGCTCATATTATTGCCACACTGAAAAGTATGAATATT  
 TACATAAAAATGGGATAAGTAAAGATTGCAAGTAGTCTTATATCAGCT  
 CAGGTCTGGTTGTGCTGCCAAATGAGATTGCCACAGATTTACATGAA  
 AAAATTACCTTGTTTCAGAGCTTGATGGATTTGGTACTGTGTGCTT  
 AGGATTGTATCTAGAGGTGCAGGGAAAATGCCCTGAAATCTCCCCAT  
 GGGGAGAGGAGGTGCACTCAGGTGGCCTTTTCCCAGTCCAGAGGCT  
 GCCCTGCCCCCTACTCTGTGAGCCATTGAGTTGTGAGGAGGGAAGTG  
 TGCTGGCAGTAACTCTGCTACCGGAAAAGTATGGCGGGAGGAGGCC  
 TGTGGGGCTGGTGGTCAGGAGGTGGCCAAAGGGCAGTGCAACTTCT  
 GAGCTGCTCCCGTCTGTTTCAGGTGAAAGAGGAGAGTAGAGATAGTA  
 GGTCTGTTCCCTACCTTCCAGGGAGACCTAGAGACCTGGCCCAGGAC  
 TGTGGGCATCCTGAGAGTGGCTCTGGCTTCCCAGTGGGTCATATTT  
 GCCGCCCTCTTCCCTGAGGGATCAGCAGTGAAGGGCTGAACGTGAT  
 AAGAGGGCCCAGGCATG 3'

- vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
- vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
- viii. **NOMBRE/CLAVE:** N.A.
- ix. **SECUENCIA ID N° 6**

- 5
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: VII**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador directo para la secuencia ID: 1
  - iii. **LONGITUD:** 18 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' GGG GCA AGT GGC GAT AGG 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
  - viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético
  - ix. **SECUENCIA ID Nº 7**
- 10
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: VIII**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador inverso para la secuencia ID: 1
  - iii. **LONGITUD:** 20 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' TGT TCC CCC ATG GCA GTG TA 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
  - viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético
  - ix. **SECUENCIA ID Nº 8**
- 15
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: IX**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador directo para la secuencia ID: 2
  - iii. **LONGITUD:** 21 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' GGG CTG GAG GGG GTG GAG TAG 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
  - viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético
  - ix. **SECUENCIA ID Nº 9**
- 20
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: X**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador inverso para la secuencia ID: 2
  - iii. **LONGITUD:** 25 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' ATC ACC CCA CAG AGC TAA GGC AAC A 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
  - viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético
  - ix. **SECUENCIA ID Nº 10**
- 25
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: XI**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador directo para la secuencia ID: 3
  - iii. **LONGITUD:** 23 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' TCA CCC AGT ACC AGA CCA TCA TC 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
  - viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético
  - ix. **SECUENCIA ID Nº 11**
- 30
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: XII**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador inverso para la secuencia ID: 3
  - iii. **LONGITUD:** 22 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' TGG GAA AGC AGA GGG AGT GAC T 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
  - viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético
  - ix. **SECUENCIA ID Nº 12**
- 35
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: XIII**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador directo para la secuencia ID: 4
  - iii. **LONGITUD:** 24 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' TGC AGC AGC CCT TAG TTT GTT TAG 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
- 40
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: XIV**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador inverso para la secuencia ID: 4
  - iii. **LONGITUD:** 25 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' TGC AGC AGC CCT TAG TTT GTT TAG 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
- 45
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: XV**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador directo para la secuencia ID: 4
  - iii. **LONGITUD:** 25 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' TGC AGC AGC CCT TAG TTT GTT TAG 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
- 50
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: XVI**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador inverso para la secuencia ID: 4
  - iii. **LONGITUD:** 25 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' TGC AGC AGC CCT TAG TTT GTT TAG 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
- 55
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: XVII**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador directo para la secuencia ID: 4
  - iii. **LONGITUD:** 25 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' TGC AGC AGC CCT TAG TTT GTT TAG 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural
- 60
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: XVIII**
  - ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador inverso para la secuencia ID: 4
  - iii. **LONGITUD:** 25 bases
  - iv. **TIPO:** ADN
  - v. **5' TGC AGC AGC CCT TAG TTT GTT TAG 3'**
  - vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)
  - vii. **INMEDIATA:** secuencia natural

- viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 13**
- 5  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº:** XIV  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador inverso para la secuencia ID: 4  
 iii. **LONGITUD:** 18 bases  
 iv. **TIPO:** ADN  
 v. **5' AGG GGG CCG TTG GTC TGA 3'**  
 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 10  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 14**
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº:** 15  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador directo para la secuencia ID: 5  
 iii. **LONGITUD:** 23 bases  
 15  
 iv. **TIPO:** ADN  
 v. **5' ATG GCG AGG GCT GTG AGG ATG TC 3'**  
 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 20  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 15**
- i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº:** XVI  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador inverso para la secuencia ID: 5  
 iii. **LONGITUD:** 24 bases  
 25  
 iv. **TIPO:** ADN  
 v. **5' GAA GCT AGG TCT GTG GGC AAG TCT 3'**  
 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 16**
- 30  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº:** 17  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador directo para la secuencia ID: 6  
 iii. **LONGITUD:** 21 bases  
 iv. **TIPO:** ADN  
 35  
 v. **5' CCT TGG CTG CAT GGG TTC TCA 3'**  
 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 17**
- 40  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº:** 18  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador inverso para la secuencia ID: 6  
 iii. **LONGITUD:** 21 bases  
 iv. **TIPO:** ADN  
 45  
 v. **5' CAT GCC TGG GCC CTC TTA TCA 3'**  
 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 18**
- 50  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº:** 19  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador de Snapshot para SNP 75 A/T (rs3769712) en secuencia ID: 4  
 iii. **LONGITUD:** 19 bases  
 iv. **TIPO:** ADN  
 55  
 v. **5' CAA AGC CCT TTC CCT TAC A 3' (hebra inversa)**  
 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 19**
- 60  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº:** 20  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador de Snapshot para el polimorfismo 388 C/T (rs3769710) en secuencia ID: 4

- 5  
 iii. **LONGITUD:** 22 bases  
 iv. **TIPO:** ADN  
 v. **5' ATC CCG AAG GGT GGC TGA TGG T 3' (hebra inversa)**  
 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 20**
- 10  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 21**  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador de Snapshot para 861 C/T (rs2278208) en secuencia ID: 4  
 iii. **LONGITUD:** 25 bases  
 iv. **TIPO:** ADN  
 v. **5' AGC CGT ACT GGG TCA TCA GGG TCC T 3' (hebra inversa)**  
 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 21**
- 15  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: XXII**  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador de Snapshot para el polimorfismo C/T (rs2278206) en el nucleótido 147 en secuencia ID: 5  
 iii. **LONGITUD:** 20 bases  
 iv. **TIPO:** ADN  
 v. **5' CAG ATG AGG ATG GCA TGC AG 3' (hebra inversa)**  
 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 22**
- 20  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 23**  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador de Snapshot para el polimorfismo C/T (rs10201079) en el nucleótido 1221 en secuencia ID: 6  
 iii. **LONGITUD:** 18 bases  
 iv. **TIPO:** ADN  
 v. **5' GAT TGC CAC AGA TTT ACA 3'**  
 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 23**
- 25  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 24**  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** secuencia de ADNc que contiene la región de variante de corte y empalme  
 iii. **LONGITUD:** variable de 817 - 598 nucleótidos  
 iv. **TIPO:** ADN
- 30  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 23**  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador de Snapshot para el polimorfismo C/T (rs10201079) en el nucleótido 1221 en secuencia ID: 6  
 iii. **LONGITUD:** 18 bases  
 iv. **TIPO:** ADN  
 v. **5' GAT TGC CAC AGA TTT ACA 3'**  
 vi. **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)  
 vii. **INMEDIATA:** secuencia natural  
 viii. **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético  
 ix. **SECUENCIA ID Nº 23**
- 35  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 24**  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** secuencia de ADNc que contiene la región de variante de corte y empalme  
 iii. **LONGITUD:** variable de 817 - 598 nucleótidos  
 iv. **TIPO:** ADN
- 40  
 i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 24**  
 ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** secuencia de ADNc que contiene la región de variante de corte y empalme  
 iii. **LONGITUD:** variable de 817 - 598 nucleótidos  
 iv. **TIPO:** ADN

**5'GGGCGCCAGCAGCACACTGCCAAGGTTTTAAGTCAGGAGGTCTCCGC  
 AAAAAGCTGCACAAATTTGAAGAGACCAAGAAACATTTTGAGGAGTGT**

TGTACATCATCTGGCTGCCAGTCCATAATCTACATACCCCAGGATGTTG  
 TCAGAGCCAAGGAGATCATCGCCCAGATCAACACCCTGAAAACCCAAG  
 TGAGTTACTACGCAGAGCGGCTGTCAAGGGCAGCCAAGGACAGGTCTG  
 CCACTGGCCTTGAGAGGACACTCGCCATCTTGGCAGACAAGACACGGC  
 AGCTGGTCACGGTCTGCGACTGCAAGCTCCTGGCCAACCTCCATCCATGG  
 GCTGAACGCTGCACGGCCTGACTACATTGCCTCCAAGGCCTCTCCCACT  
 TCGACTGAGGAGGAGCAGGTGATGCTTAGAAATGACCAGGACACCCTC  
 ATGGCCCGGTGGACAGGGAGAAACAGCCGATCTTCCCTGCAGGTGGAC  
 TGGCACGAGGAGGAGTGGGAGAAAGTGTGGCTGAACGTGGACAAGAG  
 CCTAGAGTGCATCATTAGCGTGTGGACAAGCTGCTGCAGAAGGAGCG  
 GCTGCATGGCGAGGGCTGTGAGGATGTCTTCCCCTGTGCAGGCAGCTG  
 CACCAGCAAGAAAGGTAACCCGGACAGCCACGCCTACTGGATCAGACC  
 AGAAGACCCCTTCTGTGATGTC<sup>¢</sup>CCTCCTCACCATGCCCTCCACCATG  
 CCCTCTACTGCATGCCATCCTCATCTGACCACACATTGCAGTCCCCCTC  
 CTGAAGAGTCCAGCCCAGGTGAATGGAGTGAGGCCCTTTACCCGC 3'

vi **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)

vii **INMEDIATA:** secuencia natural

viii **NOMBRE/CLAVE:** N.A.

ix **SECUENCIA ID Nº 24**

i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 25**

ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador directo para la secuencia de ADNc que contiene la región de variante de corte y empalme

iii **LONGITUD:** 19 bases

iv **TIPO:** ADN

v. **5' GGG GCG CCA GCA GCA CAC T 3'**

vi **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)

vii **INMEDIATA:** secuencia natural

viii **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético

ix **SECUENCIA ID Nº 25**

i. **INFORMACIÓN DE SEC ID Nº: 26**

ii. **CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:** cebador inverso para la secuencia de ADNc que contiene la región de variante de corte y empalme

iii **LONGITUD:** 24 bases

iv **TIPO:** ADN

v. **5' GCG GGT AAA GGG CCT CAC TCC ATT 3'**

vi **ORGANISMO:** humano (secuencia natural)

vii **INMEDIATA:** secuencia natural

viii **NOMBRE/CLAVE:** oligonucleótido sintético

ix **SECUENCIA ID Nº 26**

**Referencias:**

1. Abney M, Ober C, McPeck MS (2002) Quantitative-trait homozygosity and association mapping and empirical genomewide significance in large, complex pedigrees: fasting serum-insulin level in the Hutterites. Am J Hum Genet 70:920-34.

2. Alam R y col (1994) Transforming growth factor beta abrogates the effects of hematopoietins on eosinophils and induces their apoptosis. J Exp Med 179: 1041-1045.

3. Altshuler D, Kruglyak L, Lander E (1998) Genetic polymorphisms and disease. N Engl J Med 338:1626.

4. Ather MH, Abbas F, Faruqui N, Israr M, Pervez S. Expression of pS2 in prostate cancer correlates with grade and Chromogranin A expression but not with stage. BMC Urol. 2004; 4(1):14.

5. Aubert JD, Dalal BI, Bai TR y col (1994) Transforming growth factor  $\beta$ 1 gene expression in human airways. Thorax 49:225-232.

6. Babron MC, Selinger-Leneman H, Dizier MH, Clerget-Darpoux F (2001) Homogeneity of asthma genome scan results. Genet Epidemiol 21 Suppl 1:S44-8.

7. Barringer KJ, Orgel L, Wahl G, Gingeras TR (1990) Blunt-end and single-strand ligations by Escherichia

- coli ligase: influence on an in vitro amplification scheme. *Gene* 89:117-22.
8. Baron M (2001) The search for complex disease genes: fault by linkage or fault by association? *Mol Psychiatry* 6:143-9.
9. Barnes PJ (2001) Th2 cytokines and asthma: an introduction. *Respir Res* 2:64-5.
- 5 10. Barnes KC (1999) Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetic analysis of asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 4:47-51.
11. Barnes KC, Neely JD, Duffy DL, Freidhoff LR, Breazeale DR, Schou C, Naidu RP y col (1996) Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations. *Genomics* 37:41-50.
- 10 12. Barnes PJ. New aspects of asthma. *J Intern Med* 1992; 231:453-61
13. Ben-Asouli Y, Banai Y, Pel-Or Y, Shir A, Kaempfer R (2002) Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. *Cell* 108:221-32.
14. Bleeker ER, Postma DS, Meyers DA (1997) Evidence for multiple genetic susceptibility loci for asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156:S113-6.
- 15 15. Blumenthal MN, Amos DB (1987) Genetic and immunologic basis of atopic responses. *Chest* 91:176S-184S.
16. Blumenthal MN, Langefeld CD (2004) A genome-wide search for allergic response (atopy) genes in three ethnic groups: Collaborative Study on the Genetics of asthma. *Hum Genet* 114(2):157-164.
- 20 17. Blumenthal MN, Ober C (2004) Genome scan for loci linked to mite sensitivity: the Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *Genes Immun* 5(3):226-231.
18. Bodmer WF (1987) The human genome sequence and the analysis of multifactorial traits. *Ciba Found Symp* 130:215-28.
19. Breslow JL (1988) Apolipoprotein genetic variation and human disease. *Physiol Rev* 68:85-132.
- 25 20. Caraballo LR, Hernandez M (1990) HLA haplotype segregation in families with allergic asthma. *Tissue Antigens* 35:182-6.
21. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N y col (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22:231-8.
22. Carriere KC, Kocher SC(2000): Comparing sub-survival functions in a competing risks model. *Lifetime Data Anal.*: 6(1):85-97.
- 30 23. Chang C, Bowman JL, DeJohn AW, Lander ES, Meyerowitz EM (1988) Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6856-60.
24. Christie L, Hine RJ, Parker JG, Burks W (2002). Food allergies in children affect nutrient intake and growth. *J Am Diet Assoc.* 102 (11):1648-51.
- 35 25. Cohen D, Cohen O, Marcadet A, Massart C, Lathrop M, Deschamps I, Hors J y col (1984) Class II HLA-DC beta-chain DNA restriction fragments differentiate among HLA-DR2 individuals in insulin-dependent diabetes and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1774-8.
26. Cookson WO, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA y col (1992) Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* 340:381-4.
- 40 27. Cookson W (1999) The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 402:B5-11.
28. Duffy DL (1997) Genetic epidemiology of asthma. *Epidemiol Rev* 19:129-43.
29. Elias JA, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, Chen Q, Ma B, Blackburn M, Zhu Z. Transgenic Modeling of Interleukin-13 in the Lung. *Chest*. 2003 Mar;123(3 Suppl):339S-45S.
30. Erlich HA (eds), Freeman Press, N.Y., N.Y., 1992); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds. Innis y col., Academic Press, San Diego, Calif., 1990. ,
- 45 31. Friedhoff P, Hahn M, Wolfes H, Pingoud A (1993) Quantitative polymerase chain reaction with oligodeoxynucleotide ligation assay/enzyme-linked immunosorbent assay detection. *Anal Biochem* 215:9-16.
32. Fujii D, Brissenden J.E, Derynck R, Francke U (1986) Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet* 12:281-288
- 50 33. de Gouyon B, Melanitou E, Richard MF, Requarth M, Hahn IH, Guenet JL, Demenais F y col (1993) Genetic analysis of diabetes and insulinitis in an interspecific cross of the nonobese diabetic mouse with *Mus spretus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1877-81.
34. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Sneider H, Kemp PR y col Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor  $\beta$ 1. *Hum Mol Gen* 8:93-97
- 55 35. Hacia JG, Fan JB, Ryder O, Jin L, Edgemon K, Ghandour G, Mayer RA y col (1999) Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 22:164-7.
36. Herd CM, Page CP. Pulmonary immune cells in health and disease: platelets. *Eur Respir J* 1994; 7:1145-60
- 60 37. Hefferon WT, Groman DJ, Yurk EC, Garry RC (2004) A variable dinucleotide repeat in the CFTR gene contributes to phenotype diversity by forming RNA secondary structures that alter splicing. *PNAS* 101(10):3504-3509.
38. Heinzmann A, Grotherr P, Jerkic SP, Lichtenberg A, Braun S, Kruse S, Forster J y col (2000) Studies on linkage and association of atopy with the chromosomal region 12q13-24. *Clin Exp Allergy* 30:1555-61.
- 65 39. Hirschhorn JN, Sklar P, Lindblad-Toh K, Lim YM, Ruiz-Gutierrez M, Bolk S, Langhorst B y col (2000)

- SBE-TAGS: an array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12164-9.
40. James E. Gem, Robert F. Lemanske, Jr. and William W. Busse (1999) Early life origins of asthma. *J Clin Invest*, 104:7, 837-843
- 5 41. Julier C, de Gouyon B, Georges M, Guenet JL, Nakamura Y, Avner P, Lathrop GM (1990) Minisatellite linkage maps in the mouse by cross-hybridization with human probes containing tandem repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4585-9.
42. Kameyoshi Y, Dörchner A, Mallet AI y col. (1992) RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med*; 176:587-92
- 10 43. Kameyoshi Y, Schröder JM, Christopher E y col. (1994) Identification of the cytokine RANTES released from platelets as an eosinophil chemotactic factor. *Int Arch Allergy Immunol*; 104(suppl 1):49-51
44. Klingler MH, Wilhelm D, Bubel S y col.(1995) Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage. *Int Arch Allergy Immunol*; 107:541-4.6
- 15 45. Kreuzt R, Hubner N, James MR, Bihoreau MT, Gauguier D, Lathrop GM, Ganten D y col (1995) Dissection of a quantitative trait locus for genetic hypertension on rat chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8778-82.
46. Kwoh DY, Davis GR, Whitfield KM, Chappelle HL, DiMichele LJ, Gingeras TR (1989) Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1173-7.
- 20 47. Lander ES, Botstein D (1986) Strategies for studying heterogeneous genetic traits in humans by using a linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7353-7.
48. Lander ES (1993) Finding similarities and differences among genomes. *Nat Genet* 4:5-6.
49. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J (1984) Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3443-6:
- 25 50. Levitt RC (1994) Molecular genetic methods for mapping disease genes. *Am J Respir Crit Care Med* 150:S94-9.
51. Longo DR, Johnson JC, Kruse RL, Brownson RC, Hewett JE (2001): A prospective investigation of the impact of smoking bans on tobacco cessation and relapse. *Tob Control*, Sep;10(3):267-72.
- 30 52. Mattila P, Korpela J, Tenkanen T, Pitkanen K (1991) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase--an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Res* 19:4967-73.
53. Mokdad-Gargouri R, Belhadj K, Gargouri A (2001) Translational control of human p53 expression in yeast mediated by 5'-UTR-ORF structural interaction. *Nucleic Acids Res* 29:1222-7.
- 35 54. Mukawa A, Kamitsuma Y, Tsunekawa S, Tanaka N (1989): Report on a long-term trial of CYBEST Model 2 for prescreening for squamous cell carcinoma of the uterine cervix *Anal Cell Pathol*. Aug;1(4):225-33.
55. Nagarkatti R, B Rao C, Rishi JP, Chetiwal R, Shandilya V, Vijayan V, Kumar R, Pemde HK, Sharma SK, Sharma S, Singh AB, Gangal SV, Ghosh B (2002) Association of IFNG gene polymorphism with asthma in the Indian population. *JACI* 2002 Sep; 110(3):410-2.
- 40 56. Norris FA, Atkins RC, Majerus PW. (1997) Inositol polyphosphate 4-phosphatase is inactivated by calpain-mediated proteolysis in stimulated human platelets. *J Biol Chem*. Apr 25;272(17):10987-9
57. Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ (2000) A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 67:1154-62.
- 45 58. Oberle I, Heilig R, Moisan JP, Kloepfer C, Mattei GM, Mattei JF, Boue J y col (1986) Genetic analysis of the fragile-X mental retardation syndrome with two flanking polymorphic DNA markers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:1016-20.
59. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2766-70.
- 50 60. Paul WE (1997) Interleukin 4: signalling mechanisms and control of T cell differentiation. *Ciba Found Symp* 204:208-16; discussion 216-9.
61. Piacquadio DJ, Chen DM, Farber HF, Fowler JF Jr, Glazer SD, Goodman JJ, Hruza LL, Jeffes EW, Ling MR, Phillips TJ, Rallis TM, Scher RK, Taylor CR, Weinstein GD (2004): Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch Dermatol.*; 140(1): 41-6.
- 55 62. Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T y col (2001) Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 411:199-204.
63. Rothenburg S, Koch-Nolte F, Rich A, Haag F (2001) A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z-DNA and inhibits promoter activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8985-90.
- 60 64. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S y col (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409:928-33.
- 65 65. Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed., CSHP, New York 1989.
66. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324:163-6.

67. Sham, P. C. y Curtis, D. (1995). "Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci". *Annals of Human Genetics*, 59, 97-105.

68. Shearn CT, Walker J, Norris FA. (2001) Identification of a novel spliceoform of inositol polyphosphate 4-phosphatase type Ialpha expressed in human platelets: structure of human inositol polyphosphate 4-phosphatase type I gene. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 10;286 (1):119-25.

5 69. Simon C. Pitchford (2004) Platelets are necessary for airway wall remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Blood*:103, 2

70. Sorensen G, Emmons K, Stoddard AM, Linnan L, Avrunin J (2002): Do social influences contribute to occupational differences in quitting smoking and attitudes toward quitting? *Am J Health Promot*. Jan-Feb;16(3):135-41.

10 71. Stephens M, Donnelly P (2003): A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet*. Nov 73:1162-9.

72. Tay AH, Tan EC, Chew FT, Goh DL, Shek LP, Lee BW (1999) Ethnic differences in genetic susceptibility to atopy and asthma. *Asian Pac J Allergy Immunol* 17:239-42.

15 73. Thomas NS, Wilkinson J, Holgate ST (1997) The candidate region approach to the genetics of asthma and allergy. *Am J Respir Crit Care Med* 156:S144-51.

74. Vyas P, Norris FA, Joseph R, Majerus PW, Orkin SH. (2000) Inositol polyphosphate 4-phosphatase type I regulates cell growth downstream of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 5;97 (25):13696-701

20 75. Xu J, Wiesch DG, Meyers DA (1998) Genetics of complex human diseases: genome screening, association studies and fine mapping. *Clin Exp Allergy* 28 Suppl 5:1-5; discussion 26-8.

76. Xu J, Meyers DA, Ober C, Blumenthal MN, Mellen B, Barnes KC, King RA y col (2001) Genomewide screen and identification of gene-gene interactions for asthma-susceptibility loci in three U.S. populations: collaborative study on the genetics of asthma. *Am J Hum Genet* 68:1437-46.

25

LISTA DE SECUENCIAS

<110> COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH

<120> VARIANTES GENÉTICAS DE INOSITOL POLIFOSFATO-4-FOSFATASA HUMANA, TIPO I (INPP4A), ÚTILES PARA LA PREDICCIÓN Y LA TERAPIA DE TRASTORNOS INMUNOLÓGICOS

- 5 <130> PCT0657  
 <150> 1536DEL2005  
 <151> 25/10/2005  
 <160> 26  
 <170> PatentIn versión 3.3
- 10 <210> 1  
 <211> 401  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1
- |   |     |
|---|-----|
| ggggcaagtg gcgatagggc tttctacata cacacacaca cacacacaca cacacacaca | 60  |
| cacacacaca caatgatgga agtaaattag agggacatag caaccaacct gaaagagctc | 120 |
| ccaatggcca aaactgaagc catttgaana acaaaatttt taaatttagt attagactat | 180 |
| atcccaaagt ataaaagtcc atgagtctat gccataaatg aatgattgaa taaataaatt | 240 |
| aatgagggag aaaggacaca tattttttac agaaggattc cagatcatat atgtagatta | 300 |
| tttgatactt tccaccccag gatgtaaagc cttattgatg gatcttgac tcagaactgg  | 360 |
| agccaaggat ccagcagcct ctacactgcc atgggggaac a                     | 401 |
- 15 <210> 2  
 <211> 240  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens
- 20 <400> 2
- |  |     |
|--|-----|
| gggctggagg ggggtggagta gggagtgttg tgaaagtttc aagcacagag gactgaatgg | 60  |
| aagcctcaca atgcaaccta aggactttgg attcttgctt ttgagtacat gactgtgtg   | 120 |
| tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtaaattgg gtagtttgtt  | 180 |
| ggctgtcagc cttactagga ggctggtttg gagcctgttg ccttagctct gtggggatgat | 240 |
- 25 <210> 3  
 <211> 159  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens
- <400> 3
- |   |     |
|---|-----|
| tcaccagta ccagaccatc atcctcacat accaggagaa cctgaccgac ctccatcagt  | 60  |
| acagaggtgg gtgcaccccc atgctgtcac cacacacgcg tgcgcacaca cacacacaca | 120 |
| cactctcact ctactcagt cactccctct gctttcca                          | 159 |
- 30 <210> 4  
 <211> 1036  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens
- <400> 4

ES 2 378 395 T3

tgcagcagcc cttagtttgt ttagagaact tgattcagga aaaaggaacc atcttttgga 60  
 aatgagagg gatcatgtaa gggaaagggc tttgagaaaa atatttagtt acgtcatgtg 120  
 tcagagttaa ctctagttgg gttagagtta aatgtacaaa atagacatca ttctttttaa 180  
 aggagctaaa ggcggctgat gattgaacag atagagcagg aaaggacttc acaggcacga 240  
 ggacagggca aggaaatcac aaaggaaatg gtcagtagat gggaccagac aaaaatttag 300  
 aacctgatta agtgagacct tgtaaataga aagcctgaag ttccagggtg tccccagggt 360  
 ccctggatga atcagatgag cccagggcac catcagccac ccttcgggat gtcagggtaa 420  
 agctgactga ggctggggta gcatcagctg tgcatatca ggattcaagg gcttcaggaa 480  
 gccctggctg gattccatta cttggagtcc aggcttaggc cttgggctaa tataagcctc 540  
 aagggtgggt gggaaaggaac agaaaagggc ccagggccag aacaagggtg tctgtagtcc 600  
 tcaactctgac acgtgtcccc ctcaccctct gggcaggggt gagcacaggc actggcagca 660  
 gctcaggaac agcattggct cctcctcagg gaggccccct ctgacttcac cagcacgtcc 720  
 acacttccct gtggtgctg tccgttcaga cacagccctc cactgtgccc catggtttcc 780  
 ttgtctgtct cgcctgagag gagccctgtg tgacacagtg atgctgactg actggtcagt 840  
 cagctcggcc ctgctgcccc caggaccctg atgaccctg acggctaggg ctttgtattt 900  
 cagcagaaaa gaagcacagt tgcagacca ctattaaag catgtttgtc atcacaggtc 960  
 tgcagagagt gaccgtgtag gtaacatcac cgtgattggc tggcagatgg aggagaagtc 1020  
 agaccaacgg cccctc 1036

<210> 5  
 <211> 961  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens

5

<400> 5

atggcgaggg ctgtgaggat gtcttcccct gtgcaggcag ctgcaccagc aagaaaggta 60  
 acccggacag ccacgcctac tggatcagac cagaagacc cttctgtgat gtcccctcct 120  
 caccatgcc ctccaccatg cctccactg catgccatcc tcatctgacc acacgtgctg 180  
 atgcatccat gcttcccata tegtgcctcc atttcacctt gtgctgcttc catttgtctg 240  
 tgtctctgac tccatgcct cctccccat gcagactgca gggagggctg ccagggtggag 300  
 cggggcgctc ccagtgcag gagcagcagg cagtgagagc ggagtctccg gttgccttc 360  
 catgtaactg gagcccatgt gtgattctgc atctctgcca gtcagaatct cagggtcctc 420  
 ttgagataca ccaccatggc tataaggggt gggctcctgg gcttttcagg tttgtaaagc 480  
 aatctgagaa cctgaaggag gccaggatgc agatgccttt ctgatgtgat tgtctatggc 540  
 attaggaatt ggtagaatga aaggggaaag gggaaattgt cagggacaca gctggatgag 600  
 agatattggc aggtccagtg gacatgtcta aaagctgggt ggcattggct gggcactctc 660  
 ttatgcagca gaggcattgt gccttgggac ttggtaacac agagaatggg accctgttcc 720  
 tgggcttctg gtggtctgag tcagggtggt tggcaggacc cttcagggtg ggacactggc 780  
 atgaagcagc atgcttcaga acagtctct gtctgcagag acacagcata ccaggacact 840  
 gtcctgcaga tggccttaa gctgggaaac agtccctgca actgagatgt ctccgccttt 900  
 tcctgtaaga gccatagagt tacaagctag gcagctgaga cttgccaca gacctagctt 960  
 c 961

ES 2 378 395 T3

<210> 6  
 <211> 1707  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens

5 <400> 6

```

ccttggtctg atgggttctc acgttgtcca ccgaatccca ggcattcccct ggggataagg      60
ggttgtgggg cagcagtgcc agccactcag gtactgagtc cttccatccc cagtttgagc      120
agagctgctc tccttttcag gctcttattt ctttttgttt gtgtgatga ataaagggtc      180
cctggctgaa tagctggaat atctttagtc aggtctaagc ctatatctca tggatgggga      240
gaccagcag tgcaccacaa gtggctgggt tccctctggg atggaagcct ggcactgcag      300
tgcctcttg ggcaaggatg catcactggc catccctgcc tgccttcag aacctcacgt      360
tagctctgga tgcagcatct atgaatttaa agctttttga aacctatagt tccagcttcc      420
gtcatgtgtt tgggtcatga actctacagc ccacagaatt tagtgacat accaagttca      480
ctcttgcttt gtcagttaca actttacaaa tttgattaat ttactctcca ttagcttagg      540
gtctgcttat ctgcttaggg cctgttattt ttttttcttt ctttttgttg gtctgttctc      600
agaagaagcc tattctcctt ctgattgtct tgcctgaaca ttgggtcttt tgttttgctt      660
ttccctagac gaggttctta gcaactgtacc atgttcgtgt ctagtgatga tcctggtagt      720
gactggcatg ctctttggct ttgctggcct gacaagcagg tgttggtcca tcttcaggag      780
ttgatgagac actgatattt ttctggcata caacagatac ccggagccca ccatcatatc      840
acttggatga tgtttcatta aataaccagcc ttgggtgcat agtgcagtat ctgatacggt      900
gcatagtcct ttatctgaag cccctgtggc cagatgcttt ggaatgcaca ggttttcaga      960
ttttagaaag tactgtggta cacagttggt gtttacttat gtaagtaata tggtgcccat     1020

cgcatatgtg taccatggtg tacatacagg atttaacatc cccgggggag cctgagacag     1080
cactctgcaa ccaagctcat attattgcca cactgaaaag tatgaatatt tacataaaat     1140
gggataagta aagattgcaa gtagtcttat atcagctcag gtctggttgt gctgc'caaat     1200
gagattgcca cagatttaca tgaaaaaatt accttgtttc agagcttgat ggatttggtg     1260
actgtgtgcc taggattgta tctagagggt cagggaaaat gccctgaaat ctccccatgg     1320
ggagaggagg tgcactcagg tggccttttc ccagtc'caga ggctgccctg ccccctactc     1380
tgtgagccat tcagtgtgga ggagggaagt gtgctggcag taactctgct accgggaaag     1440
tatggcggga ggaggcctgt ggggctgggt gtcaggaggt ggccaaaggg cagtgc'aaact     1500
tctgagctgc tcccgtctgt tcaggtgaaa gaggagagta gagatagtag gtctgttccc     1560
taccttccag ggagacctag agacctggcc caggactgtg ggcattcctga gagtggctct     1620
ggcttcccca gtgggtcata tttgccgccc tctttccctg agggatcagc agtgaagggc     1680
tgaacgtgat aagagggcc aggcatg                                     1707
    
```

<210> 7  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10

<220>

<223> Cebador directo para amplificar la secuencia ID: 1

<400> 7

15

gggcaagtg gcatag 18

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Cebador inverso para amplificar la secuencia ID: 1

<400> 8  
 tgttccccca tggcagtga 20

10 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador directo para amplificar la secuencia ID: 2

15 <400> 9  
 gggctggagg gggaggagta g 21

<210> 10  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador inverso para amplificar la secuencia ID: 2

<400> 10  
 atcacccac agagctaagg caaca 25

25 <210> 11  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador directo para amplificar la secuencia ID: 3

30 <400> 11  
 tcaccagta ccagaccatc atc 23

<210> 12  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Cebador inverso para amplificar la secuencia ID: 3

<400> 12  
 tgggaaagca gagggagtga ct 22

<210> 13  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Cebador directo para amplificar la secuencia ID: 4

<400> 13  
 tgcagcagcc ctagttgt ttag 24

50 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador inverso para amplificar la secuencia ID: 4

<400> 14  
5 agggggccgt tggctga 18

<210> 15  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Cebador directo para amplificar la secuencia ID: 5

<400> 15  
atggcgaggg ctgtgaggat gtc 23

15 <210> 16  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador inverso para amplificar la secuencia ID: 5

20 <400> 16  
gaagctaggt ctgtggcaa gtct 24

<210> 17  
<211> 21  
<212> ADN  
25 <213> Artificial

<220>  
<223> Cebador directo para amplificar la secuencia ID: 6

<400> 17  
ccttgctgc atgggtctc a 21

30 <210> 18  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
35 <223> Cebador inverso para amplificar la secuencia ID: 6

<400> 18  
catgcctggg ccctttatc a 21

<210> 19  
<211> 19  
40 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador de Snapshot para SNP 75 A/T (rs3769712) en la secuencia ID: 4

<400> 19  
45 caaagccctt tccctaca 19

<210> 20  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

50 <220>

## ES 2 378 395 T3

<223> Cebador de Snapshot para 388 C/T polimorfismo (rs3769710) en la secuencia ID: 4

<400> 20  
atcccgaagg gtggtgatg gt 22

5 <210> 21  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador de Snapshot para 861 C/T (rs2278208) en la secuencia ID: 4

10 <400> 21  
agccgtactg ggtcatcagg gtcct 25

<210> 22  
<211> 20  
<212> ADN  
15 <213> Artificial

<220>  
<223> Cebador de Snapshot para el polimorfismo C/T (rs2278206) en el nucleótido 147 en la secuencia ID: 5

<400> 22  
cagatgagga tggcatgcag 20

20 <210> 23  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> Cebador de Snapshot para el polimorfismo C/T (rs10201079) en el nucleótido 1221 en la secuencia ID: 6

<400> 23  
gattgccaca gattaca 18

30 <210> 24  
<211> 816  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia de ADNc que contiene la región de la variante de corte y empalme

<400> 24

gggcccagc agcacactgc caaggtttta agtcaggagg tctccgcaa aagctgcaca	60
aatttgaaga gaccaagaaa cattttgagg agtgttgtac atcatctggc tgccagtcca	120
taatctacat accccaggat gttgtcagag ccaaggagat catcgcccag atcaacacc	180
tgaaaacca agtgagttac tacgcagagc ggctgtcaag ggcagccaag gacaggtctg	240
35 ccactggcct tgagaggaca ctgccatct tggcagacaa gacacggcag ctggtcacgg	300

ES 2 378 395 T3

tctgcgactg caagctcctg gccaaactcca tccatgggct gaacgctgca cggcctgact 360  
 acattgcctc caaggcctct cccacttcga ctgaggagga gcaggtgatg cttagaaatg 420  
 accaggacac cctcatggcc cgggtggacag ggagaaacag ccgatcttcc ctgcaggtgg 480  
 actggcacga ggaggagtgg gagaaagtgt ggctgaacgt ggacaagagc ctagagtgca 540  
 tcattcagcg tgtggacaag ctgctgcaga aggagcggct gcatggcgag ggctgtgagg 600  
 atgtcttccc ctgtgcaggc agctgcacca gcaagaaagg taaccggac agccacgcct 660  
 actggatcag accagaagac cccttctgtg atgtcccctc ctcacatgc ccctccacca 720  
 tgccctctac tgcatgcat cctcatctga ccacacattg cagtcccct cctgaagagt 780  
 ccagcccagg tgaatggagt gaggcccttt acccgc 816

<210> 25  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Cebador directo para amplificar la secuencia de ADNc que contiene la región de la variante de corte y empalme

10 <400> 25  
 ggggcgccag cagcacact 19

<210> 26  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Cebador inverso para amplificar la secuencia de ADNc que contiene la región de la variante de corte y empalme

<400> 26  
 gcgggtaaag ggcctcactc catt 24

20

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento *in vitro* de predicción de la susceptibilidad de un individuo a asma que comprende determinar si dicho individuo posee o no un haplotipo de variantes genéticas, seleccionándose dichas variantes de variantes genéticas del gen humano de inositol polifosfato 4-fosfatasa (INPP4A) y la repetición del dinucleótido CA en el locus M1 localizado 44,7 kb en la dirección 5' del sitio de iniciación de dicho gen, en el que dicho haplotipo está positivamente asociado o negativamente asociado a la aparición de asma.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que se determina un haplotipo que representa una combinación de variantes seleccionadas de una variante alélica de dicha repetición del dinucleótido CA en el locus M1, variante +92031A/T en el locus S1, repetición del dinucleótido CA en el locus M3 en +99095 y variante +110832 A/G en el locus S4.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que se determina un haplotipo de cuatro loci con referencia al orden de los loci M1\_S1\_M3\_S4 y se selecciona de:

396_T_154_G,	398_A_152_A,	400_T_152_A,	400_A_152_A,
406_T_152_A,	406_A_156_T,	412_A_154_A,	400_T_154_A,
402_T_152_A,	404_A_156_T,	410_A_154_A,	404_A_152_G,
406_A_152_A,	404_A_152_A,	406_T_152_G,	396_A_152_G,
400_A_154_G,	402_T_154_A,	402_A_152_A,	404_T_154_A,
400_T_154_G,	396_T_152_G,	404_T_152_A,	398_A_152_G,
386_A_154_A,	402_T_152_G,	398_T_152_G,	404_A_154_G,
408_A_154_A,	406_A_154_A,	398_A_154_A,	404_T_152_G,
400_A_154_A,	400_T_152_G,	402_A_154_A,	404_A_154_A

en el que el primer número representa la longitud en pares de bases del fragmento obtenible por la amplificación por PCR correspondiente al locus M1 usando el par de cebadores de SEC ID N° 7 y 8 y el último número representa la longitud en pares de bases obtenible por la amplificación por PCR correspondiente al locus M3 usando el par de cebadores de SEC ID N° 11 y 12.

4. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que el haplotipo 402\_A\_154\_A se detecta como un factor de riesgo para asma.

5. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que el haplotipo 400\_A\_154\_A y/o 400\_T\_152\_G se detecta como negativamente asociado a la aparición de asma y/o el haplotipo 400\_T\_152\_G se detecta como negativamente asociado a la aparición de asma atópico.

6. Cebadores definidos por SEC ID N° 7-18 para su uso en la predicción de la predisposición a asma.

7. Cebadores según la reivindicación 6 adicionalmente complementados con los cebadores definidos por SEC ID N° 19-23.

8. Uso *in vitro* de cebadores definidos por SEC ID N° 7-18 para predecir la predisposición a asma.

9. El uso según la reivindicación 8, en el que dichos cebadores están adicionalmente complementados por los cebadores definidos por SEC ID N° 19-23.

10. Un procedimiento *in vitro* para detectar y predecir la predisposición a asma cribando haplotipos de INPP4A y variantes de corte y empalme y su expresión en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

[a] aislar ADN de muestras seleccionadas de sangre completa, semen, saliva, lágrimas, orina, materia fecal, sudor, de la boca, piel o pelo;

[b] proporcionar cebadores que tienen SEC ID N° 7-18;

[c] amplificar y secuenciar extensiones de ADN genómico usando cebadores de SEC ID N° 7 - 18, en el que los cebadores de SEC ID N° 7, 9, 11, 13, 15, 17 son cebadores directos y los cebadores de SEC ID N° 8, 10, 12, 14, 16, 18 son cebadores inversos;

[d] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 1 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 7 y 8, conteniendo SEC ID N°1 la secuencia correspondiente a la repetición de microsatélites en el locus M1 D2S2311;

[e] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 2 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 9 y 10, conteniendo SEC ID N° 2 la secuencia correspondiente a la repetición

de microsatélites en el locus M2 D2S2187 en la posición +43987 en el intrón 1;

[f] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 3 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 11 y 12, conteniendo SEC ID N° 3 la secuencia correspondiente a la repetición de microsatélites en el locus M3 +99095;

5 [g] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 4 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 13 y 14, conteniendo SEC ID N° 4 el locus S1 +92031A/T, el locus S2 +92344 C/T y el locus S3 locus +92817C/T de sitios de polimorfismo de un único nucleótido (SNP);

10 [h] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 5 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 15 y 16, conteniendo SEC ID N° 5 el sitio de SNP en el locus S4 en la posición +110832A/G en el exón 17 de variante de variante de corte y empalme;

[i] amplificar y secuenciar la extensión de ADN de SEC ID N° 6 del gen de INPP4A usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 17 y 18, conteniendo SEC ID N° 6 el sitio de SNP en el locus S5 en la posición +131237 C/T, y

15 [j] validar e identificar las variantes del gen de INPP4A específicas computacionalmente comparando con las secuencias del gen de INPP4A naturales conocidas; y

[k] aislar ARN de muestras de sangre completa; y

[l] aislar e identificar variantes de corte y empalme de SEC ID N° 24 usando la combinación de cebadores de SEC ID N° 25 y 26.

11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que el sujeto es humano.

20 12. Marcadores farmacogenéticos que tienen SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 para su uso en detectar y predecir la predisposición a asma en un sujeto, teniendo dichos marcadores las siguientes características:

(i) la SEC ID N° 1 contiene 1-230 nucleótidos contiguos que contienen un grupo de dinucleótidos CA del locus M1 presente 44,7 kb en la dirección 5' del sitio de iniciación del gen;

25 (ii) la SEC ID N° 2 contiene 1-400 nucleótidos contiguos que contienen los dinucleótidos GT en el locus M2;

(iii) la SEC ID N° 3 tiene 1-159 nucleótidos contiguos que contienen un polimorfismo de repetición de CA en el nucleótido 229 del locus M3;

30 (iv) la SEC ID N° 4 tiene 1-1036 nucleótidos contiguos que contienen un polimorfismo A/T en el nucleótido 75 del locus S1, un polimorfismo C/T en el nucleótido 388 del locus S2 y un polimorfismo C/T en el nucleótido 861 del locus S3;

(v) la SEC ID N° 5 tiene 1-961 nucleótidos contiguos que contienen un polimorfismo G/A en el nucleótido 147 del locus S4;

(vi) la SEC ID N° 6 tiene 1-1707 nucleótidos contiguos que contienen un polimorfismo C/T en el nucleótido 1221 del locus S5;

(vii) la SEC ID N° 24 tiene 1-817 nucleótidos contiguos que contienen variantes de corte y empalme.

35 13. Un kit de diagnóstico que comprende marcadores farmacogenéticos que tienen los nucleótidos de SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 junto con un manual de instrucciones para detectar y predecir la predisposición a asma en un sujeto.

14. Uso in vitro de un kit de diagnóstico según la reivindicación 13 para predecir y detectar seres humanos susceptibles a asma.

40

FIGURA 1A.

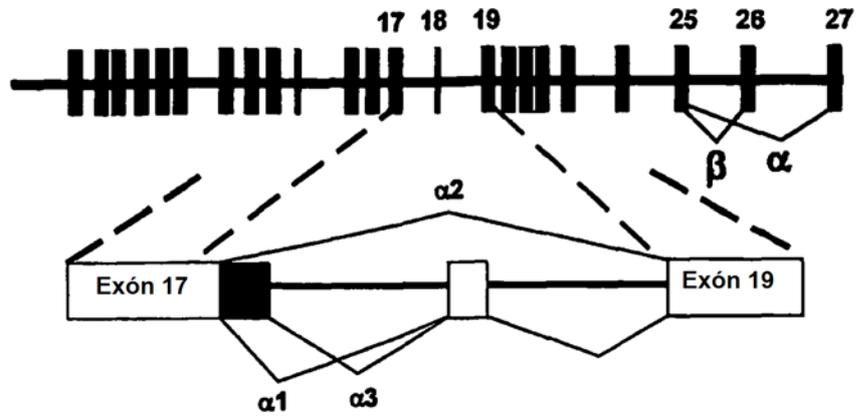


FIGURA 1B.

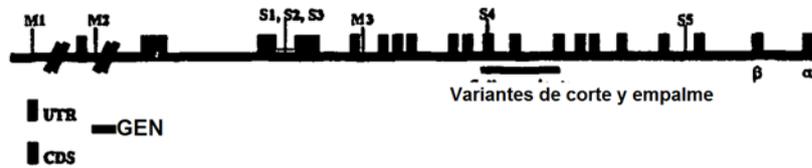


Fig. 1. Diagrama esquemático del gen de INPP4A con las variantes conocidas (A) y los loci estudiados (B).

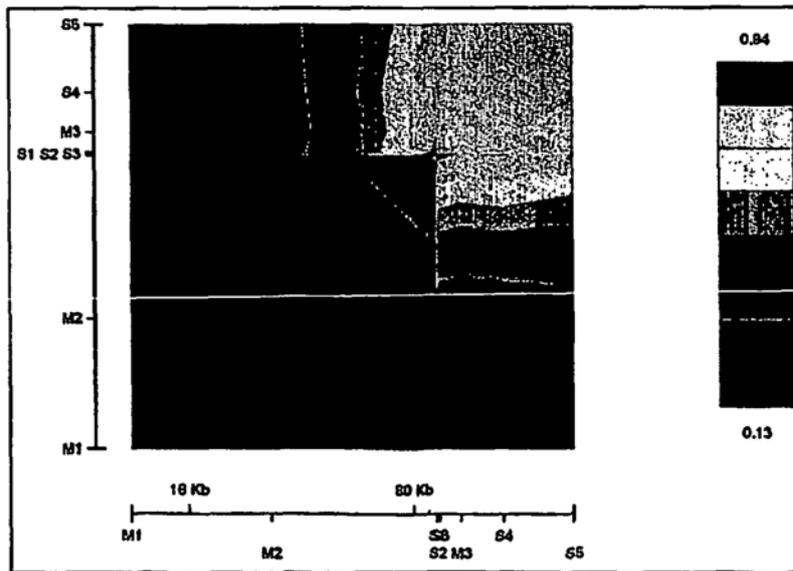


Fig. 2 Visión general gráfica del desequilibrio de enlace para los ocho loci estudiados usando GOLD (la distancia entre marcadores entre M1 y M2 se ha reducido 50 kb en el mapa para una clara visión general gráfica).

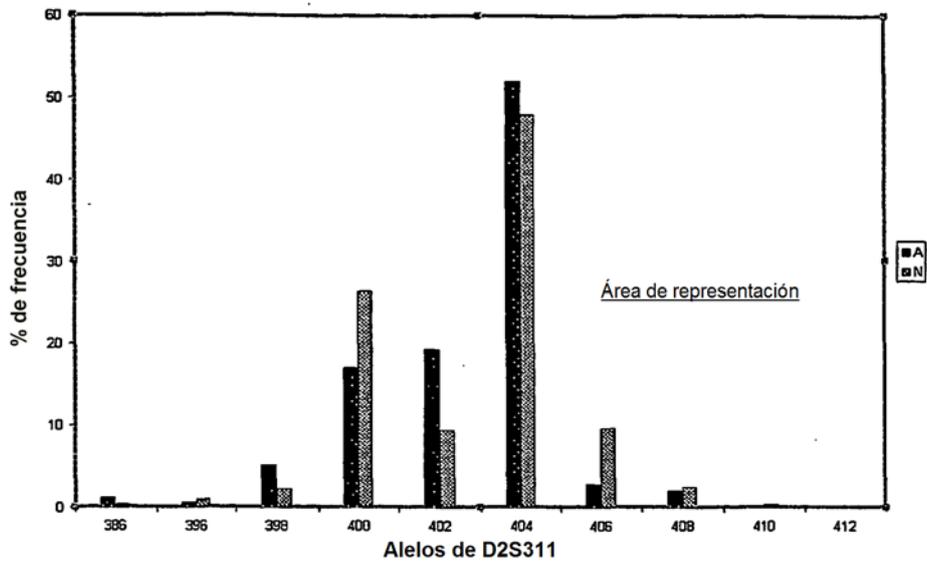


Fig. 3: Distribución alélica de los alelos de D2S311 en pacientes y el grupo de control ( $N_p = 192$ ,  $N_c = 272$ )

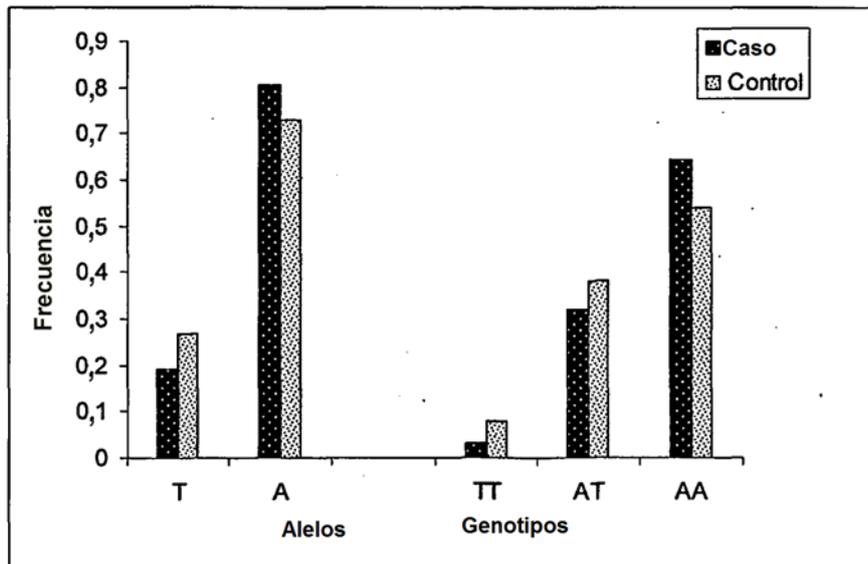


Fig. 4: Distribución alélica y genotípica de +92031 A/T (S1) en el estudio de casos y controles

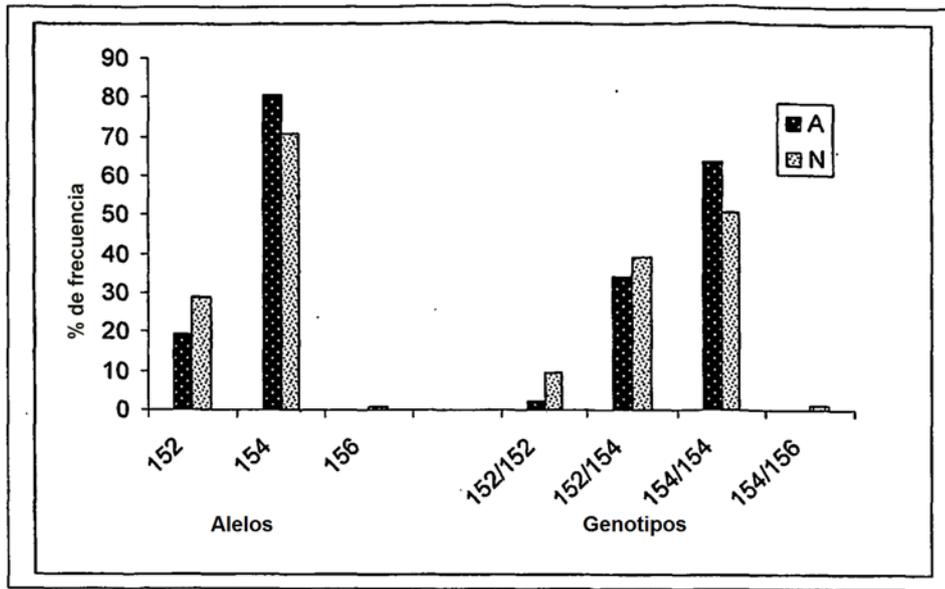


Fig. 5: Distribución alélica y genotípica del polimorfismo de repeticiones de CA/CT en el intrón 11 en el estudio de casos y controles.

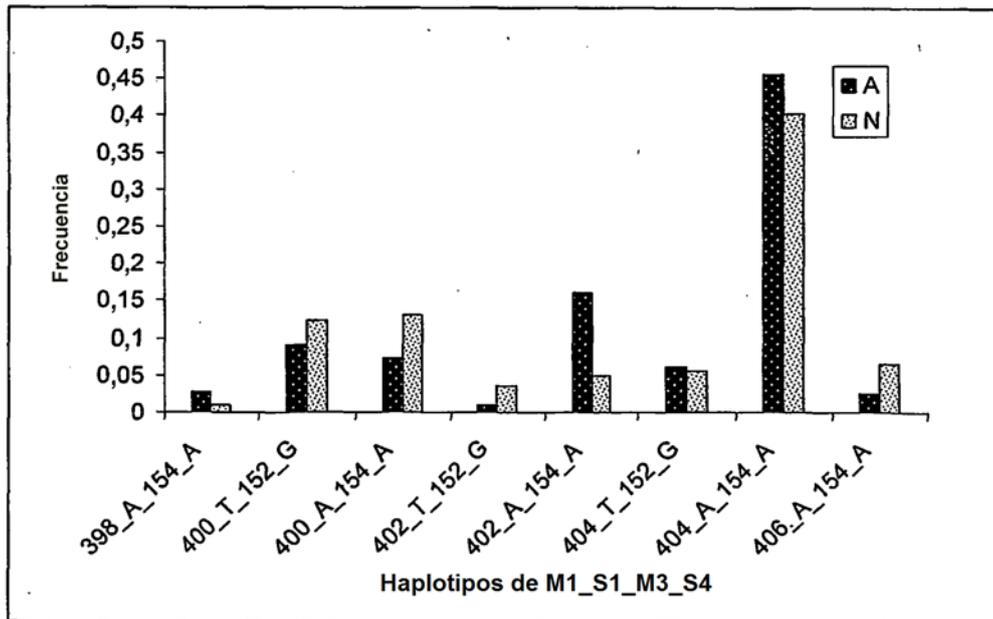


Fig. 6: Distribución de haplotipos en pacientes y controles ( $N_p = 192$ ,  $N_c = 272$ )

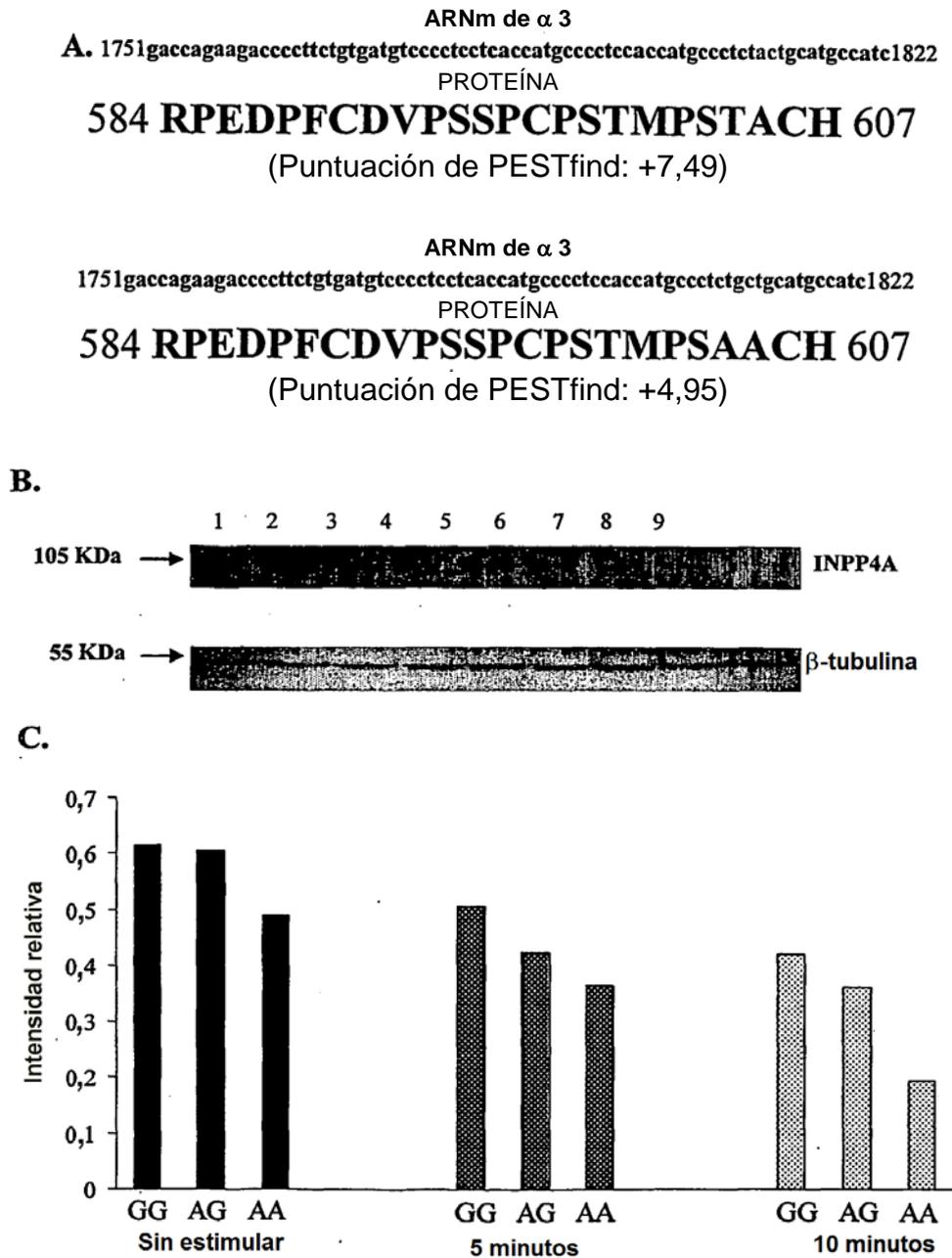


Figura 7: A. Las puntuaciones comparativas de la posible secuencia PEST ([www.at.cmbnt.org/embnet/tools/bio/pestfind/](http://www.at.cmbnt.org/embnet/tools/bio/pestfind/)) antes y después de la sustitución de treonina por alanina en el aminoácido 604. B) Análisis de transferencia Western para INPP4A y  $\beta$ -tubulina en plaquetas aisladas de sangre humana (una imagen representativa de tres experimentos independientes) que tienen genotipos AG (carriles 1, 2 y 3), GG (carriles 4, 5 y 6) y AA (carriles 7, 8 y 9). Los carriles 1, 4 y 7 representan plaquetas sin estimulación, los carriles 2, 5 y 8 representan plaquetas estimuladas con ionomicina 2  $\mu$ M durante 5 minutos, los carriles 3, 6 y 9 estimuladas con ionomicina 2  $\mu$ M durante 10 minutos. C) Intensidad relativa de proteína de INPP4A con respecto a  $\beta$ -tubulina en plaquetas sin estimular y estimuladas por barrido por densitometría de puntos de datos de transferencia Western.

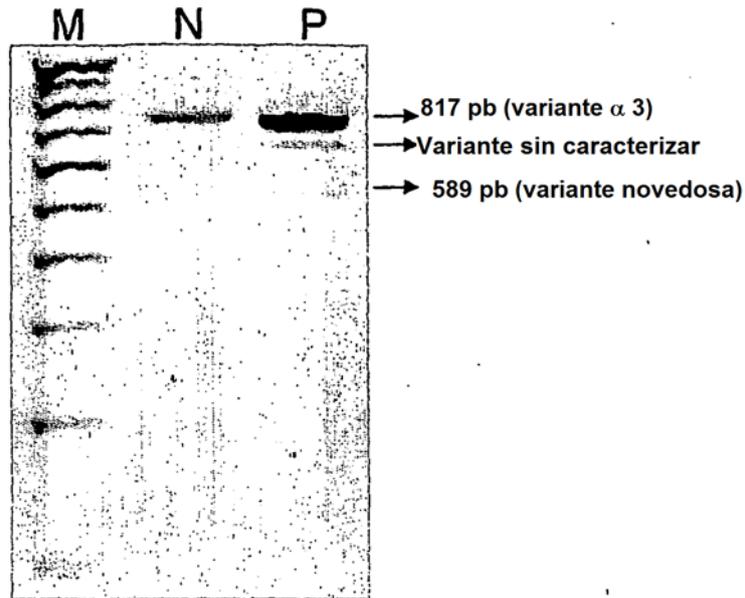


Figura 8: Imagen de gel de variantes de corte y empalme en individuo asmático atópico que muestra la variante de corte y empalme novedosa de 598 pb. Carril M: marcador en escalera de 100 pb, carril N: normal, carril P: asmático atópico.



Figura 9: Inmunohistoquímica de INPP4A en secciones de tejido de pulmón de ratón (20x) de **(a)** ratones sensibilizados con referencia y expuestos a solución salina, **(b)** ratones sensibilizados con OVA y expuestos a OVA y **(c)** ratones sensibilizados con OVA y expuestos a OVA tratados con dexametasona a partir del día uno de la exposición. Las flechas negras indican células inflamatorias infiltrantes en la región broncovascular (bronquio B).

\* Imagen representativa del experimento hecho en ratones BALB/c hembra. La sensibilización con OVA y el experimento de tratamiento con solución salina se hizo en 3 experimentos independientes que tenían al menos 3 ratones en cada grupo (dos veces con ratones BALB/c macho y una vez con ratones BALB/c hembra). El experimento de tratamiento con esteroide se hizo una vez con ratones BALB/c hembra.