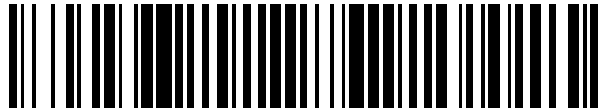


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 108**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008 E 08797299 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2185726**

54 Título: **Nuevos polimorfismos de un único nucleótido y combinaciones de polimorfismos nuevos y conocidos para determinar la expresión específica de alelo del gen IGF2**

30 Prioridad:

06.08.2007 US 954290 P
16.11.2007 US 988715 P

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

04.04.2014

73 Titular/es:

ORION GENOMICS, LLC (100.0%)
4041 FOREST PARK AVENUE
ST. LOUIS, MO 63108, US

72 Inventor/es:

ORDWAY, JARED;
LAKEY, NATHAN;
MALONEY, REBECCA y
ROHLFING, THERESA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 453 108 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevos polimorfismos de un único nucleótido y combinaciones de polimorfismos nuevos y conocidos para determinar la expresión específica de alelo del gen *IGF2*

5

Antecedentes de la invención

El gen para el factor de crecimiento de tipo insulina 2, o *IGF2*, se localiza en un grupo de genes impresos en el cromosoma humano 11p15.5. La impronta genómica es un mecanismo importante de regulación génica en el que una copia del gen normalmente se expresa y la otra copia se silencia mediante una marca epigenética de origen parental. *IGF2* normalmente tiene impronta materna en tejidos humanos y por lo tanto se expresa solamente de la copia heredada por vía paterna del gen (DeChiara TM, *et al.* Cell 64, 849-859 (1991); Rainier S, *et al.*, Nature 362, 747-749 (1993); Ogawa, *et al.*, Nature 362, 749-751 (1993)). La pérdida de impronta de *IGF2* (denominada pérdida de impronta o LOI) se ha ligado fuertemente con varios tipos de cáncer (más de 20 tipos tumorales revisados en Falls, *et al.* 1999, AJP 154, 635-647). Además, pruebas crecientes indican que los individuos que presentan LOI de *IGF2* pueden tener un riesgo elevado de desarrollar cáncer colorrectal (Kinouchi *et al.*, 1996, Cancer Letters 107, 105-108 (1996); Nishihara S. 2000, Int. Jour. Oncol. 17, 317-322; Cui H 1998, Nature Medicine 4-11, 1276-1280; Nakagawa H 2001, PNAS 98-2, 591-596). La LOI de *IGF2* puede detectarse en tejidos normales de pacientes con cáncer incluyendo sangre periférica y mucosa colónica normal (Kinouchi *et al.*, 1996, Cancer Letters 107, 105-108 (1996); Ogawa, *et al.*, Nature Genetics 5, 408-412 (1993); Cui H, Science 299, 1753 (2003)) y en los tejidos normales de personas que se cree que no tienen cáncer (Cui H, *et al.* Nature Medicine 4-11, 1276-1280 (1998); Cui H, Science 299, 1753 (2003); Woodson K *et al.*, JNCI 96, 407-410 (2004); Cruz-Correa Met *al.*, Gastroenterology 126,964-970 (2004)).

Varios estudios de sangre periférica de poblaciones generales indican que entre el 7 y 10 % de las personas presentan pérdida de impronta de *IGF2* en tejido de mucosa colónica. Tres estudios retrospectivos indican que las probabilidades de que pacientes con cáncer colorrectal presenten LOI de *IGF2* en sangre periférica o mucosa colónica son significativamente mayores (entre 2-21 veces) que las probabilidades de que un grupo de control sin cáncer de la misma edad presente LOI. Estos estudios sugieren que la LOI de *IGF2* puede predisponer a individuos sanos en lo demás a cáncer colorrectal. Por lo tanto, un ensayo de riesgo basado en la detección de LOI de *IGF2* puede tener un beneficio clínico futuro (Cui H, *et al.* Nature Medicine 4-11, 1276-1280 (1998); Cui H, Science 14, 1753-1755 (2003); Woodson K 2004, JNCI 96, 407-410; Cruz-Correa M, Gastroenterology 126, 964-970 (2004)). Estos estudios muestran que las personas con LOI de *IGF2* (también denominado el biomarcador *IGF2*) pueden tener hasta 20 veces más probabilidades de desarrollar cáncer colorrectal que los individuos sin el biomarcador *IGF2*.

La detección de LOI de *IGF2* se basa en un ensayo de expresión génica específico de alelo cuantitativo, en el que se cuantifican los transcritos de cada una de ambas copias del gen *IGF2*. Después se comparan las cantidades entre sí para determinar una relación de expresión génica alélica, que se compara posteriormente con un valor umbral. Si la concentración del alelo menos abundante es "relativamente similar" a la concentración del alelo más abundante, entonces se determina que la impronta de *IGF2* se ha perdido. Si la concentración del alelo menos abundante es "relativamente diferente" a la concentración del alelo más abundante, entonces se determina que la impronta de *IGF2* está presente. Un método para medir el estado de impronta de *IGF2* en una muestra es determinar en primer lugar el genotipo o los genotipos de uno o más sitios polimórficos en la región transcrita del gen *IGF2*. Los marcadores heterocigotos en la región transcrita del gen proporcionan indicios moleculares convenientes por los que pueden distinguirse los alelos individuales del gen *IGF2* entre sí en una muestra. La transcripción de ARN de cada una de las dos copias del gen *IGF2* puede medirse independientemente con ensayos específicos de alelos cuantitativos. Por lo tanto puede realizarse una comparación de la cantidad de expresión de un alelo con la cantidad de expresión de otro alelo y puede determinarse el estado de impronta del gen *IGF2* (véase Figura 2).

IGF2 tiene cuatro promotores, que conducen cada uno expresión de transcritos de corte y empalme alternativo, de una manera específica de tejido (Figura 1A). Los exones 7, 8 y 9 están presentes en todos los transcritos, mientras que se ha indicado los exones 1-6 se expresan de una manera específica de promotor. El exón 9 incluye un tramo corto de secuencia codificante de proteínas seguida de una 3' UTR considerablemente más larga. Los marcadores polimórficos en los exones 7, 8 y 9 son por lo tanto útiles en la determinación del estado de impronta de *IGF2* permitiendo la detección de expresión específica de alelos de la transcripción de *IGF2* conducida desde cualquiera de los cuatro promotores de *IGF2*.

Los expertos en la materia conocen cuatro ensayos de expresión específicos de alelo que miden el estado de impronta de *IGF2*. Woodson, *et al.* midieron el estado de impronta de *IGF2* con una combinación de dos ensayos basados en SNP (rs680 – análogo de SEC ID N°: 64 en la Tabla 1A; y rs2230949 - análogo de SEC ID N°: 56 en la Tabla 1A) (Woodson K 2004, JNCI 96, 407-410). Ambos SNP están en el exón 9 de *IGF2* pero se indica por Woodson *et al.* que están en desequilibrio de enlace mínimo. Por lo tanto, los intentos de medir la LOI de un individuo con dicha combinación de marcadores aumenta la probabilidad de que el individuo sea heterocigoto para al menos uno de los dos SNP, y por lo tanto aumenta la probabilidad de que pueda determinarse el estado de LOI del individuo. Los autores demostraron que el primer SNP, el segundo SNP o ambos SNP eran informativos (es decir,

eran heterocigotos y, por lo tanto, permitían la medición de LOI de *IGF2* en 48 de 106 pacientes evaluados (o 45 %). Cui *et al.* midieron la impronta de *IGF2* con una combinación de dos ensayos, uno que se dirigía a un SNP (rs680 - análogo de SEC ID N°: 64 en la Tabla 1A) y un segundo que medía polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de una repetición de secuencia sencilla dentro del exón 9 de *IGF2*. Los autores demostraron que el SNP, la repetición o ambos marcadores eran informativos en 191 de 421 (o 45 %) pacientes evaluados (Cui H, *et al.* Nature Medicine 4-11, 1276-1280 (1998)).

Estudios previos han demostrado que el uso de estos polimorfismos da como resultado una frecuencia combinada baja de heterocigosidad en poblaciones de pacientes y, por lo tanto, un gran número de individuos en estas poblaciones eran "no informativos" de modo que no pudo determinarse su estado de impronta de *IGF2*. La presente solicitud describe SNP de nuevo descubrimiento en el exón 9 de *IGF2*, y descubrimiento de combinaciones útiles de SNP que permiten mediciones de LOI exitosas en una proporción aumentada de la población humana. La capacidad para medir LOI usando esos polimorfismos en la población en general tendrá un profundo beneficio médico, actuando como la base de diversos ensayos de diagnóstico y terapéuticos moleculares.

La capacidad informativa de un SNP dado para la detección de LOI se basa en la frecuencia de heterocigosidad del SNP dentro de una población. Además, la capacidad informativa óptima de una combinación de diferentes SNP depende del enlace entre los diferentes marcadores. Por ejemplo, si dos SNP quedan dentro de un bloque de haplotipo común, el uso combinado de los dos SNP proporciona un aumento mínimo de la capacidad informativa en relación con el uso de cada uno de los dos SNP por sí solo. Sin embargo, si dos SNP no están en el mismo bloque de haplotipo (es decir, están en un desequilibrio de enlace mínimo), el uso combinado de los dos SNP proporciona un aumento efectivo de la capacidad informativa en relación con el uso de cada uno de los dos SNP por sí solo.

La reciente publicación del conjunto de datos de variación genética humana HapMap II proporciona análisis de haplotipo de datos de secuencias de ADN de todo el genoma. En el estudio HapMap II, se identificaron SNP en 270 personas genotipadas de cuatro poblaciones geográficamente diversas, incluyendo 30 tríos de madre-padre-hijo adulto de los Yoruba en Ibadan, Nigeria; 30 de dichos tríos de origen europeo septentrional y occidental que vivían en Utah; individuos chinos Han no relacionados en Pekín y 45 individuos japoneses no relacionados en Tokio. El análisis de haplotipo de esos SNP dentro de una región de aproximadamente 70 kb incluyendo locus *IGF2* proporciona una vista de los bloques de haplotipos predichos por este conjunto de datos actual y exhaustivo. En la Figura 3, la visualización de Haploview de predicción de enlace se representa debajo de un diagrama a escala del locus *IGF2*. Se identifican tres bloques de haplotipos (representados como barras horizontales negras situadas en escala con el locus *IGF2*). Los datos predicen bloques de haplotipos que abarcan de aproximadamente 14 a 19 kb cadena arriba del exón 1 de *IGF2*, de aproximadamente 1 kb cadena arriba del exón 3 a aproximadamente 5 kb cadena abajo del exón 4 y de aproximadamente 2 kb cadena arriba del inicio del exón 9 a aproximadamente 14 kb cadena abajo del final del exón 9, un bloque de haplotipo que abarca los exones 8 y 9. En general, las regiones entre estos bloques de haplotipo presentan desequilibrio de enlace mínimo y proporcionan fuertes pruebas para recombinación histórica (indicado por rombos blancos que representan múltiples comparaciones de SNP por parejas). Estos datos se resumen en la Figura 1B. Los bloques de haplotipo se representan por barras horizontales negras y la región de desequilibrio de enlace mínimo predicho se representa por una barra horizontal gris.

Gaunt *et al.* realizaron un estudio de asociación con respecto a índice de masa corporal (BMI) en una cohorte caucásica de 2.734 hombres europeos usando 12 SNP que variaban de justo cadena arriba del exón 1 de *IGF2* a aproximadamente 1 kb antes del extremo de la 3' UTR del exón 9 (Gaunt *et al.* Human Mol Genet. vol. 10, n° 14: 1491-1501). Ese estudio incluyó el análisis de enlace de un único SNP (rs680 - análogo de SEC ID N°: 64 en la Tabla 1A), que tenía un alelo que se ha indicado que estaba asociado positivamente con alta BMI en la cohorte, con cada uno de los otros 11 SNP por parejas. Los autores indican un bloque de haplotipo dentro de la 3'UTR del exón 9, que contiene 3 SNP de su estudio (véase Ejemplo 3, la barra horizontal negra en la Figura 1C y la barra gris en la Figura 4).

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona métodos para determinar un genotipo de SNP en un individuo humano. Estos métodos comprenden determinar, en una muestra que contiene ADN genómico del individuo, el nucleótido o los nucleótidos en el nucleótido polimórfico de un polimorfismo de un único nucleótido (SNP), donde el SNP es SEC ID N°: 10 y donde el nucleótido en la posición polimórfica del SNP (y por lo tanto en la posición correspondiente del polinucleótido) es el nucleótido subrayado como se presenta en la Tabla 2A o 2B.

La presente invención también proporciona métodos para cuantificar la expresión específica de alelo de ARN en un individuo humano, donde el individuo humano es un heterocigoto para un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el gen del *Factor de Crecimiento de Insulina 2 (IGF2)*. Estos métodos comprenden cuantificar la cantidad de ARN en una muestra del individuo humano que comprende cada opción polimórfica del SNP, donde el SNP es SEC ID N°: 10; y correlacionar la cantidad relativa de ARN que comprende cada opción polimórfica del SNP con pérdida de impronta del gen *IGF2*.

La muestra puede ser una muestra sanguínea o tisular. La muestra puede ser una muestra de heces. Los métodos pueden comprender correlacionar la cantidad relativa de ARN que comprende cada opción polimórfica del SNP con pérdida de impronta del gen *IGF2*. La etapa de correlación puede comprender correlacionar la cantidad relativa de ARN con un pronóstico o diagnóstico de cáncer o una predicción de la eficacia de un fármaco para tratar cáncer. El
 5 ARN puede transcribirse de forma inversa en ADNc y la cantidad de ADNc específico de alelo puede usarse para determinar la cantidad de ARN.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además determinar si el individuo es homocigoto o heterocigoto para uno o más SNP.
 10

La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados de entre 8-100 nucleótidos, donde el polinucleótido distingue entre un alelo de un SNP (o complemento del mismo) y el otro alelo del SNP (o complemento del mismo) en una reacción de hibridación, donde el SNP es SEC ID N°: 10.

15 En algunas realizaciones, el penúltimo o último nucleótido 3' del polinucleótido hibrida con el nucleótido polimórfico del SNP.

La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados de entre 8-100 nucleótidos donde el polinucleótido actúa como un cebador en el ADNc del *Factor de Crecimiento de tipo Insulina 2 (IGF2)*, de modo que el polinucleótido hibrida con el ADNc y el nucleótido 3' del polinucleótido es complementario del nucleótido inmediatamente cadena arriba del nucleótido polimórfico de un SNP, donde el SNP es SEC ID N°: 10.
 20

En algunas realizaciones, al menos los 10 nucleótidos 3' contiguos del polinucleótido son complementarios del ADNc.
 25

La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados que comprenden la secuencia de SNP, o complemento de la misma, de SEC ID N°: 10, donde el nucleótido en la posición polimórfica del SNP es T como se presenta en la Tabla 2A o 2B.

30 La presente invención también proporciona kits que comprenden un polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos donde el polinucleótido actúa como un cebador en el ADNc del *Factor de Crecimiento de tipo Insulina 2 (IGF2)*, de modo que el polinucleótido hibrida con el ADNc y el nucleótido 3' del polinucleótido es complementario del nucleótido inmediatamente cadena arriba del nucleótido polimórfico de un SNP, donde el SNP es SEC ID N°: 10.

35 En algunas realizaciones, el kit comprende un primer polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos, donde el polinucleótido distingue entre un primer alelo de un SNP y un segundo alelo del SNP (o complemento del mismo) en una reacción de hibridación.

En algunas realizaciones, el kit comprende además un segundo polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos, donde el polinucleótido distingue entre el primer alelo del SNP (o complemento del mismo) y el segundo alelo del SNP (o complemento del mismo) y donde el primer polinucleótido es complementario del nucleótido polimórfico en el primer alelo y el segundo polinucleótido es complementario del nucleótido polimórfico del segundo alelo.
 40

En algunas realizaciones, el kit comprende además uno o más cebadores para amplificar una región del locus *IGF2* que abarca el sitio polimórfico, donde el o los cebadores son diferentes del polinucleótido aislado.
 45

El kit puede comprender además una ADN polimerasa. La polimerasa puede ser una ADN polimerasa termoestable. El kit puede comprender además una transcriptasa inversa. El primer y/o segundo polinucleótido puede marcarse de forma detectable.
 50

Se desvela una mezcla de reacción que comprende un polinucleótido aislado: de entre 8-100 nucleótidos donde el polinucleótido actúa como un cebador en el ADNc del *Factor de Crecimiento de tipo Insulina 2 (IGF2)*, de modo que el polinucleótido hibrida con el ADNc y el nucleótido 3' terminal del polinucleótido es complementario del nucleótido inmediatamente cadena arriba del nucleótido polimórfico de un SNP de modo que la extensión del polinucleótido por una polimerasa incorpora un nucleótido complementario del nucleótido polimórfico del SNP; o
 55

de entre 8-100 nucleótidos donde el polinucleótido actúa como un cebador en el ADNc del *Factor de Crecimiento de tipo Insulina 2 (IGF2)*, de modo que el polinucleótido hibrida con el ADNc y el nucleótido 3' terminal del polinucleótido es complementario del nucleótido inmediatamente cadena arriba del nucleótido polimórfico de un SNP de modo que la extensión del polinucleótido por una polimerasa incorpora un nucleótido complementario del nucleótido polimórfico del SNP, donde el SNP se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 y 47.
 60

65

Las mezclas de reacción pueden comprender:

5 un primer polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos, donde el polinucleótido distingue entre un primer alelo de un SNP (o un complemento del mismo) y un segundo alelo del SNP (o un complemento del mismo) en una reacción de hibridación; una ADN polimerasa termoestable; y ADN genómico o ADNc de transcripción inversa de ARN humano.

10 El primer polinucleótido aislado puede hibridar con el ADN. La polimerasa puede ser una ADN polimerasa termoestable.

15 Las mezclas de reacción pueden comprender además un segundo polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos, donde el polinucleótido distingue entre el primer alelo del SNP (o complemento del mismo) y el segundo alelo del SNP (o complemento del mismo), y donde el primer polinucleótido es complementario del nucleótido polimórfico en el primer alelo y el segundo polinucleótido es complementario del nucleótido polimórfico del segundo alelo.

20 Las mezclas de reacción pueden comprender además uno o más cebadores para amplificar una región del locus *IGF2* que abarca el sitio polimórfico, donde el o los cebadores son diferentes del polinucleótido aislado.

25 Se desvelan métodos para cuantificar la expresión específica de alelo de ARN en un individuo humano, donde el individuo humano es un heterocigoto para al menos dos polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en el gen del *Factor de Crecimiento de Insulina 2 (IGF2)*. Los métodos pueden comprender:

30 cuantificar la cantidad de ARN en una muestra del individuo humano que comprende una o más opciones polimórficas de cada uno de al menos dos SNP, donde los dos SNP se seleccionan cada uno de "Bloque de Enlace" 1 de las Tablas 1A, 1B, 1C, 2A o 2B;

35 cuantificar la cantidad de ARN en una muestra del individuo humano que comprende una o cada opción polimórfica de cada uno de al menos dos SNP, donde los al menos dos SNP se seleccionan cada uno de "Bloque de Enlace" 2 de las Tablas 1A, 1B, 1C, 2A o 2B; o

40 cuantificar la cantidad de ARN en una muestra del individuo humano que comprende una o cada opción polimórfica de cada uno de al menos dos SNP, donde los al menos dos SNP se seleccionan cada uno de "Bloque de Enlace" 3 de las Tablas 1A, 1B, 1C, 2A o 2B.

45 La muestra puede ser una muestra de sangre o tisular. La muestra puede ser una muestra de heces. El método puede comprender correlacionar la cantidad relativa de ARN que comprende cada opción polimórfica de los SNP con pérdida de impronta del gen *IGF2* y/o predisposición a cáncer.

50 El ARN puede transcribirse de forma inversa en ADNc y la cantidad de ADNc específico de alelo se usa para determinar la cantidad de ARN.

Definiciones

55 Una "polimerasa termoestable" se refiere a una polimerasa útil para aplicaciones de PCR. Una polimerasa termoestable puede generalmente calentarse a 75 °C repetidamente (por ejemplo, al menos 20 veces durante un minuto cada vez) y conservar al menos el 80 % de su actividad original. Los ejemplos de dichas polimerasas incluyen, pero sin limitación, *Taq* polimerasa.

60 Un "polimorfismo de un único nucleótido" o "SNP" se refiere a un sitio de un nucleótido que varía entre alelos.

65 Un "alelo" se refiere a un miembro de un par o conjunto de formas diferentes de un gen. En un organismo diploide, un individuo tiene dos copias de cada gen autosómico. Para un polimorfismo de un único nucleótido, un individuo tiene dos alelos diferentes del nucleótido polimórfico si el genotipo en el nucleótido polimórfico es diferente en una copia del gen que en la otra copia del gen (es decir, el individuo es heterocigoto para el nucleótido polimórfico). Si un individuo tiene el mismo genotipo en el nucleótido polimórfico en ambas copias del gen (es decir el individuo es homocigoto para el nucleótido polimórfico), entonces el individuo tiene dos copias del mismo alelo del nucleótido polimórfico. Un individuo dado puede ser homocigoto para un nucleótido polimórfico dentro de un gen (dos copias del mismo alelo del nucleótido polimórfico) y heterocigoto para un nucleótido polimórfico diferente dentro del mismo gen (dos alelos diferentes del nucleótido polimórfico).

70 "Hibridación" se refiere a la formación de una estructura bicatenaria por dos ácidos nucleicos monocatenarios debido a formación de pares bases complementarias. La hibridación puede producirse entre cadenas de ácido nucleico exactamente complementarias o entre cadenas de ácido nucleico que contienen regiones menores de emparejamiento erróneo.

75

“Secuencia diana” o “región diana” se refiere a una región de un ácido nucleico que va a analizarse y comprende el sitio polimórfico de interés.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “ácido nucleico”, “polinucleótido” y “oligonucleótido” se refieren a regiones de ácido nucleico, segmentos de ácido nucleico, cebadores, sondas, amplicones y fragmentos oligoméricos. Las expresiones no se limitan por longitud y son genéricas para polímeros lineales de polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y cualquier otro N-glucósido de una base purínica o pirimidínica, o bases purínicas o pirimidínicas modificadas. Estas expresiones incluyen ADN bicatenario y monocatenario, así como ARN bicatenario y monocatenario.

Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender, por ejemplo, enlaces fosfodiéster o enlaces modificados incluyendo, pero sin limitación, enlaces fosfotriéster, fosforamido, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamido, carbamato, tioéter, fosforamido unido, metilfosfonato unido, fosfortioato, metilfosfonato, fosforditioato, fosfortioato unido o sulfona, y combinaciones de dichos enlaces.

Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender las cinco bases de origen biológico (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco bases de origen biológico. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de bases modificadas, no convencionales o derivatizadas, incluyendo, pero sin limitación, N⁶-metil-adenina, N⁶-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificadas, no convencionales o derivatizadas pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos N^o 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525 y 5.679.785.

Además, un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitación, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y una hexosa.

“Bloque de haplotipo” se refiere a una región de un cromosoma que contiene uno o más sitios polimórficos (por ejemplo, 1-10) que tienden a heredarse juntos. En otras palabras, las combinaciones de formas polimórficas en los sitios polimórficos dentro de un bloque se segregan conjuntamente en una población más frecuentemente que las combinaciones de sitios polimórficos que aparecen en diferentes bloques de haplotipo. Los sitios polimórficos dentro de un bloque de haplotipo tienden a estar en desequilibrio de enlace entre sí. Con frecuencia, los sitios polimórficos que definen un bloque de haplotipo son sitios polimórficos comunes. Algunos bloques de haplotipo contienen un sitio polimórfico que no segrega conjuntamente con sitios polimórficos adyacentes en una población de individuos.

“Desequilibrio de enlace” se refiere a la segregación preferente de una forma polimórfica particular con otra forma polimórfica en una localización cromosómica diferente más frecuentemente de lo que se espera al azar. El desequilibrio de enlace también puede referirse a una situación en la que un rasgo fenotípico presenta segregación preferente con una forma polimórfica particular u otro rasgo fenotípico más frecuentemente de lo que se espera al azar.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A ilustra la estructura del gen *IGF2*. La barra de escala encima del diagrama génico está dibujada en incrementos de 1 kb y representa la localización de *IGF2* en el cromosoma 11 (construcción de NCBI 36). La barra de escala también está presente en la Figura 4. Las flechas en la Figura 1A representan los cuatro promotores de *IGF2*. Los exones 1 a 9 están indicados debajo del diagrama génico. Los exones 1 a 6 sombreados en negro no codifican proteína en la mayoría de los transcritos de *IGF2*. Los exones 7 y 8 en blanco codifican proteína, como lo hace la región blanca pequeña del exón 9. La región sombreada en negro del exón 9 es la 3' UTR.

La Figura 1B ilustra las regiones de *IGF2* que se predice que quedan dentro de bloques de haplotipo (barras horizontales negras) y dentro de regiones que se predice que están en desequilibrio de enlace bajo (barra horizontal gris) basándose en el análisis de haplotipo de datos de genotipación de HapMap II, como se ha descrito en la sección de Antecedentes.

La Figura 1C ilustra la región de *IGF2* que se predice que queda dentro de un bloque de haplotipo (barras horizontales negras) y dentro de dos regiones no caracterizadas de *IGF2* (barras horizontales grises) basándose en un estudio previo (Gaunt *et al.* Human Mol Genet. 10(14): 1491-1501 (2001)), como se describe en la sección de Antecedentes y en el Ejemplo 3.

La Figura 2 ilustra una estrategia básica para determinar la LOI de *IGF2* en una muestra biológica. El ADN genómico y ARN total o poliadenilado se aíslan de una muestra biológica (por ejemplo, sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica, heces, etc.) de un individuo. La muestra de ADN genómico se usa para genotipar uno o más marcadores polimórficos (Ensayo de SNP de ADN). Esta etapa determina si el individuo es heterocigoto para un SNP específico o combinación de SNP. Puede utilizarse cualquier SNP, o combinación de SNP, que se determina que es heterocigoto para análisis de expresión específica de alelos del gen *IGF2* en la muestra de ARN coincidente (ensayo de SNP de ARN). En el ejemplo mostrado, se determinó por un ensayo de genotipación de ADN diferenciador de alelos que en un individuo era homocigoto para los SNP hipotéticos 1, 3, 4 y 6 y heterocigoto para los SNP hipotéticos 2 y 5. El ADNc se amplifica a partir de la región relevante del transcrito de *IGF2* usando transcriptasa inversa convencional y métodos de PCR de modo que se amplifiquen productos de PCR que incluyen al menos los SNP 2 y 5. La expresión de cada una de las dos copias del gen *IGF2* se mide independientemente usando el ADNc generado con un ensayo de expresión génica específico de alelo cuantitativo, y que puede diferenciar suficientemente entre los dos alelos del gen. La comparación de la cantidad de expresión de un alelo en relación con la cantidad de expresión del otro alelo determina de este modo el estado de la impronta del gen *IGF2*. Pueden realizarse de forma simultánea ensayos que diferencian los SNP 2 y 5, y pueden compararse las relaciones de expresión específicas de alelo obtenidas para cada ensayo para mejorar la precisión.

La Figura 3 ilustra el análisis de haplotipo de datos de genotipos de SNP de HapMap II, como se ha descrito en la sección de Antecedentes. Se muestra el diagrama génico de *IGF2* (descrito en la Figura 1A), con datos de enlace generados por Haploview representados debajo. Las líneas verticales indican las posiciones de bloques de haplotipo predichos (barras negras horizontales) en relación con el diagrama génico de *IGF2*. Los rombos se somborean basándose en los datos de enlace para la comparación por parejas indicada de SNP. Los rombos negros representan pares de SNP para los que hay fuertes pruebas de desequilibrio de enlace ($D' = 1$ y puntuación $LOD \geq 2$). Los rombos blancos representan pares de SNP para los que hay fuertes pruebas de recombinación histórica, lo que indica desequilibrio de enlace mínimo ($D' < 1$ y puntuación de $LOD < 2$). Los rombos grises representan partes de SNP que proporcionan datos no informativos para la determinación del desequilibrio de enlace. Se indican identificadores de dbSNP para los SNP que definen los límites de los bloques de haplotipo predichos en la parte de abajo a la izquierda de la figura. El análisis de los datos HapMap II apoya un bloque de haplotipo que abarca el exón 9.

La Figura 4 ilustra el análisis de haplotipo de datos de genotipos de SNP para una cohorte combinada de individuos caucásicos, afroamericanos, chinos, japoneses y mejicanos generados por el estudio descrito en la presente solicitud. Se muestra el diagrama génico de *IGF2*. Las líneas verticales indican las posiciones relativas de los SNP analizados, y se extienden a la visualización de Haploview del análisis de enlace posterior. La barra gris horizontal representa el bloque de haplotipo, y las barras blancas horizontales representan las regiones no caracterizadas del exón 9 como se determinan por Gaunt *et al.* (véase sección de Antecedentes y Ejemplo 3). El sombreado de los rombos es como se ha descrito en la Figura 3. Los números de SEC ID N°: para los SNP analizados y el bloque de enlace previamente indicado (Bloque Gaunt) al que pertenece cada uno se indican en la parte de abajo a la izquierda.

La Figura 5 ilustra el uso de un ensayo basado en enzimas de restricción para genotipación del SNP correspondiente a SEC ID N°: 64. El nucleótido polimórfico se localiza dentro de la secuencia de reconocimiento de dos enzimas de restricción. *Apa I* reconoce y escinde la secuencia cuando está presente el alelo "G", y *Ava II* reconoce y escinde la secuencia cuando está presente el alelo "A". Se amplificó un amplicón de PCR que incluía SEC ID N°: 64 de tres muestras de ADN genómico independientes derivadas de tres individuos (Muestras A, B y C). Los amplicones se digirieron con *Apa I* o *Ava II* o una combinación de ambas enzimas (Doble). La digestión con *Apa I* solamente indica que el individuo es homocigoto para el alelo G (Muestra B), la digestión por *Ava II* solamente indica que el individuo es homocigoto para el alelo A (Muestra C), y la digestión por ambas enzimas indica que el individuo es heterocigoto para el SNP (Muestra A).

La Figura 6 ilustra el uso de un método basado en enzimas de restricción para detectar la LOI de *IGF2*. Se extrajo ARN total de tres individuos que son heterocigotos para SEC ID N°: 64. La región que incluía SEC ID N°: 64 se amplificó por RT-PCR a partir de cada muestra. Los amplicones de ADNc se digirieron con *Apa I* o *Ava II* o una combinación de ambas enzimas, como se indica encima de cada carril. Los productos digeridos se resolvieron en un Bioanalizador Agilent, y se determinaron las concentraciones de fragmentos cortados y no cortados. La cantidad de fragmentos cortados por *Apa I* representa la proporción de ADNc que incluye el alelo "G". La cantidad de fragmentos cortados por *Ava II* representa la proporción de ADNc que incluye el alelo "A". Por lo tanto, la relación de fragmentos cortados por *Apa I* y fragmentos cortados por *Ava II* indican la relación relativa de expresión de los dos alelos en la muestra de ARN original. La relación G:A calculada se muestra debajo de cada triplete de carriles que representa cada muestra. La Muestra 2 expresa exclusivamente el alelo "A". Las Muestras 1 y 3 expresan ambos alelos (es decir presentan LOI de *IGF2*), con relaciones de G:A de 0,5 y 0,3, respectivamente.

La Figura 7 representa en diagrama un método para la detección específica de alelo de un SNP usando una estrategia de extensión de cebadores de un único nucleótido. El SNP representado por SEC ID N°: 64 y su

secuencia de ADN circundante se muestran como un ejemplo (“secuencia de amplicón de PCR”) - SEC ID N°: 114). La posición de nucleótido de SEC ID N°: 64 se indica por la flecha marcada “SecID 64”. La secuencia del polinucleótido usado para extensión de cebadores de un único nucleótido se indica por la llave marcada “Cebador” (SEC ID N°: 113). El amplicón de ADN de PCR (o, como alternativa, un amplicón de ADNc de RT-PCR) que incluye la secuencia de interés se amplifica de la muestra para ensayar. Se añade un cebador al producto de PCR purificado (o, como alternativa RT-PCR) que hibrida su nucleótido 3’ terminal complementario del nucleótido del molde una base hacia el extremo 3’ del nucleótido polimórfico para genotipar. Se lleva a cabo extensión de cebadores de un único nucleótido usando una ADN polimerasa termoestable y ddNTP diferencialmente marcados con fluorescencia. En este ejemplo, se añade ddGTP marcado con dR110 o ddATP marcado con dR6G al extremo 3’ del cebador (generando SEC ID N°: 115 y 116, respectivamente). Estos polinucleótidos marcados se resuelven después y se calculan las áreas pico representativas de cada posible nucleótido incorporado. Las áreas pico se comparan para determinar el genotipo del individuo en esa posición de SNP (o, como alternativa la relación de expresión génica específica de alelo).

La Figura 8 ilustra el uso del ensayo de extensión de cebadores de un único nucleótido descrito en la Figura 7 para genotipar tres individuos con respecto a SEC ID N°: 64. Se genotiparon los tres individuos que se ensayaron con respecto a LOI de *IGF2* por ensayo basado en enzimas de restricción mostrado en la Figura 6. La figura muestra los cromatogramas resultantes para cada muestra después de resolución y detección de picos usando un Analizador Genético ABI y software Gene Mapper. Como se esperaba, se obtienen picos que representan ambos alelos de SEC ID N°: 64 en proporciones relativamente iguales, confirmando que los tres individuos son heterocigotos para SEC ID N°: 64 y demostrando la concordancia entre resultados obtenidos por el método basado en enzimas de restricción y el método basado en extensión de cebadores de un único nucleótido.

La Figura 9 ilustra la aplicación del método basado en extensión de cebadores de un único nucleótido para detectar la LOI de *IGF2*. La región que incluía SEC ID N°: 64 se amplificó por RT-PCR a partir de una muestra de ARN total derivada de cada uno de los tres individuos genotipados en la Figura 8. Los productos de ADNc obtenidos se purificaron y se analizaron como se representa en diagrama en la Figura 7. La figura muestra los cromatogramas resultantes para cada muestra después de resolución y detección de picos usando un Analizador Genético ABI y software Gene Mapper. Para cada muestra, las áreas pico que representan cada uno de los dos alelos posibles se calcularon y se compararon entre sí. Las relaciones G:A calculadas se indican a la derecha de cada cromatograma. De forma coherente con los resultados mostrados en la Figura 6, se determinó que las Muestras 1 y 3 mostraban LOI de *IGF2*, y se determinó que la Muestra 2 mostraba impronta normal de *IGF2*.

La Figura 10 ilustra la linealidad analítica cuantitativa de ensayos de extensión de cebadores de un único nucleótido desarrollados para nueve SNP independientes. La SEC ID número para cada SNP ensayado se indica a la derecha del gráfico. Para cada ensayo, los productos de PCR se amplificaron por separado a partir de muestras de ADN genómico derivadas de dos individuos; uno homocigoto para un alelo del SNP y el otro homocigoto para el otro alelo del SNP. Los productos de PCR se purificaron y cuantificaron. Para cada uno de los nueve SNP, se combinaron dos productos de PCR (uno amplificado a partir de la muestra de ADN homocigota para un alelo y el otro amplificado a partir de la muestra de ADN homocigota para el otro alelo) en las siguientes relaciones de alelo 1 y alelo 2; 1:10, 1:8, 1:6, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 6:1, 8:1 y 10:1. Para cada uno de los nueve SNP, se realizó el ensayo de extensión de cebadores de un único nucleótido por triplicado en cada punto de dilución. Se calcularon las áreas pico que representan cada uno de los dos posibles alelos (eje y) y se compararon con la relación de entrada conocida de cada par de alelos (eje x). Los valores se representan en una escala log₁₀. La R² media de los ensayos es 0,996 ± 0,002 y la pendiente media es 0,830 ± 0,024, lo que demuestra que cada ensayo es capaz de medir de forma sensible y precisa las relaciones cuantitativas relativas de cada par de alelos representado en una muestra.

50 Descripción detallada

I. Introducción

La presente invención proporciona métodos para detectar la LOI de *IGF2* e incluye nuevos polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en el gen *IGF2*. La detección de estos SNP, solos o en combinación entre sí, o en combinación con SNP previamente conocidos, proporcionan un nuevo modo valioso de detectar, por ejemplo, la pérdida de impronta de *IGF2*. Los nuevos SNP pueden, solos o en combinación, usarse para controlar independientemente la expresión de cada una de las dos copias de un individuo humano del gen *IGF2*, y pueden usarse para determinar el estado de impronta de *IGF2* en una muestra biológica. Por ejemplo, si un individuo es heterocigoto para un SNP de *IGF2* particular, entonces pueden emplearse sondas u otros reactivos para detectar y cuantificar por separado ARN de cada alelo de *IGF2*. Si un alelo se expresa de forma predominante, entonces es probable que se produzca impronta de *IGF2*. Sin embargo, si se expresan ambos alelos a niveles similares, es probable que se haya producido pérdida de impronta de *IGF2*.

Además, es posible ahora controlar la pérdida de impronta en muchos más fondos genéticos y raciales humanos. Como ejemplo, la presente invención proporciona varios SNP que aparecen habitualmente en poblaciones

afroamericanas, caucásicas, chinas, japonesas y mejicanas, permitiendo de este modo métodos más útiles para determinar el riesgo de cáncer en esas poblaciones que antes.

Además del descubrimiento de nuevos SNP de *IGF2*, se desvelan combinaciones de SNP de *IGF2* que proporcionan una mejora sorprendente de la capacidad para detectar LOI en individuos en comparación con lo que se había predicho previamente. Por ejemplo, la investigación previa sobre la frecuencia de recombinación genética en el locus *IGF2* describió la existencia de bloques de baja combinación, lo que indica que no supondría una ventaja usar dos o más SNP dentro del mismo bloque. Véase, por ejemplo, HapMap II (construcción de NCBI 36); Gaunt *et al.*, mencionado anteriormente. Estos bloques se representan en las Figuras 1B y 1C. Sin embargo, como se muestra en los datos presentados en el presente documento (véase, por ejemplo, Figura 4) hay de hecho recombinación sustancial dentro de estos "bloques" y por lo tanto la detección de dos o más SNP dentro de estos "bloques" proporciona una mejora sustancial en la capacidad de detectar LOI en individuos de lo que se había predicho en la técnica anterior.

En consecuencia, se desvela la combinación de SNP (como se ha descrito por primera vez en el presente documento o como se conocían previamente) que son sorprendentemente eficaces en la mejora de la precisión de la determinación de LOI así como la expansión de las posibles poblaciones de personas para las que el ensayo será eficaz (donde una persona es heterocigota para al menos un SNP).

II. SNP de *IGF2*

Los siguientes identificadores de secuencia representan secuencias de SNP dentro del locus *IGF2* seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 y 112.

Se desvelan ácidos nucleicos aislados que comprenden al menos un SNP que tiene una o la otra secuencia polimórfica, donde las secuencias de SNP se seleccionan del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 y 47.

Se desvelan además polinucleótidos que distinguen entre dos alelos de un SNP, donde el SNP se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 y 47.

Por ejemplo, la presente invención proporciona polinucleótidos que hibridan con un primer alelo de un SNP particular, pero no hibrida significativamente con el segundo alelo del SNP. "No hibrida significativamente" significa que en presencia de cantidades iguales de ambos alelos en una muestra, el polinucleótido es capaz de detectar la presencia del primer alelo pero no detecta la presencia del segundo alelo en un grado tal que interfiera con la interpretación del ensayo. En algunas realizaciones, en presencia de cantidades iguales de ambos alelos en una muestra, el polinucleótido proporciona una señal para una muestra que tiene el primer alelo que es al menos, por ejemplo, aproximadamente 100; 1.000; 10.000; 100.000 veces o más la señal generada por el polinucleótido para una muestra que tiene una cantidad igual del segundo alelo. "Señal" se refiere a cualquier resultado indicativo de hibridación del polinucleótido con una secuencia complementaria. Al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % de la secuencia del polinucleótido puede ser complementario del SNP de SEC ID N°: 10, por ejemplo, tienen al menos 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50 nucleótidos complementarios.

Como alternativa, los polinucleótidos pueden distinguir entre dos alelos de un SNP actuando como un cebador en una reacción de extensión de cebadores específica de molde. En estas realizaciones, los polinucleótidos no abarcan generalmente el nucleótido polimórfico sino que en su lugar hibridan con el ADN genómico de modo que se produce extensión 3' del polinucleótido en el nucleótido polimórfico. Por lo tanto, en algunas realizaciones el extremo 3' del polinucleótido es complementario de 1 nucleótido cadena arriba del nucleótido polimórfico. En algunas realizaciones, los polinucleótidos son complementarios sobre al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de la longitud de los polinucleótidos de un ADNc de *IGF2*. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende el extremo 3', al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, o más nucleótidos contiguos que son al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % complementarios de un ADNc de *IGF2*. Opcionalmente, el extremo 5' del polinucleótido comprenderá un marcador de secuencia u otra secuencia no complementaria de un ADNc de *IGF2*. Como se conoce bien en la técnica, puede emplearse una diversidad de métodos de extensión de cebadores para detectar SNP.

Los polinucleótidos que distinguen entre los dos alelos pueden ser de entre 8-100 nucleótidos de longitud. Estos polinucleótidos pueden ser de al menos 8, 10, 12, 15, 20, 30, 50, o más nucleótidos de longitud. Los polinucleótidos pueden ser de no más de 100, 80, 50, 40, 30 o 25 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden ser, por ejemplo, de 8-25, 8-30, 8-50, 8-100, 10-25, 10-50, 10-100 nucleótidos, etc. Los polinucleótidos que distinguen entre los dos alelos típicamente incluirán un nucleótido que corresponde (es decir, se alinea con) y es

complementario de uno de los nucleótidos polimórficos del SNP. En algunas realizaciones, el último o penúltimo nucleótido 3' del polinucleótido es complementario de un nucleótido en la posición polimórfica del SNP. Dichas realizaciones pueden ser particularmente útiles en métodos de detección de SNP que emplean los polinucleótidos como cebadores o sondas, por ejemplo en ensayos basados en amplificación tales como los que implican la reacción en cadena de la polimerasa.

Los polinucleótidos de la invención pueden marcarse de forma detectable. Los marcadores detectables adecuados para su uso en la presente invención incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen biotina para tinción con conjugado de estreptavidina marcado, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, Texas red, rodamina, proteína verde fluorescente, y similares, véase, por ejemplo, Probes, Eugene, Oregón, Estados Unidos), radio marcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina y otras habitualmente usadas en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal (por ejemplo, partículas de oro en el intervalo de tamaños de diámetro de 40-80 diámetros dispersan luz verde con alta eficacia) o perlas de vidrio coloreado o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Las patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen las Patentes de Estados Unidos N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241.

Las condiciones de reacción de hibridación pueden variar dependiendo del ensayo que se use para detectar los SNP. Se conocen bien en la técnica condiciones de hibridación específicas de secuencia, rigurosas, en las que un oligonucleótido hibridará solamente con la secuencia diana exactamente complementaria. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas que serán aproximadamente 5 pc más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (en fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de los pares de bases se han disociado. La relajación de la rigurosidad de las condiciones de hibridación permitirán tolerar emparejamientos erróneos de secuencia; el grado de emparejamiento erróneo tolerado puede controlarse por el ajuste adecuado de las condiciones de hibridación.

Para hibridación de tipo Southern, las condiciones ejemplares son: formamida 50 %, SSC 5X y SDS 1 %, incubando a 42 °C o SSC 5X, SDS 1 %, incubando a 65 °C, con lavado en SSC 0,2X y SDS 0,1 % a 55 °C, 60 °C o 65 °C. Dichos lavados pueden realizarse durante 5, 15, 30, 60, 120 o más minutos. Para aplicaciones de PCR (que implican hibridación y/o extensión de cebadores y/o sondas), las condiciones de hibridación que comprenden las condiciones de atemperación y extensión se conocen bien, por ejemplo, como se describe en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis *et al.*, eds., 1990).

La presente invención se basa en técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que desvelan los métodos generales de uso en la presente invención incluyen Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds., 1994).

III. Métodos para medir la pérdida de impronta y predisposición al cáncer

La detección de LOI se basa en una comparación de la cantidad de expresión derivada de cada una de las dos copias del gen *IGF2* dentro de una muestra biológica de un individuo. Por lo tanto, si un individuo tiene dos alelos diferentes del gen *IGF2*, entonces puede usarse detección específica de alelo para cuantificar la expresión de cada copia del gen. Si está actuando la impronta, entonces una copia del gen (típicamente la copia materna) no se expresará a pesar de la presencia de una copia genómica del gen. Sin embargo, si se ha producido LOI, entonces se producirá expresión de las copias tanto materna como paterna del gen *IGF2*. Debido a que los niveles de expresión no siempre son exactamente iguales cuando se ha producido LOI, en algunas realizaciones, se determina que una muestra presenta LOI de *IGF2* si la proporción cuantificada del alelo menos abundante es mayor de o igual a 33,3 % de la proporción cuantificada del alelo más abundante.

Generalmente es deseable conocer si un individuo es heterocigoto para un SNP particular. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se obtiene tanto ADN (es decir, ADN genómico) como ARN de una muestra. El ADN genómico se ensaya para determinar si el individuo es heterocigoto para un SNP particular. Si el individuo es heterocigoto, entonces es posible medir la pérdida de impronta detectando ARN que tenga uno de los alelos SNP y comparando después su expresión. Esto se ilustra en la Figura 2. En algunas circunstancias, sin embargo, puede ser beneficioso detectar solamente ARN sin conocer si el individuo es un heterocigoto para un SNP particular. En esta circunstancia, observar la expresión de dos alelos indica LOI, mientras que detectar la expresión de un alelo no es informativo porque no se sabrá si el resultado negativo es debido a impronta u homocigosidad del SNP particular. Sin embargo, aumentando el número de SNP diferentes detectados, es posible diseñar un ensayo de modo que la probabilidad de que un individuo sea homocigoto para cada SNP sea extremadamente baja.

Puede ensayarse más de un SNP para un individuo. "Ensayado" o "ensayado con respecto a" se refiere a cuantificar por separado cada alelo posible del SNP. En general, puede ensayarse con respecto a cualquier combinación de

SNP en una muestra. Pueden ensayarse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 o más SNP diferentes para determinar si ha producido LOI de *IGF2*. De forma óptima, se diseñan amplicones que abarcan más de un SNP, permitiendo de este modo la detección eficaz de múltiples SNP.

5 Como se ha explicado en detalle en el Ejemplo 3, la detección de dos SNP en proximidad general entre sí mejora tanto la precisión del ensayo como el número de posibles candidatos heterocigotos. Este último hallazgo es particularmente sorprendente a la vista de informes tempranos que implicaban que ciertas regiones genómicas se segregaban como bloques de enlace. A la vista de los descubrimientos descritos en el Ejemplo 3, se desvela la
10 detección de las cantidades relativas de las opciones polimórficas de dos o más SNP, donde cada SNP se selecciona del mismo "Bloque" como se enumera en las Tablas 1A, 1B, 1C, 2A y 2B. Por lo tanto, se ensaya con respecto a dos o más SNP en el Bloque 1. O se ensaya con respecto a dos o más SNP en el Bloque 2. O se ensaya con respecto a dos o más SNP en el Bloque 3. Estas opciones no excluyen adición posterior de SNP de otros Bloques. Simplemente como ejemplo, esto significa que puede ensayarse con respecto a dos SNP del Bloque 1 y un SNP del Bloque 2.

15 Como se muestra en las Tablas 4-8, diversos grupos raciales presentan tasas de aparición diferentes de heterocigosidad para los SNP. Por lo tanto, pueden seleccionarse SNP para su uso dentro de un grupo racial particular para permitir una probabilidad mejorada de ensayar con respecto a SNP que sean heterocigotos en un grupo racial particular. Por lo tanto, se ensaya con respecto a uno o más SNP en la Tabla 4 en personas de origen
20 chino, se ensaya con respecto a uno o más SNP en la Tabla 5 en personas de origen japonés, se ensaya con respecto a uno o más SNP en la Tabla 6 en personas de origen africano, se ensaya con respecto a uno o más SNP en la Tabla 7 en personas caucásicas, y se ensaya con respecto a uno o más SNP en la Tabla 8 en personas de origen mejicano.

25 Como alternativa, puede seleccionarse un conjunto de SNP para permitir la mayor probabilidad de ensayar con respecto a un SNP heterocigoto independientemente de la raza. Por lo tanto, puede usarse un panel de SNP seleccionado de las Tablas 4-8.

30 Una persona de cierto grupo racial como se enumera en las Tablas 4-8 puede ensayarse con uno o más SNP que tienen el mismo Bloque de Enlace como se enumera en las Tablas 1A-C y 2 A-B para ese mismo grupo racial.

IV. Métodos de detección de SNP

35 Las técnicas de detección para evaluar ácidos nucleicos con respecto a la presencia de un SNP implican procedimientos bien conocidos en el campo de la genética molecular. Además, muchos de los métodos implican amplificación de ácidos nucleicos. Se proporcionan en la técnica amplias directrices para su realización. Las referencias ejemplares incluyen manuales tales como PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. Innis, *et al.*, Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, 1994-1999, incluyendo actualizaciones complementarias hasta abril de 2004; Sambrook & Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª Ed, 2001).

45 Aunque los métodos típicamente emplean etapas de PCR, también pueden usarse otros protocolos basados en amplificación o no basados en amplificación. Los métodos de amplificación adecuados incluyen reacción en cadena de la ligasa (véase, por ejemplo, Wu & Wallace, Genomics 4: 560-569, 1988); ensayo de desplazamiento de cadena (véase, por ejemplo Walker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 392-396, 1992; Patente de Estados Unidos N° 5.455.166); y varios sistemas de amplificación basados en transcripción, incluyendo los métodos descritos en las Patentes de Estados Unidos N°: 5.437.990; 5.409.818 y 5.399.491; el sistema de amplificación de transcripción (TAS) (Kwoh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177, 1989); y replicación de secuencia automantenida (3SR) (Guatelli *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878, 1990; documento WO 92/08800). Como alternativa,
50 pueden usarse métodos que amplifican la sonda hasta niveles detectables, tales como amplificación por Q β -replicasa (Kramer & Lizardi, Nature 339: 401-402, 1989; Lomeli *et al.*, Clin. Chem. 35: 1826-1831, 1989). Se proporciona una revisión de métodos de amplificación conocidos, por ejemplo, por Abramson y Myers en Current Opinion in Biotechnology 4: 41-47, 1993

55 Típicamente, se realiza detección de SNP en un individuo usando cebadores y/o sondas oligonucleotídicas. Los oligonucleótidos pueden prepararse por cualquier método adecuado, habitualmente síntesis química. Los oligonucleótidos pueden sintetizarse usando reactivos e instrumentos disponibles en el mercado. Como alternativa, pueden obtenerse a través de fuentes comerciales. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 68: 90-99, 1979; Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68: 109-151, 1979; Beaucage *et al.*, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862, 1981; y el método de soporte sólido de la Patente de Estados N° 4.458.066). Además, pueden usarse modificaciones de los métodos anteriormente descritos de síntesis para afectar de forma deseable al comportamiento enzimático con respecto a los oligonucleótidos sintetizados. Por ejemplo, la incorporación de enlaces fosfodiéster modificados (por ejemplo, fosforotioato, metilfosfonatos, fosfoamidato o boranofosfato) o enlaces distintos de un derivado de ácido fosforoso en un oligonucleótido pueden usarse para evitar la escisión en un sitio seleccionado. Además, el uso de azúcares modificados en amino 2' tiende

a favorecer el desplazamiento frente a la digestión del oligonucleótido cuando se hibrida con un ácido nucleico que también es el molde para síntesis de una nueva cadena de ácido nucleico.

La cantidad y/o presencia de un alelo de un SNP en una muestra de un individuo puede determinarse usando muchos métodos de detección que se conocen bien en la técnica. Varios formatos de ensayo de SNP implican uno de varios protocolos generales: hibridación usando oligonucleótidos específicos de alelo, extensión de cebadores, ligamiento específico de alelo, secuenciación, o técnicas de separación electroforética, por ejemplo, polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP) y análisis de heterodúplex. Los ensayos ejemplares incluyen ensayos de nucleasa 5', incorporación de terminador de colorante dirigido a molde, ensayos de oligonucleótidos específicos de alelo de baliza molecular, ensayos de extensión de bases individuales y puntuación de SNP por secuencias de pirofosfato en tiempo real. Puede realizarse análisis de secuencias amplificadas usando diversas tecnologías tales como microplacas, ensayos de polarización de fluorescencia y espectrometría de masas de desorción e ionización por láser asistida por matriz (MALDI). Dos métodos que también pueden usarse son ensayos basados en la escisión invasiva con Flap y metodologías que emplean sondas candado.

La determinación de la presencia o ausencia de un alelo de SNP particular generalmente se realiza analizando una muestra de ácido nucleico que se obtiene de una muestra biológica del individuo para analizar. Aunque la cantidad y/o presencia de un alelo de SNP puede medirse directamente usando ARN de la muestra, con frecuencia el ARN en una muestra se transcribirá de forma inversa, opcionalmente se amplificará, y después el alelo de SNP se detectará en el ADNc resultante.

Se describen brevemente metodologías frecuentemente usadas para análisis de muestras de ácido nucleico para medir la cantidad y/o presencia de un alelo de un SNP. Sin embargo, puede usarse en la invención cualquier método conocido en la técnica para medir la cantidad y/o presencia de polimorfismos de un único nucleótido.

Hibridación específica de alelo

Esta técnica, también denominada habitualmente hibridación oligonucleotídica específica de alelo (ASO) (por ejemplo, Stoneking *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 48: 70-382, 1991; Saiki *et al.*, Nature 324, 163-166, 1986; documentos EP 235.726; y WO 89/11548), se basa en distinguir entre dos moléculas de ADN que difieren en una base hibridando una sonda oligonucleotídica que es específica de una de las variantes con un producto amplificado obtenido de amplificar la muestra de ácido nucleico. Este método puede emplear oligonucleótidos cortos, por ejemplo, de 15-20 bases de longitud. Las sondas se diseñan para hibridar diferencialmente con una variante frente a otra. Están disponibles en la técnica principios y directrices para diseñar dichas sondas, por ejemplo, en las referencias citadas en el presente documento. Las condiciones de hibridación deberían ser suficientemente rigurosas para que haya una diferencia significativa en la intensidad de hibridación entre alelos, y preferentemente una respuesta esencialmente binaria, por lo que una sonda hibrida solamente con uno de los alelos. Algunas sondas se diseñan para hibridar con un segmento de ADN o ADNc diana de modo que el sitio polimórfico se alinee con una posición central (por ejemplo, a una distancia de 4 bases del centro del oligonucleótido, por ejemplo, en un oligonucleótido de 15 bases en la posición 7; en un oligonucleótido de 16 bases en la posición 8 o 9) de la sonda (por ejemplo, un polinucleótido de la invención distingue entre dos alelos de SNP como se exponen en el presente documento), pero este diseño no es necesario.

La cantidad y/o presencia de un alelo se determina midiendo la cantidad de oligonucleótido específico de alelo que se hibrida con la sonda. Típicamente, el oligonucleótido se marca con un marcador tal como un marcador fluorescente. Por ejemplo, un oligonucleótido específico de alelo se aplica a oligonucleótidos inmovilizados que representan secuencias de SNP potenciales. Después de condiciones de hibridación y lavado rigurosas, se mide la intensidad de fluorescencia para cada oligonucleótido de SNP.

El oligonucleótido presente en el sitio polimórfico se identifica por hibridación en condiciones de hibridación específicas de secuencia con una sonda oligonucleotídica exactamente complementaria de uno de los alelos polimórficos en una región que abarca el sitio polimórfico. La secuencia que hibrida con la sonda y las condiciones de hibridación específica de secuencia se seleccionan de modo que un único emparejamiento erróneo en el sitio polimórfico desestabilice la doble cadena de hibridación suficientemente para que de hecho no se forme. Por lo tanto, en condiciones de hibridación específicas de secuencia, se formarán solamente dobles cadenas estables entre la sonda y la secuencia alélica exactamente complementaria. Por lo tanto, están dentro del alcance de la invención oligonucleótidos de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud, por ejemplo de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud, que son exactamente complementarios de una secuencia alélica en una región que abarca el sitio polimórfico (por ejemplo, SEC ID N°: 10).

La cantidad y/o presencia del nucleótido en el sitio polimórfico puede identificarse por hibridación en condiciones de hibridación suficientemente rigurosas con un oligonucleótido sustancialmente complementario de uno de los alelos de SNP en una región que abarca el sitio polimórfico, y exactamente complementario del alelo en el sitio polimórfico. Debido a que los emparejamientos erróneos que aparecen en sitios no polimórficos son emparejamientos erróneos con ambas secuencias de alelos, la diferencia en el número de emparejamientos erróneos en una doble cadena formada con la secuencia del alelo diana y en una doble cadena formada con la secuencia del alelo no diana

correspondiente es la misma que cuando se usa un oligonucleótido exactamente complementario de la secuencia del alelo diana. En esta realización, las condiciones de hibridación son suficientemente relajadas para permitir la formación de dobles cadenas estables con la secuencia diana, manteniendo a la vez suficiente rigurosidad para excluir la formación de dobles cadenas estables con secuencias no diana. En condiciones de hibridación

5 suficientemente rigurosas, se formarán dobles cadenas estables solamente entre la sonda y el alelo diana. Por lo tanto, están dentro del alcance de la invención oligonucleótidos de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud, que son sustancialmente complementarios de una secuencia de alelo en una región que abarca el sitio polimórfico, y son exactamente complementarios de la secuencia de alelo en el sitio polimórfico.

10 El uso de oligonucleótidos sustancialmente, más que exactamente, complementarios puede ser deseable en formatos de ensayo en los que la optimización de las condiciones de hibridación es limitada. Por ejemplo, en un formato de ensayo de sonda inmovilizada multidiana típico, se inmovilizan sondas para cada diana en un único soporte sólido. Se llevan a cabo hibridaciones simultáneamente poniendo en contacto el soporte sólido con una solución que contiene ADN o ADNc diana. Como todas las hibridaciones se llevan a cabo en condiciones idénticas, las condiciones de hibridación no pueden optimizarse por separado para cada sonda. La incorporación de emparejamientos erróneos en una sonda puede usarse para ajustar la estabilidad de doble cadena cuando el formato de ensayo excluye ajustar las condiciones de hibridación. El efecto de un emparejamiento erróneo introducido particular en la estabilidad de la doble cadena se conoce bien, y la estabilidad de la doble cadena puede

15 tanto estimarse como determinarse empíricamente de forma rutinaria, como se ha descrito anteriormente. Las condiciones de hibridación adecuadas, que dependen del tamaño y la secuencia exactos de la sonda, pueden seleccionarse de forma empírica usando las directrices proporcionadas en el presente documento y bien conocidas en la técnica. El uso de sondas oligonucleotídicas para detectar diferencias de un único par de bases en la secuencia se describe, por ejemplo, en Corner *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 278-282, y Patentes de Estados Unidos N° 5.468.613 y 5.604.099.

20 El cambio proporcional en la estabilidad entre una doble cadena de hibridación perfectamente coincidente y con un emparejamiento erróneo de una única base depende de la longitud de los oligonucleótidos hibridados. Las dobles cadenas formadas con secuencias sonda más cortas se desestabilizan proporcionalmente más por la presencia de un emparejamiento erróneo. En la práctica, se prefieren oligonucleótidos entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos de longitud para detección específica de secuencia. Además, debido a que los extremos de un oligonucleótido hibridado experimentan disociación aleatoria continua y rehibridación debido a energía térmica, un emparejamiento erróneo en uno de los extremos desestabiliza la doble cadena de hibridación

25 menos que un emparejamiento erróneo que aparezca de forma interna. Preferentemente, para la diferenciación de un cambio de un único par de bases en la secuencia diana, se selecciona la secuencia sonda que hibrida con la secuencia diana de modo que aparezca el sitio polimórfico en la región interna de la sonda.

30 Los criterios anteriores para seleccionar una secuencia sonda que hibrida con un SNP particular se aplican a la región de hibridación de la sonda, es decir, la parte de la sonda que esté implicada en la hibridación con la secuencia diana. Una sonda puede estar unida a una secuencia de ácido nucleico adicional, tal como una cola poli-T usada para inmovilizar la sonda, sin alterar significativamente las características de hibridación de la sonda. Un experto en la materia reconocerá que para su uso en los presentes métodos, una sonda unida a una secuencia de ácido nucleico adicional que no es complementaria de la secuencia diana y, por lo tanto, no está implicada en la hibridación, es esencialmente equivalente a la sonda no unida.

35 Se conocen en la técnica formatos de ensayo adecuados para detectar híbridos formados entre sondas y secuencias de ácido nucleico diana en una muestra e incluyen el formato de diana inmovilizada (transferencia puntual) y los formatos de ensayo de sonda inmovilizada (transferencia puntual inversa o transferencia lineal). Los formatos de ensayo de transferencia puntual y transferencia puntual inversa se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 5.310.893; 5.451.512; 5.468.613; y 5.604.099.

40 En un formato de transferencia puntual, se inmoviliza ADN o ADNc diana amplificado en un soporte sólido, tal como una membrana de nailon. El complejo de membrana-diana se incuba con sonda marcada en condiciones de hibridación adecuadas, se retira sonda no hibridada lavando en condiciones adecuadamente rigurosas, y la membrana se controla con respecto a la presencia de sonda unida.

45 En el formato de transferencia puntual inversa (o transferencia lineal), las sondas se inmovilizan en un soporte sólido, tal como una membrana de nailon o una placa de microtitulación. El ADN o ADNc diana se marca, típicamente durante la amplificación por la incorporación de cebadores marcados. Uno o ambos de los cebadores pueden marcarse. El complejo de membrana-sonda se incuba con el ADN o ADNc diana amplificado marcado en condiciones de hibridación adecuadas, el ADN o ADNc diana no hibridado se retira por lavado en condiciones de hibridación rigurosas y la membrana se controla con respecto a la presencia de ADN o ADNc diana unido.

50 Con frecuencia se usa una sonda específica de alelo que es específica para una de las variantes de polimorfismo junto con la sonda específica de alelo para la otra variante de polimorfismo. En algunas realizaciones, las sondas se inmovilizan en un soporte sólido y la secuencia diana en un individuo se analiza usando ambas sondas

simultáneamente. Se describen ejemplos de matrices de ácido nucleico en el documento WO 95/11995. La misma matriz o una matriz diferente pueden usarse para análisis de polimorfismos caracterizados. El documento WO 95/11995 también describe submatrices que se optimizan para detección de formas variantes de un polimorfismo precaracterizado.

5

Cebadores específicos de alelos

La cantidad y/o presencia de un alelo también se detecta habitualmente usando amplificación específica de alelo o métodos de extensión de cebadores. Estas reacciones típicamente implican uso de cebadores que se diseñan para dirigirse específicamente a un polimorfismo mediante un emparejamiento erróneo en el extremo 3' de un cebador. La presencia de un emparejamiento erróneo afecta a la capacidad de una polimerasa para extender un cebador cuando la polimerasa carece de actividad correctora de errores. Por ejemplo, para detectar una secuencia de alelo usando un método basado en amplificación o extensión específica de alelo, se diseña un cebador complementario del nucleótido polimórfico de un SNP de modo que el nucleótido 3' hibride en la posición polimórfica. La presencia del alelo particular puede determinarse por la capacidad del cebador para iniciar la extensión. Si el extremo 3' está emparejado de forma errónea, se impide la extensión. Si un cebador coincide con el nucleótido polimórfico en el extremo 3', el cebador se extenderá eficazmente.

10

15

Típicamente, el cebador se usa junto con un segundo cebador en una reacción de amplificación. El segundo cebador hibrida en un sitio no relacionado con la posición polimórfica. La amplificación se realiza desde los dos cebadores que conducen a un producto detectable lo que indica que está presente la forma alélica particular. Se describen métodos basados en extensión y amplificación específicos de alelos en, por ejemplo, el documento WO 93/22456; las Patentes de Estados Unidos N° 5.137.806; 5.595.890; 5.639.611; y la Patente de Estados Unidos N° 4.851.331.

20

25

Usando métodos basados en amplificación específicos de alelos, la identificación y/o cuantificación de los alelos requieren detección de la presencia o ausencia de secuencias diana amplificadas. Se conocen bien en la técnica métodos para la detección de secuencias diana amplificadas. Por ejemplo, la electroforesis en gel y ensayos de hibridación de sonda descritos se usan con frecuencia para detectar la presencia de ácidos nucleicos.

30

35

En un método sin sonda alternativo, el ácido nucleico amplificado se detecta controlando el aumento en la cantidad total de ADN bicatenario en la mezcla de reacción, y se describe, por ejemplo en la Patente de Estados Unidos N° 5.994.056; y las Publicaciones de Patente Europea N° 487.218 y 512.334. La detección de ADN o ADNc diana bicatenario se basa en el aumento de fluorescencia que diversos colorantes que se unen a ADN, por ejemplo, Verde SYBR, muestran cuando se unen a ADN bicatenario.

40

Como se aprecia por un experto en la materia, pueden realizarse métodos de amplificación específicos de alelo en reacciones que emplean múltiples cebadores específicos de alelo para dirigirse a alelos particulares. Los cebadores para dichas aplicaciones múltiples están generalmente marcados con marcadores distinguibles o se seleccionan de modo que los productos de amplificación producidos a partir de los alelos sean distinguibles por tamaño. Por lo tanto, por ejemplo, ambos alelos en una única muestra pueden identificarse y/o cuantificarse usando una única amplificación por diversos métodos.

45

Como en el caso de sondas específicas de alelos, un cebador oligonucleotídico específico de alelo puede ser exactamente complementario de uno de los alelos polimórficos en la región de hibridación o puede tener algunos emparejamientos erróneos en posiciones distintas del extremo 3' del oligonucleótido, produciéndose dichos emparejamientos erróneos en sitios no polimórficos en ambas secuencias de alelo.

50

Ensayo de nucleasa 5'

55

60

La cantidad y/o presencia de un alelo también puede determinarse usando un "TaqMan®" o "ensayo de nucleasa 5'", como se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 5.210.015; 5.487.972; y 5.804.375; y Holland *et al.* 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280. En el ensayo de TaqMan®, se añaden sondas de detección marcadas que hibridan dentro de la región amplificada durante la reacción de amplificación. Las sondas se modifican para evitar que las sondas actúen como cebadores para síntesis de ADN. La amplificación se realiza usando una ADN polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5' a 3'. Durante cada etapa de síntesis de la amplificación, cualquier sonda que hibride con el ácido nucleico diana cadena abajo del cebador que se extiende se degrada por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa. Por lo tanto, la síntesis de una nueva cadena diana también da como resultado la degradación de una sonda, y la acumulación de producto de degradación proporciona una medida de la síntesis de secuencias diana.

65

La sonda de hibridación puede ser una sonda específica de alelo que diferencia entre los alelos de SNP. Como alternativa, el método puede realizarse usando un cebador específico de alelo y una sonda marcada que se une con producto amplificado.

Puede usarse cualquier método adecuado para detectar producto de degradación en un ensayo de nucleasa 5'. Con frecuencia, la sonda de detección se marca con dos colorantes fluorescentes, uno de los cuales es capaz de interrumpir la fluorescencia del otro colorante. Los colorantes se unen a la sonda, preferentemente uno se une al extremo 5' y el otro se une a un sitio interno, de modo que se produzca interrupción cuando la sonda está en un estado no hibridado y de modo que la escisión de la sonda por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa se produzca entre los dos colorantes. La amplificación da como resultado escisión de la sonda entre los colorantes con una eliminación conjunta de interrupción y un aumento de la fluorescencia observable a partir del colorante interrumpido inicialmente. La acumulación de producto de degradación se controla midiendo el aumento de la fluorescencia de la reacción. Las Patentes de Estados Unidos N° 5.491.063 y 5.571.673, ambas incorporadas en el presente documento por referencia, describen métodos alternativos para detectar la degradación de sonda que sucede junto con la amplificación.

Secuenciación de ADN y extensiones de cebadores de una única base u otros

La cantidad y/o presencia de un alelo también puede determinarse por secuenciación directa. Los métodos incluyen, por ejemplo, métodos basados en secuenciación de didesoxi y otros métodos tales como secuencia de Maxam y Gilbert (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, mencionado anteriormente).

Otros métodos de detección incluyen Pyrosequencing™ de productos de longitud oligonucleotídica. Dichos métodos con frecuencia emplean técnicas de amplificación tales como PCR. Por ejemplo, en pirosecuenciación, un cebador de secuenciación se hibrida con un molde de ADN o ADNc amplificado por PCR, monocatenario; y se incubaba con las enzimas, ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa, y los sustratos, adenosin 5' fosfosulfato (APS) y luciferina. El primero de cuatro desoxinucleótido trifosfatos (dNTP) se añade a la reacción. La ADN polimerasa cataliza la incorporación del desoxinucleótido trifosfato en la cadena de ADN, si es complementario de la base en la cadena molde. Cada acontecimiento de incorporación se acompaña de la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado. La ATP sulfurilasa convierte cuantitativamente PPi a ATP en presencia de adenosin 5' fosfosulfato. Este ATP conduce la conversión mediada por luciferasa de luciferina a oxiluciferina que genera luz visible en cantidades que son proporcionales a la cantidad de ATP. La luz producida en la reacción catalizada por luciferasa se detecta por una cámara de dispositivo acoplado a carga (CCD) y se ve cómo un pico en un pyrogram™. Cada señal luminosa es proporcional al número de nucleótidos incorporado. La apirasa, una enzima degradante de nucleótidos, degrada continuamente dNTP no incorporados y ATP en exceso. Cuando la degradación se completa, se añade otro dNTP.

Otro método similar para caracterizar SNP no requiere el uso de una PCR completa, sino que típicamente usa solamente la extensión de un cebador por una única molécula de ácido didesoxirribonucleico marcada de forma detectable (por ejemplo, con fluorescencia) (ddNTP) que es complementaria del nucleótido para investigar. El nucleótido en el sitio polimórfico puede identificarse mediante detección de un cebador que se ha extendido por una base y está marcado con fluorescencia (por ejemplo, Kobayashi *et al.* Mol. Cell. Probes, 9: 175-182, 1995). Por supuesto los productos de extensión también pueden detectarse basándose en otros tipos de marcadores, o por espectrometría de masas, según se desee.

En un método similar, el ADN diana amplificado por PCR o ADNc diana amplificado por RT-PCR puede usarse como un molde para una reacción de extensión de cebador de un único nucleótido por la que se incorpora un único ddNTP marcado con fluorescencia complementario del nucleótido polimórfico en el extremo 3' de un único cebador. Cada ddNTP específico puede marcarse con un colorante fluorescente diferente (por ejemplo, ddATP marcado con dR6G, ddCTP marcado con dTAMRA™, ddGTP marcado con dR110 y ddTTP o ddUTP marcado con dROX™). Por lo tanto, la extensión de un único nucleótido del cebador inicialmente no marcado marca el cebador con un colorante fluorescente específico que identifica la base que se añadió al extremo 3' del cebador no marcado. Los cebadores extendidos pueden resolverse y analizarse para determinar la presencia y cantidad relativa de cada cebador marcado con colorante específico, que representa las cantidades relativas de cada alelo en el molde de ADN diana o ADNc diana.

Análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

En otras realizaciones, la cantidad y/o presencia de un alelo de un SNP puede determinarse por digestión diferencial de ADN o ADNc diana amplificado cuando el nucleótido polimórfico de interés queda dentro de la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción. En un caso, un alelo del SNP (el primer alelo) mantiene la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción y el otro alelo (el segundo alelo) no. En este caso, la enzima de restricción escindiría el ADN o ADNc diana que incluye el primer alelo, pero no el ADN o ADNc diana que incluye el segundo alelo. En otro caso, un alelo (el primer alelo) del SNP mantiene la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción (la primera enzima de restricción) y el otro alelo (el segundo alelo) mantiene la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción diferente (la segunda enzima de restricción). En este caso, la primera enzima de restricción escindiría el ADN o ADNc diana que incluye el primer alelo, pero no el ADN o ADNc diana que incluye el segundo alelo. La segunda enzima de restricción escindiría el ADN o ADNc diana que incluye el segundo alelo, pero no el ADN o ADNc diana que incluye el primer alelo. La cantidad y/o presencia de alelos puede determinarse por diversos métodos incluyendo, pero sin limitación, hibridación de transferencia de Southern con

fragmentos restringidos inmovilizados y cuantificación de intensidades de bandas, resolución y visualización de fragmentos de restricción por electroforesis en gel, resolución y cuantificación de fragmentos de restricción por electroforesis capilar (tal como se realiza usando un BioAnalizador Agilent), o amplificación por PCR cuantitativa diferencial de ADN o ADNc molde escindido frente a no escindido.

5

Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante

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

10

Análisis de polimorfismo de conformación monocatenaria

15

Los alelos de secuencias diana pueden diferenciarse usando análisis de polimorfismo de conformación monocatenaria, que identifica diferencias de bases por la alteración en la migración electroforética de productos de PCR monocatenarios, como se ha descrito, por ejemplo, en Orita *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. 86, 2766-2770 (1989). Pueden generarse productos de PCR o RT-PCR amplificados como se ha descrito anteriormente, y calentarse o desnaturalizarse de otro modo, para formar productos de amplificación monocatenarios. Los ácidos nucleicos monocatenarios pueden volver a plegarse o formar estructuras secundarias que dependen parcialmente de la secuencia de bases. Las diferentes movilidades electroforéticas de productos de amplificación monocatenarios pueden relacionarse con una diferencia de secuencia de bases entre alelos de la diana.

20

25

Los métodos de detección de SNP con frecuencia emplean oligonucleótidos marcados. Los oligonucleótidos pueden marcarse incorporando un marcador detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Los marcadores útiles incluyen colorantes fluorescentes, marcadores radiactivos, por ejemplo, ^{32}P , reactivos electrón-densos, enzima, tal como peroxidasa o fosfatasa alcalina, biotina o haptenos y proteínas para los que están disponibles antiseros o anticuerpos monoclonales. Se conocen bien en este campo técnicas de marcaje (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, mencionado anteriormente; Sambrook & Russell, mencionado anteriormente).

30

V. Métodos para cuantificar ARN

35

La presencia y cantidad de ARN correspondiente a un SNP particular puede determinarse fácilmente de acuerdo con cualquier método para cuantificar ARN. Pueden usarse diversos métodos que implican enlace de ARN con un soporte sólido y que exploran el ARN (por ejemplo, transferencias de Northern, transferencias puntuales, etc.).

40

En algunas realizaciones, el ARN diana se transcribe de forma inversa en primer lugar (por ejemplo, con transcriptasa inversa) y después el ADNc resultante se cuantifica por cualquier método conocido en la técnica (hibridación de transferencia, RT-PCR, etc.) como un sustituto de la cantidad de ARN. Se conocen y se describen diversos métodos de transcripción inversa, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds., 1994)), y puede implicar transcripción inversa usando cebadores específicos o no específicos.

45

En algunas realizaciones, se usa RT-PCR u otras técnicas de amplificación cuantitativa para cuantificar el ARN diana. La amplificación de ADNc usando reacciones se conoce bien (véase Patentes de Estados Unidos 4.683.195 y 4.683.202; PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (Innis *et al.*, eds, 1990)).

50

Las secuencias amplificadas por los métodos desvelados pueden adicionalmente evaluarse, detectarse, clonarse, secuenciarse y similares, en solución o después de su unión con un soporte sólido, por cualquier método habitualmente aplicado a la detección de un ADN específica tal como PCR, restricción de oligómeros (Saiki, *et al.*, Bio/Technology 3: 1008-1012 (1985)), análisis de sondas oligonucleotídicas específica de alelo (ASO) (Conner, *et al.*, PNAS USA 80: 278 (1983)), ensayos de ligamiento de oligonucleótidos (OLA) (Landegren, *et al.*, Science 241: 1077, (1988)) y similares. Se han revisado técnicas moleculares para el análisis de ADN (Landegren, *et al.*, Science 242: 229-237 (1988)).

55

Se desvelan métodos de amplificación cuantitativa, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 6.180.349; 6.033.854; y 5.972.602, así como en, por ejemplo, Gibson *et al.*, Genome Research 6: 995-1001 (1996); DeGraves, *et al.*, Biotechniques 34 (1): 106-10, 112-5 (2003); Deiman B, *et al.*, Mol Biotechnol. 20(2): 163-79 (2002). Las amplificaciones pueden controlarse en "tiempo real".

60

En general, la amplificación cuantitativa se basa en el control de la señal (por ejemplo, fluorescencia de una sonda) que representa copias del molde en ciclos de una reacción de amplificación (por ejemplo, PCR). En los ciclos iniciales de la PCR, se observa una señal muy baja porque la cantidad del amplicón formado no soporta una salida

65

de señal medible del ensayo. Después de los ciclos iniciales, a medida que aumenta la cantidad de amplicón formado, la intensidad de señal aumenta hasta un nivel medible y alcanza una meseta en ciclos posteriores cuando la PCR entra en una fase no logarítmica. Mediante una representación de la intensidad de señal frente al número de ciclos, puede deducirse el ciclo específico en el que se obtiene una señal medible de la reacción de PCR y usarse para retrocalcular la cantidad de la diana antes del inicio de la PCR. El número de los ciclos específicos que se determina por este método típicamente se denomina umbral de ciclo (Ct). Se describen métodos ejemplares, por ejemplo, en Heid *et al.* *Genome Methods* 6: 986-94 (1996) con referencia a sondas de hidrólisis.

Un método para la detección de productos de amplificación es el ensayo de PCR de "hidrólisis" de exonucleasa 5'-3' (también denominado el ensayo TaqMan™) (Patentes de Estados Unidos N° 5.210.015 y 5.487.972; Holland *et al.*, *PNAS USA* 88: 7276-7280 (1991); Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 21: 3761-3766 (1993)). Este ensayo detecta la acumulación de un producto de PCR específico por hibridación y escisión de una sonda fluorogénica marcada doble (la sonda "TaqMan™") durante la reacción de amplificación. La sonda fluorogénica consiste en un oligonucleótido marcado tanto con un colorante indicador fluorescente como con un colorante interruptor. Durante la PCR, esta sonda se escinde por la actividad exonucleasa 5' de la ADN polimerasa si, y solamente si, hibrida con el segmento que se amplifica. La escisión de la sonda genera un aumento en la intensidad de fluorescencia del colorante indicador.

Otro método para detectar productos de amplificación que se basan en el uso de la transferencia de energía es el método de "sonda de baliza" descrito por Tyagi y Kramer, *Nature Biotech.* 14: 303-309 (1996), que también es el objeto de las Patentes de Estados Unidos N° 5.119.801 y 5.312.728. Este método emplea sondas de hibridación de oligonucleótidos que pueden formar estructuras en horquilla. En un extremo de la sonda de hibridación (bien el extremo 5' o bien el 3'), hay un fluoróforo donante, y en el otro extremo un resto aceptor. En el caso del método de Tyagi y Kramer, este resto aceptor es un interruptor, es decir, el aceptor absorbe la energía liberada por el donante, pero después él mismo no emite fluorescencia. Por lo tanto, cuando la baliza está en la conformación abierta, la fluorescencia del fluoróforo donante es detectable, mientras que cuando la baliza está en conformación de horquilla (cerrada), la fluorescencia del fluoróforo donante se apaga. Cuando se emplea en PCR, la sonda de baliza molecular, que hibrida con una de las cadenas de producto de PCR, está en "conformación abierta", y se detecta fluorescencia, mientras que las que permanecen sin hibridar no emitirán fluorescencia (Tyagi y Kramer, *Nature Biotechnol.* 14: 303-306 (1996)). Como resultado, la cantidad de fluorescencia aumentará a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR, y por lo tanto puede usarse como una medida del progreso de la PCR. Los expertos en la materia reconocerán que también están disponibles otros métodos de amplificación cuantitativa.

También se conocen diversas otras técnicas para realizar amplificación cuantitativa de un ácido nucleico. Por ejemplo, algunas metodologías emplean uno o más oligonucleótidos sonda que se estructuran de modo que se genere un cambio de la fluorescencia cuando el oligonucleótido o los oligonucleótidos hibridan con un ácido nucleico diana. Por ejemplo, uno de dichos métodos implica un enfoque de fluoróforo doble que aprovecha la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), por ejemplo, sondas de hibridación LightCycler™, donde dos sondas oligo hibridan con el amplicón. Los oligonucleótidos se diseñan para hibridar en una orientación de cabeza a cola con los fluoróforos separados a una distancia que es compatible con transferencia de energía eficaz. Otros ejemplos de oligonucleótidos marcados que están estructurados para emitir una señal cuando se unen con un ácido nucleico o se incorporan en un producto de extensión incluyen: sondas Scorpions™ (por ejemplo, Whitcombe *et al.*, *Nature Biotechnology* 17: 804-807, 1999, y Patente de Estados Unidos N° 6.326.145), sondas Sunrise™ (o Amplifluor™) (por ejemplo, Nazarenko *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25: 2516-2521, 1997, y Patente de Estados Unidos N° 6.117.635) y sondas que forman una estructura secundaria que da como resultado señal reducida sin un interruptor y que emite señal aumentada cuando hibrida con una diana (por ejemplo, sondas Lux™).

En otras realizaciones, pueden usarse agentes intercaladores que producen una señal cuando se intercalan en ADN bicatenario. Los agentes ejemplares incluyen SYBR GREEN™ y SYBR GOLD™. Puesto que estos agentes no son específicos de molde, se supone que la señal se genera basándose en la amplificación específica de molde. Esto puede confirmarse controlando la señal en función de la temperatura debido a que el punto de fusión de las secuencias molde será generalmente mucho mayor que, por ejemplo, dímeros de cebadores, etc.

VI. Kits

La invención también proporciona kits como se definen en las reivindicaciones 10-13, que comprenden componentes útiles para practicar los métodos. En algunas realizaciones, el kit puede comprender uno o ambos polinucleótidos de detección específica de alelos (por ejemplo, cebadores o sondas) para un SNP de la invención, que opcionalmente puede fijarse con una membrana de soporte apropiada. En algunas realizaciones, los kits comprenden un primer polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos, en el que el polinucleótido distingue entre un primer alelo de un SNP (o un complemento del mismo) y un segundo alelo del SNP (o un complemento del mismo) en una reacción de hibridación, y opcionalmente un segundo polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos, donde el polinucleótido distingue entre el primer alelo del SNP (o un complemento del mismo) y el segundo alelo del SNP (o un complemento del mismo) y donde el primer polinucleótido es complementario del nucleótido polimórfico en el primer alelo y el segundo polinucleótido es complementario del nucleótido polimórfico del segundo alelo. Opcionalmente, los kits comprenden uno o ambos polinucleótidos específicos de alelo para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100 o

más SNP seleccionados de SEC ID N°: 1-112. Dicho kit también puede contener cebadores de amplificación para amplificar una región del locus *IGF2* que abarca el sitio polimórfico. Como alternativa, los kits útiles pueden contener un conjunto de cebadores que comprenden un cebador específico de alelo para la amplificación específica de los alelos polimórficos. Dicho kit puede comprender también sondas para la detección de productos de amplificación.

5 Como alternativa, los kits útiles pueden contener un conjunto de cebadores complementarios de secuencias 5' hasta pero sin incluir las posiciones de SNP de interés (o complementos de las mismas) para su uso en métodos de extensión de cebadores como se ha descrito anteriormente.

10 Otros componentes opcionales de los kits incluyen reactivos adicionales usados para genotipar pacientes y/o cuantificar la cantidad relativa de alelos específicos presentes. Por ejemplo, un kit puede contener una polimerasa, nucleósido trifosfatos de sustrato marcados o no marcados, medios para marcar y/o detectar ácido nucleico, tampones apropiados para reacciones de amplificación o hibridación, e instrucciones para llevar a cabo el presente documento.

15 **VII. Mezclas de reacción**

Se desvelan mezclas de reacción que comprenden componentes para la práctica de los métodos. En algunas realizaciones, el kit puede comprender uno o ambos polinucleótidos de detección específicos de alelo (por ejemplo, cebadores o sondas) para un SNP (o un complemento del mismo) de la invención, que opcionalmente puede fijarse con una membrana de soporte apropiada. Las mezclas de reacción pueden comprender un primer polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos, donde el polinucleótido distingue entre un primer alelo de un SNP (o un complemento del mismo) y un segundo alelo del SNP (o un complemento del mismo) en una reacción de hibridación y opcionalmente un segundo polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos, donde el polinucleótido distingue entre el primer alelo del SNP (o un complemento del mismo) y el segundo alelo del SNP (o un complemento del mismo) y donde el primer polinucleótido es complementario del nucleótido polimórfico en el primer alelo y el segundo polinucleótido es complementario del nucleótido polimórfico del segundo alelo. Opcionalmente, las mezclas de reacción comprenden uno o ambos polinucleótidos específicos de alelo para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100 o más SNP seleccionados de SEC ID N°: 1-112. Dichas mezclas de reacción también pueden contener cebadores de amplificación para amplificar una región del locus *IGF2* que abarca el sitio polimórfico. Como alternativa, las mezclas de reacción pueden contener un conjunto de cebadores que comprenden un cebador específico de alelo para la amplificación específica de los alelos polimórficos. Dicha mezcla de reacción también puede comprender sondas para la detección de productos de amplificación. Opcionalmente, las mezclas de reacción comprenden un conjunto de cebadores complementarios de secuencias 5' hasta pero sin incluir las posiciones de SNP para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100 o más SNP seleccionados de SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 y 112.

40 Otros componentes opcionales de las mezclas de reacción incluyen reactivos adicionales usados para genotipar pacientes y/o cuantificar la cantidad relativa de alelos específicos presentes. Por ejemplo, una mezcla de reacción puede contener una polimerasa, nucleósido trifosfatos de sustrato marcados o no marcados, medios para marcar y/o detectar ácido nucleico, tampones apropiados para reacciones de amplificación o hibridación.

45 **VII. DETECCIÓN DE CÁNCER**

La LOI de *IGF2* se asocia con por ejemplo, una predisposición de cáncer así como predicción de la eficacia del tratamiento de cáncer usando diversos fármacos. Véase, por ejemplo, documento WO2004/003003; Kaneda *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104(52): 20926-20931 (2007). En consecuencia, la detección de la LOI en *IGF2* como se describe en el presente documento puede usarse en el diagnóstico, pronóstico, clasificación, predicción de riesgo de cáncer, detección de recurrencia de cáncer y selección de tratamiento de varios tipos de cánceres. Puede detectarse un cáncer en cualquier estadio de progresión, tal como cánceres primarios, metastásicos y recurrentes. Puede encontrarse información con respecto a numerosos tipos de cáncer, por ejemplo, de la Sociedad Americana del Cáncer (disponible en Internet en cancer.org), o de, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine, Kaspar, *et al.*, eds., 16ª Edición, 2005, McGraw-Hill, Inc. Los cánceres ejemplares que pueden detectarse incluyen cáncer de vejiga, de mama, cervical, coriocarcinoma, neoplasia colorrectal (adenoma colorrectal o cáncer colorrectal), esofágico, adenocarcinoma gástrico, glioma, hepatocelular, leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena crónica, de pulmón, meduloblastoma, de próstata, mesotelioma, ovárico, carcinoma de células renales, de células germinales testiculares y uterino.

60 Se desvelan métodos para determinar si un mamífero (por ejemplo, un ser humano) tiene o no cáncer, si una muestra biológica tomada de un mamífero contiene o no células cancerosas, estimar el riesgo o probabilidad de que un mamífero desarrolle cáncer, clasificar tipos y estadios de cáncer, controlar la eficacia de tratamiento antineoplásico o seleccionar el tratamiento antineoplásico apropiado en un mamífero con cáncer.

65

La muestra biológica puede comprender una muestra tisular de un tejido que se sospecha que contiene células cancerosas. Por ejemplo, en un individuo que se sospecha que tiene cáncer, puede evaluarse el tejido mamario, tejido linfático, tejido pulmonar, tejido cerebral o sangre. Como alternativa, puede evaluarse tejido pulmonar, renal, hepático, ovárico, de cabeza y cuello, tiroideo, de vejiga, cervical, de colon, endometrial, esofágico, de próstata o cutáneo. El tejido o las células pueden obtenerse por cualquier método conocido en la técnica incluyendo, por ejemplo, por cirugía, biopsia, flebotomía, hisopo, secreción del pezón, heces, etc. Una muestra tisular que se sabe que contiene células cancerosas, por ejemplo, de un tumor, puede analizarse con respecto a la presencia o cantidad de metilación en uno o más de los biomarcadores de diagnóstico para determinar información acerca del cáncer, por ejemplo, la eficacia de ciertos tratamientos, la expectativa de supervivencia del individuo, etc. Los métodos pueden usarse junto con métodos de diagnóstico adicionales, por ejemplo, detección de otros biomarcadores del cáncer, etc.

Los métodos pueden usarse para evaluar individuos que se sabe o se sospecha que tienen cáncer o como un ensayo clínico rutinario, es decir, en un individuo que no se sospecha necesariamente que tenga cáncer. Pueden realizarse ensayos de diagnóstico adicionales para confirmar el estado de cáncer en el individuo.

Además, los presentes métodos pueden usarse para evaluar la eficacia de un ciclo de tratamiento. Por ejemplo, la eficacia de un tratamiento antineoplásico puede evaluarse controlando la LOI a lo largo del tiempo en un mamífero que tenga cáncer. Por ejemplo, una reducción o ausencia de la LOI en *IGF2* en una muestra biológica tomada de un mamífero después de un tratamiento, en comparación con un nivel en una muestra tomada del mamífero antes de, o más temprano en, el tratamiento, indica tratamiento eficaz. Además, un paciente puede explorarse con respecto a la LOI de *IGF2* antes de la selección de un fármaco apropiado para tratamiento de cáncer. Por ejemplo, una vez que se detecta LOI, el paciente probablemente es un buen candidato para un inhibidor de IGF1R. Véase, por ejemplo, Kaneda *et al.*, mencionado anteriormente.

Los métodos pueden comprender registrar un diagnóstico, pronóstico, evaluación de riesgo o clasificación, basándose en el estado de metilación determinado de un individuo. Se contempla cualquier tipo de registro, incluyendo registro electrónico, por ejemplo, por un ordenador.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Descubrimiento de nuevos SNP dentro del exón 9 del gen *IGF2*

Se ha presentado previamente una colección de SNP dentro del exón 9 del gen *IGF2*. Las Tablas 1A, 1B y 1C enumeran las coordenadas genómicas (construcción de NCBI 36), variantes de secuencias de un único nucleótido, identificador de referencia del dbSNP de NCBI y secuencias de nucleótidos circundantes de SNP previamente identificados (construcción de dbSNP 129). Para identificar SNP previamente no caracterizados, los inventores diseñaron 15 amplicones de PCR que abarcan la mayoría del exón 9 de *IGF2*. Cada uno se usó para amplificar por PCR el ADN genómico derivado de un panel de 589 individuos, incluyendo 562 muestra que son parte de la colección de Proyecto HapMap Internacional. El panel incluyó 225 individuos caucásicos (98 del Panel de Variación Humana de Coriell incluyendo individuos caucásicos sanos no relacionados y 127 individuos de los que se obtuvieron muestras sanguíneas comercialmente), 96 individuos afroamericanos (Panel de Variación Humana de Coriell), 96 individuos de origen mejicano (Panel de Variación Humana de Coriell de la Comunidad Méjico-Americana de Los Ángeles incluyendo individuos no relacionados, que tenían cada uno tres o cuatro abuelos nacidos en Méjico), 88 individuos japoneses (colección de Proyecto HapMap Internacional incluyendo individuos de Tokio, Japón), y 84 individuos chinos (colección de Proyecto HapMap Internacional incluyendo individuos chinos Han de Pekín, China). Se realizaron múltiples intentos de secuenciación directa en ambas direcciones para todos los amplicones. Las secuencias se ensamblaron y se alinearon, se puntuaron los genotipos y se identificaron los SNP para cada persona en el panel por un proyecto de análisis de secuenciación de polyphred y polyscan automático. Las designaciones de genotipo para SNP de alta frecuencia de heterocigosidad se confirmaron manualmente por inspección manual de cromatogramas de secuencia dentro de CONSED. Como una medida adicional de la confianza de las designaciones de genotipo basadas en los datos de secuenciación, se diseñó un ensayo de genotipación basado en enzimas de restricción independiente para el SNP correspondiente a SEC ID N°: 64 en la Tabla 1A, como se describe en el Ejemplo 4. Las designaciones de genotipo se compararon con las basadas en los datos de secuenciación. Se genotiparon setenta individuos del panel caucásico por ambos métodos. La concordancia entre las asignaciones de genotipo basadas en los dos métodos independientes (ensayos basados en digestión con enzimas de restricción y secuenciación) fue del 100 %.

Las Tablas 2A y 2B enumeran las coordenadas genómicas (construcción de NCBI 36) de variantes de secuencias de un único nucleótido y secuencias de nucleótidos circundantes de nuevos SNP descubiertos en el estudio descrito en la presente solicitud. Las frecuencias observadas de heterocigosidad para SNP seleccionados (incluyendo SNP tanto nuevos como previamente identificados) en los paneles secuenciados de todos los individuos, así como en los individuos afroamericanos, caucásicos, chinos, japoneses y mejicanos se enumeran en la Tabla 3. La identificación de nuevos SNP implica que los nuevos SNP descritos en la presente solicitud pueden ser útiles para mejorar la detección de la LOI de *IGF2*. Por ejemplo, la frecuencia de heterocigosidad observada de SEC ID 10 entre

individuos en el panel afroamericano es del 17,33 %.

Este estudio demuestra las frecuencias de heterocigosidad diferenciales de SNP tanto nuevos como previamente identificados entre diferentes grupos raciales. Los SNP que se genotiparon como heterocigotos en al menos el 2 % de los individuos dentro de las cohortes china, japonesa, afroamericana, caucásica y mejicana se enumeran en las Tablas 4-8, respectivamente. Por lo tanto, el SNP o las combinaciones de SNP óptimos para controlar la LOI de *IGF2* puede variar entre grupos raciales.

Ejemplo 2. Uso de uno cualquiera de los SNP nuevos para mejorar la detección de la LOI del gen *IGF2*.

Como se ha descrito anteriormente, la detección de LOI del gen *IGF2* se basa en la comparación independiente de la cantidad de expresión derivada de cada una de las dos copias del gen *IGF2* aislado de una muestra biológica de un individuo dado. El gen *IGF2* normalmente tiene impronta materna (es decir, la copia heredada de la madre de un individuo normalmente está reprimida de forma transcripcional), mientras que la copia heredada por vía paterna del gen normalmente está expresada. Se produce LOI cuando la impronta materna del *IGF2* está relajada, dando como resultado niveles de expresión similares de las copias heredadas tanto por vía paterna como por vía materna del gen. Un método para medir el estado de impronta de *IGF2* en una muestra es aislar en primer lugar ADN genómico de una muestra biológica y después determinar el genotipo o los genotipos de uno o más sitios polimórficos en la región transcrita del gen *IGF2*. En segundo lugar, se mide después la expresión específica de alelo de *IGF2* utilizando uno o más nucleótidos heterocigotos en ARN que se extrae de la misma muestra biológica. La expresión de cada una de las dos copias del gen *IGF2* puede medirse independientemente con un ensayo o ensayos que sean cuantitativos, y que puedan diferenciar suficientemente entre los dos alelos de uno o más SNP heterocigotos dentro de la muestra. En tercer lugar, se calcula una relación de la cantidad de expresión de un alelo y la cantidad de expresión del otro alelo y se compara con un valor umbral, determinando de este modo el estado de impronta del gen *IGF2* en la muestra.

Como ejemplo de la utilidad de uno o más cualesquiera de los SNP nuevos indicados en la presente solicitud para controlar la LOI de *IGF2*, se describe aquí un enfoque pretendido específico. Resulta evidente para los expertos en la materia que existen múltiples enfoques para la detección y cuantificación de los SNP, y puede utilizarse cualquiera de estos tanto para la genotipación del ADN genómico de una muestra biológica para un SNP particular como para la cuantificación de niveles relativos de cada variante de secuencia presente en ARNm expresado de una muestra biológica. Se perfila una estrategia básica en la Figura 2. Esta implica aislar tanto ADN genómico como ARN total o poliadenilado de una muestra biológica (por ejemplo, sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica, muestra de mucosa colónica, muestra de heces, etc.) derivada de un individuo. La muestra de ADN genómico se genotipa después con ensayos que detectan los alelos de uno o más SNP. Esta etapa determina qué SNP, si los hubiera, pueden utilizarse para análisis de expresión específica de alelos del gen *IGF2* en la muestra de ARN coincidente. Si el individuo es homocigoto para todos los SNP evaluados por un ensayo, el individuo no es informativo para esos SNP y no puede medirse con respecto a LOI de *IGF2*. Si el individuo es heterocigoto (informativo) para uno o más SNP, se amplifica ADNc de la región relevante del transcrito de *IGF2* usando métodos de transcriptasa inversa/PCR convencionales (RT-PCR). La expresión de cada una de las dos copias del gen *IGF2* se mide de forma independiente usando el ADNc generado con un ensayo que es cuantitativo, y que puede diferenciar suficientemente entre los dos alelos. El cálculo de la relación de la cantidad de expresión de un alelo en relación con la cantidad de expresión del otro alelo, y la comparación de esta relación con un valor umbral determina el estado de impronta del gen *IGF2*. Si existen múltiples SNP heterocigotos para una muestra dada, pueden usarse simultáneamente ensayos que diferencian cada uno de los SNP. Esto permite mediciones redundantes de la expresión específica de alelos dentro de una muestra, y la comparación de estas mediciones puede usarse para determinar la precisión de la determinación de la LOI. Aunque puede usarse un intervalo de valores umbrales, típicamente, se determina clásicamente que una muestra presenta LOI de *IGF2* si la proporción cuantificada del alelo menos abundante es mayor de o igual a 33,3 % de la proporción cuantificada del alelo más abundante.

Un método para genotipar a un individuo con respecto a un SNP dado se consigue diseñando un cebador oligonucleotídico que es complementario de la secuencia del gen *IGF2* y que tiene un nucleótido 3' terminal que es complementario del nucleótido del molde de *IGF2* una base 3' del nucleótido polimórfico del molde (véase Figura 7 por ejemplo). Pueden diseñarse ensayos para genotipar uno cualquiera o más de los SNP enumerados en las Tablas 1A, 1B, 1C, 2A y 2B. El cebador oligonucleotídico se combina con y se hibrida con el producto de ADN amplificado por PCR de la muestra de ADN genómico en una mezcla que incluye todos los ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP (o ddUTP)), cada uno marcado con un resto fluorescente diferente. Por ejemplo, si va a genotiparse un polimorfismo G/A (y el nucleótido G/A está en la cadena molde de la muestra de ADN genómico), el cebador oligonucleotídico se diseña para hibridar con el molde complementario con su nucleótido 3' terminal hibridado con el nucleótido de molde complementario una base 3' de la posición de G/A del molde. La extensión de cebador de un único nucleótido se cataliza por una ADN polimerasa en presencia de los ddNTP marcados con fluorescencia diferencialmente de modo que los oligonucleótidos que se extienden por incorporación de ddCTP (que representan el alelo G) o por incorporación de ddTTP (que representan el alelo A) se marcan con fluorescencia diferencialmente en sus extremos 3' terminales. Los oligonucleótidos extendidos se resuelven después por electroforesis capilar y se analizan en presencia de un quinto patrón de tamaño marcado con colorante fluorescente. Se detectan los picos que representan productos de extensión de cebadores de un único nucleótido específicos y se cuantifican para

determinar el genotipo para la muestra de ADN dada. Pueden genotiparse múltiples SNP en una reacción aumentando el número de cadenas con oligonucleótidos de diferentes longitudes diseñados para terminar justo 3' de diferentes sitios polimórficos. Se obtienen diferentes genotipos basándose en i) la resolución de oligonucleótidos extendidos de diferente longitud y ii) el ddNTP marcado con fluorescencia específico incorporado durante una extensión de un único nucleótido.

Un método para determinar el estado de impronta de *IGF2* implica un enfoque de extensión de cebadores de un único nucleótido análogo que se diseña para diferenciar alelos diferentes de un SNP particular. Los ensayos pueden diseñarse para utilizar uno cualquiera o más de los SNP enumerados en las Tablas 1 y 2. Si se determina que un SNP dado es heterocigoto en una muestra de ADN genómico, se amplifica el ADNc de primera cadena de la muestra de ARN coincidente por una transcriptasa inversa (RT) usando cebadores hexaméricos o decaméricos aleatorios, cebadores oligodT complementarios de colas poliA o un cebador complementario de una región específica del transcrito de *IGF2*. Los cebadores oligonucleotídicos complementarios de secuencias que flanquean el sitio de SNP se usan posteriormente para amplificar por PCR un producto de ADNc que incluye el sitio polimórfico. Como alternativa, pueden usarse enfoques de PCR anidada para generar productos de ADNc. Como alternativa, pueden usarse enfoques que incluyen la generación de un ARN a partir de ADNc por transcripción *in vitro* lineal, seguido de una segunda reacción de transcripción inversa que usa cebadores hexaméricos o decaméricos aleatorios o cebador específico de transcrito de *IGF2* y puede usarse amplificación por PCR posterior para generar productos de ADNc. Estos productos de RT-PCR se ensayan después con respecto a las variantes de secuencia específicas del sitio polimórfico usando el mismo o los mismos ensayos de extensión de cebadores de un único nucleótido descritos anteriormente. Se detectan y cuantifican los picos que representan productos de extensión de cebadores de un único nucleótido específicos. Se determina la relación de la cantidad cuantificada de un alelo y el otro alelo. La LOI se detecta si la proporción cuantificada del producto de PCR que representa el alelo menos abundante es mayor de o igual a 33,3 % de la proporción cuantificada del producto de PCR que representa el alelo más abundante. Como se ha descrito anteriormente, pueden usarse múltiples SNP heterocigotos para medir la LOI en una reacción común aumentando el número de cadenas con oligonucleótidos de diferentes longitudes diseñados para terminar justo 3' de diferentes sitios polimórficos o con oligonucleótidos que incorporan diferentes ddNTP marcados en el cebador extendido.

30 **Ejemplo 3. El análisis de enlace indica desequilibrio de enlace mínimo entre numerosos SNP.**

La presente solicitud describe el descubrimiento de numerosos SNP nuevos en el exón 9 del *IGF2*. Estos datos permitieron análisis de haplotipo de alta resolución de 589 individuos (véase ejemplo 1 para una descripción del panel de descubrimiento). Los datos de genotipo se analizaron por Haploview (Instituto Broad del MIT y Universidad de Harvard) para determinar la presencia, o ausencia, de bloques de haplotipo entre las regiones analizadas.

La Figura 4 muestra análisis de haplotipo de SNP distribuidos por toda la región del exón 9 del *IGF2* en el panel de individuos completo. Los SNP incluidos en el análisis presentaron al menos 1 % de frecuencia de heterocigosidad dentro de los individuos genotipados.

Entre todos los individuos (Figura 4), se realizaron ocho SNP distribuidos por todo el exón 9 (SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 64, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 32, SEC ID N°: 102). Se incluye en el subconjunto de ocho SNP SEC ID 10, que, de todos los SNP nuevos incluidos en este estudio, tuvo la mayor frecuencia de heterocigosidad dentro de una cohorte dada (frecuencia de heterocigosidad del 17,33 % en la cohorte afroamericana). Este estudio demostró desequilibrio de enlace mínimo entre los SNP dentro del bloque de haplotipo previamente indicado (es decir, dentro del "Bloque de Gaunt 2" como se indica en la Figura 4). Por ejemplo, se detectaron fuertes pruebas de recombinación histórica entre los SNP de alta frecuencia SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 16 (indicado por el rombo blanco en el resultado de Haploview). También se observó desequilibrio de enlace mínimo entre los SNP dentro del bloque de haplotipo previamente indicado y SNP dentro de las regiones cadena arriba y cadena abajo del exón 9 (regiones no caracterizadas bloque 1 y bloque 3). Un ejemplo de esto es el SNP de alta frecuencia en el bloque 2, SEC ID 10, que presentó mínimo desequilibrio de enlace con SEC ID 102 en el bloque 3. Los ejemplos adicionales de estos pares de SNP incluyen SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 64; SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 16; SEC ID N°: 64 y SEC ID N°: 32; y SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 102. Sorprendentemente, y a diferencia del hallazgo de Gaunt y del análisis de enlace de HAPMAP de esta región, los inventores no encontraron pruebas de fuerte desequilibrio de enlace. Estos hallazgos indican una frecuencia inesperada de recombinación dentro de esta región relativamente pequeña de secuencia genómica. Estos hallazgos apoyan la conclusión de que para este locus, el uso de ensayos que detectan más de un marcador polimórfico que se colocaliza en lo que se creía que era el mismo "bloque de enlace" de la técnica anterior, aumentará la capacidad informativa de un ensayo para determinar el estado de impronta de una muestra. Los paneles de marcadores para cuantificar pueden basarse en combinaciones de SNP entre los SNP previamente descritos y los nuevos SNP descritos en la presente solicitud, y estos hallazgos demuestran, a diferencia lo que se conocía antes del estudio de los inventores, que dichas combinaciones de marcadores pueden mejorar la capacidad para controlar la LOI de *IGF2* aumentando drásticamente el porcentaje de poblaciones que pueden ensayarse.

65 **Ejemplo 4. Demostración de uso de los SNP para determinar el estado de LOI de *IGF2*.**

El SNP correspondiente a SEC ID N°: 64 (rs680) queda dentro de las secuencias de reconocimiento diana de dos enzimas de restricción, *Apa I* y *Ava II*. Estas dos enzimas se escinden de una manera específica de alelo. *Apa I* reconoce y escinde la secuencia cuando está presente el alelo "G", y *Ava II* reconoce y escinde la secuencia cuando está presente el alelo "A". Para evaluar independientemente genotipos dentro de un panel seleccionado de individuos, se amplificó un amplicón de PCR que incluía la posición de SEC ID N°: 64 a partir de una muestra de ADN genómico derivada de cada individuo. Los amplicones se digirieron con *Apa I* o *Ava II* o una combinación de ambas enzimas. La digestión por *Apa I* solamente indica que el individuo es homocigoto para el alelo G, la digestión por *Ava II* solamente indica que el individuo es homocigoto para el alelo A, y la digestión por ambas enzimas indica que el individuo es heterocigoto para el SNP. Se muestra un ejemplo del resultado de datos para cada posible genotipo de SEC ID N°: 64 en la Figura 5. Como se ha descrito anteriormente, la elección de genotipo determinada por el ensayo basado en digestión coincidió exactamente con la elección de genotipo basada en la secuenciación de ADN en 70 de 70 individuos (100 %).

Puede utilizarse la misma estrategia de ensayo básica para detectar la LOI de *IGF2*, siempre que el individuo que se ensaye sea heterocigoto para SEC ID N°: 64. Se muestra un ejemplo en la Figura 6. Se extrajo ARN total de tres individuos heterocigotos para SEC ID N°: 64. Se mostró previamente que dos individuos tenían LOI para *IGF2* y se mostró previamente que el tercero presentaba impronta normal de *IGF2*. La región que incluía SEC ID N°: 64 se amplificó por RT-PCR a partir de cada muestra. Se realizaron en paralelo reacciones sin transcriptasa inversa para confirmar que no había amplificación de ADN genómico. Después se digirieron los amplicones de RT-PCR con *Apa I* o *Ava II* o una combinación de ambas enzimas, como se ha descrito anteriormente. Se resolvieron productos digeridos en un Bionalizador Agilent, y se determinaron las concentraciones de fragmentos cortados y no cortados. La cantidad de fragmentos cortados por *Apa I* representa la proporción de ADNc amplificada a partir del alelo "G". La cantidad de fragmentos cortados por *Ava II* representa la proporción de ADNc amplificada a partir del alelo "A". Por lo tanto, la relación de fragmentos cortados con *Apa I* y fragmentos cortados con *Ava II* indica la relación relativa de expresión de los alelos en la muestra de ADN original. Como se muestra en la Figura 6, la Muestra 2 expresa exclusivamente el alelo "A". Las Muestras 1 y 3 expresan ambos alelos (es decir, presentan LOI de *IGF2*), con relaciones de G:A de 0,5 y 0,3, respectivamente. Como se ha descrito anteriormente, estudios previos han usado un umbral de 33,3 % de expresión del alelo menos abundante en relación con el alelo más abundante como la definición para LOI de *IGF2*.

Otros SNP que pueden ser útiles para detectar LOI de *IGF2* no quedan dentro de las secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción. Por lo tanto, la capacidad para controlar la LOI en un individuo dado se mejora desarrollando ensayos de expresión de genes específicos de alelos que no requieren digestión con enzimas de restricción. Como demostración, los inventores desarrollaron un ensayo basado en extensión de cebadores para SEC ID N°: 64. La Figura 7 representa en diagrama el uso de un ensayo de extensión de cebadores para genotipar SEC ID N°: 64. La región que incluye el SNP de interés se amplifica por PCR usando ADN genómico obtenido del individuo para genotipar. Se añade un cebador al producto de PCR purificado que hibrida con su nucleótido 3' terminal complementario del nucleótido del molde 1 base al lado 3' del nucleótido polimórfico para genotipar. Se lleva a cabo extensión de cebadores de un único nucleótido usando una ADN polimerasa termoestable y ddNTP marcados con fluorescencia diferencialmente. En el ejemplo representado en diagrama en la Figura 7, se añaden ddGTP marcado con dR110 o ddATP marcado con dR6G al extremo 3' del cebador. Estos polinucleótidos marcados se resuelven después y se calculan las áreas pico representativas de cada posible nucleótido incorporado (es decir, usando un Analizador Génico ABI 3730 con software Gene Mapper). Las áreas pico se comparan para determinar el genotipo del individuo en esa posición de SNP.

Los tres individuos que se ensayaron con respecto a LOI de *IGF2* por el ensayo basado en enzimas de restricción (Figura 6) se genotiparon con respecto a SEC ID N°: 64 usando el ensayo de extensión de cebadores (Figura 8). Como se esperaba, se detectaron picos que representaban ambos alelos del SNP, confirmando que los tres individuos son heterocigotos para SEC ID N°: 64.

Para medir la expresión específica de alelos de *IGF2* en los mismos tres individuos, la región que incluía SEC ID N°: 64 se amplificó por RT-PCR a partir de una muestra de ARN total derivada de cada individuo. Se realizaron reacciones sin transcriptasa inversa para confirmar que no había amplificación de ADN genómico. Los productos de ADNc obtenidos se purificaron y analizaron como se representa en diagrama en la Figura 7. Se calcularon las áreas pico que representan cada uno de los dos posibles alelos. Para corregir con respecto a diferencias en intensidades de colorante, estos valores se normalizaron basándose en comparaciones de áreas pico calculadas usando relaciones 1:1 predeterminadas de cada alelo (es decir relación 1:1 de amplicones de ADN derivados de individuos que son homocigotos para cada uno de los dos alelos). Los cromatogramas resultantes y las relaciones de alelos calculadas se muestran en la Figura 9. De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 6, se determinó que las Muestras 1 y 3 mostraban LOI de *IGF2*, y se determinó que la Muestra 2 mostraba impronta normal de *IGF2*. Podría usarse el mismo tipo de ensayo de extensión de cebadores de un único nucleótido que utiliza cualquier SNP dentro de la región transcrita de *IGF2* para controlar la expresión específica de alelo de *IGF2*.

Para demostrar el uso de SNP adicionales para medir la expresión específica de alelo de *IGF2*, se diseñaron ensayos de extensión de cebadores de un único nucleótido basándose en ocho SNP adicionales (SEC ID N°: 1, 10, 21, 56, 83, 85, 102 y 111). Los SNP correspondientes a SEC ID N°: 1, 10 y 21 son nuevos SNP. Para cada uno de

los nueve SNP (incluyendo SEC ID N°: 64), los productos de PCR se amplificaron por separado a partir de muestras de ADN genómico derivadas de dos individuos; uno homocigoto para un alelo del SNP y el otro homocigoto para el otro alelo del SNP. Los productos de PCR se purificaron y cuantificaron. Para cada uno de los nueve SNP, se combinaron dos productos de PCR (uno amplificado de la muestra de ADN homocigota para un alelo y el otro amplificado de la muestra de ADN homocigota para el otro alelo) en las siguientes relaciones de alelo 1 y alelo 2; 1:10, 1:8, 1:6, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2: 1, 3:1, 4:1, 6:1, 8:1 y 10:1. Para cada uno de los nueve SNP, se realizó el ensayo de extensión de cebadores de un único nucleótido por triplicado en cada punto de dilución. Se calcularon las áreas pico que representan cada uno de los dos posibles alelos. Para corregir con respecto a diferencias en las intensidades de colorante, estos valores se normalizaron basándose en comparaciones de áreas pico calculadas usando relaciones 1:1 predeterminadas de cada alelo. Se muestra la linealidad cuantitativa analítica de cada ensayo en la Figura 10. La R² media de los ensayos es 0,996 ± 0,002 y la pendiente media es 0,830 ± 0,024.

Tabla 1A. Polimorfismos conocidos en los exones 8 y 9 de <i>IGF2</i>					
Sec. ID	Posición Genómica*	dbSNP	Alelos	Bloque	Secuencia
48	2111395	rs1803647	[C/G]	1	TGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGC [C/G]CTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCC
49	2110976	rs14367	[G/A]	1	AGTTCTTCCAATATGACACCTGGAA[G/A] CAGTCCACCCAGCGCCTGCGCAGGG
50	2110955	rs1065443	[C/T]	1	GGAAGCAGTCCACCCAGCGCCTGCG [C/T]AGGGGCCTGCCTGCCCTCCTGCGTG
51	2110819	rs11545014	[C/T]	1	AAGACCCCGCCCACGGGGGCGCCCC [C/T]CAGAGATGGCCAGCAATCGGAAGTG
52	2110818	rs1050342	[A/C]	1	AGACCCCGCCCACGGGGGCGCCCC [A/C]AGAGATGGCCAGCAATCGGAAGTGA
53	2110796	rs12993	[G/T]	1	CCCCCAGAGATGGCCAGCAATCGGAA [G/T]TGAGCAAACTGCCGCRAGTCTGCA
54	2110779	rs9282726	[A/G]	1	CAATCGGAAKTGAGCAAACTGCCGC [A/G]AGTCTGCAGCCYGGYGCCACCATCC
55	2110767	rs3741214	[C/T]	1	AGCAAACTGCCGCAAGTCTGCAGCC [C/T]GGCGCCACCATCCTGCAGCCTCCTC
56	2110764	rs2230949	[C/T]	1	AAACTGCCGCAAGTCTGCAGCCCGG[C/T] GCCACCATCCTGCAGCCTCCTCCTG
57	2110733	rs3213234	[G/T]	1	CATCCTGCAGCCTCCTCCTGACCAC[G/T] GACGTTTCCATCAGGTTCCATCCCG
58	2110683	rs34337549	[-/G]	1	CGGGGACTGGGTGAGGAGAAGCCCCA [-/G]GGGGACGTGGAACCGAGAGATTTTC
59	2110613	rs6233	[A/C]	1	CAGGCTACTCTCCTCGGCCCTCCTCC[A/C] TCGGGCTGAGGAAGCACAGCAGCAT
60	2110586	rs11510	[A/T]	1	TCGGGCTGAGGAAGCACAGCAGCAT [A/T]TCAAACATGTACAAAATCGATTGGC
61	2110554	rs 1803648	[A/C]	1	ATGTACAAAATCGATTGGCTTTAAA[A/C] ACCCTTACATACCCTCCCCCAA
62	2110470	rs11564731	[-/AC]	1	AAAACATTAATAAACCCTTCCCC [-/AC]CCCCCCCACAACAACCCTCTAAAA
63	2110279	rs15737	[C/T]	1	TGGCACTCCCCACCCCTCTTTCT[C/T] TTCTCCCTTGGACTTTGAGTCAAAT
64	2110210	rs680	[G/A/C/T]	2	CTGAACCAGCAAAGAGAAAAGAAGG [G/A/C/T] CCCCAGAAATCACAGGTGGGCACGT
65	2110180	rs1065685	[C/G]	2	CAGAAATCACAGGTGGGCACGTGCT [C/G]CTACCGCCATCTCCCTTCTCACGGG
66	2109887	rs56731553	[C/T]	2	GTGCTCGTGTGTGCTGTGTTTCATG [C/T]GTGTGCTGTGTGTTGTGTGTGTA
67	2109881	rs56154171	[C/T]	2	TGTGCTGTGCTCGTGTGTGCTGTG [C/T]TCATGCGTGTGCTGTGTGTTGTGTG
68	2109862	rs59198946	[-/AT]	2	GTGCTGTGCGTTTGTGTGTGCTGTG [-/AT]GCTCGTGTGTGCTGTGTTCA TGC
69	2109849	rs61872709	[C/T]	2	TCTGTGTGCTGTGTGCTGTGCGTT [C/T]GTGTGTGTGCTGTGCTCGTGTGTG
70	2109847	rs61872708	[C/T]	2	CATCTGTGTGCTGTGTGCTGTGCG [C/T]TTGTGTGTGCTGTGCTCGTGTGTG
71	2109730	rs61872707	[A/G]	2	TGCGTTTGTGTGTGCTGTGTGTGC [A/G]TGTGTGTGCGTGTGTGTGCCGTGCC

Sec. ID	Posición Genómica*	dbSNP	Alelos	Bloque	Secuencia
96	2107847	rs11541372	[A/C]	3	CCCCTCAGCACCCCTGCCTTGTCTCC[A/C] GGAGGTCCGAAGCTCTGTGGGACCT
97	2107755	rs11541374	[G/T]	3	CAGGCGGGTCTGAGCCACAGAGCAG [G/T]AGAGCTGCCAGGTCTGCCCATCGAC
98	210602	rs3189464	[A/C]	3	CCTCGCCCCACTTGTGCCCCAGCT [A/C] AGCCCCCTGCACGCAGCCCGACTA
99	2107472	rs61745040	[C/T]	3	CAGTCGCAGAGGGTCCCTCGGCAAG [C/T]GCCCTGTGAGTGGGCCATTCCGGAAC
100	2107471	rs11564732	[G/A/T]	3	AGTCGCAGAGGGTCCCTCGGCAAGC [G/A/T] CCCTGTGAGTGGGCCATTCCGGAACA

* Coordenadas relativas a la Construcción de NCBI 36, Cr: 11

Tabla 1C. Polimorfismos conocidos en el exón 9 de IGF2

Sec. ID	Posición Genómica*	dbSNP	Alelos	Bloque	Secuencia
101	2107452	rs11541376	[C/T]	3	GCAAGCGCCCTGTGAGTGGGCCATT [C/T] GGAACATTGGACAGAAGCCCAAAGA
102	2107273	rs7873	[A/G]	3	GTGTTCCCGGGGGCACTTGCCGACC [A/G] GCCCTTGCCTCCAGGTTTGCAG
103	2107263	rs61745039	[G/A/T]	3	GGCACTTGCCGACCAGCCCTTGC [G/A/T] TCCCCAGGTTTGCAGCTCTCCCTG
104	2107147	rs3177805	[C/T]	3	TTGTCTCCTCCCGTGTCCCAATGT [C/T] TTCAGTGGGGGGCCCCCTCTGGGT
105	2107135	rs1065715	[C/G]	3	CGTGCCCCAATGTCTTCAGTGGGGG [C/G] CCCCCTCTGGGTCCCCTCCTCTGC
106	2107134	rs11541371	[C/G]	3	TGTCCCAATGTCTTCAGTGGGGG [C/G] CCCCTCTGGGTCCCCTCCTCTGCC
107	2107128	rs1049926	[C/T]	3	CCAATGTCTTCAGTGGGGGGCCCCCT [C/T]TTGGGTCCCCTCCTCTGCCATCACC
108	2107113	rs3177946	[C/T]	3	GGGGCCCCCTCTGGGTCCCCTCCT [C/T]GCCATCACCTGAAGCCCTCACGC
109	2107049	rs1050035	[A/C]	3	GTCACCTGTGCCTGCCGCTCGGTCC [A/C] CCTTGCGGCCCGTGTGTTGACTCAAC
110	2107027	rs11541370	[A/G]	3	AATATTAGCGTTAAAGGAGCTGAGTT [A/G] AGTCAAACACGGGCCGCAAGGTGGA
111	2107020	rs2585	[G/A/C/T]	3	TGCGCCCCGTGTTGACTCAACTCA [G/A/C/T] CTCCTTTAACGTAATATTTCCGGC
112	2106955	rs1050141	[C/A]	3	GGGTTTTGTCTTTAACCTTGTAAACG[C/A] TTGCAATCCCAATAAAGCATTAAAA

* Coordenadas relativas a la Construcción de NCBI 36, Cr: 11

Tabla 2A. Polimorfismos nuevos en el exón 9 de IGF2

Sec. ID	Posición Genómica*	Alelos	Bloque	Secuencia
1	2110869	[G/A]	1	GCGTTCAGGGAGGCCAAACGTCACC[G/A] CCCCTGATTGCTCTACCCACCCAA
2	2110827	[G/A]	1	CCCACCCAAGACCCCGCCACGGGG[G/A] CGCCCCCAGAGATGGCCAGCAAT
3	2110825	[G/A]	1	CACCCAAGACCCCGCCACGGGGG[G/A] CCCCCAGAGATGGCCAGCAATCG

Sec. ID	Posición Genómica*	Alelos	Bloque	Secuencia
4	2110781	[G/A]	1	GCAATCGGAAGTGAGCAAACTGCC[G/A] CAAGTCTGCAGCCCGGCGCCACCAT
5	2110657	[G/A]	1	TGGGGCTTCTCCTGACCCAGTCCCC[G/A] TGCCCCGCTCCCCGAAACAGGCTA
6	2110465	[C/T]	1	TTAAACTAACCCCTTCCCCCCCC[C/T] CACAAACACCCTCTTAAACTAATT
7	2110430	[G/A/T]	1	CCTCTTAAACTAATTGGCTTTTTA[G/A/T] AAACACCCACAAAAGCTCAGAAAT
8	2110287	[C/G]	1	AAGGAATTTGGCACTCCCCACCCCC[C/G] TCTTCTCTTCTCCCTTGGACTTTG
9	2110197	[C/T]	2	GAGAAAAGAAGACCCAGAAATCA[C/T] AGGTGGGCACGTGCTGCTACCGCC
10	2110187	[C/T]	2	GGACCCAGAAATCACAGGTGGGCA[C/T] GTCGCTGCTACCGCCATCTCCCTC
11	2110129	[G/A]	2	AATTTTCAGGGTAAACTGGCCATCC[G/A] AAAATAGCAACAACCCAGACTGGCT
12	2110109	[C/T]	2	CATCCGAAAATAGCAACAACCCAGA[C/T] TGGCTCCTCACTCCCTTTTCCATCA
13	2110063	[A/C]	2	CATCACTAAAAATCACAGAGCAGTC[A/C] GAGGGACCCAGTAAGACCAAAGGAG
14	2110060	[G/C]	2	CACTAAAAATCACAGAGCAGTCAGA[G/C] GGACCCAGTAAGACCAAAGGAGGGG
15	2110058	[G/T/A]	2	CTAAAAATCACAGAGCAGTCAGAGG[G/T/A] ACCCAGTAAGACCAAAGGAGGGGAG
16	2109220	[A/C]	2	GCGCACACACGCACACCCCCACA[A/C] AATTGGATGAAAACAATAAGCATAT
17	2109153	[G/A]	2	TCTGTATGGATCAGGCCAAAGTCCC[G/A] CTAAGATTCTCCAATGTTTTTTCATGG
18	2109095	[C/T]	3	CCCGCTCCTGTTCCCATCTCCACTG[C/T] CCCTCGGCCCTGTCTGTGCCCTGCC
19	2109074	[C/G]	3	ACTGCCCTCGGCCCTGTCTGTGCC[C/G] TGCCTCTCAGAGGAGGGGGTACAGA
20	2108843	[T/C]	3	CATTCCCAGATACACCTTACTTACTG[T/C] GTGTTGGCCAGCCAGAGTGAGGAA
21	2108835	[C/T]	3	ATACACCTTACTTACTGTGTGTTGG[C/T] CCAGCCAGAGTGAGGAAGGAGTTTG
22	2108806	[A/C/T]	3	GCCAGAGTGAGGAAGGAGTTTGGCC[A/C/T] CATTGGAGATGGCGGTAGCTGAGCA
23	2108738	[G/A/T]	3	AGCCTGACTCCCTGGTGTGCTCCTG[G/A/T] AAGGAAGATCTTGGGGACCCCCCA
24	2108440	[C/T/G]	3	CAAATTTTCATGTCAATTGATCTATT[C/T/G] CCCCTCTTTGTTTCTTGGGGCATT
25	2108424	[T/G]	3	TGATCTATCCCCCTCTTTGTTTCT[T/G] GGGGCATTCTTTCCCTTTTTTTTTTT
26	2108417	[T/G]	3	TTCCCCCTCTTTGTTTCTTGGGGCA[T/G] TTTTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGT
27	2108326	[G/A]	3	AATTAACCCCCCCCCCATGTAACA[G/A] GGGGGCAGTGACAAAAGCAAGAACG
28	2107988	[C/T/A]	3	GGCTCCTGGCTGGCCTGAGGCTGGC[C/T/A] GGAGGGGAAGGGGCTAGCAGGTGTG
29	2107918	[G/C/A]	3	GGCTGGGGCAGGGTGGCCGCTTCC[G/C/A] CACACTTGAGGAACCCTCCCCTCTC

* Coordenadas relativas a la Construcción de NCBI 36, Cr: 11

Tabla 2B. Polimorfismos nuevos en el exón 9 de *IGF2*

Sec. ID	Posición Genómica*	Alelos	Bloque	Secuencia
30	2107819	[T/G]	3	AGGTCCGAAGCTCTGTGGGACCTCT[T/G] GGGGGCAAGGTGGGGTGAAGCCGGG
31	2107776	[G/A]	3	AGGCCGGGGAGTAGGGAGGTCAGGC[G/A] GGTCTGAGCCACAGAGCAGGAGAG

Sec. ID	Posición Genómica*	Alelos	Bloque	Secuencia
32	2107668	[G/A]	3	ATGCCATAGCAGCCACCACCGCGGC[G/A] CCTAGGGCTGCGGCAGGGACTCGGC
33	2107664	[A/T]	3	CATAGCAGCCACCACCGCGGCCT[A/T] GGGCTGCGGCAGGGACTCGGCCTCT
34	2107625	[C/T]	3	GACTCGGCCTCTGGGAGGTTTACCT[C/T] GCCCCACTTGTGCCCCAGCTCAG
35	2107595	[C/G]	3	CCACTTGTGCCCCAGCTCAGCCCC[C/G] CTGCACGCAGCCCGACTAGCAGTCT
36	2107523	[C/T]	3	CCTGGTGACGGGGCTGGCATGACCC[C/T] GGGGGTGTCATGCCAGTCCGCCT
37	2107478	[G/A]	3	CCGCCTCAGTCGCAGAGGGTCCCTC[G/A] GCAAGCGCCCTGTGAGTGGGCCATT
38	2107472	[C/T]	3	CAGTCGCAGAGGGTCCCTCGGCAAG[C/T] GCCCTGTGAGTGGCCATTCGGAAC
39	2107469	[C/T]	3	TCGCAGAGGGTCCCTCGGCAAGCC[C/T] CTGTGAGTGGGCCATTTCGGAACATT
40	2107379	[C/T]	3	ACCCACATTGGCCTGAGATCCAAAA[C/T] GCTTCGAGGCACCCCAAATTACCTG
41	2107353	[C/G]	3	GCTTCGAGGCACCCCAAATTACCTG[C/G] CCATTTCGTCAGGACACCCACCCACC
42	2107278	[C/T]	3	AGTGGGTGTTCCCGGGGGCACTTGC[C/T] GACCAGCCCCTTGGTCCCCAGGTT
43	2107263	[G/A]	3	GGCACTTGCCGACCAGCCCCTTGC[G/A] TCCCCAGTTTGCAGCTCTCCCTG
44	2107151	[A/G]	3	ATCTTGTCTCCTCCCCGTGTCCCA[A/G] TGTCTTCAGTGGGGGGCCCCCTCTT
45	2107054	[G/A]	3	GAATGTCACCTGTGCCTGCCGCCTC[G/A] GTCCACCTTGCGGCCCGTGTGAC
46	2107037	[G/A]	3	GCCGCCTCGGTCCACCTTGC GGCC[C/G/A] TGTTTGACTCAACTCAACTCCTTTA
47	2106956	[G/A/C]	3	TGGTTTTGTCTTTAACCTTGTAA[C/G/A/C] CTTGCAATCCCAATAAAGCATTAAA

* Coordenadas relativas a la Construcción de NCBI 36, Cr. 11

Tabla 3. Heterocigosidad observada de SNP de *IGF2* transcritos en poblaciones humanas

SEC ID Nº:	Posición Genómica	Bloque	Todos HETObs	AA HETObs	CAU HETObs	CHI HETObs	JAP HETObs	MEX HETObs
1	2110869	1	1,08 % (6 de 553)	3,3 % (3 de 91)	1 % (2 de 201)	0 % (0 de 84)	0 % (0 de 90)	1,15 % (1 de 87)
4	2110781	1	0,95 % (4 de 421)	2,9 % (2 de 69)	0 % (0 de 155)	0 % (0 de 61)	2,86 % (2 de 70)	0 % (0 de 66)
56	2110764	1	1,45 % (1 de 69)	6,25 % (1 de 16)	0 % (0 de 35)	0 % (0 de 8)	0 % (0 de 2)	0 % (0 de 2)
6	2110465	1	3,38 % (7 de 207)	11,48 % (7 de 61)	0 % (0 de 51)	0 % (0 de 21)	0 % (0 de 29)	0 % (0 de 45)
7	2110430	1	1,23 % (1 de 81)	16,67 % (1 de 6)	0 % (0 de 54)	0 % (0 de 8)	0 % (0 de 7)	0 % (0 de 6)
64	2110210	2	54,46 % (110 de 202)	13,89 % (5 de 36)	63,08 % (41 de 65)	70,83 % (17 de 24)	64,1 % (25 de 39)	57,89 % (22 de 38)
10	2110187	2	2,82 % (15 de 531)	17,33 % (13 de 75)	1 % (2 de 201)	0 % (0 de 80)	0 % (0 de 89)	0 % (0 de 86)
16	2109220	2	1,57 % (9 de 572)	9,88 % (8 de 81)	0 % (0 de 214)	0 % (0 de 90)	0 % (0 de 91)	1,04 % (1 de 96)
83	2109215	2	3,28 % (19 de 579)	0 % (0 de 94)	8,13 % (17 de 209)	0 % (0 de 90)	0 % (0 de 91)	2,11 % (2 de 95)
85	2109117	2	38,59 % (137 de 355)	27,27 % (18 de 66)	40,16 % (49 de 122)	40,74 % (22 de 54)	53,85 % (35 of 65)	27,08 % (13 of 48)
20	2108843	3	0,35 % (2 de 566)	2,3 % (2 de 87)	0 % (0 de 202)	0 % (0 de 90)	0 % (0 de 91)	0 % (0 de 96)

SEC ID N°:	Posición Genómica	Bloque	Todos HETObs	AA HETObs	CAU HETObs	CHI HETObs	JAP HETObs	MEX HETObs
21	2108835	3	4,07 % (20 de 492)	1,43 % (1 de 70)	9,94 % (18 de 181)	0 % (0 de 79)	0 % (0 de 81)	1,23 % (1 de 81)
87	2108682	3	1,89 % (5 de 265)	14,29 % (4 de 28)	1,01 % (1 de 99)	0 % (0 de 41)	0 % (0 de 52)	0 % (0 de 45)
88	2108628	3	7,57 % (14 de 185)	3,13 % (1 de 32)	4,88 % (2 de 41)	12,2 % (5 de 41)	20 % (5 de 25)	2,17 % (1 de 46)
25	2108424	3	0,35 % (1 de 288)	2,17 % (1 de 46)	0 % (0 de 89)	0 % (0 de 67)	0 % (0 de 57)	0 % (0 de 29)
26	2108417	3	3,38 % (9 de 266)	7,32 % (3 de 41)	6,74 % (6 de 89)	0 % (0 de 44)	0 % (0 de 56)	0 % (0 de 36)
92	2107971	3	2,8 % (15 de 536)	16,3 % (15 de 92)	0 % (0 de 185)	0 % (0 de 79)	0 % (0 de 87)	0 % (0 de 93)
32	2107668	3	2,35 % (12 de 511)	0 % (0 de 94)	0,7 % (1 de 142)	10,23 % (9 de 88)	2,2 % (2 de 91)	0 % (0 de 96)
100	2107471	3	4,66 % (26 de 558)	1,05 % (1 de 95)	1,97 % (4 de 203)	1,16 % (1 de 86)	5,75 % (5 de 87)	17,24 % (15 de 87)
102	2107273	3	6,41 % (32 de 499)	14,81 % (8 de 54)	9,34 % (17 de 182)	0 % (0 de 86)	0 % (0 de 85)	7,61 % (7 de 92)
111	2107020	3	50,19 % (135 de 269)	23,08 % (3 de 13)	49,58 % (59 de 119)	50 % (24 de 48)	53,85 % (21 de 39)	56 % (28 de 50)
47	2106956	3	0,33 % (1 de 304)	0 % (0 de 70)	0 % (0 de 115)	0 % (0 de 43)	0 % (0 de 42)	2,94 % (1 de 34)

* Coordenadas relativas a la Construcción de NCBI 36, Cr: 11

Tabla 4: SNP informativos en chinos			
SEC ID N°:	Posición Genómica	Bloque	Het Obs
64	2110210	2	70,83 % (17 de 24)
85	2109117	2	40,74 % (22 de 54)
88	2108628	3	12,2 % (5 de 41)
32	2107668	3	10,23 % (9 de 88)
111	2107020	3	50 % (24 de 48)

Tabla 5: SNP informativos en japoneses			
SEC ID N°:	Posición Genómica	Bloque	Het Obs
4	2110781	1	2,86 % (2 de 70)
64	2110210	2	64,1 % (25 de 39)
85	2109117	2	53,85 % (35 de 65)
88	2108628	3	20 % (5 de 25)
32	2107668	3	2,2 % (2 de 91)
100	2107471	3	5,75 % (5 de 87)
111	2107020	3	53,85 % (21 de 39)

Tabla 6: SNP inf. en afroamericanos			
SEC ID N°:	Posición Genómica	Bloque	Het Obs
1	2110869	1	3,3 % (3 de 91)
4	2110781	1	2,9 % (2 de 69)
56	2110764	1	6,25 % (1 de 16)
6	2110465	1	11,48 % (7 de 61)
7	2110430	1	16,67 % (1 de 6)
64	2110210	2	13,89 % (5 de 36)
10	2110187	2	17,33 % (13 de 75)
16	2109220	2	9,88 % (8 de 81)
85	2109117	2	27,27 % (18 de 66)
20	2108843	3	2,3 % (2 de 87)
87	2108682	3	14,29 % (4 de 28)
88	2108628	3	3,13 % (1 de 32)
25	2108424	3	2,17 % (1 de 46)
26	2108417	3	7,32 % (3 de 41)
92	2107971	3	16,3 % (15 de 92)
102	2107273	3	14,81 % (8 de 54)
111	2107020	3	23,08 % (3 de 13)

Tabla 7: SNP informativos en caucásicos

SEC	Genómico	Bloque	Het Obs
64	2110210	2	63,08 % (41 de 65)
83	2109215	2	8,13 % (17 de 209)
85	2109117	2	40,16 % (49 de 122)
21	2108835	3	9,94 % (18 de 181)
88	2108628	3	4,88 % (2 de 41)
26	2108417	3	6,74 % (6 de 89)
100	2107471	3	1,97 % (4 de 203)
102	2107273	3	9,34 % (17 de 182)
111	2107020	3	49,58 % (59 de 119)

Tabla 8: SNP informativos en mejicanos

SEC ID	Genómico	Bloque	Het Obs
64	2110210	2	57,89 % (22 de 38)
83	2109215	2	2,11 % (2 de 95)
85	2109117	2	27,08 % (13 de 48)
88	2108628	3	2,17 % (1 de 46)
100	2107471	3	17,24 % (15 de 87)
102	2107273	3	7,61 % (7 de 92)
111	2107020	3	56 % (28 de 50)
47	2106956	3	2,94 % (1 de 34)

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Ordway, Jared
Lakey, Nathan
Maloney, Rebecc
Rohlfing, Theresa
- 10 Orion Genomics LLC
- <120> Nuevos Polimorfismos de un Único Nucleótido y Combinaciones de Polimorfismos Nuevos y Conocidos para Determinar la Expresión Específica de Alelo del Gen IGF2
- 15 <130> 021031-002520PC
- <140> WO PCT/US08/Aún no asignado
<141> Aún no asignado
- 20 <150> US 60/954.290
<151> 06-08-2007
- <150> US 60/988.715
<151> 16-11-2007
- 25 <160> 116
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 30 <210> 1
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)
- <400> 1
gcggttcaggg aggccaaacg tcaccrtccc ctgattgctc taccaccca a 51
- 40 <210> 2
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 453 108 T3

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

5 <400> 2
cccaccaag accccgcca cgggdcgcc ccccagaga tggccagca t 51

<210> 3
<211> 51
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 3
cacccaagac cccgcccacg ggggcrcccc cccagagatg gccagcaatc g 51

<210> 4
<211> 51
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

25 <400> 4
30 gcaatcggaa gtgagcaaaa ctgccrcaag tctgcagccc ggcgccacca t 51

<210> 5
<211> 51
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

40 <400> 5
tggggctct cctgaccag tcccrtgcc cgcctccc gaaacaggct a 51

<210> 6
<211> 51
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

50 <400> 6
55 ttaaactaac cccctccc ccccchaca acaaccctct taaaactaat t 51

<210> 7
<211> 51
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

65 <400> 7
cctctaaaa ctaattggct tttadaaac accccacaaa agctcagaaa t 51

ES 2 453 108 T3

<210> 8
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

10

<400> 8
aaggaattg gcactcccca ccccstctt tctctctcc ctggacttt g 51

<210> 9
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

20

<400> 9
gagaaaagaa ggaccccaga aatcayaggt gggcacgtcg ctgctaccgc c 51

25

<210> 10
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

35

<400> 10
ggaccccaga aatcacaggt gggcaygtcg ctgctaccgc catctccctt c 51

<210> 11
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

45

<400> 11
aatttcagg gtaaactggc catccraaaa tagcaacaac ccagactggc t 51

<210> 12
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

55

<400> 12
catccgaaaa tagcaacaac ccagaytggc tcctcactcc ctttccatc a 51

60

<210> 13
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65

<220>

ES 2 453 108 T3

<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

5 <400> 13
catcactaaa aatcacagag cagtchgagg gacccagtaa gaccaaagga g 51

<210> 14
<211> 51
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 14
cactaaaaat cacagagcag tcagasggac ccagtaagac caaaggaggg g 51

<210> 15
<211> 51
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

25 <400> 15
ctaaaaatca cagagcagtc agaggdacc agtaagacca aaggagggga g 51

30 <210> 16
<211> 51
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

40 <400> 16
gcgcacacac acgcacaccc ccacamaatt ggatgaaaac aataagcata t 51

<210> 17
<211> 51
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

50 <400> 17
tctgtatgga tcaggccaaa gtcccvctaa gattctcaa tgtttcatg g 51

<210> 18
<211> 51
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

60 <400> 18
cccgtctctg ttccatctc cactgyccct cggccctgtc tgtgccctgc c 51

65

ES 2 453 108 T3

<210> 19
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

10

<400> 19
actgccctc ggcctgtct gtgccstgcc tctcagagga gggggctcag a 51

<210> 20
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

20

<400> 20
cattcccgat acaccttact tactgytgtg tggcccagcc agagtgagga a 51

25

<210> 21
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

35

<400> 21
atacacctta ctactgtgt gttggyccag ccagagtgag gaaggagttt g 51

<210> 22
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

45

<400> 22
gccagagtga ggaaggagtt tggcchcatt ggagatggcg gtgactgagc a 51

<210> 23
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

55

<400> 23
agcctgactc cctggtgtgc tctgdaagg aagatcttgg ggaccccc a 51

60

<210> 24
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65

ES 2 453 108 T3

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

5 <400> 24
caaatttcat gtcaattgat ctattbcccc tctttgttct ttggggcatt t 51

<210> 25
<211> 51
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 25
tgatctattc cccctcttgg ttctkgggg catttttct tttttttt t 51

<210> 26
<211> 51
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

25 <400> 26
30 ttccccctct ttgttcttg gggcadtttt ccttttttt tttttttgt t 51

<210> 27
<211> 51
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

40 <400> 27
aattaaacct ccccccatg taacargggg gcagtgacaa aagcaagaac g 51

<210> 28
<211> 51
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

50 <400> 28
55 ggctcctggc tggcctgagg ctggchggag gggaaggggc tagcaggtgt g 51

<210> 29
<211> 51
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

65 <400> 29
ggctggggca ggggtggccg cttccvcaca cttgaggaac cctcccctct c 51

ES 2 453 108 T3

<210> 30
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

10

<400> 30
aggtcgaag ctctgtgga cctctkggg gcaaggtgg gtgaggccg g 51

<210> 31
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

20

<400> 31
aggccggga gtagggaggt cagcrgtc tgagccaca gagcaggaga g 51

25

<210> 32
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

35

<400> 32
atgcatagc agccaccacc gcggcrccta gggctcggc agggactcg c 51

<210> 33
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

45

<400> 33
catagcagcc accaccgcg cgctwgggc tgcggcaggg actcggcctc t 51

50

<210> 34
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

60

<400> 34
gactggcct ctgggaggt tacctgccc ccaactgtgc cccagctca g 51

<210> 35
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65

ES 2 453 108 T3

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

5 <400> 35
ccactgtgtc cccagctca gccccctgc acgcagcccg actagcagtc t 51

<210> 36
<211> 51
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 36
cctgtgtgacg gggctggcat gacccygggg gtcgtccatg ccagtccgcc t 51

<210> 37
<211> 51
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

25 <220>
<221> base modificada
30 <222> (26)...(26)
<223> n = g, a, c o t

<400> 37
35 cgcctcagt cgcagagggt ccctngcaa ggcctctgtg agtgggcat t 51

<210> 38
<211> 51
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

45 <400> 38
cagtgcgaga gggtcctcg gcaagygcc tgtgagtggt ccattcgaa c 51

<210> 39
<211> 51
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

55 <400> 39
60 tgcagaggg tcctcgca agcgcctgtg gaggggcca ttcggaacat t 51

<210> 40
<211> 51
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 453 108 T3

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

5 <400> 40
accacattg gcctgagatc caaaaygctt cgaggcacc caaattacct g 51

<210> 41
<211> 51
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 41
gcttcgaggc accccaaatt acctgscat tcgtcaggac acccaccac c 51

<210> 42
<211> 51
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

25 <400> 42
30 agtgggtgt cccgggggca ctgcygacc agcccctgc gtcccaggt t 51

<210> 43
<211> 51
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

40 <400> 43
gggcactgc cgaccagccc ctgcdtccc caggttgca gctctccc t 51

<210> 44
<211> 51
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

50 <400> 44
55 atctgtctc ctcccgtgt ccccartgct ttcagtggg ggccccct t 51

<210> 45
<211> 51
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

65

ES 2 453 108 T3

<400> 45
gaatgtcacc tgtgcctgcc gcctcrgtcc accttgoggc ccggtttga c 51

5
<210> 46
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15
<400> 46
gccgcctcgg tccaccttgc ggccrctgtt tgactcaact caactcctt a 51

20
<210> 47
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> nuevo polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

30
<220>
<221> base modificada
<222> (25) ... (25)
<223> n = g, a, c o t

35
<400> 47
tgggtttgt cttaacctt gtaacnctg caatcccaat aaagcattaa a 51

40
<210> 48
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs1803647 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

50
<400> 48
tgctgttcc gcagctgtga cctggcsctc ctggagacgt actgtgctac cc 52

55
<210> 49
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs14367 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

65
<400> 49
agttctcca atatgacacc tggaarcagt ccaccacagc cctgcgcagg g 51

60
<210> 50
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65
<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs1065443 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

<400> 50

ES 2 453 108 T3

ggaagcagtc caccagcgc ctgcyaggg gcctgcctgc cctcctgcgt g 51

5 <210> 51
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11545014 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 51
aagacccgc ccacgggggc gccccycag agatggccag caatcggaag tg 52

20 <210> 52
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs1050342 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

30 <400> 52
agacccgcc cacgggggcg cccccc maga gatggccagc aatcggaagt ga 52

35 <210> 53
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs12993 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

45 <400> 53
ccccagaga tggccagcaa tcggaaktga gcaaaactgc cgcragtctg ca 52

50 <210> 54
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs9282726 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

60 <400> 54
caatcggaak tgagcaaaac tgccgcragt ctgcagccyg gyccacat cc 52

65 <210> 55
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs3741214 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

75 <400> 55
agcaaaactg ccgcaagtct gcagccygc gccacatcc tgagcctcc tc 52

80 <210> 56
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 453 108 T3

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs2230949 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

5 <400> 56
aaactgccgc aagtctgcag cccggygccca ccatcctgca gcctctctct g 51

<210> 57
<211> 51
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs3213234 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 57
catctctgcag cctctctctg accackgacg ttccatcag gttccatccc g 51

<210> 58
<211> 52
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs34337549 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

25 <220>
<221> base modificada
30 <222> (27)...(27)
<223> g en la posición 27 puede estar presente o ausente

<400> 58
35 cggggactgg gtcaggagaa gccccagggg gacgtggaac cgagagattt tc 52

<210> 59
<211> 51
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs6223 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

45 <400> 59
caggctactc tctcggccc cctccmtcgg gctgaggaag cacagcagca t 51

<210> 60
<211> 52
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11510 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

55 <400> 60
tcgggctgag gaagcacagc agcatcwtca aacatgtaca aaatcgattg gc 52

60 <210> 61
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs1803648 en el gen del factor de crecimiento de

ES 2 453 108 T3

insulina humano 2 (IGF2)

5 <400> 61
atgtacaaaa tcgattggct ttaaamacc tcacatacc ctcccccaa a 51

<210> 62
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11564731 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <220>
<221> base modificada
<222> (7) ... (8)
<223> ac en las posiciones 7 y 8 puede estar presente o ausente

20 <400> 62
aaaacattaa actaaccccc tccccaccc cccccacaac aaccctcta aaa 53

25 <210> 63
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs15737 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

35 <400> 63
tggcactccc cacccccctc ttctyttct ccctggact ttgagcaaa t 51

40 <210> 64
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs680 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

50 <220>
<221> base modificada
<222> (26)...(26)
<223> n = g, a, c o t

55 <400> 64
ctgaaccagc aaagagaaaa gaaggncccc agaaatcaca ggtgggcag t 51

60 <210> 65
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs1065685 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

<400> 65
cagaaatcac aggtgggcac gtcgctscta ccgcatctc cttctcag gg 52

<210> 66
<211> 52
<212> ADN

ES 2 453 108 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs56731553 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

5

<400> 66
gtgctcgtgt gtgtgctgtg ttcattgytg tgctgtgtgt tgtgtgtgtg ta 52

10

<210> 67
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs56154171 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

20

<400> 67
tgtgtgtgtc tcgtgtgtgt gctgtgtyca tgcgtgtgct gttgtgtgtg tg 52

25

<210> 68
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs59198946 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

35

<220>
<221> base modificada
<222> (7)...(8)
<223> at a en las posiciones 7 y 8 puede estar presente o ausente

40

<400> 68
gtgctgtgcg tttgtgtgtg tgctgtatgc tcgtgtgtgt gctgtgttca tgc 53

45

<210> 69
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs61872709 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

55

<400> 69
tctgtgtgct gtgtgtgctg tgcgttytg tgtgtgctgt gctcgtgtgt gt 52

60

<210> 70
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs61872708 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

70

<400> 70
catctgtgtg ctgtgtgtgc tgtgcgyttg tgtgtgtgct gtgctcgtgt gt 52

75

<210> 71
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 453 108 T3

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs61872707 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

5 <400> 71
tgcgtttg tgtgtgctgt gtgtgcrtgt gtgtgcgtgt gtgtgccgtg cg 52

<210> 72
<211> 52
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs61872706 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 72
gtgctgtgcg tttgtgtgtg tgctgtrtgt gcatgtgtgt gcgtgtgtgt gc 52

20 <210> 73
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11042774 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

30 <400> 73
gtgcgtttgt gtgtgctgtg cgtttgygtg tgtgctgtgt gtgcatgtgt gt 52

<210> 74
<211> 55
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs59630895 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

40 <220>
<221> base modificada
<222> (7)...(10)
<223> tgtg en las posiciones 7-10 puede estar presente o ausente

45 <400> 74
ttgtgtgtgt gctgtgtgct agtgtgtgtg ctgtgtgtgc atgtgtgtgc gtgtg 55

50 <210> 75
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs7111331 en el gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

60 <400> 75
tgctgtgttc gtgtgtgctg ttttcgygtg tgtgtgctgt gtgtgcatgt gt 52

<210> 76
<211> 52
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 453 108 T3

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11042767 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

5 <400> 76
acatttcttg gggggtcccc aggagayggg caaagatgat ccctaggtgt gc 52

<210> 77
<211> 51
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs7129583 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 77
agtctctggg ggccgtgcac tgatgyggg agtgtgggaa gtctggcgg t 51

20 <210> 78
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs28462050 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

30 <400> 78
gcattttcc tttttttt ttttyggtt ttttttacc cctccttagc t 51

35 <210> 79
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs28472590 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

45 <220>
<221> base modificada
<222> (7) ... (8)
<223> gg en las posiciones 7 y 8 puede estar presente o ausente

50 <400> 79
tgccccctg ttacatgggg ggggggggtt taattggtt tctgagcgca taa 53

55 <210> 80
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs58312807 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

65 <400> 80
gagtcctcgg gggccgtgca ctgatgyggg gagtgtggga agtctggcgg tt 52

<210> 81
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 453 108 T3

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs60649995 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

5 <400> 81
aggctggccg gaggggaagg ggctarcagg tgtgtaaaca gagggttcca t 51

<210> 82
<211> 52
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs58562468 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 82
cagggtggcc gccttcgca cactgrgga accctcccct ctcctcggg ga 52

20 <210> 83
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs1065687 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

30 <400> 83
cgcctccgc aacttgagg aaccctccc tctcctcgg tgacatctg cc 52

35 <210> 84
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs3208122 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

40 <400> 84
taagcaacta cgatatctgt atggatmagg ccaaagtccc gctaagattc tc 52

45 <210> 85
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs3168310 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

50 <400> 85
ccaatgtttt catggtctga gccccctcc tgttccatc tccactgccc c 51

55 <210> 86
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs58527086 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

65 <220>
<221> base modificada

ES 2 453 108 T3

<222> (7) ... (7)
<223> t en la posición 7 puede estar presente o ausente

<400> 86
5 catcgtggct cacgctgcfg gggccgtggg gacagggccc aaggaggcca gc 52

<210> 87
<211> 52
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs57156844 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 87
acatttcttg gggggtcccc aggagayggg caaagatgat ccctaggtgt gc 52

<210> 88
<211> 51
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs3802971 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

<400> 88
30 agtctctggg ggccgtgcac tgatgygggg agtgtgggaa gtctggcgtt t 51

<210> 89
<211> 51
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs3180700 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

40 <400> 89
gcattttcc tttttttt ttttkgtt ttttttacc cctccttagc t 51

<210> 90
<211> 53
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs57423851 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

50 <220>
<221> base modificada
<222> (7) ... (8)
55 <223> gg en las posiciones 7 y 8 puede estar presente o ausente

<400> 90
tgccccctg ttacatgggg ggggggggtt taattggtt tctgagcgca taa 53

60 <210> 91
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs35818489 en el exón 9 del gen del factor de

ES 2 453 108 T3

crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

<400> 91

5 gagtcctcgg gggccgtgca ctgatgyggg gagtgtggga agtctggcgg tt 52

<210> 92
<211> 51
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11825733 en el exón 9 del gen del factor de
15 crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

<400> 92
aggctggccg gaggggaagg ggctarcagg tgtgtaaaca gagggttcca t 51

<210> 93
<211> 52
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11541377 en el exón 9 del gen del factor de
crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

<400> 93
30 cagggtggcc gccttcgca cactgrgga accctcccct ctcctcggg ga 52

<210> 94
<211> 52
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11541375 en el exón 9 del gen del factor de
crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

<400> 94
45 cgcctccgc acaactgagg aaccctscct tctccctcgg tgacatcttg cc 52

<210> 95
<211> 52
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11541373 en el exón 9 del gen del factor de
crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

<400> 95
55 ggtgacatct tgcccgccc tcagcaycct gcctgtctc caggaggctcc ga 52

<210> 96
<211> 51
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11541372 en el exón 9 del gen del factor de
crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

<400> 96
65 cccctcagca ccctgccttg tctccmggag gtccgaagct ctgtgggacc t 51

ES 2 453 108 T3

<210> 97

<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11541374 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

10

<400> 97
caggcgggtc tgagcccaca gagcagkaga gctgccaggt ctgcccacg ac 52

<210> 98
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs3189464 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

20

<400> 98
cctgcccc actgtgccc ccagctmagc ccccctgcac gcagcccac ta 52

25

<210> 99
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs61745040 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

35

<400> 99
cagtcgcaga gggccctcg gcaagygcc tggagtggg ccattcgaa c 51

<210> 100
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11564732 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

45

<400> 100
agtgcagag ggtccctcg caagcdcct gtgagtgggc cattcggaac a 51

50

<210> 101
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11541376 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

60

<400> 101
gcaagcggc tggagtggg ccattygaa cattggacag aagccaaag a 51

<210> 102
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65

ES 2 453 108 T3

<220>
 <223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs7873 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

5 <400> 102
 gtgtcccg gggcactgc cgaccrgccc ctgctgccc caggttgca g 51

<210> 103
 <211> 51
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs61745039 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

15 <400> 103
 gggcactgc cgaccagccc ctgctgccc caggttgca gctctcccct g 51

<210> 104
 <211> 52
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs3177805 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

25 <400> 104
 30 ttgtctctc cccgtgtccc caatgyttc agtggggggc cccctctgg gt 52

<210> 105
 <211> 52
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs1065715 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

40 <400> 105
 cgtgtccca atgtctcag tgggggscct cctctgggt cccctctct gc 52

<210> 106
 <211> 51
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11541371 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

50 <400> 106
 55 tgccccaat gtctcagtg gggggscctt tctgggtcc cctctctgc c 51

<210> 107
 <211> 52
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs1049926 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

65 <400> 107
 ccaatgtctt cagtgggggg cccctyctg ggtcccctcc tctgcatca cc 52

ES 2 453 108 T3

<210> 108
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs3177946 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

10

<400> 108
ggggccccct ctgggtccc ctctygtcc atcacctgaa gacccccacg c 51

<210> 109
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs1050035 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

20

<400> 109
gtcacctgtg cctgccgcct cggtcmmct tgcggcccgt gtttgactca ac 52

25

<210> 110
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs11541370 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

35

<400> 110
aatattagcg ttaaaggagc tgagtragt caaacacggg ccgcaaggtg ga 52

<210> 111
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs2585 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

45

<220>
<221> base modificada
<222> (26)...(26)
<223> n = g, a, c o t

50

<400> 111
tgcggcccgt gtttgactca actcanctcc ttaacgcta atattccgg c 51

<210> 112
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> polimorfismo de un único nucleótido (SNP) conocido rs1050141 en el exón 9 del gen del factor de crecimiento de insulina humano 2 (IGF2)

60

<400> 112
gggtttgtc ttaacctg taacgmtgc aatccaata aagcattaa a 51

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para cuantificar la expresión específica de alelo de ARN en un individuo humano que es un heterocigoto para un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el gen del Factor de Crecimiento de Insulina 2 (IGF2), comprendiendo el método
- 5
- cuantificar en una muestra del individuo la cantidad de ARN que comprende cada opción polimórfica del SNP, donde el SNP es SEC ID N°: 10; y
- correlacionar la cantidad relativa de ARN que comprende cada opción polimórfica del SNP con pérdida de impronta del gen IGF2.
- 10
2. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de correlación comprende correlacionar la cantidad relativa de ARN con un pronóstico o diagnóstico de cáncer o una predicción de la eficacia de un fármaco para tratar el cáncer.
- 15
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar si el individuo es homocigoto o heterocigoto para el SNP.
4. Un método para determinar un genotipo de SNP en un individuo humano, comprendiendo el método determinar, en una muestra que contiene ADN genómico del individuo, el nucleótido o los nucleótidos en la posición polimórfica de un polimorfismo de un único nucleótido (SNP), donde el SNP es SEC ID N°: 10 y donde el nucleótido es el nucleótido subrayado como se presenta en la Tabla 2A o 2B.
- 20
5. Un polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos, donde el polinucleótido distingue entre un alelo de un SNP (o complemento del mismo) y el otro alelo del SNP (o complemento del mismo) en una reacción de hibridación, donde el SNP es SEC ID N°: 10.
- 25
6. El polinucleótido de la reivindicación 5, donde el penúltimo o último nucleótido 3' del polinucleótido hibrida con el nucleótido polimórfico del SNP.
- 30
7. Un polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos donde el polinucleótido actúa como un cebador en ADNc de Factor de Crecimiento de tipo Insulina 2 (IGF2), de modo que el polinucleótido hibride con el ADNc y el nucleótido 3' del polinucleótido sea complementario del nucleótido inmediatamente cadena arriba del nucleótido polimórfico de un SNP, donde el SNP es SEC ID N°: 10.
- 35
8. El polinucleótido de la reivindicación 7, donde al menos los 10 nucleótidos 3' contiguos del polinucleótido son complementarios del ADNc.
9. Un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de SNP, o complemento de la misma, SEC ID N°: 10, donde el nucleótido de la posición polimórfica del SNP es T.
- 40
10. Un kit que comprende un polinucleótido aislado de la reivindicación 5 o 7.
11. El kit de la reivindicación 10 que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 5 como un primer polinucleótido.
- 45
12. El kit de la reivindicación 11, donde el kit comprende además un segundo polinucleótido aislado de entre 8-100 nucleótidos, donde dicho segundo polinucleótido distingue entre el primer alelo del SNP (o complemento del mismo) y el segundo alelo del SNP (o complemento del mismo), y donde el primer polinucleótido es complementario del nucleótido polimórfico en el primer alelo y el segundo polinucleótido es complementario del nucleótido polimórfico del segundo alelo.
- 50
13. El kit de la reivindicación 10, donde el kit comprende además uno o más cebadores para amplificar una región del locus de IGF2 que abarca el sitio polimórfico, donde el o los cebadores son diferentes del polinucleótido aislado.

Figura 1A *Modelo del Gen IGF2*

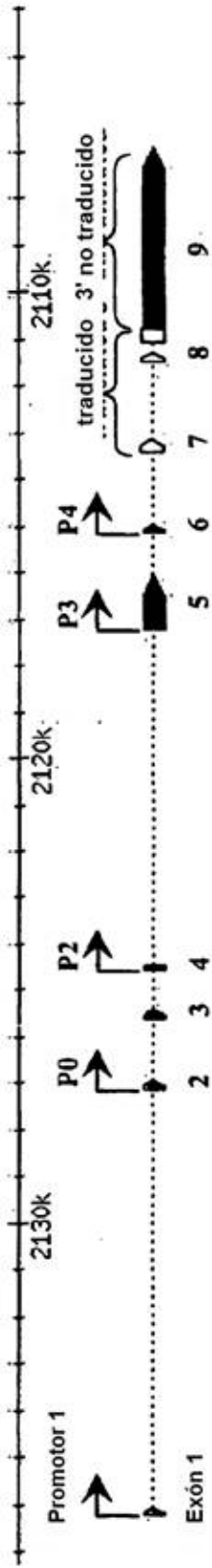


Figura 1B *Bloques de enlace en IGF2 - Proyecto HapMap*



Figura 1C *Bloques de enlace en IGF2 - Gaunt et al., Human Molec. Genet. 2001, vol. 10, n° 14 1491-1501*



Figura 2

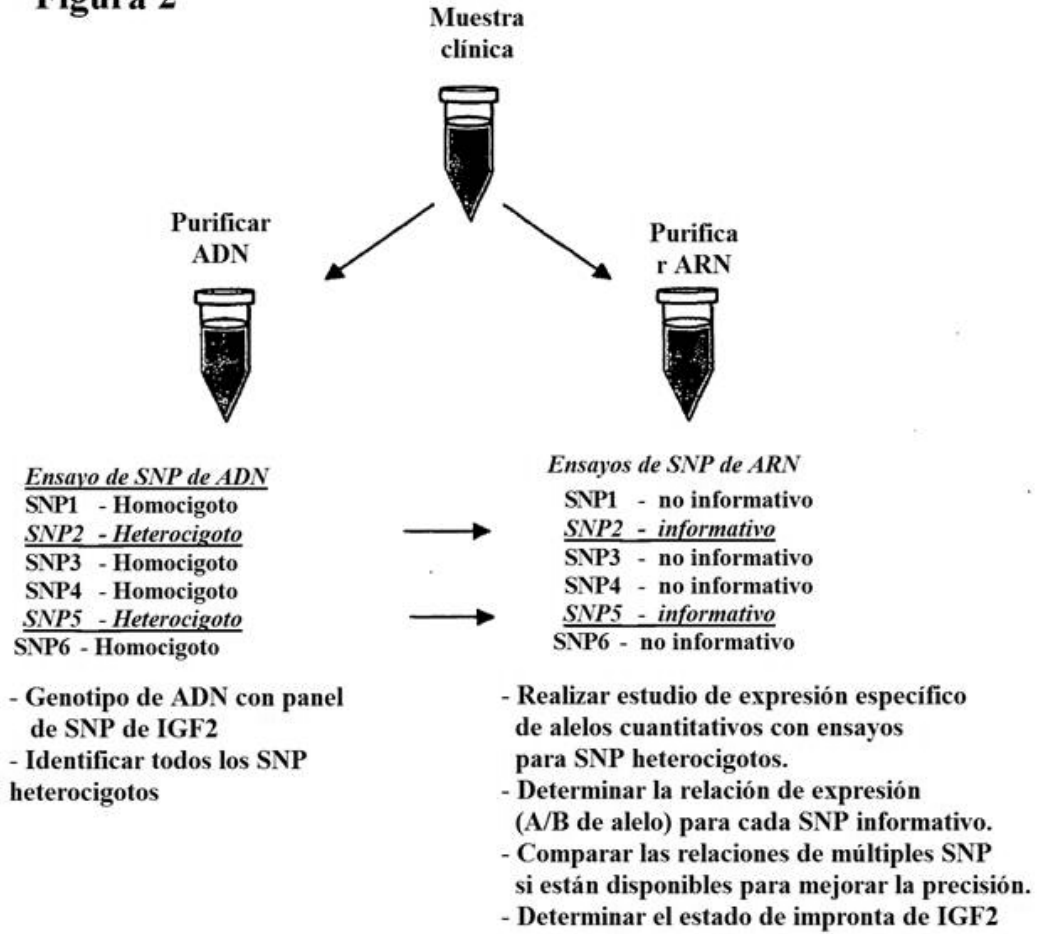


Figura 3: Desequilibrio de enlace en IGF2 de HapMap II

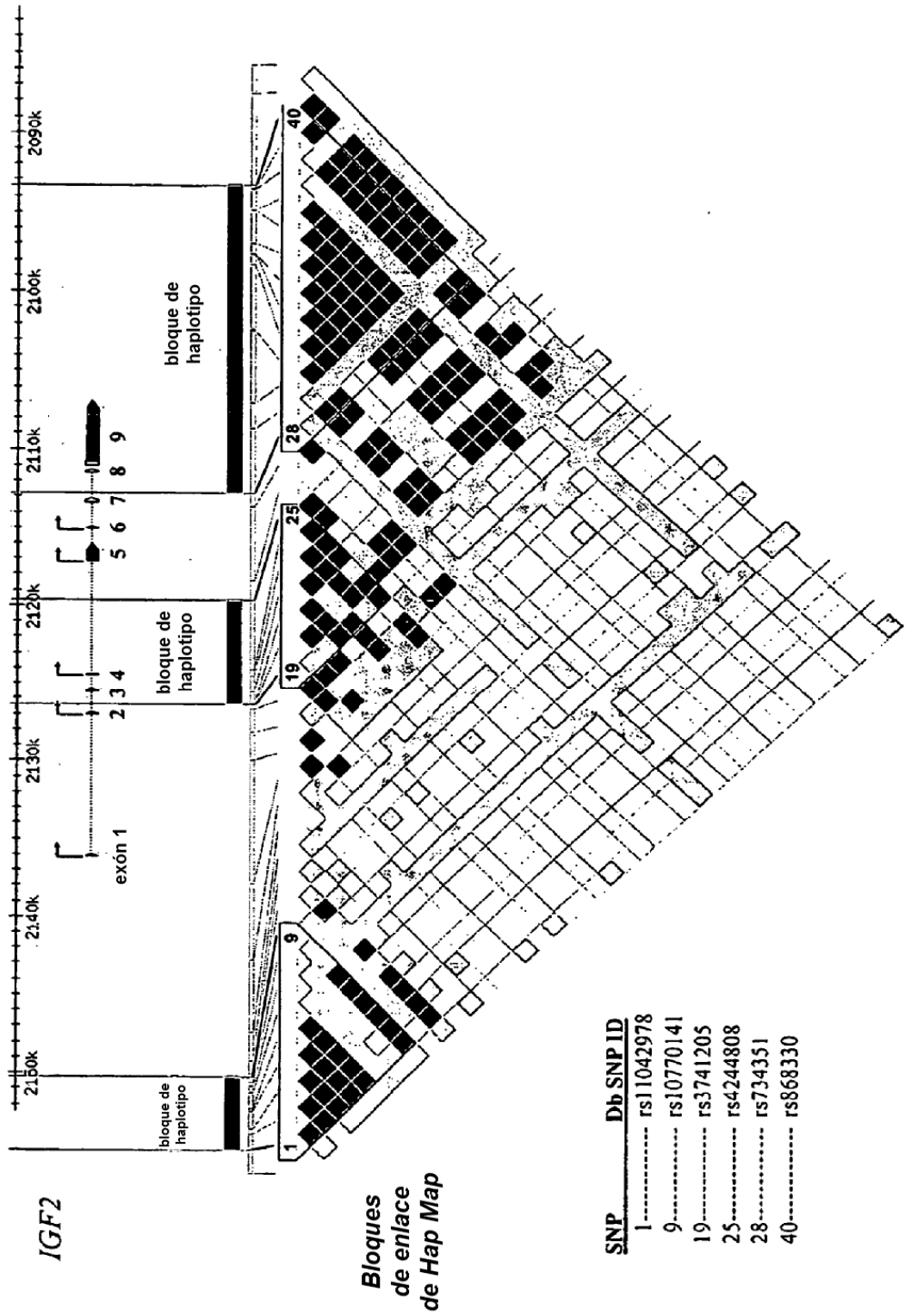


Figura 4: Desequilibrio de enlace de SNP en todos los individuos

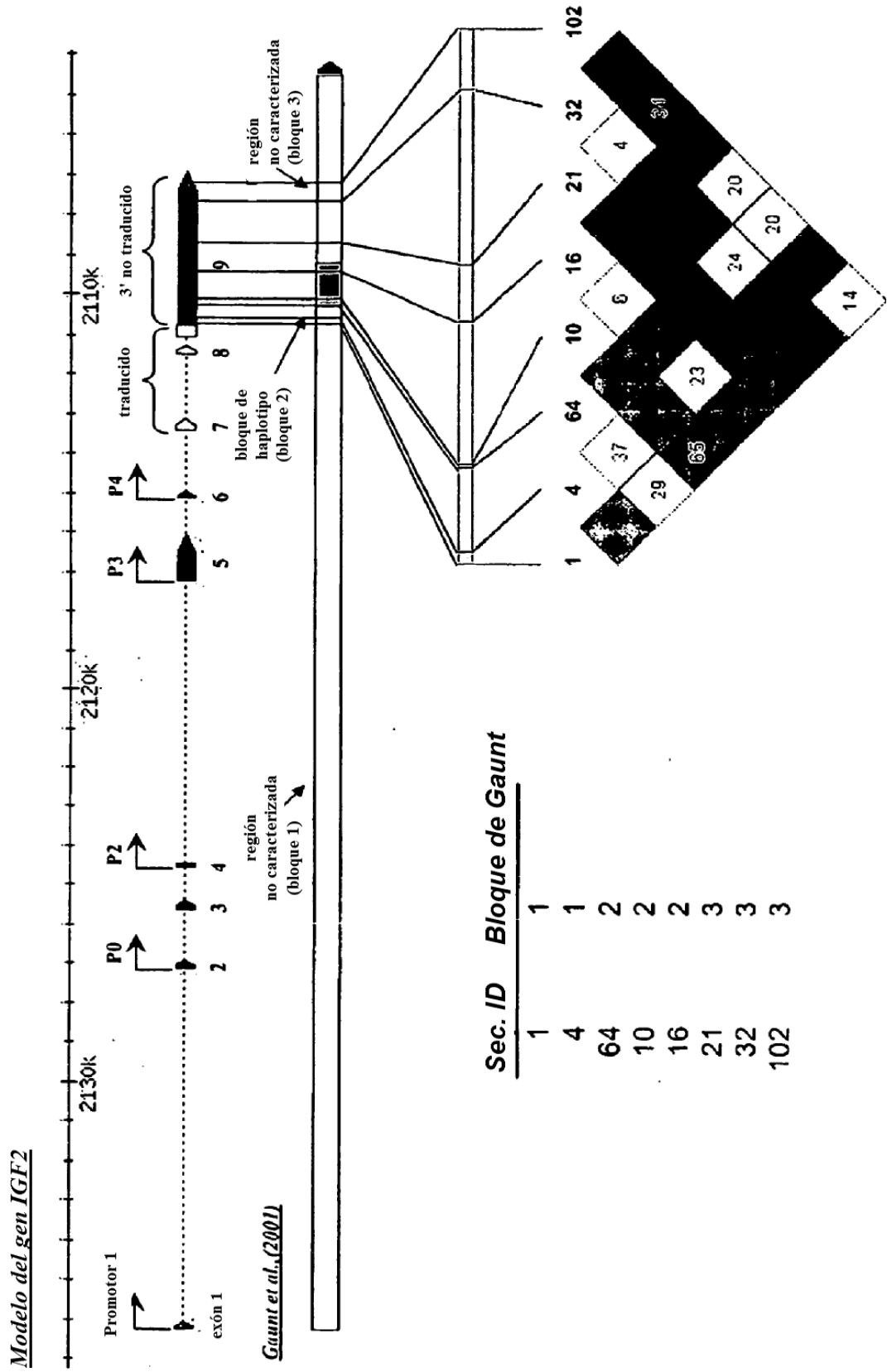


Figura 5. Ejemplo de Ensayo Basado en Enzimas de Restricción para Genotipar SEC ID 64

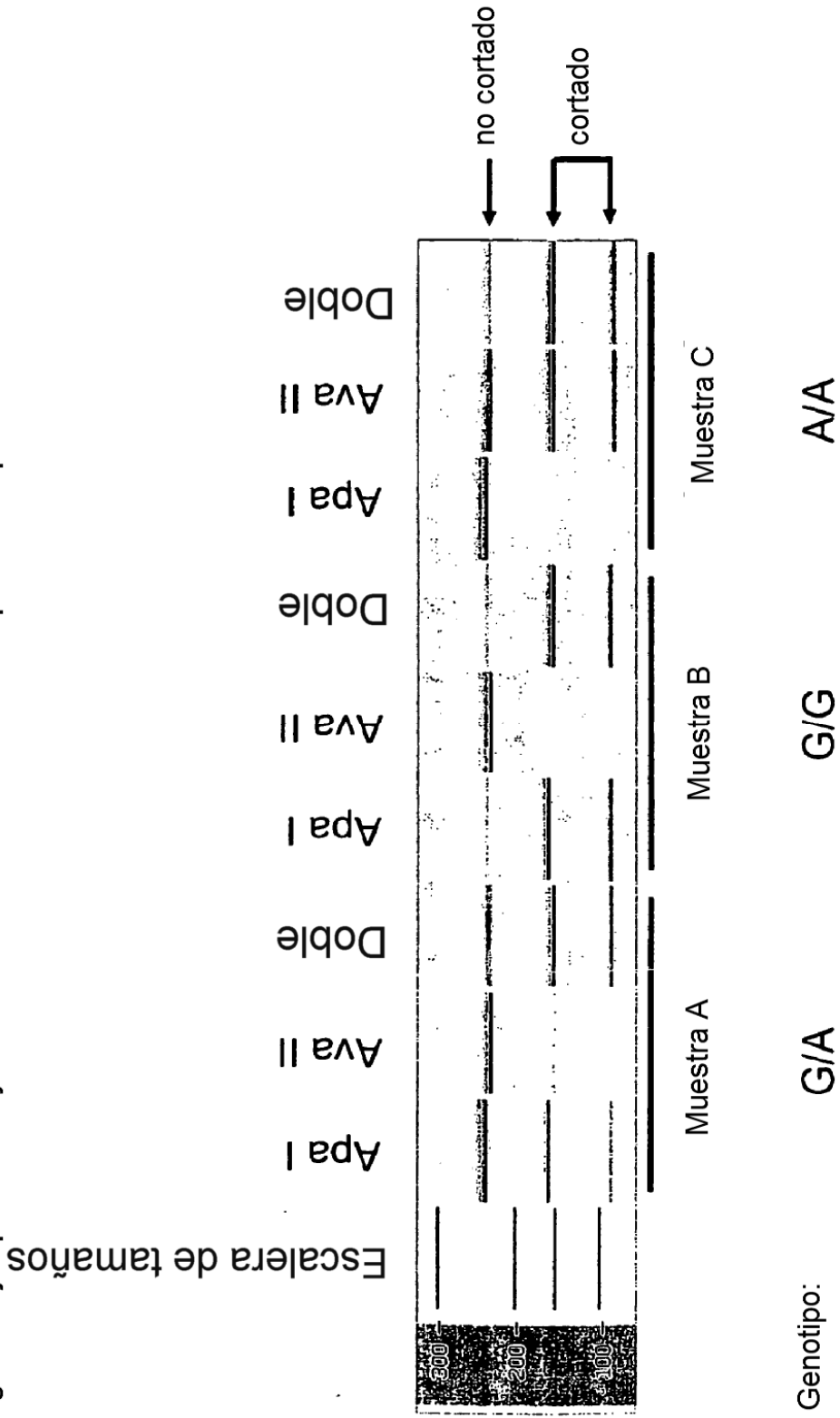


Figura 6. Ejemplo de Ensayo Basado en Enzimas de Restricción para Detectar la LOI de IGF2

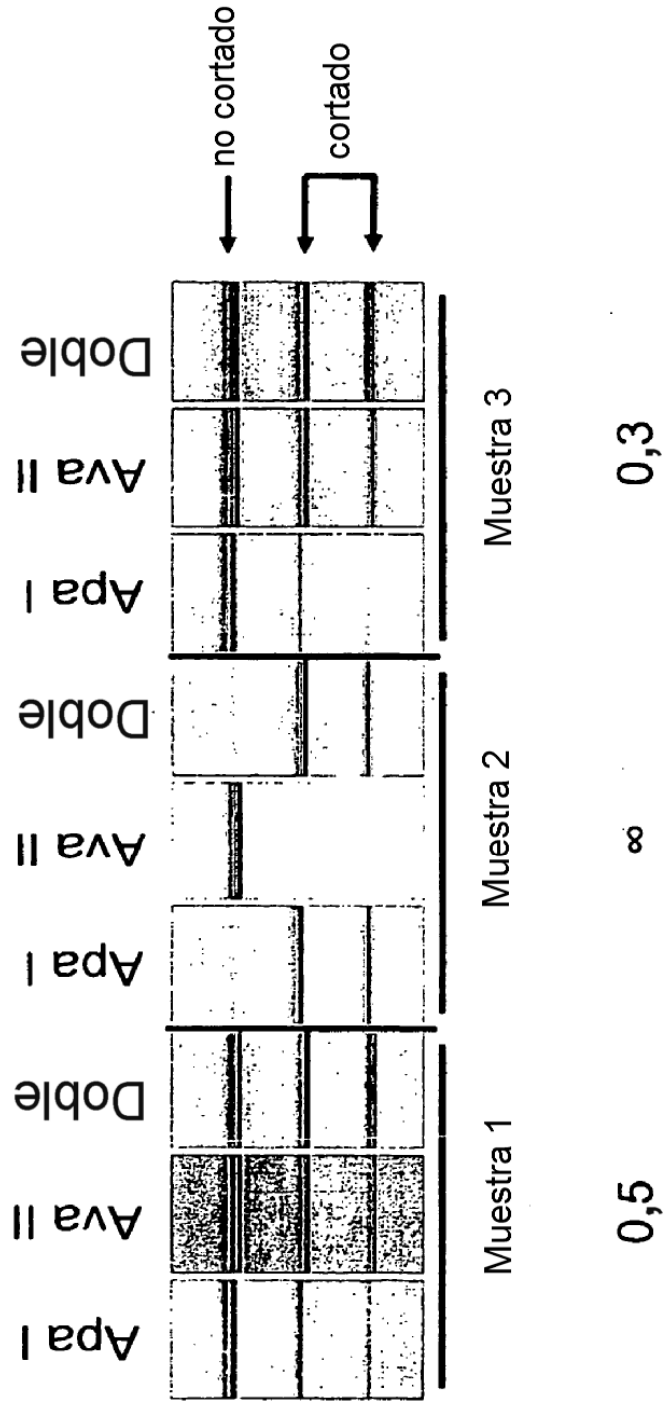


Figura 7. Diagrama de Ensayo de Extensión de Cebadores de un Único Nucleótido

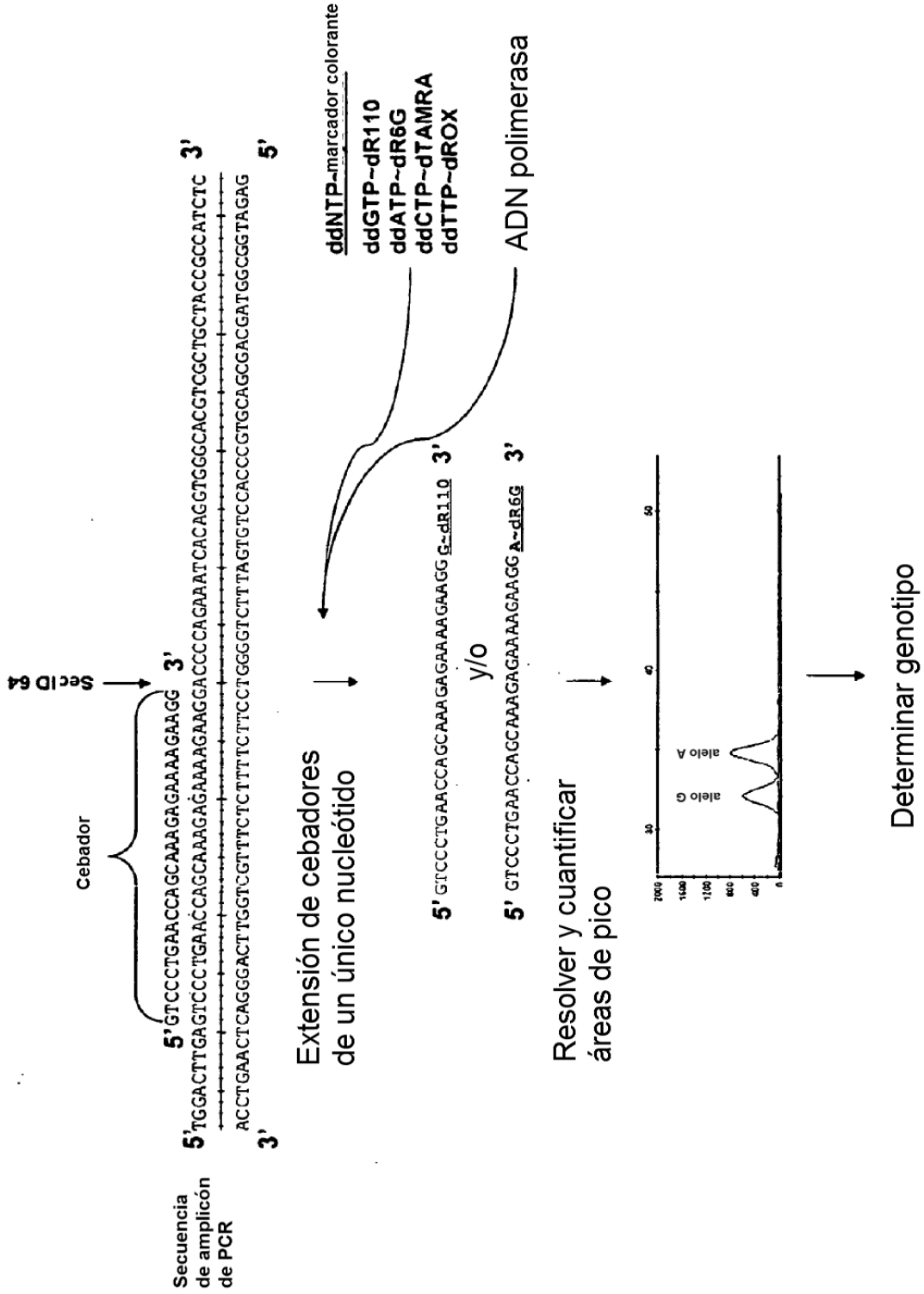
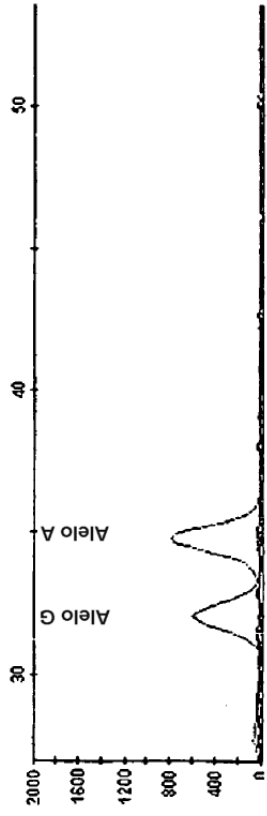


Figura 8. Genotipación por Extensión de Cebadores de un Único Nucleótido de SEC ID 64

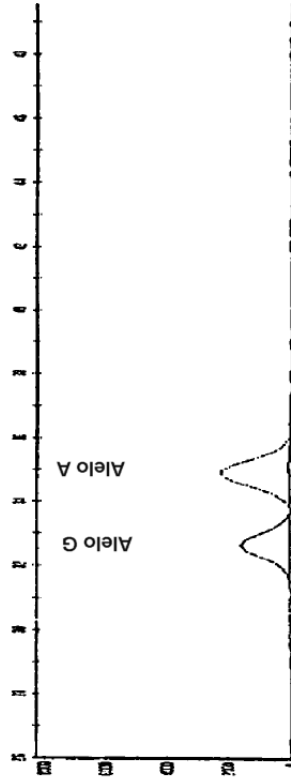
Genotipo de rs680 (Sec ID 64)

Muestra 1



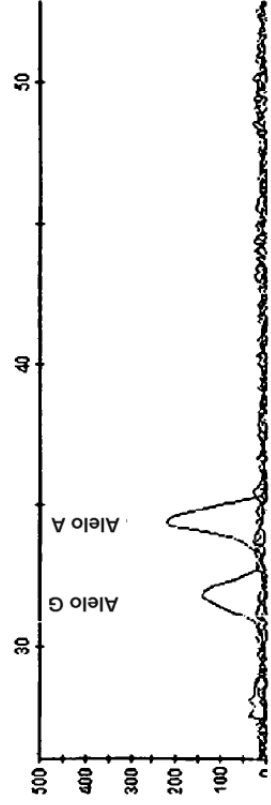
G/A

Muestra 2



G/A

Muestra 3



G/A

Figura 9. El Ensayo de Extensión de Cebadores de un Único Nucleótido Detecta la LOI de IGF2.

Relación G:A de rs680 (Sec ID 64)

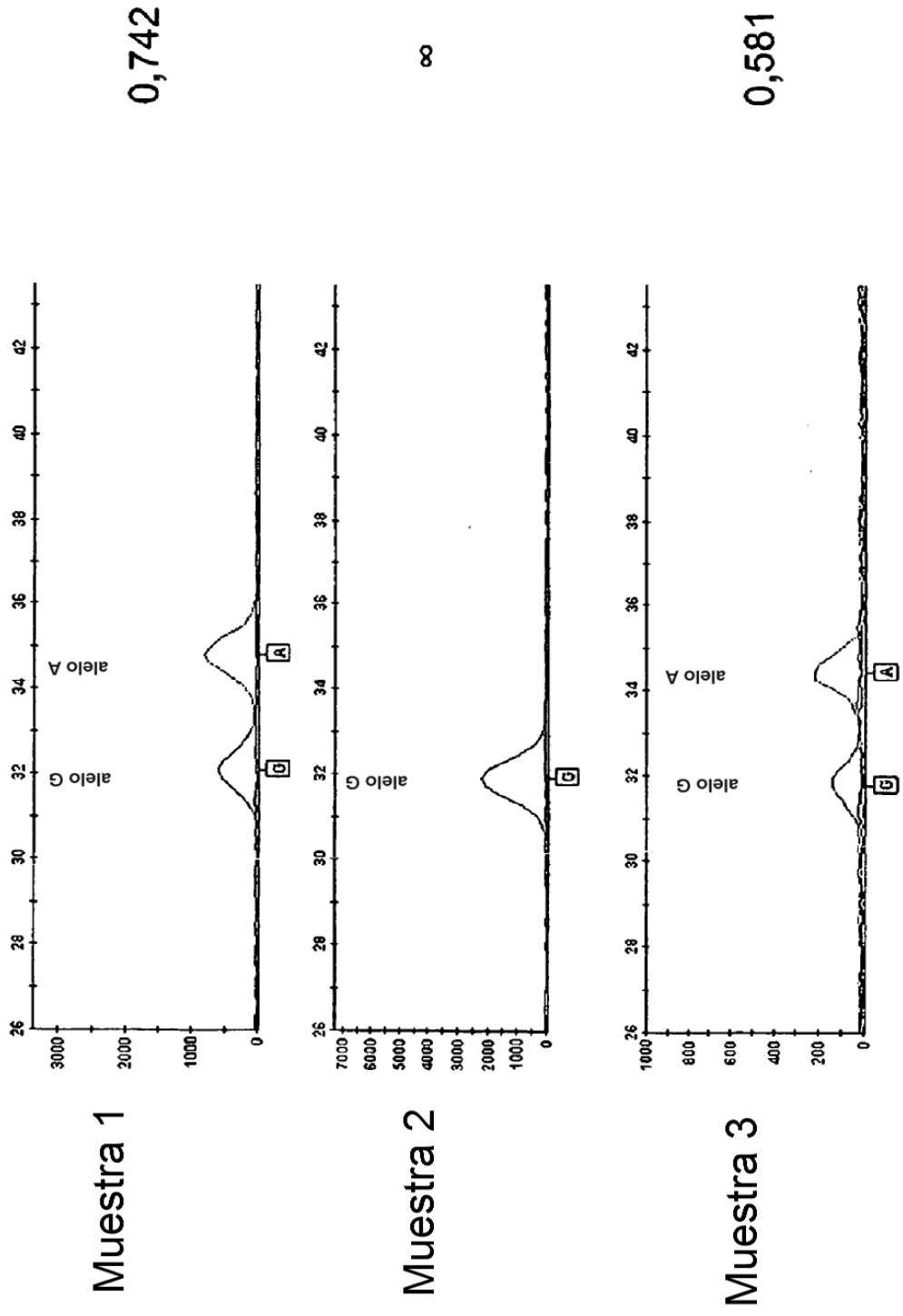


Figura 10. Linealidad Analítica Cuantitativa de Ensayos de Extensión de Cebadores de un Único Nucleótido para Nueve SNP Independientes.

