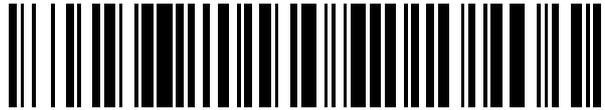


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 879**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2011 E 11706794 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2539460**

54 Título: **Polimorfismos de un solo nucleótido del cromosoma humano 4 en el gen de inositol-polifosfato-4-fosfatasa de tipo II (gen de INPP4b) para el diagnóstico o prediagnóstico de esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

22.02.2010 DE 102010008827

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

11.01.2016

73 Titular/es:

**IMMUNGENETICS AG (100.0%)
Gerhart-Hauptmann-Strasse 23
18055 Rostock, DE**

72 Inventor/es:

IBRAHIM, SALEH

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 555 879 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

Polimorfismos de un solo nucleótido del cromosoma humano 4 en el gen de inositol-polifosfato-4-fosfatasa de tipo II (gen de INPP4b) para el diagnóstico o prediagnóstico de esclerosis múltiple

5 La invención se refiere a un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de la base nitrogenada en la posición de base 143470133 (rs13102150) del cromosoma humano 4 en el gen de inositol-poli-fosfato-4-fosfatasa de tipo II (gen de INPP4b) para el diagnóstico o prediagnóstico *in vitro* de esclerosis múltiple o para el establecimiento *in vitro* del riesgo de enfermar de esclerosis múltiple.

10 Las enfermedades que causan la degeneración de tejido nervioso comprenden una pluralidad de diferentes alteraciones en seres humanos jóvenes y ancianos. Tales enfermedades conducen a una disminución de las neuronas funcionalmente activas en el cerebro y/o en la médula espinal. La destrucción de las neuronas puede tener distintas causas: depósito de proteínas o fragmentos proteicos, fallo metabólico, toxinas, inflamaciones, alteraciones de la perfusión o lesiones en la cabeza. Todos estos factores causan una extensa pérdida de neuronas y de células de la glía, por ejemplo, en el caso de un ictus. En otros casos causan una pérdida de grupos específicos de neuronas y sistemas funcionales, por ejemplo, en Parkinson (PD) o en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

15 No obstante, las características o manifestaciones clínicas de las enfermedades individuales con frecuencia apenas se pueden diferenciar entre sí. Esto conduce a dificultades al intentar conseguir un diagnóstico inequívoco. Adicionalmente varía también en gran medida el curso de distintas enfermedades. Por tanto, en algunas enfermedades raras con frecuencia no es posible determinar la enfermedad exacta hasta el ámbito de una autopsia.

25 En la población joven, de las enfermedades neurodegenerativas la esclerosis múltiple (EM) es la que está representada con mayor frecuencia. La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria crónica del sistema nervioso central (SNC). La enfermedad se caracteriza por la destrucción de las vainas de mielina que rodean a los axones de las células nerviosas. En estadios tempranos de la EM, los pacientes con frecuencia se recuperan por completo de los síntomas. Sin embargo, los daños estructurales permanecen y con cualquier recidiva adicional aumenta la probabilidad de lesiones clínicas. La mayoría de las veces, el daño se limita a regiones focales de la sustancia blanca. Los cambios estructurales causan distintos síntomas clínicos, por ejemplo, alteraciones visuales, problemas de deambulación, ataxia, parestesia, debilidad muscular y paresia, así como problemas de habla y coordinación, pero también dificultades psiquiátricas. La causa de la EM sigue siendo desconocida.

35 La enfermedad comienza con frecuencia ya en adultos jóvenes a la edad de 20 a 30 años, estando afectadas claramente más las mujeres. La EM es una enfermedad autoinmunitaria que se caracteriza, estructuralmente, por infiltración de células inflamatorias periféricas, tratándose en la mayoría de los casos de linfocitos T y B. Estas células se encuentran en la sustancia blanca en puntos de destrucción locales donde atacan las vainas de mielina. A causa de la destrucción de la mielina, el aislamiento de los axones se ve afectado. En el estado sano, los potenciales de acción se conducen a través de la conducción saltatoria al nodo de Ranvier. Estos nodos no presentan ninguna mielinización en absoluto, o solo una escasa, entre dos oligodendrocitos en un axón. Un aislamiento dañado no altera solo la conducción saltatoria, sino que conduce, a causa de los cambios en la concentración iónica, también a problemas metabólicos.

45 Con respecto a la causa de la enfermedad de EM existen únicamente algunas suposiciones de que la predisposición genética o las influencias del entorno podrían, eventualmente, desempeñar un papel en el curso de la enfermedad. También se discute una participación de factores biológicos.

50 En particular sería deseable un indicador genético para EM, ya que por esta vía sería posible un diagnóstico claro. Los enfoques anteriores muestran que un riesgo aumentado de una enfermedad de EM está asociado a la presencia del antígeno leucocitario humano (HLA) DR2. HLA-DR2 es uno de los indicadores genéticos definitivos de EM en la región de HLA. Además del haplotipo HLA-DR2, otros loci modulan la sensibilidad a EM en la región de HLA, por ejemplo HLA-DR3. No obstante, estudios genómicos señalan que otros factores contribuyen a la sensibilidad a EM. Por tanto, se intenta encontrar otros indicadores genéticos.

55 El objetivo de la presente invención era hallar otros indicadores genéticos que estuviesen asociados a esclerosis múltiple.

60 En el ámbito humano, este objetivo se ha resuelto mediante un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de la base nitrogenada en la posición de base 143470133 (rs13102150) del cromosoma humano 4 en el gen de inositol-polifosfato-4-fosfatasa de tipo II (gen de INPP4b), que sirve para el diagnóstico o prediagnóstico *in vitro* de esclerosis múltiple o para el establecimiento *in vitro* del riesgo de enfermar de esclerosis múltiple, o que se usa para esto.

65 La búsqueda de genes que participen en una enfermedad poligénica tal como EM es muy complicada y exhaustiva. Se ha empleado una combinación de distintas estrategias de mapeo, empleándose en primer lugar un modelo animal. La encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) es un modelo animal de la EM. A este respecto se puede inducir la enfermedad en distintas especies desde el ratón hasta primates superiores. El modelo animal

presenta una gran coincidencia con la enfermedad humana, por ejemplo, funciones defectuosas agudas, crónicas, con recaídas y fases de recuperación, así como desmielinización en la sustancia blanca del SNC. En el ratón se puede inducir la EAE por dos vías distintas, es decir, mediante inmunización activa o adaptativa. La vacunación activa incluye, entre otras cosas, la inmunización con autoantígenos de proteínas de mielina o con homogeneizados de médula espinal. La inmunización adaptativa se refiere a la transferencia de células de ganglio linfático de ratones inmunizados previamente o de líneas de linfocitos T específicas de antígeno estimuladas.

Para el análisis se emplean potenciales evocados (PE). Un potencial evocado es un potencial eléctrico que se registra en un paciente después de un estímulo hasta alcanzar el órgano reactivo. A modo de ejemplo cabe mencionar en este caso una contracción muscular. Los PE muestran si están presentes lesiones. Para el diagnóstico se pueden usar diferentes PE, por ejemplo, potenciales evocados visualmente (PEV) o potenciales evocados motóricamente (PEM). En este caso, para el diagnóstico se empleó la estimulación eléctrica del cerebro para desencadenar potenciales evocados motóricamente (PEM) en los músculos de las extremidades. A causa del daño de la vaina de mielina se produce una dispersión temporal de la conducción neuronal, de lo que resultan respuestas evocadas corticales modificadas. Los potenciales evocados motóricamente corticales (PEMc) proporcionan datos cuantitativos con respecto al estado fisiológico y, por tanto, son particularmente adecuados para un examen funcional.

La EM y la EAE son enfermedades complejas en las cuales participan muchos lugares de genes (loci de gen) que pueden tener un efecto sobre el fenotipo (loci de carácter cuantitativo, *quantitative trait loci*, QTL). Un QTL es un lugar de carácter cuantitativo, es decir, un punto variable en el genoma que influye en una determinada característica. Hallar tales puntos es de gran ayuda en la búsqueda de genes en relación con enfermedades en las cuales interviene más de un gen. Ya que la característica no se configura por un único gen, cualquier gen que intervenga modifica la característica.

Se emplea mapeo de QTL para identificar genes candidato para distintas características (traits). En el ratón, para el mapeo de QTL se usan cepas consanguíneas en condiciones ambientales controladas, por ejemplo C57Bl/6, SJL, FVB y C57Bl/10.S.

Para el mapeo de loci genéticos se usan distintos marcadores, por ejemplo, polimorfismos de longitud de fragmento (RFPL), RFLP hipervariables, minisatélites, microsátélites o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Resultó relevante el QTL EAE 31.

Ya que un QTL individual puede contener cientos de genes, la elección de genes candidato individuales para el examen posterior era complicada. Por tanto, era imprescindible un mapeo fino (*fine mapping*) complementario para identificar el locus cromosómico preciso. Para esto se usaron el establecimiento de líneas congénicas (*congenic lines*), selección recombinante y líneas de entrecruzamiento (*intercross lines*) avanzadas. La primera opción para la generación de cepas es la generación de poblaciones retrocruzadas (*backcross populations*). La cepa retrocruzada implica el emparejamiento de individuos F1 con una de las cepas parentales (compárese con la Fig. 1 B). Se generan generaciones de entrecruzamiento mediante emparejamiento de hermanos de la generación F1, lo que da lugar a una población F2 mixta (compárese con la Fig. 1 B). Es posible el análisis de una población mixta de dos cepas con respecto a distintos genotipos. Para el mapeo del QTL y del locus cromosómico se aplican herramientas de *software*.

Las diferencias entre distintas cepas de ratón se pueden analizar mediante marcadores de alta densidad o mediante la creación de patrones de distribución de cepas. Además de esto, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) pueden señalar relaciones filogenéticas entre cepas consanguíneas. La determinación de qué fragmento tiene ancestros iguales o distintos se hace posible mediante comparación de SNP de distintas cepas de ratón en la región QTL. Mediante los SNP, las cepas se pueden clasificar en subgrupos de haplotipos. Los SNP ayudan a combinar estas informaciones con los datos fenotípicos.

Otro enfoque es la genómica (*genomic*) comparativa. Mediante la comparación genómica de distintas especies (por ejemplo, rata, ratón, ser humano, compárese con la Fig. 2) se pueden establecer fragmentos de secuencias comunes. Además se pueden establecer el lugar del gen, regiones altamente conservadas o la cantidad de ADN no codificante. Se pueden determinar regiones altamente conservadas dentro de loci de enfermedad en distintas especies mediante genómica comparativa. Esto acelera el aislamiento de los probables genes de enfermedad.

Para el mapeo fino del QTL (EAE 31) se emplearon el análisis de haplotipos, el análisis intergenómico y el perfilado de expresión génica. A este respecto se estableció el gen de inositol-polifosfato-4-fosfatasa de tipo II (gen de INPP4b) como el mejor gen candidato en el cromosoma 8 del ratón (compárese con la Fig. 3).

La Inpp4b (proteína) es una fosfatasa independiente de Mg^{2+} que cataliza la hidrólisis del fosfato en la posición 4 del fosfatidilinositol-3,4-bifosfato, del inositol-1,3,4-trifosfato y del inositol-3,4-bifosfato. La proteína murina tiene una identidad del 96 % con el ortólogo del ser humano y del 90 % con el de rata.

El gen de Inpp4b como mejor gen candidato se secuenció en dos cepas de ratón, la cepa resistente C57Bl/10.S y la

cepa sensible SJL para hallar diferencias en la secuencia. La cepa resistente resiste una inducción de EAE, la cepa sensible reacciona a la inducción con EAE.

5 Las diferencias de secuencia se compararon con polimorfismos conocidos que conducen a variantes de aminoácidos en el ser humano. La secuencia codificante del Inpp4b de SJL y de C57BL/10.S se clonó en un vector pGEM-T-easy (Promega) y dieron dos diferencias de SNP en el ADNc que conducen a un desplazamiento de aminoácidos (aa): c1434C/A (aa 478 S/R) y c1655A/C (aa 552 H/P).

10 Para hallar si uno o ambos SNP deciden con respecto a la vulnerabilidad a EAE, se generaron construcciones de ADN que contenían respectivamente una mutación (bien serina -> arginina o bien histidina ->prolina) o ambas mutaciones. Se generaron ratones transgénicos mediante inyección de pronúcleos. En la inducción de la EAE resultó que ambos SNP son relevantes.

15 El gen de Inpp4b, que está localizado en el ratón en el cromosoma 8, se encuentra en el cromosoma 4 en el ser humano. El propio gen es conocido, la secuencia se reproduce, por ejemplo, en Anderson *et al.*, "The cDNA cloning and Characterization of Inositol Polyphosphatase 4-Phosphatase Typ II", J. Biolog. Chem. 1997, Vol. 272, n.º 38, páginas 23859-23864. Además, el gen está listado, por ejemplo, en el banco de datos ENSEMBL (cromosoma 4: 142,949, 186-143, 383, 906). Son conocidas tres variantes de corte y empalme, es decir, alfa, alfa corta y beta. En la variante alfa corta falta el exón 4.

20 Todas las siguientes indicaciones con respecto a los SNP individuales se refieren a la definición o numeración de acuerdo con el banco de datos Ensembl (Ensembl release 56 - sept 2009; Homosapiensversion 56.37a (GRCh37)). El gen de Inpp4b o las bases individuales se leen en relación con la orientación de la cadena codogénica del cromosoma 4.

25 En un estudio de asociación se examinaron pacientes con EM, considerando 39 SNP como marcadores. Se extrajo ADN de muestras corporales y se identificó la respectiva secuencia en la región del gen de Inpp4b. En el estudio participaron en el grupo de control en total 349 personas sometidas a estudio que no habían enfermado de EM, de los cuales 210 eran mujeres y 152 hombres. En el grupo de pacientes enfermos se encontraron 362 personas, 4 de ellas presentaban un síndrome aislado clínicamente, 8 tenían progresión primaria, 3 recidiva progresiva, 244 estaban en la fase de recuperación y 90 estaban en progresión secundaria.

Selección de SNP marcador

35 Mediante el algoritmo Tagger en Haploview se seleccionaron 39 SNP marcadores que abarcaban todos los haplotipos habituales dentro del gen de INPP4b (<http://www.broad.mit.edu/mpg/tagger>, www.hapmap.org). El algoritmo se basa en r^2 . La aplicación de un valor límite r^2 riguroso ($r^2 > 0,8$) entre los SNP permite resolver a los SNP marcadores seleccionados la mayoría de los haplotipos existentes (véase Altshuler D, Brooks LD, Chakravarti A, Collins FS, Daly MJ & Donnelly P 2005 International HapMap consortium a haplotype map of the human genome, Nature 437, 1299-1320; Barrett JC, Fry B, Maller J & Daly MJ 2005 Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps, Bioinformatics 21, 263-265). Se seleccionaron SNP con frecuencia de alelos menores (MAF, *minor allele frequencies*) de más de 0,05.

Genotipado de SNP

45 Se extrajo ADN genómico de leucocitos de sangre periférica mediante el uso del mini kit de ADN de sangre QIAamp (Qiagen, EE.UU.). El genotipado de todos los SNP se realizó mediante un ensayo de 5'-exonucleasa (*TaqMan* assays on demand; Applied Biosystems, Inc., [ABI] Foster City, CA), usándose cebadores puestos a disposición por el fabricante. La señal de fluorescencia de la muestra se detectó de acuerdo con las indicaciones del fabricante (TaqMan Assay for Real-Time PCR, 7500 Real Time PCR System; ABI).

50 Para cada persona sometida a estudio se estableció la EDSS, que representa una medida de la gravedad de la enfermedad (Escala de Estado de Discapacidad Expandida, *Expanded Disability Status Scale*). Se usó el ensayo de tendencia de Cochran-Armitage para ensayar en relación con asociación con vulnerabilidad a la enfermedad y con el valor de EDSS. En la Tabla 1 están reproducidos los resultados de todos los SNP examinados.

60 El término "rsXXXXXXXX" se refiere a una denominación de acuerdo con el banco de datos Ensembl, el par de bases afectado por el SNP en el cromosoma humano 4 está reproducido en la segunda columna, la columna de P indica los valores de potencial obtenidos. La columna A1 indica la base normal, la columna A2 la base del SNP. A este respecto presentaron significación rs13102150 [4:143470133 (cadena codogénica, *forward strand*)], rs2059510 [4:143459907 (cadena codogénica, *forward strand*)] y rs17717651 [4:143453079 (cadena codogénica, *forward strand*)], siendo particularmente relevante rs13102150 (entradas de banco de datos Ensembl del 11.01.2010).

Tabla 1

SNP	BP	A1	A2	P	OR	L95	U95
rs13102150	143470133	C	A	8,516E-03	0,729	0,576	0,923
rs2874870	143509994	C	T	1,189E-02	0,722	0,56	0,932
rs2636638	143230028	A	G	1,818E-02	0,741	0,577	0,951
rs4975311	143500223	G	A	5,062E-02	0,777	0,602	1
rs16998560	143481466	G	C	5,890E-02	0,783	0,607	1,01
rs2667092	142963604	C	G	7,155E-02	0,746	0,542	1,03
rs13107432	143444744	A	G	7,558E-02	0,811	0,644	1,02
rs336307	143020338	G	C	8,171E-02	0,808	0,635	1,03
rs1353624	143295246	T	C	1,310E-01	0,799	0,596	1,07
rs2636637	143081071	T	C	1,488E-01	1,22	0,93	1,61
rs1391098	143269745	A	T	1,875E-01	1,17	0,925	1,49
rs2667101	142976133	G	A	1,881E-01	0,849	0,664	1,08
rs2059510	143459907	T	C	1,998E-01	1,2	0,906	1,6
rs2667096	142969773	G	T	2,138E-01	0,857	0,671	1,09
rs336296	143014855	T	C	2,206E-01	0,849	0,654	1,1
rs1219275	143084950	T	C	2,383E-01	1,17	0,901	1,52
rs1391092	143341540	T	A	2,593E-01	0,869	0,681	1,11
rs1995960	142916958	A	G	2,618E-01	0,877	0,698	1,1
rs1907106	143229643	C	T	2,927E-01	1,13	0,898	1,43
rs1497389	143304592	C	A	3,370E-01	1,13	0,882	1,44
rs12499068	143343632	C	T	3,494E-01	0,894	0,706	1,13
rs6821787	142920229	G	T	3,797E-01	0,879	0,659	1,17
rs2635429	143243556	C	T	3,945E-01	1,11	0,876	1,4
rs1391095	143294023	A	T	4,270E-01	1,11	0,861	1,43
rs1817970	143364802	G	A	4,343E-01	0,872	0,619	1,23
rs17717651	143453079	C	A	4,609E-01	1,12	0,833	1,5
rs967003	142844783	A	T	5,069E-01	1,09	0,846	1,4
rs2627798	143163452	C	G	5,102E-01	0,921	0,722	1,18
rs1872292	143232882	G	T	5,507E-01	1,08	0,838	1,39
rs168059	142999991	T	G	5,837E-01	0,932	0,725	1,2
rs2636670	143234593	A	G	6,327E-01	1,06	0,837	1,34
rs3756125	143344473	T	C	6,820E-01	1,05	0,824	1,34
rs1994217	143130219	T	A	6,933E-01	0,953	0,748	1,21
rs2029990	143277467	C	T	7,027E-01	1,05	0,82	1,34
rs168061	143053786	C	T	7,221E-01	0,956	0,748	1,22
rs1500847	142833334	C	T	7,994E-01	1,03	0,817	1,3
rs3775707	143333792	A	G	8,607E-01	1,02	0,796	1,31
rs2636645	143216769	C	T	8,664E-01	0,979	0,761	1,26
rs3775692	143224971	C	T	9,781E-01	1	0,758	1,33

- Correspondientemente, la invención desvela un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de la base nitrogenada en la posición de base 143470133 (rs13102150) del cromosoma humano 4 en el gen de inositol-polifosfato-4-fosfatasa de tipo II (gen de INPP4b) para el diagnóstico o prediagnóstico *in vitro* de esclerosis múltiple o para el establecimiento *in vitro* del riesgo de enfermar de esclerosis múltiple. En esta posición de base 143470133 se encuentra normalmente la citosina. Esta base está reemplazada en el caso de un SNP por otra base, en este caso una adenina (A). En todo el texto, por "otra base" se ha de entender que las bases son en general las bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T) y que la expresión "otra base" comprende respectivamente el grupo de las tres bases restantes, es decir, por ejemplo cuando en la posición de base 143470133 en el caso normal está presente una citosina, las otras bases pueden ser adenina, guanina y timina, de las cuales una entonces está presente en lugar de la citosina, abarcando las reivindicaciones en la posición de base 143470133 solo la sustitución de citosina por adenina (rs13102150).
- 5
- 10
- 15 Por tanto, la invención se refiere a un polimorfismo de un solo nucleótido que es una sustitución de la base citosina por adenina en la posición de base 143470133 (rs13102150) del cromosoma humano 4 en el gen de inositol-

polifosfato-4-fosfatasa de tipo II (gen de INPP4b) para el diagnóstico o prediagnóstico *in vitro* de esclerosis múltiple o para el establecimiento *in vitro* del riesgo de enfermar de esclerosis múltiple.

5 En el caso de que en la posición de base 143470133 esté presente otra base en lugar de la citosina, en este caso adenina en lugar de citosina, se diagnostica o prediagnostica EM en el paciente o se asigna al paciente un riesgo mayor de enfermedad.

10 El ensayo en relación con la asociación con EDSS se realizó mediante el ensayo de Jonckheere-Terpstra. Se ensayaron exclusivamente pacientes con EM. Tal como ya se ha indicado anteriormente, la "puntuación de estado de discapacidad expandida" (EDSS) es una escala de rendimiento que da información acerca de la gravedad de la discapacidad en pacientes con esclerosis múltiple. La escala comienza con 0 y termina con 10, aumentando la gravedad de la enfermedad con un valor creciente. El médico al establecer la EDSS se refiere al examen de los sistemas funcionales (FS) del paciente. En la Tabla 2 están reproducidos los resultados. Se muestran los SNP con $p < 0,1$ del ensayo de asociación de EM o del ensayo de Jonckhere-Terpstra para asociación con EDSS. También
15 aquí resultó particularmente relevante rs13102150.

Tabla 2

SNP	pTendencia	pJonckTerpstra
rs1391095	4,27E-01	3,60E-03
rs2029990	7,03E-01	5,50E-03
rs3775707	8,61E-01	6,70E-03
rs3756125	6,82E-01	1,51E-02
rs1872292	5,51E-01	1,63E-02
rs1497389	3,37E-01	6,52E-02
rs2635429	3,95E-01	6,92E-02
rs2636670	6,33E-01	6,99E-02
rs1391098	1,88E-01	8,21E-02
rs2059510	2,00E-01	8,97E-02
rs2874870	1,19E-02	9,64E-02
rs2667092	7,16E-02	1,27E-01
rs4975311	5,06E-02	2,23E-01
rs13107432	7,56E-02	2,94E-01
rs2636638	1,82E-02	3,25E-01
rs13102150	8,52E-03	4,70E-01
rs336307	8,17E-02	4,80E-01
rs16998560	5,89E-02	7,69E-01

20 En el análisis de haplotipo para EM se realizó mediante un "enfoque de ventana deslizante" (*sliding window approach*), poniéndose el tamaño de la ventana en 3. En la Tabla 3 y en la Fig. 4 se muestra el resultado. De los haplotipos 1 a 6, el haplotipo 1, que presenta SNP de las bases nitrogenadas en la posición de base 143470133 (rs13102150), la posición de base 143459907 (rs2059510) y la posición de base 143453079 (rs17717651) del cromosoma humano 4 en el gen de inositol-polifosfato-4-fosfatasa de tipo II (gen de INPP4b), resultó asociado
25 significativamente a EM.

Tabla 3

Haplotipo	pHaploScore	snp1	snp2	snp3
1	8,92E-04	rs17717651	rs2059510	rs13102150
2	1,93E-03	rs2059510	rs13102150	rs16998560
3	1,08E-02	rs2667096	rs2667101	rs168059
4	1,49E-02	rs13107432	rs17717651	rs2059510
5	2,02E-02	rs16998560	rs4975311	rs2874870
6	2,74E-02	rs336307	rs168061	rs2636637

30 Correspondientemente es una forma de realización preferente de la invención que un haplotipo que comprende polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de las bases nitrogenadas en la posición de base 143470133 (rs13102150), posición de base 143459907 (rs2059510) y posición de base 143453079 (rs17717651) del cromosoma humano 4 en el gen de inositol-polifosfato-4-fosfatasa de tipo II (gen de INPP4b) se use para el diagnóstico o prediagnóstico *in vitro* de esclerosis múltiple o para el establecimiento *in vitro* del riesgo de enfermar de esclerosis múltiple.

Este haplotipo está caracterizado por que los polimorfismos comprenden una sustitución de la base citosina por

adenina en la posición de base 143470133 (rs13102150), una sustitución de la base timina por citosina en la posición de base 143459907 (rs2059510) y una sustitución de la base citosina por adenina en la posición de base 143453079 (rs17717651).

5 En otras palabras, en un haplotipo en el que en la posición de base 143470133 está presente otra base en lugar de citosina, en el presente documento adenina en lugar de citosina, en la posición de base 143459907 otra base en lugar de timina, en el presente documento citosina en lugar de timina, y en la posición de base otra base en lugar de citosina, en el presente documento adenina en lugar de citosina, al paciente se diagnostica o prediagnostica EM o se asigna al paciente un riesgo mayor de enfermedad.

10 En el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la invención para el diagnóstico o prediagnóstico de EM o para el establecimiento del riesgo de una persona sometida a estudio de enfermar de EM, se analiza al menos la base en la posición de base 143470133 (rs13102150) del cromosoma humano 4 en el gen de inositol-polifosfato-4-fosfatasa de tipo II (gen de INPP4b), diagnosticándose en el caso de que esté presente allí otra base diferente de la citosina, en el presente documento una adenina en lugar de una citosina, esclerosis múltiple a la persona sometida a estudio o asignándose a la persona sometida a estudio un riesgo mayor de enfermedad.

15 En una forma de realización preferente del procedimiento *in vitro* para el diagnóstico o prediagnóstico de esclerosis múltiple o para el establecimiento de un riesgo de una persona sometida a estudio de enfermar de esclerosis múltiple se analizan al menos las bases en la posición de base 143470133 (rs13102150), posición de base 143459907 (rs2059510) y en la posición de base 143453079 (rs17717651) del cromosoma humano 4 del gen de inositol-polifosfato-4-fosfatasa de tipo II (gen de INPP4b), diagnosticándose en el caso de que en la posición de base 143470133 esté presente otra base en lugar de una citosina, en el presente documento una adenina en lugar de una citosina, y en la posición de base 143459907 otra base en lugar de una timina, en el presente documento una citosina en lugar de una timina, y en la posición de base 143453079 otra base en lugar de una citosina, en el presente documento una adenina en lugar de una citosina, esclerosis múltiple a la persona sometida a estudio o asignándose a la persona sometida a estudio un riesgo aumentado de enfermedad.

20 En el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la invención se extrae material corporal, preferentemente material celular y/o tisular, de la persona sometida a estudio. De forma particularmente preferente se extraen muestras de sangre. A partir de esto se aísla el ADN como soporte de la información genética y a continuación se identifica la secuencia y se compara con la secuencia de referencia en el lugar correspondiente del cromosoma humano 4 o del gen de Inpp4b. Para la identificación de la secuencia son adecuados diversos procedimientos conocidos por el experto que comprenden también una secuenciación del ADN. Para procedimientos que requieren una multiplicación del ADN, la amplificación de al menos una parte del gen se puede realizar con procedimientos conocidos por el experto. En el presente documento se pueden mencionar a modo de ejemplo PCR y/o LCR. Como alternativa caben mencionar procedimientos tales como la replicación de secuencia autosostenida (*self sustained sequence replication*), sistemas de amplificación transcripcional o Q-beta replicasas.

30 Ya que una secuenciación es muy compleja, para la identificación se emplean preferentemente procedimientos que no requieren ninguna secuenciación completa. Para esto caben mencionar métodos tales como procedimientos de pirosecuenciación que se ofertan, por ejemplo, por la empresa QIAGEN, procedimientos específicos para la detección de diferencias de ADN tales como Taqman®-PCR (ensayos basados en PCR a tiempo real (*Real-Time PCR-Based Assays*)) que se ofertan, por ejemplo, por la empresa AB Applied Biosystems o enfoques electroquímicos para la detección de ADN, tales como el GENSORIC® de la empresa Gensoric GmbH. En el documento EP 1 388 589 A1 (párrafos [0111] y siguientes) están descritos otros métodos que se aplican para la identificación.

Descripción de las figuras

50 Fig. 1 Están representadas dos de las estrategias de mapeo fino aplicadas. En la parte A de la figura está mostrado un retrocruzamiento de F1 con una cepa parental (FO). En la parte B de la figura está mostrado el entrecruzamiento de F1 con un hermano (F1).

55 Fig. 2 Está representada la comparación de fragmentos cromosómicos de ser humano, ratón y rata. Está representada la localización de QTL EAE 31 en las tres especies.

Fig. 3 Está representado esquemáticamente EAE 31 QTL en el ser humano (A) y en el ratón (B). El mapeo fino de EAE 31 indica el gen Inpp4b.

60 Fig. 4 Está mostrado el análisis de haplotipo, están indicados valores de p globales para sub-haplotipos basándose en la Tabla 3. La línea entre 2,5 y 3,0 muestra el valor límite de significación después de la corrección para ensayos múltiples.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento *in vitro* para el diagnóstico o prediagnóstico de esclerosis múltiple o para el establecimiento del riesgo de una persona sometida a estudio de enfermar de esclerosis múltiple, caracterizado por que se analiza al menos la base en la posición de base 143470133 (rs13102150) del cromosoma humano 4 en el gen de inositol-polifosfato-4-fosfatasa de tipo II, diagnosticándose en el caso de que esté presente allí una adenina en lugar de una citosina esclerosis múltiple a la persona sometida a estudio o asignándose a la persona sometida a estudio un riesgo mayor de enfermedad.
- 10 2. Procedimiento *in vitro* para el diagnóstico o prediagnóstico de esclerosis múltiple o para el establecimiento del riesgo de una persona sometida a estudio de enfermar de esclerosis múltiple de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que en el caso de que en la posición de base 143470133 (rs13102150) esté presente una adenina en lugar de una citosina y en la posición de base 143459907 (rs2059510) una citosina en lugar de una timina y en la posición de base 143453079 (rs17717651) una adenina en lugar de una citosina, se diagnostica esclerosis múltiple a 15 la persona sometida a estudio o se asigna a la persona sometida a estudio un riesgo mayor de enfermedad.
3. Procedimiento *in vitro* de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-2, caracterizado por que se analiza el material corporal, preferentemente material celular y/o tisular, extraído de la persona sometida a estudio.
- 20 4. Procedimiento *in vitro* de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que se analizan muestras de sangre extraídas de la persona sometida a estudio.
- 25 5. Procedimiento *in vitro* de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, caracterizado por que el ADN que se debe examinar se aísla de material corporal, preferentemente material celular y/o tisular, extraído de la persona sometida a estudio, preferentemente de muestras de sangre, y a continuación se identifica la secuencia.

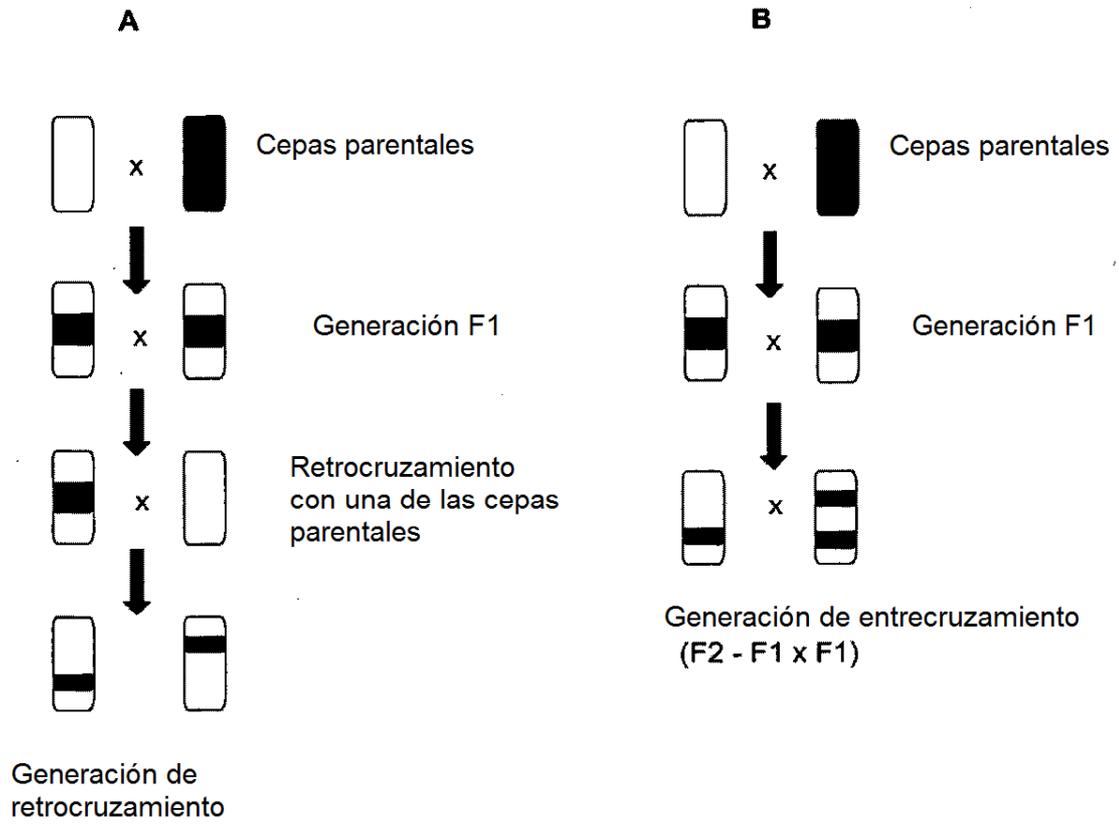


Fig. 1

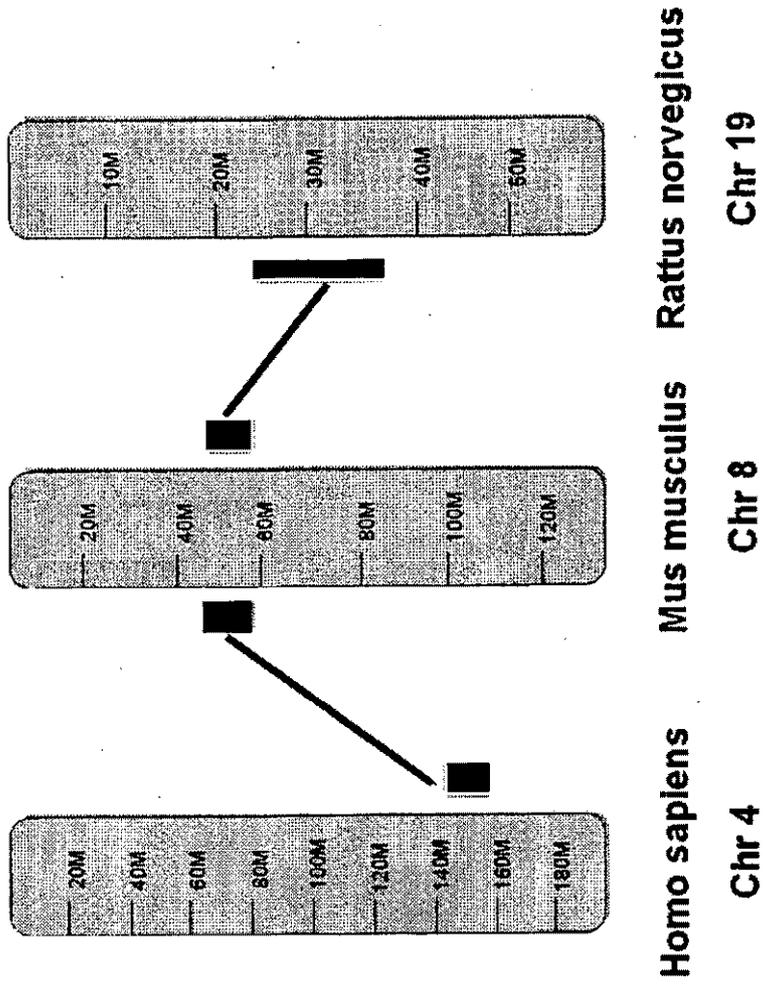


Fig. 2

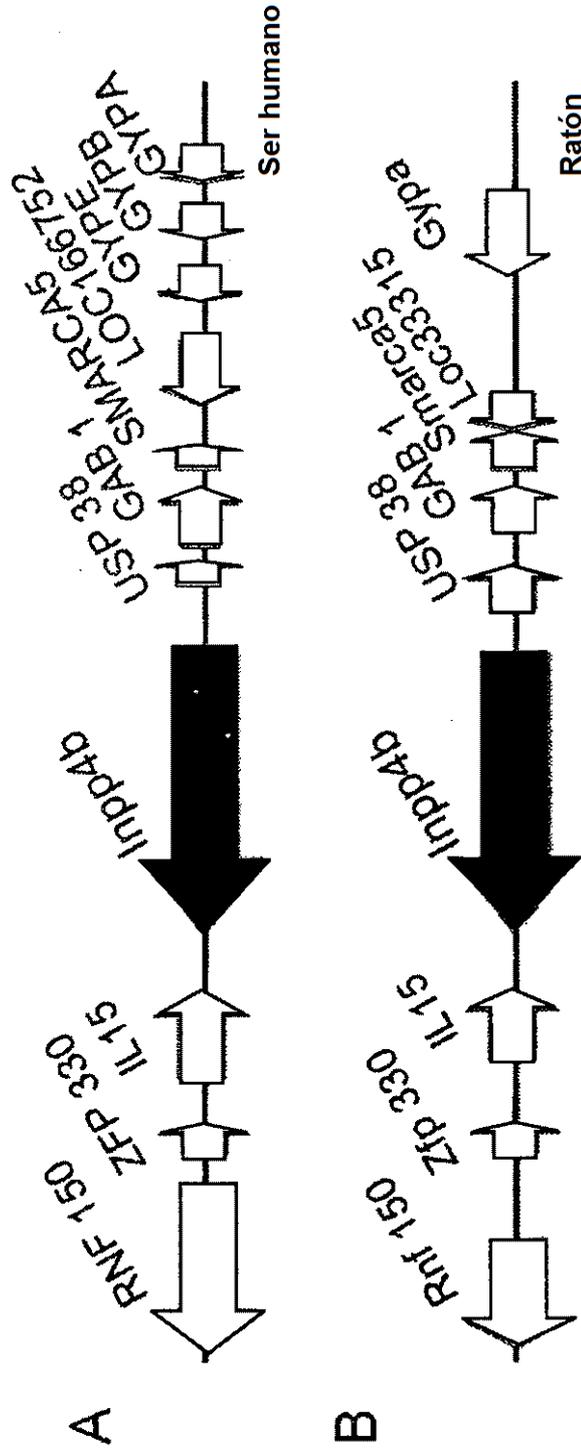


Fig. 3

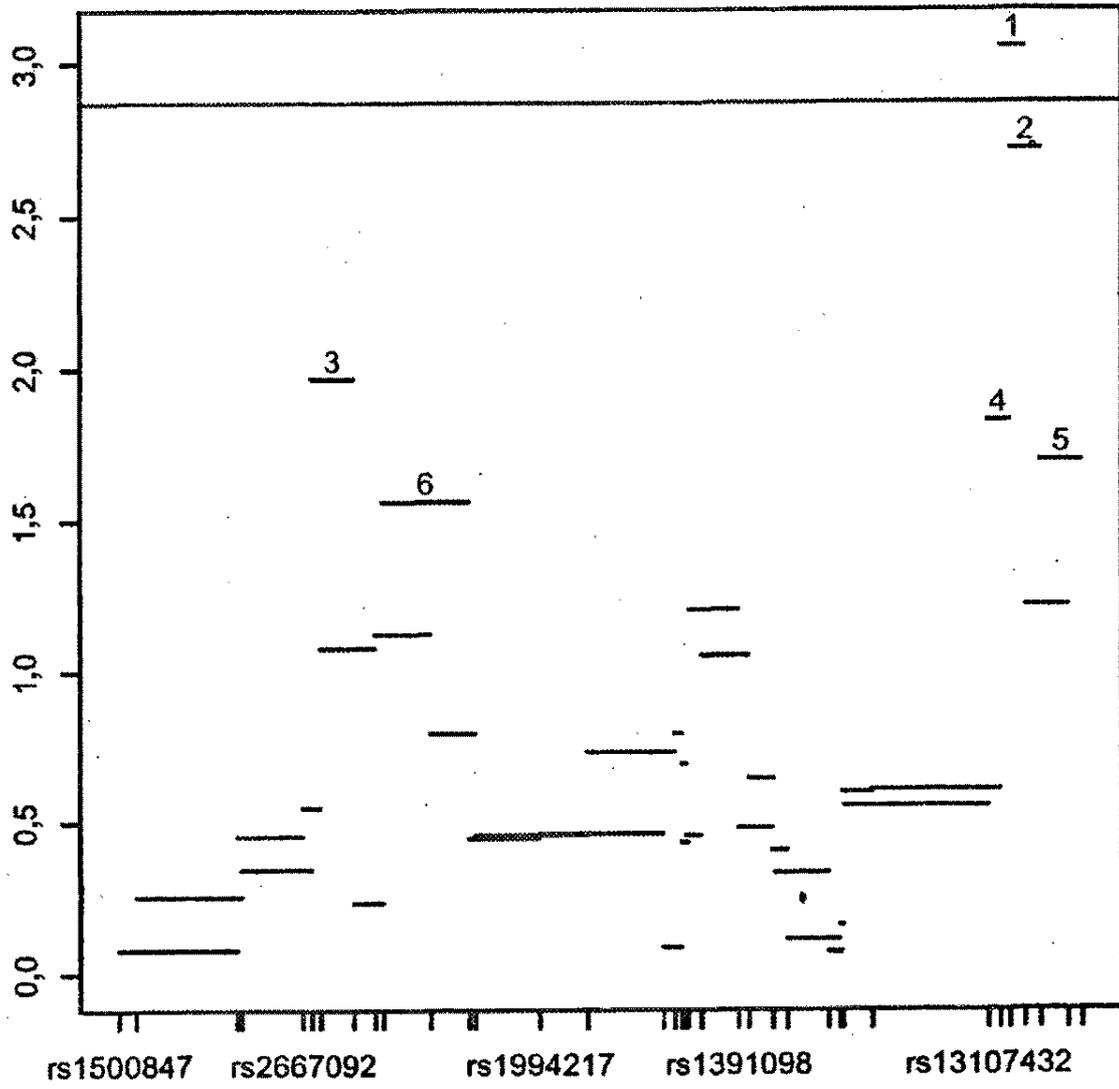


Fig. 4