



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 351 146**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04728336 .1**

96 Fecha de presentación : **20.04.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1618210**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

54 Título: **Asociación de los polimorfismos en el gen FRZB con la osteoporosis.**

30 Prioridad: **21.04.2003 US 464372 P**  
**02.12.2003 US 526689 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.02.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2011**

73 Titular/es: **ROCHE DIAGNOSTICS GmbH**  
**Sandhofer Strasse 116**  
**68305 Mannheim, DE**  
**F. Hoffmann-La Roche AG.**

72 Inventor/es: **Peltz, Gary, Allen;**  
**Fijal, Bonnie;**  
**Ro, Sunhee, Kwon;**  
**Li, Jia y**  
**Higuchi, Russell, Gene**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 351 146 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).

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN FRZB CON LA OSTEOPOROSIS**

5 **Descripción**

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La invención está relacionada con métodos y reactivos para detectar el riesgo de un individuo de padecer osteoporosis. Más en concreto, está relacionada con los métodos y reactivos para  
10 detectar el aumento o descenso de riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis mediante la identificación de la presencia de al menos un polimorfismo en el gen FRZB.

**ANTECEDENTES OF LA INVENCIÓN**

Los experimentos de transplantes de Spemann y Mangold  
15 (1924, Arch. Mikroskopische Anat. Entwicklungsmechanik, 100:599-638) establecieron la presencia de una región anatómica concreta, el organizador Spemann, o labio dorsal, que controla el patrón de desarrollo del eje corporal en los embriones de los vertebrados. Se encontró que los factores difundibles que salen de esta región  
20 están involucrados en diferentes procesos del desarrollo. La distribución de los pelos de la cutícula de *Drosophila* en una polaridad definida se encontró que estaba genéticamente controlada por "*frizzled*" (FZD1), un receptor transmembrana de 7 lazos con un gran dominio extracelular rico en cisteínas.

25 Los homólogos bovinos y humanos de FZD1 se clonaron mediante RT-PCR y mediante el cribaje de bibliotecas de cDNA de cartílago articular bovino y de placenta humana, que identificaron cDNA que codifican por FRZB, el análogo de mamífero de FZD1

(Hoang et al., 1996, J. Biol. Chem., 271:26131-26137). Las proteínas deducidas de 325 aminoácidos de FRZB bovino y humano comparten el 94% de identidad de aminoácidos. El análisis de las secuencias predijo que FRZB contiene un péptido señal de 25 aminoácidos, un sitio de N-glicosilación en N-terminal, un segmento transmembrana putativo de 24 aminoácidos, una región con múltiples sitios potenciales de fosforilación Ser/Thr, y un dominio C-terminal rico en serina. La región N-terminal de FRZB comparte el 50% de identidad de aminoácidos, incluyendo la conservación de los 10 residuos de Cys, con *frizzled*. El análisis por inmunoblot determinó que FRZB se expresa como una proteína de aproximadamente 36-kD. El análisis de hibridación in situ de los embriones humanos que representa las diferentes etapas de desarrollo, no detectaron expresión desde la semana 6 hasta la semana 13 excepto en el esqueleto apendicular en desarrollo, así como en varios huesos craneofaciales y extremos epifíseos de la caja torácica. El análisis inmunohistoquímico confirmó la expresión de FRZB en las estructuras esqueléticas en desarrollo.

El análisis Northern blot reveló que FRZB se expresa fuertemente en la placenta y el corazón, de forma moderada en el cerebro, músculo esquelético, riñón, y páncreas, y a niveles bajos en los pulmones e hígado (Leyns et al., 1997, Cell 88:747-756). El análisis SDS-PAGE detectó secreción de FRZB, posiblemente tras la escisión proteolítica, consistente con la falta de FRZB de los 7 dominios transmembrana encontrados en *Drosophila* y en la familia génica *frizzled* de vertebrados. EL análisis funcional en los embriones de *Xenopus* mostró que FRZB puede antagonizar los efectos iniciales y tardíos de la señalización de WNT8. Los genes WNT

de mamíferos incluye oncogenes que conducen a tumores en mamíferos. Para una mayor caracterización de FRZB, véase, por ejemplo, Dann et al., 2001, Nature 412:86-90; Rattner et al., 1997, Proc. Nat. Acad. Sci. 94:2859-2863; y Schumann et al., 2000, Cardio-  
5 vasc. Res. 45:720-728.

Leyns et al. (supra) mapearon el gen FRZB humano en 2q31-q33. Encontraron que la pérdida de una copia en el brazo 2q ocurre con una gran incidencia en los carcinomas de pulmón y colorectal, así como en neuroblastomas, y sugiere que FRZB puede funcionar como un gen supresor de tumores. Hoang et al. (supra) sugirió que FRZB puede jugar un papel en la morfogénesis del esqueleto. No obstante, no se ha identificado un papel directo para el gen FRZB en la enfermedad humana y el desarrollo.  
10

J. Loughlin et al (Rheumatology (2002); 41: 955-956) describe un estudio que localiza el locus de susceptibilidad genética de la osteoartritis de cadera en el cromosoma 2q24.3-q31.1. CJ Ciesielski et al (Arthritis and Rheumatism vol. 46, n° 9, (2002), página S274) describe 4 SNP en el gen FRZB que se encontró en pacientes con osteoartritis.  
15

Entre otros aspectos, la presente invención proporciona alelos de FRZB, identificados por la presencia de uno o más polimorfismos de predisposición o protectores, que están asociados con una aumento o descenso del riesgo de osteoporosis. Se obtendrá un completo entendimiento de la invención tras revisar lo que  
20 viene a continuación.

#### **RESUMEN DE LA INVENCION**

La invención proporciona métodos, reactivos y equipos para detectar un aumento o descenso del riesgo de un individuo para

enfermedades osteoporóticas y enfermedades relacionadas. En ciertas realizaciones, se utilizan los métodos para determinar el riesgo de un individuo para la osteoporosis y enfermedades relacionadas. En otras realizaciones, los métodos para determinar el riesgo se combina con métodos clínicos conocidos para diagnosticar la osteoporosis.

Una clase general de realizaciones proporciona métodos para determinar el riesgo de un individuo por la osteoporosis. En los métodos, se detecta la presencia de al menos un polimorfismo relacionado con la osteoporosis en el gen de la proteína relacionada con *frizzled* (FRZB) en una muestra de ácidos nucleicos del individuo. La presencia de al menos un polimorfismo proporciona una indicación del riesgo del individuo para la osteoporosis. El riesgo de un individuo para la osteoporosis puede ser, por ejemplo, un aumento del riesgo o una disminución del riesgo si se compara con un individuo sin al menos un polimorfismo (por ejemplo, un individuo con un alelo diferente en el sitio del polimorfismo). De acuerdo con esto, al menos un polimorfismo puede comprender un polimorfismo de predisposición o de protección en el gen FRZB.

El polimorfismo puede comprender en esencia cualquier polimorfismo(s) adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, DNA polimórfico amplificado aleatorio, polimorfismos de longitud de fragmentos arbitrarios, repeticiones de secuencias sencillas, polimorfismos de conformación de cadenas sencillas, y secuencias variables amplificadas. En una clase preferible de realizaciones, el polimorfismo comprende al menos un polimorfismo de nucleótido único

(SNP). Por ejemplo, el polimorfismo puede ser un alelo de T2303723C, C18679T, G19524A, T19575G, T22242A, G23043A, G23415A, T23549C, A24791G, C26794G, o G27014A. En una clase de realizaciones, el al menos un polimorfismo se selecciona del grupo que consiste en: alelo C de C18679T, alelo T de C18679T, alelo G de G19524A, alelo A de G19524A, alelo A de A24791G, alelo G de A24791G, alelo C de C26794G, alelo G de C26794G, alelo G de G27014A, y alelo A de G27014A.

En una clase de realizaciones, la presencia de dos o más polimorfismos se detecta (por ejemplo, dos o más polimorfismos en un sitio único de polimorfismo y/o en sitios diferentes de polimorfismo, por ejemplo, un haplotipo). Al menos uno de dos o más polimorfismos (por ejemplo, todos los polimorfismos) se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en: el alelo C de C18679T, el alelo T de C18679T, el alelo G de G19524A, el alelo A de G19524A, el alelo A de A24791G, el alelo G de A24791G, el alelo C de C26794G, el alelo G de C26794G, el alelo G de G27014A, y el alelo A de G27014A.

La muestra de ácido nucleico normalmente comprende DNA o RNA. La presencia de al menos un polimorfismo en la muestra de ácido nucleico puede detectarse mediante cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, el polimorfismo puede detectarse secuenciando, por ejemplo, secuenciando la región del gen FRZB que incluye los sitio(s) polimórficos. La región de FRZB se amplifica opcionalmente antes del paso de secuenciación. Como otro ejemplo, el polimorfismo se detecta mediante amplificación, por ejemplo, de la región del gen FRZB que incluye los sitio(s) polimórficos. La amplificación puede ser, por ejemplo, una amplifica-

ción específica de alelo. La amplificación puede comprender una reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, una PCR cinética), una reacción en cadena de la ligasa o similares. En otro ejemplo, el polimorfismo puede detectarse mediante hibridación de una sonda de ácido nucleico. Así, en una clase de realizaciones, para detectar el polimorfismo, la muestra de ácido nucleico se pone en contacto con al menos un oligonucleótido específico de secuencia bajo condiciones (por ejemplo, condiciones astringentes) que permiten la unión de al menos un oligonucleótido a la muestra de ácido nucleico. Los oligonucleótidos específicos de secuencia hibridan bajo condiciones astringentes con una región del gen FRZB que comprende al menos un polimorfismo relacionado con la osteoporosis. La hibridación de al menos un oligonucleótido con la muestra de ácidos nucleicos se detecta entonces. En una clase de realizaciones relacionadas, la región FRZB que comprende el(los) polimorfismo(s) se amplifica antes de la hibridación con la sonda. Así, en esta clase de realizaciones, la muestra de ácido nucleico se amplifica para proporcionar una muestra de ácido nucleico amplificada. La muestra de ácido nucleico amplificada se pone en contacto con al menos un oligonucleótido específico de secuencia bajo condiciones que permiten la unión del oligonucleótido a la muestra de ácido nucleico amplificada (por ejemplo, condiciones astringentes). El al menos un oligonucleótido específico de secuencia hibrida bajo condiciones astringentes con una región del gen FRZB que comprende al menos un polimorfismo relacionado con la osteoporosis. Se detecta la hibridación de al menos un oligonucleótido específico de secuencia con la muestra de ácido nucleico amplificada. La presencia de al menos un polimor-

fismo relacionado con la osteoporosis puede, por ejemplo, detectarse de forma cualitativa o cuantitativa.

En ciertas realizaciones, la presencia de polimorfismo heredado de uno de los padres del individuo proporciona una indicación del riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis (por ejemplo, cuando el alelo FRZB asociado ejerce un efecto dominante, por lo que la herencia del polimorfismo de uno de los padres es suficientemente predictiva). En otras realizaciones, la presencia del polimorfismo heredado de los dos padres del individuo proporciona una indicación del riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis.

Tal como se ha dicho, los métodos se combinan opcionalmente con métodos clínicos conocidos, por ejemplo, para diagnosticar osteoporosis. Así, los métodos opcionalmente incluyen la realización de al menos una prueba clínica para detectar la osteoporosis (por ejemplo, un ensayo de recambio óseo o un escáner óseo).

Otra clase general de realizaciones proporciona métodos para determinar el riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis. En los métodos, se determina el genotipo del individuo en uno o más sitios polimórficos en un gen FRZB. Un primer genotipo en los sitios polimórficos se asocia estadísticamente con un aumento del riesgo por osteoporosis si se compara con un segundo genotipo en uno o más sitios polimórficos. Así, por ejemplo, si el genotipo del individuo corresponde con el primer genotipo, el riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis es mayor que la de otros individuos que poseen el segundo genotipo.

Cada sitio polimórfico puede comprender uno o más nucleótidos. En una clase preferible de realizaciones, al menos uno de

los sitios polimórficos consiste en una posición de nucleótido única (es decir, el individuo se genotipa para uno o más SNP, por ejemplo, un grupo y/o un haplotipo de SNP). En ciertas realizaciones, un grupo de sitios polimórficos consiste cada uno de un  
5 posición de nucleótido única (por ejemplo, posición 2628, 18679, 19524, 19575, 22242, 23043, 23415, 23549, 24791, 26794, o 27014 de Id. de Sec. N°:1). Por ejemplo, al menos uno de los sitios polimórficos puede seleccionarse del grupo que consiste en: posición de nucleótido 2628, posición de nucleótido 18679, posición  
10 de nucleótido 19524, posición de nucleótido 22242, posición de nucleótido 24791, posición de nucleótido 26794, y posición de nucleótido 27014 de Id. de Sec. N°:1.

En algunas realizaciones, la presencia de un alelo único de un polimorfismo particular es suficiente para indicar si el riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis está aumentado o disminuido. En otras realizaciones, dos copias de un alelo de un polimorfismo particular debe estar presente para indicar un aumento o descenso del riesgo de osteoporosis (por ejemplo, cuando el efecto es recesivo de forma que ambos cromosomas homólogos deben llevar el alelo). Así, en una clase de realizaciones, el primer genotipo está estadísticamente asociado con un aumento del riesgo de sufrir osteoporosis si se compara con el segundo genotipo. El primer genotipo comprende dos alelos C y el segundo genotipo dos alelos T o un alelo T y un alelo C de SNP C18679T; el primer genotipo comprende dos alelos G y el segundo genotipo dos alelos A  
20 o un alelo A y un alelo G de SNP G19524A; el primer genotipo comprende dos alelos A y el segundo genotipo dos alelos G o un alelo G y un alelo A de SNP A24791G; el primer genotipo comprende dos  
25

alelos C y el segundo genotipo dos alelos G o un alelo C y un alelo G de SNP C26794G; y/o el primer genotipo comprende dos alelos G y el segundo genotipo dos alelos A o un alelo G y un alelo A de SNP G27014A.

5           Determinar el genotipo del individuo normalmente implica obtener una muestra de ácido nucleico del individuo. Determinar el genotipo del individuo puede implicar la amplificación de al menos una porción del gen FRZB de la muestra de ácido nucleico, la porción comprende al menos uno de uno o más sitios polimórficos. Dicha amplificación puede ser, por ejemplo, para determinar  
10           directamente el genotipo o para facilitar la detección de uno o más polimorfismos mediante un paso adicional. En una clase de realizaciones, el genotipo del individuo se determina mediante la realización de una amplificación específica de alelo o una reacción de extensión específica de alelo. En otras clase de realiza-  
15           ciones, el genotipo del individuo se determina mediante la secuenciación de al menos una porción del gen FRZB de la muestra de ácido nucleico, la porción comprende al menos uno de uno o más sitios polimórficos. en otra clase de realizaciones, el genotipo  
20           del individuo se determina mediante la hibridación de una sonda de ácido nucleico, opcionalmente tras la amplificación de al menos una porción del gen FRZB. En una clase de ejemplo de realizaciones, al menos uno de uno o más sitios polimórficos consiste en una posición de nucleótido única. En estas realizaciones, la  
25           muestra de ácido nucleico se pone en contacto con al menos un oligonucleótido específico de secuencia bajo condiciones astringentes. El oligonucleótido hibrida bajo las condiciones astringentes a la muestra de ácido nucleico cuando un primer nucleótido

ocupa la posición de nucleótido que define el sitio polimórfico pero no cuando un segundo nucleótido ocupa la posición de nucleótido. Se detecta la hibridación del oligonucleótido a la muestra de ácido nucleico.

5           Un aspecto de la invención proporciona equipos para detectar la presencia de un primer polimorfismo de predisposición o protector en un gen FRZB, por ejemplo, en una muestra de ácido nucleico de un individuo cuyo riesgo de sufrir osteoporosis y/o

10           obesidad está siendo evaluado. Así, una clase general de realizaciones proporcionan un equipo que incluye uno o más primer oligonucleótido capaz de detectar el primer polimorfismo e instrucciones para detectar el primer polimorfismo con uno o más primer oligonucleótido y para correlacionar dicha detección con el riesgo de un individuo para sufrir osteoporosis y/o obesidad, empaquetado en uno o más recipientes.

15

          Esencialmente todas las características indicadas para las realizaciones del método anterior, se aplican a esta realización también. Por ejemplo, en una clase preferible de realizaciones, el primer polimorfismo es un polimorfismo de nucleótido único,

20           por ejemplo, un SNP seleccionado del grupo que consiste en: el alelo T de T2303723C, el alelo C de T2303723C, el alelo C de C18679T, el alelo T de C18679T, el alelo G de G19524A, el alelo A de G19524A, el alelo T de T22242A, el alelo A de T22242A, el alelo A de A24791G, el alelo G de A24791G, el alelo C de C26794G, el

25           alelo G de C26794G, el alelo G de G27014A, y el alelo A de G27014A. Otro SNP potencial incluye, pero no se limita a, cualquier alelo de T19575G, G23043A, G23415A, y T23549C.

          En un aspecto, el equipo puede utilizarse para detectar la

presencia del primer polimorfismo mediante la hibridación de una sonda de ácido nucleico con el polimorfismo. Así, en una clase de realizaciones, el primer oligonucleótido comprende al menos una sonda. En ciertas realizaciones, el primer oligonucleótido hibrida bajo condiciones astringentes con una región del gen FRZB que comprende el primer polimorfismo. En una clase de realizaciones, el primer polimorfismo es un primer polimorfismo de nucleótido único que comprende un primer nucleótido en una posición de primer nucleótido. En esta clase de realizaciones, bajo condiciones astringentes, el primer oligonucleótido hibrida con una región del gen FRZB que comprende el primer polimorfismo de nucleótido único con una relación señal-ruido que es al menos de 2x (por ejemplo, al menos 5x o al menos 10x) la relación señal-ruido en la que el primer oligonucleótido hibrida con la región del gen FRZB comprende un segundo nucleótido en la posición del primer nucleótido. El primer oligonucleótido es normalmente completamente complementario con la región del gen FRZB que comprende el primer polimorfismo, y normalmente comprende al menos alrededor de 10 nucleótidos complementarios contiguos al gen FRZB.

Para facilitar la detección del polimorfismo (por ejemplo, a través de la detección de la hibridación entre el conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales y un ácido nucleico que comprende el polimorfismo), por ejemplo, el conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales opcionalmente comprende un marcaje, por ejemplo, un marcaje isotópico, fluorescente, fluorogénico, luminiscente o colorimétrico. En algunas realizaciones, el marcaje en sí produce directamente una señal detectable (por ejemplo, un marcaje fluorescente). En otras realizaciones, el equipo tam-

bién incluye un reactivo que detecta el marcaje (por ejemplo, una enzima que escinde un marcaje colorimétrico, una porción de unión, o similares).

En un aspecto, el conjunto de uno o más oligonucleótidos  
5 iniciales comprende uno o más cebadores. El(los) cebador(es) pueden utilizarse para detectar el polimorfismo, por ejemplo, en una amplificación específica de alelo o reacción de extensión. Por ejemplo, en una clase de realizaciones, el primer polimorfismo es un primer polimorfismo de nucleótido único que comprende un pri-  
10 mer nucleótido en una posición de primer nucleótido, y el nucleótido 3' del conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales es complementario al primer nucleótido.

El(los) cebador(s) pueden utilizarse para amplificar una región de FRZB que comprende el polimorfismo, por ejemplo, para  
15 la posterior detección del polimorfismo mediante hibridación, secuenciación o similares. En una clase de realizaciones, el conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales comprende cebadores de amplificación, en la que los cebadores de amplificación amplifican una secuencia de ácido nucleico que comprende el primer po-  
20 limorfismo. En una clase relacionada de realizaciones, el conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales comprende secuenciar cebadores que flanquean el primer polimorfismo.

El conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales está opcionalmente inmovilizado en un sustrato. El sustrato puede ser,  
25 por ejemplo, un sustrato plano o un sustrato con cuentas. El(los) oligonucleótido(s) puede(n) organizarse en un chip de oligonucleótidos utilizado para detectar otros polimorfismos, por ejemplo, otros polimorfismos en FRZB.

El equipo puede utilizarse opcionalmente para detectar más de un polimorfismo (de forma simultanea o secuencial). Así, en una clase de realizaciones, el equipo también incluye un conjunto de uno o más segundos oligonucleótidos capaces de detectar un se-  
5 gundo polimorfismo (y opcionalmente tercer, cuarto, quinto, etc. oligonucleótidos capaces de detectar un tercer, cuarto, quinto, etc. polimorfismo). El segundo polimorfismo puede estar en el mismo sitio polimórfico que el primer sitio o en un sitio poli-  
mórfico diferente (en FRZB o un gen diferente), y puede ser pro-  
10 tector o de predisposición.

Una clase general de realizaciones proporciona chips para detectar la presencia de uno o más polimorfismos de predisposición y/o protectores en un gen FRZB, por ejemplo, en una muestra de ácido nucleico de un individuo cuyo riesgo de sufrir osteopo-  
15 rosis está siendo evaluado. En una clase de realizaciones, el chip comprende un sustrato y una serie de oligonucleótidos, cada uno de los cuales hibrida con una región del gen FRZB que comprende al menos uno de los polimorfismos. La hibridación detecta la presencia del polimorfismo, y esta detección proporciona una  
20 indicación del riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis. La pluralidad de oligonucleótidos está inmovilizada en el sustrato. Normalmente, el chip se utiliza para detectar la presencia de un grupo de polimorfismos, por ejemplo, alelos múltiples en un sitio polimórfico único y/o sitios polimórficos diferentes.

25 Esencialmente todas las características descritas para el método y realizaciones del equipo anteriores aplican también a esta realización. Por ejemplo, el conjunto de uno o más polimorfismos preferiblemente comprende uno o más polimorfismos de nu-

cleótido único. Por ejemplo, al menos uno del conjunto de uno o más polimorfismos puede seleccionarse del grupo que consiste en: el alelo T de T2303723C, el alelo C de T2303723C, el alelo C de C18679T, el alelo T de C18679T, el alelo G de G19524A, el alelo A de G19524A, el alelo T de T22242A, el alelo A de T22242A, el alelo A de A24791G, el alelo G de A24791G, el alelo C de C26794G, el alelo G de C26794G, el alelo G de G27014A, y el alelo A de G27014A. Otros SNP potenciales incluyen, pero no se limitan a, cualquier alelo de T19575G, G23043A, G23415A, y T23549C.

10           En una clase de realizaciones en que el chip puede utilizarse para detectar la presencia de uno o más SNP, cada uno de los oligonucleótidos en el chip hibrida bajo condiciones estrictas con una región del gen FRZB que comprende uno de los polimorfismos de nucleótido únicos con una proporción de señal-ruido de al menos 2x (por ejemplo, al menos 5x o al menos 10x) en la que el oligonucleótido hibrida con una región del gen FRZB que comprende cualquiera de los restantes polimorfismos de nucleótido únicos. Normalmente, se utiliza un oligonucleótido para detectar un SNP; es decir, cada uno de los oligonucleótidos normalmente  
15           hibrida con un polimorfismo de nucleótido único distinto.

20           Como se ha dicho antes, el grupo de oligonucleótidos se inmoviliza en un sustrato, por ejemplo, un sustrato plano, una membrana, un portaobjetos o similares. Normalmente, cada grupo de oligonucleótidos se inmoviliza en una posición conocida, predefinida del sustrato.

25           Para facilitar la detección de polimorfismos mediante hibridación específica con el oligonucleótido, cada grupo de oligonucleótidos es normalmente completamente complementario con una

región del gen FRZB que comprende uno de los polimorfismos, y cada grupo de oligonucleótidos normalmente comprende al menos de alrededor de 10 nucleótidos contiguos complementarios con el gen FRZB. Cada grupo de oligonucleótidos opcionalmente comprende un  
5 marcaje, por ejemplo, un marcaje que facilita la detección de la hibridación entre el oligonucleótido y el correspondiente polimorfismo.

El chip forma parte opcionalmente de un sistema. Así, una clase de realizaciones proporciona un sistema que comprende un  
10 chip de la invención y un sistema de instrucciones que correlaciona la detección de la presencia de uno o más polimorfismos de predisposición o protectores con el riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

15 La Figura 1 describe ejemplos de SNP de FRZB. Se muestran nueve pares de bases centradas en cada SNP; la cadena superior corresponde con la cadena cuya secuencia se muestra en Id. de Sec. N°:1. los alelos SNP ilustrados son: alelo C de C18679T (Panel A), alelo T de C18679T (Panel B), alelo G de G19524A (Panel  
20 C), alelo A de G 19524A (Panel D), alelo T de T19575G (Panel E), alelo G de T19575G (Panel F), alelo T de T22242A (Panel G), alelo A de T22242A (Panel H), alelo G de G23043A (Panel I), alelo A de G23043A (Panel J), alelo G de G23415A (Panel K), alelo A de G23415A (Panel L), alelo de T23549C (Panel M), alelo C de T23549C  
25 (Panel N), alelo A de A24791G (Panel O), alelo G de A24791G (Panel P), alelo C de C26794G (Panel Q), alelo G de C26794G (Panel R), alelo G de G27014A (Panel S), alelo A de G27014A (Panel T), alelo T de T2303723C (Panel U), y alelo C de T2303723C (Panel V).

**DEFINICIONES**

Antes de describir la invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a dispositivos o sistemas biológicos particulares, que pueden variar, por descontado. Debe también entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene como propósito describir tan solo realizaciones particulares, y no pretende ponerles límite.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento poseen el mismo significado que el que se entiende normalmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención. Las siguientes definiciones complementan las de la materia y están dirigidas a la presente solicitud y no deben imputarse a cualquier otro caso relacionado o no relacionado, por ejemplo, a cualquier patente o solicitud propia. Aunque puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento, para la práctica de análisis de la invención, los materiales y métodos preferibles se describen en este documento. En la descripción y reivindicaciones de la invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones descritas anteriormente.

Tal como se utiliza en esta especificación y las reivindicaciones anexadas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluye los plurales a no ser que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, en referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células; en referencia a "bacteria" incluye mezclas de bacterias, y similares.

Tal como se utiliza en el documento, los términos "ácido

nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a polímeros de nucleótido de cadena sencilla o de doble cadena que comprende más de dos subunidades de nucleótido unidas covalentemente. Los nucleótidos pueden comprender desoxiribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), ribonucleótidos (que contienen D-ribosa), y/o cualquier otro N-glicósido de una base de purina o pirimidina, o base de purina o pirimidina modificada, o cualquier combinación de las mismas. Los grupos de azúcar de las subunidades de nucleótido pueden también comprender derivados modificados de ribosa o desoxiribosa, como O-metilribosa. Las subunidades de nucleótido de un oligonucleótido pueden unirse mediante enlaces fosfodiéster, enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato o mediante otros enlaces, que incluye, pero no se limita a, enlaces raros o que no suceden normalmente, que no previenen la hibridación del oligonucleótido. Además, un oligonucleótido puede tener nucleótidos infrecuentes o porciones que no son nucleótidos. Con la adición de dichos análogos como ácidos nucleicos bloqueados (LNA), el tamaño de los cebadores y sondas pueden reducirse en tan solo 8 ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos bloqueados son una nueva clase de análogos bicíclicos de DNA en que las posiciones 2' y 4' en el anillo furanosa están unidos mediante una porción O-metileno (oxi-LNA), S-metileno (tio-LNA), o amino metileno (amino-LNA).

Las sondas de oligonucleótido y los oligonucleótidos de amplificación de una secuencia definida pueden producirse mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia, como la síntesis química o bioquímica, y mediante expresión in vitro o in vivo de moléculas de ácido nucleico recombinante, por ejemplo, vecto-

res bacterianos o retrovirales. Tal como se utiliza aquí, un oligonucleótido no consiste del DNA cromosómico de tipo salvaje o los productos de transcripción in vivo de los mismos.

Los oligonucleótidos que son secuencias de cebador y/o de  
5 sondas, tal como se describe más adelante, pueden comprender análogos de DNA, RNA o ácido nucleico como análogos de ácido nucleico sin carga que incluye, pero no se limita a, péptido de ácidos nucleicos (PNA), que se describen en la Solicitud de Patente Internacional WO 92/20702, o análogos de morfolino, que se describen en Pat. Estadounidenses N° 5.185.444, 5.034.506, y 5.142.047.  
10 Dichas secuencias pueden sintetizarse de forma rutinaria utilizando una serie de técnicas disponibles en la actualidad. Por ejemplo, una secuencia de DNA puede sintetizarse utilizando química convencional de fosforamidita de nucleótido y los instrumentos disponibles de Applied Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.); DuPont (Wilmington, Del.); o Milligen (Bedford, Mass.). De forma similar, y cuando se desee, las secuencias pueden marcarse utilizando las metodologías conocidas en la técnica como las descritas en las Pat. Estadounidenses N° 5.464.746, 5.424.414 y  
20 4.948.882. Los oligonucleótidos (incluyendo, por ejemplo, oligos marcados o modificados) pueden también solicitarse a una serie de fuentes comerciales conocidas por los expertos en la materia. En esencia cualquier ácido nucleico puede solicitarse a gusto de cada uno de cualquier fuente comercial, por ejemplo, The Midland  
25 Certified Regent Company ([www.mcrc.com](http://www.mcrc.com)), La Great American Gene Company ([www.genco.com](http://www.genco.com)), ExpressGen Inc. ([www.expressgen.com](http://www.expressgen.com)), y QIAGEN (<http://oligos.qiagen.com>), entre otras.

Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido o oligonu-

cleótido puede comprender las cinco bases naturales (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases diferentes de las cinco bases naturales. Estas bases pueden servir para varios propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para promover o inhibir la degradación de sondas; o como puntos de anclaje para las porciones detectables o porciones bloqueadoras. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener una o más porciones modificadas, no usuales, o de bases derivadas, que incluye, pero no se limita a, N6-metil-adenina, N6-terc-butyl-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-carboximetilamino-metiluracilo, 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-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, uracil-5-oxiacetato de metilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidine. Otros ejemplos de porciones de bases modificadas, no usuales, o porciones de base derivadas pueden encontrarse en las Patentes Estadounidenses N° 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, nucleótido, polinucleótido o oligonucleótido puede comprender una o más porciones modificadas de azúcar que incluyen, pero no se limitan a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa. Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido o oligonucleótido puede comprender enlaces fosfodiéster o enlaces modificados que incluye, pero no se limita a fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato con puentes, metilfosfonato con puentes, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato con puentes o enlaces sulfona, y combinaciones de dichos enlaces.

Una molécula de ácido nucleico "aislado", tal como se utiliza aquí, es una que está separada de las secuencias de nucleótido que normalmente flanquean la molécula de ácido nucleico y/o se ha purificado completa o parcialmente a partir de otro material biológico (por ejemplo, una proteína) normalmente asociada con el ácido nucleico.

La molécula de ácido nucleico puede fusionarse con otras secuencias codificantes o reguladoras y aún debe considerarse aislada. Así, el DNA recombinante contenido en un vector se incluye en la definición de "aislado" tal como se utiliza aquí. También, las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen moléculas de DNA recombinante en células huésped heterólogas, así como moléculas de DNA parcialmente o sustancialmente purificadas en solución. Las moléculas de ácido nucleico "aisladas" también abarcan transcritos de RNA in vivo e in vitro de las moléculas de DNA de la invención. Una molécula de ácido nucleico aislada o secuencia de nucleótido puede incluir una molécula de ácido nucleico

co o secuencia de nucleótido que se sintetiza químicamente o mediante métodos recombinantes. También, los polinucleótidos aislados incluyen moléculas de DNA recombinante en organismos heterólogos, así como parcialmente o sustancialmente moléculas de DNA purificadas en solución. Los transcritos de RNA in vivo e in vitro de las moléculas de DNA de la invención también están abarcadas por las secuencias de nucleótido "aisladas". Dichos polinucleótidos son útiles, por ejemplo, como cebadores y/o sondas para detectar polimorfismos, en la fabricación del polipéptido codificado, como sondas para aislar secuencias homólogas (por ejemplo, de otras especies de mamíferos), para el mapeado génico (por ejemplo, mediante hibridación in situ con cromosomas), o para detectar la expresión de genes en tejidos (por ejemplo, tejido humano), como el análisis Northern blot.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas pueden ser RNA, mRNA, DNA, o cDNA, por ejemplo, y pueden ser de cadena doble o sencilla. Pueden codificar una cadena sentido, las regiones no codificantes, y/o la cadena antisentido. La molécula de ácido nucleico puede incluir toda o una porción de la secuencia codificante del gen y puede comprender además regiones no codificantes adicionales como intrones y secuencias 3' y 5' no codificantes (incluyendo, por ejemplo secuencias reguladoras). De forma adicional, la molécula de ácido nucleico puede fusionarse a una secuencia marcadora, por ejemplo, una secuencia que puede utilizarse para purificar la molécula de ácido nucleico.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención puede comprender uno o más residuos de nucleótido modificados. La modificación puede ser en la base, azúcar y/o porción fosfato e inclu-

ye, por ejemplo, halogenación, hidroxilación, alquilación, un enlazante unido y/o un marcaje. Las modificaciones pueden comprender además, por ejemplo, marcajes, metilación, modificaciones internucleótido como enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos), enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos), porciones colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno), quelantes, alquilantes, y enlaces modificados (por ejemplo, ácido nucleicos alfa anoméricos). También se incluyen las moléculas sintéticas que imitan moléculas de ácido nucleico en su capacidad de unión a una secuencia diseñada mediante puentes de hidrógeno y otras interacciones químicas. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, aquellas en que los enlaces peptídicos sustituyen los enlaces fosfato en el esqueleto de la molécula.

En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen, pero no se limitan a, mRNA de FRZB, cDNA y/o moléculas de DNA genómico. Las moléculas de ácido nucleico de la invención también incluyen oligonucleótidos, por ejemplo, un oligonucleótido comprende uno o más de los SNP de FRZB descritos aquí.

Tal como se utiliza aquí, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que posee una especificidad de hibridación suficiente para la iniciación de una polimerización enzimática bajo condiciones predeterminadas, por ejemplo en una técnica de amplificación como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un proceso de secuenciación, en un método de transcripción inversa y/o similares.

Tal como se utiliza aquí, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido con una especificidad de hibridación suficiente para unirse a una secuencia diana definida bajo condiciones predeterminadas, por ejemplo en una técnica de amplificación como una reacción de 5'-nucleasa, en un método de detección dependiente de la hibridación, como un Southern o Northern blot, y/o similares. Los cebadores y sondas pueden utilizarse en una serie de formas y pueden definirse mediante el uso específico. Por ejemplo, una "sonda de captura" se inmoviliza o puede inmovilizarse en un soporte sólido mediante un método apropiado, que incluye, pero no se limita a: enlaces covalentes, adsorción, interacción hidrofóbica y/o electrostática, o mediante síntesis directa en un soporte sólido (véase en particular la solicitud de patente WO 9210092). Una "sonda de detección" puede marcarse por medio de un marcador escogido, por ejemplo, de entre isótopos radioactivos, enzimas, en particular enzimas capaces de actuar en un sustrato cromogénico, fluorescente o luminiscente (en particular una peroxidasa o una fosfatasa alcalina), compuestos cromofóricos químicos, cromogénicos, fluorogénicos o compuestos luminiscentes, análogos de bases de nucleótido, y ligandos como biotina. Los compuestos fluorescentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, carboxifluoresceína, tetraclorofluoresceína, hexaclorofluoresceína, Cy3, tetrametilrodamina, Cy3.5, carboxi-x-rodamina, rojo Texas, Cy5, y Cy5.5. Los compuestos luminiscentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, luciferina y 2,3-dihidroftalazinedionas, como luminol.

Todos los oligonucleótidos, cebadores y sondas de la invención, tanto si las sondas de ensayo de hibridación, cebadores de

amplificación, u otros oligonucleótidos, pueden modificarse con grupos químicos para aumentar su rendimiento o para facilitar la caracterización de los productos de amplificación. Por ejemplo, oligonucleótidos modificados en su estructura como los que tienen

5 grupos fosforotioato o metilfosfonato que proporcionan a los oligonucleótidos resistencia a la actividad nucleolítica de ciertas polimerasas o las enzimas nucleasas pueden permitir el uso de dichas enzimas en una amplificación u otra reacción. Otro ejemplo de modificación implica el uso de enlazantes no nucleótidos (por

10 ejemplo, Arnold, et al., "Reactivos de unión no nucleotídicos para sondas de nucleótido", PE 0 313 219) incorporada entre nucleótidos en la cadena de ácido nucleico que no interfiere con la hibridación o la elongación del cebador. Los oligonucleótidos de amplificación pueden también contener mezclas de los nucleótidos

15 deseados modificados y naturales.

El extremo 3' de un cebador de amplificación o una sonda puede opcionalmente bloquearse para prevenir la iniciación de la síntesis de DNA como se describe por McDonough, et al., titulado

"Amplificación de secuencias de ácidos nucleicos", WO94/03472 que

20 goza de propiedad común con la invención. Una mezcla de diferentes oligonucleótidos de amplificación bloqueados en 3', o de oligonucleótidos bloqueados y no bloqueados en 3', puede aumentar la eficiencia de la amplificación de ácido nucleico, como se ha descrito allí. El extremo 5' de los oligonucleótidos puede modificarse

25 para ser resistente a la actividad exonucleasa 5' presente en algunas polimerasas de ácido nucleico. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo añadiendo un grupo no nucleótido al nucleótido terminal 5' del cebador utilizando técnicas como las

descrita en Arnold, et al., supra, titulado "Reactivos de unión no nucleotídicos para sondas de nucleótido".

Una vez sintetizado, las sondas de oligonucleótido seleccionadas pueden marcarse mediante cualquiera de los métodos conocidos (por ejemplo, J. Sambrook, infra). Los marcajes útiles incluyen radioisótopos así como grupos marcadores no radioactivos. Los marcajes isotópicos incluye  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{57}\text{Co}$  y  $^{14}\text{C}$ . Los marcajes isotópicos pueden introducirse en el oligonucleótido mediante técnicas conocidas en la materia como la traslación de la mella ("*nick translation*", marcaje de extremos, síntesis de segunda cadena, uso de transcripción inversa, y mediante métodos químicos. Cuando se utilizan sondas de hibridación radiomarcadas pueden detectarse, por ejemplo, mediante autoradiografía, conteo de centelleo, o conteo gamma. El método de detección seleccionado dependerá del radioisótopo concreto utilizado para el marcaje.

Los materiales no isotópicos pueden también utilizarse para el marcaje y pueden introducirse internamente en la secuencia de ácido nucleico o al final de la secuencia del ácido nucleico. Los nucleótidos modificados pueden incorporarse enzimáticamente o químicamente. Las modificaciones químicas de la sonda pueden realizarse durante o después de la síntesis de la sonda, por ejemplo, a través del uso de grupos enlazantes no nucleotídicos como se describe en Arnold, et al., supra " Reactivos de unión no nucleotídicos para sondas de nucleótido,". Los marcajes no isotópicos incluyen moléculas fluorescentes, moléculas quimioluminiscentes, enzimas, cofactores, sustratos de enzima, haptenos u otros ligandos.

En una realización, las sondas están marcadas con un éster

de acridinio. El marcaje del éster de acridinio puede realizarse como se describe en Arnold et al., Pat. Estadounidense N° 5.185.439, titulado "Marcaje de éster de acridinio y purificación de sondas de Nucleótido" depositado 9 Febrero de 1993.

5 El término "oligonucleótido específico de secuencia" se refiere a un oligonucleótido que hibrida (bajo condiciones definidas) con un ácido nucleico diana con una proporción de señal-ruido al menos de 2x superior a la de una proporción de señal-ruido en la que hibrida con un ácido nucleico que no es la diana.

10 Por ejemplo, un oligonucleótido específico de secuencia puede hibridar, bajo condiciones astringentes, con una región de FRZB que comprende un primer alelo de un SNP (el ácido nucleico diana) con una proporción de señal-ruido de al menos 2x (por ejemplo, al menos 5x o 10x) superior a la proporción de señal-ruido en la que

15 el oligonucleótido hibrida con la región de FRZB que comprende un segundo alelo de SNP.

El término "gen FRZB" o "locus FRZB" se refiere a la secuencia de ácido nucleico genómico que codifica la proteína FRZB. La secuencia de nucleótido de un gen, tal como se utiliza aquí,

20 abarca regiones codificantes, referidas como exones, regiones intermedias, regiones no codificantes, referidas como intrones y regiones corriente arriba y/o corriente abajo. Las regiones corriente arriba o corriente abajo pueden incluir regiones del gen que se transcribe pero no parte de un intrón o exón, o regiones

25 del gen que comprende, por ejemplo, sitios de unión para factores que modulan la transcripción génica. La secuencia para la secuencia genómica humana FRZB se proporciona en los números de acceso del GenBank NT\_005100.3, NT\_005265, y NT\_005403, y una porción de

la secuencia se proporciona aquí como Id. de Sec. N°:1. La secuencia para el mRNA de FRZB humano se proporciona en el número de acceso del GenBank N\_001463, y se proporciona aquí como Id. de Sec. N°:2.

5 El término "alelo", tal como se utiliza aquí, se refiere a una variante de secuencia de un gen y/o un polimorfismo. Los alelos se identifican normalmente con respecto a una o más posiciones polimórficas, con el resto de la secuencia génica no especificada. Por ejemplo, un alelo FRZB puede definirse por el nucleótido presente en un SNP único, o mediante los nucleótidos presentes en un grupo de SNP. Ejemplos de dichos SNP de FRZB se proporcionan en la Tabla 1, a continuación.

10 Por comodidad, el alelo presente en la mayor frecuencia en la población se referirá como el alelo de tipo salvaje, y los alelos menos frecuentes se referirán como alelos mutantes. (No obstante, vale la pena decir que un alelo que es más frecuente en una población puede ser menos frecuente en una población diferente.) Esta designación de un alelo como mutante sólo se dice para distinguir el alelo del alelo de tipo salvaje y no significa un cambio o pérdida de función.

20 Los términos "polimórficos" y "polimorfismo", tal como se utiliza aquí, se refieren a la condición en que dos o más variantes de una secuencia genómica específica, o la secuencia de aminoácidos codificada, puede encontrarse en una población. Los términos se refieren tanto a la secuencia de ácido nucleico como a la secuencia de aminoácidos codificada; el uso quedará claro según el contexto. El término "región polimórfica" o "sitio polimórfico" se refiere a una región de ácido nucleico en la que apa-

recen las diferencias de nucleótidos que distingue las variantes, o para secuencias de aminoácidos, una región de la secuencia de aminoácidos en la que aparecen las diferencias de aminoácidos que distingue las variantes de proteína. Tal como se utiliza aquí, el término "polimorfismo de nucleótido único", o SNP, se refiere al polimorfismo en el que el sitio polimórfico consiste en una posición de nucleótido única. Ya que quedará claro en el contexto, el término polimorfismo puede referirse a una secuencia de variante específica en la que el sitio polimórfico; por ejemplo, el término SNP puede referirse al nucleótido específico (por ejemplo, A, C, G, o T) que ocupa un sitio polimórfico que consiste en una posición de nucleótido única.

Los aminoácidos individuales en una secuencia están representados aquí como AN o NA, en la que la A es el aminoácido en la secuencia y N es la posición en la secuencia. En el caso que la posición N sea polimórfica, es adecuado designar una variante (por ejemplo, la variante más frecuente) como A<sub>1</sub>N y la otra variante (por ejemplo, la variante menos frecuente) como NA<sub>2</sub>. Alternativamente, el sitio polimórfico, N, está representado como A<sub>1</sub>NA<sub>2</sub>, en la que A<sub>1</sub> es el aminoácido en una variante y A<sub>2</sub> es el aminoácido en la otra variante. Vale la pena decir que un alelo que es más frecuente en una población puede ser menos frecuente en una diferente población. Tanto el código de una letra como el de tres letras se utiliza para designar a los aminoácidos (véase Lehninger, BioChemistry 2<sup>a</sup> ed., 1975, Worth Publishers, Inc. New York, NY: páginas 73-75). Las posiciones de los aminoácidos se numeran según la secuencia de la proteína madura FRZB.

Las representaciones de nucleótidos y variaciones de nu-

cleótido únicas en las secuencias de DNA son análogas a las representaciones de los aminoácidos. Por ejemplo, C18679T representa un polimorfismo de nucleótido único en la posición de nucleótido 18679, en la que la citosina está presente en el alelo más frecuente (de tipo salvaje) en la población y la timidina está presente en el alelo menos frecuente (mutante). En general, un SNP puede representarse como A<sub>1</sub>NA<sub>2</sub>, en el que A<sub>1</sub> es el nucleótido presente en una variante y A<sub>2</sub> es el nucleótido en la otra variante. EL código de letra única para los nucleótidos es bien conocido por los expertos en la materia, es decir, C para citosina; A para adenina; T para timidina, G para guanina, I para inosina, y U para uracilo. Queda claro que en una forma de doble cadena, la cadena complementaria de cada alelo contiene la base complementaria de la posición polimórfica; un SNP (u otro polimorfismo) puede así describirse y/o detectarse en referencia al nucleótido(s) que ocupa el sitio polimórfico sobre cualquier cadena.

Tal como se utiliza aquí, el término "polimorfismo de predisposición" se refiere a un polimorfismo que está asociado positivamente con una condición, como por ejemplo, obesidad y/o osteoporosis. La presencia de un polimorfismo de predisposición en un individuo puede ser indicativo que el individuo presenta un riesgo aumentado para la enfermedad en relación con un individuo sin el polimorfismo. El término "polimorfismo protector" se refiere a un polimorfismo que está asociado negativamente con una condición. La presencia de un polimorfismo protector en un individuo puede ser indicativo que el individuo presenta un riesgo disminuido para la enfermedad en relación con un individuo sin el polimorfismo.

El término "polimorfismo asociado a la osteoporosis" o "polimorfismo relacionado con la osteoporosis" se refiere a un polimorfismo que está asociado con la osteoporosis (por ejemplo, con un aumento de la incidencia de fractura de cadera y/o vertebral y/o descenso de la densidad ósea mineral), tanto positiva o negativamente.

El término "asociación" o "asociado con" en el contexto de esta invención se refiere a la presencia de una enfermedad o rasgo fenotípico en individuos con uno o más alelos específicos o polimorfismos en uno o más genes específicos.

Tal como se utiliza aquí, el término razón de posibilidades "odds ratio" (OR) se refiere a la proporción de la frecuencia de la enfermedad en individuos con un marcador particular (alelo o polimorfismo) con la frecuencia de la enfermedad en individuos sin el marcador (alelo o polimorfismo).

Tal como se utiliza aquí, el término "desequilibrio de unión" (LD) se refiere a los alelos en diferentes loci que no están asociados de forma aleatoria, es decir, no están asociados en proporción a sus frecuencias. Si los alelos están en un desequilibrio de unión positivo, entonces los alelos aparecen juntos más a menudo de lo esperado, asumiendo una independencia estadística. Por el contrario, si los alelos están en un desequilibrio de unión negativo, entonces los alelos aparecen juntos menos a menudo de lo esperado, asumiendo una independencia estadística.

El término "genotipo", tal como se utiliza aquí, se refiere a una descripción de los alelo(s) de un gen o genes contenidos en un individuo o una muestra. Tal como se utiliza aquí, no se hace distinción entre el genotipo de un individuo y el genotipo de una

muestra originada de un individuo. Aunque, normalmente, un genotipo se determina a partir de las muestras de células diploides, un genotipo puede determinarse a partir de una muestra de células haploides, como una célula espermática. De forma similar, un "genotipo en unos o más sitios polimórficos" de un individuo se refiere a una descripción del alelo(s) de uno o más polimorfismos contenidos en el individuo o una muestra. Por ejemplo, un genotipo de un individuo para un SNP está definido por el nucleótido presente en el sitio polimórfico.

10 El término "haplotipo", tal como se utiliza aquí, se refiere a una descripción de las variantes de un gen o genes contenidos en un cromosoma, es decir, el genotipo de un sólo cromosoma. Un haplotipo es un grupo de alelos heredados por vía materna, o un grupo de alelos heredados por vía paterna, en cualquier locus.

15 Un haplotipo también puede referirse a dos o más SNP agrupados juntos.

Tal como se utiliza aquí, el término "región diana" se refiere a una región de un ácido nucleico que se va a analizar y normalmente incluye al menos una región polimórfica.

20 El término "astringente" tal como se utiliza aquí se refiere a las condiciones de hibridación y lavado que están cerca o en la  $T_m$  de una secuencia particular, teniendo en cuenta, por ejemplo las consideraciones como la concentración de sal y la longitud del oligonucleótido y la composición de la base. Generalmente,

25 te, las condiciones astringentes se seleccionan para que estén entre alrededor de 5 °C y 15 °C por debajo del punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica definida y pH. Se seleccionan mayores condiciones de astringencia

de forma opcional, por ejemplo, igual a la  $T_m$  o incluso 5 °C o más por encima de la  $T_m$ . La  $T_m$  es la temperatura (bajo una fuerza iónica definida y pH) en la que el 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Normalmente, las

5 condiciones astringentes serán aquellas en las que la concentración de sal sea al menos alrededor de 0,02 molar a pH 7 y la temperatura sea al menos alrededor de 50 °C para una secuencia con una  $T_m$  de alrededor de 55-65 °C. Como otros factores pueden afectar significativamente la astringencia de hibridación, incluyendo,

10 do, entre otros, la composición de las bases, la longitud de las cadenas de ácido nucleico, la presencia de solventes orgánicos, y la longitud de emparejamiento de bases, la combinación de parámetros es más importante que la medida absoluta de cualquiera de ellos.

15 Un "marcaje" es una porción que facilita la detección de una molécula. Los marcajes habituales en el contexto de la presente invención incluye marcajes fluorescentes, luminiscentes, y/o colorimétricos. Los marcajes adecuados incluye radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, porciones fluorescentes, porciones quimioluminiscentes, partículas magnéticas,

20 y similares. Las patentes que muestran el uso de dichos marcajes incluye las patentes Estadounidense N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Muchos marcajes están disponibles comercialmente y pueden utilizarse en

25 el contexto de la invención.

Una "secuencia de polinucleótido", "secuencia de nucleótido", o "secuencia de ácido nucleico" es un polímero de nucleótidos (un oligonucleótido, un DNA, un ácido nucleico, etc.) o una

cadena de caracteres que representa un polímero de nucleótido, dependiendo del contexto. A partir de cualquier secuencia de polinucleótido especificada, puede determinarse tanto el ácido nucleico determinado o la secuencia de polinucleótido complementaria (por ejemplo, el ácido nucleico complementario).

Una serie de términos adicionales se definen o se caracterizan de otra manera aquí.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

Ciertas realizaciones de la invención parten de la observación que al menos un polimorfismo en el gen FRZB se correlaciona con el riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis. Otras realizaciones proporcionan métodos para detectar un aumento o descenso del riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis. Otras realizaciones proporcionan equipos, reactivos y chips útiles para detectar el riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar un aumento o descenso del riesgo de un individuo de sufrir osteoporosis mediante la detección de la presencia de al menos un polimorfismo asociado con la osteoporosis en el locus FRZB en una muestra de ácido nucleico del individuo, en la que la presencia de dicho al menos un polimorfismo indica un aumento o descenso del riesgo en el individuo de sufrir osteoporosis.

En otra realización, la invención proporciona un método para detectar la presencia de osteoporosis en un individuo mediante una combinación del ensayo diagnóstico para la predisposición y al menos una otra prueba clínica para la osteoporosis, que incluye pero no se limita a ensayo de recambio óseo y cualquier tipo de escáner óseo. Otras enfermedades, condiciones o criterios que

pueden causar predisposición o utilizarse además de lo anterior, incluyen pero no se limitan a, hipertiroidismo, fase post-trasplante, mala adsorción, hiperparatiroidismo, alcoholismo e historial familiar.

5           En una realización, el polimorfismo FRZB se selecciona de los polimorfismos FRZB numerados en la Tabla 1. En otra realización, se detecta más de un polimorfismo en la muestra de ácido nucleico, al menos uno de ellos se selecciona de los polimorfismos numerados en la Tabla 1. En otra realización, se detectan al  
10 menos dos de los polimorfismos seleccionados de los numerados en la Tabla 1. Ejemplos de polimorfismos en FRZB que pueden utilizarse incluyen pero no se limitan a: T2303723C, C18679T, G19524A, T19575G, T22242A, G23043A, G23415A, T23549C, A24791G, C26794G, y G27014A.

15           El individuo puede ser cualquier mamífero, incluyendo a humanos de cualquier raza o población. El individuo puede ser macho o hembra. No obstante, se entiende que los métodos, equipos y composiciones descritos aquí se ajustaran adecuadamente para los análisis de osteoporosis en las mujeres mayores de 50, y/o post-  
20 menopáusicas. Además, los métodos, equipos y composiciones descritas aquí deberán ajustarse adecuadamente a los análisis de osteoporosis en hombres o mujeres entre 35 y 77 años. Más en particular, hombres o mujeres por encima de 40 años de edad deberán ajustarse adecuadamente para los análisis.

25           La muestra de ácido nucleico puede obtenerse de cualquier parte del cuerpo del individuo, incluyendo, pero sin limitarse a: pelo, piel, uñas, tejidos, como órganos o tumores, o fluidos corporales, como saliva, sangre, plasma, suero, líquido espinal,

linfa, líquido sinovial, semen, líquido seminal, lavado bronquio-  
alveolar, orina, o lágrimas, así como muestras de sangre aislada  
o células de tejido o componentes de cultivo de células in vitro  
(que incluye, pero no se limita a, medio condicionado obtenido  
5 del crecimiento de células en el medio de cultivo celular, célu-  
las recombinantes y componentes celulares). La muestra de ácido  
nucleico puede, pero no es necesario, amplificarse mediante cual-  
quier método de amplificación que incluye, pero no se limita a,  
la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR").

10 El polimorfismo puede ser cualquier polimorfismo de predis-  
posición o protector en el locus FRZB. En una realización de la  
invención, el polimorfismo puede ser cualquier polimorfismo iden-  
tificado como de predisposición o protector por los métodos des-  
critos aquí. En una realización, el polimorfismo puede ser un po-  
15 limorfismo de nucleótido único (SNP) en el locus FRZB. En otra  
realización, los haplotipos específicos en el locus FRZB así como  
las combinaciones específicas de, y las interacciones entre, los  
SNP en este locus puede ser indicativo de un riesgo aumentado o  
disminuido de sufrir osteoporosis.

20 En otra realización, la presencia del polimorfismo de sólo  
un padre es suficientemente predictiva. En otra realización, la  
presencia del polimorfismo de ambos padres es suficientemente  
predictiva.

El polimorfismo puede detectarse mediante cualquier método  
25 conocido en la materia para detectar la presencia de un polimor-  
fismo específico en una muestra de ácido nucleico. Estos métodos  
incluyen, pero no se limitan a, contactar la muestra de ácido nu-  
cleico con una o más moléculas de ácido nucleico que hibridan ba-

jo condiciones de hibridación astringentes en al menos un polimorfismo de FRZB y detectar la hibridación, detección mediante amplificación de la muestra de ácido nucleico mediante, por ejemplo, PCR, y mediante secuenciación directa de la muestra de ácido nucleico.

En ciertas realizaciones, el riesgo de un individuo de sufrir enfermedades osteoporóticas se diagnostica a partir del genotipo FRZB del individuo. Un individuo que posee al menos un polimorfismo estadísticamente asociado con osteoporosis posee un factor que contribuye tanto a un aumento como una disminución del riesgo en comparación con un individuo sin el polimorfismo. La asociación estadística de varios polimorfismos de FRZB (variantes de secuencia) con osteoporosis se muestra en los ejemplos.

El genotipo puede determinarse utilizando cualquier método capaz de identificar una variación de nucleótido, por ejemplo, variación de nucleótido que consiste en sitios polimórfico de nucleótido único. El método particular utilizado no es un aspecto crítico de la invención. Se describen a continuación una serie de métodos adecuados.

En una realización de la invención, la genotipificación se lleva a cabo utilizando sondas de oligonucleótido específicas a variantes de secuencias de FRZB. En una realización, una región del gen FRZB que abarca uno o varios sitios polimórficos de interés se amplifica antes de, o a la vez que, la hibridación de las sondas dirigidas contra estos sitios. Los ensayos basados en sondas para la detección de variantes de secuencia son bien conocidos en la materia.

Alternativamente, la genotipificación se lleva a cabo uti-

lizando una amplificación específica de alelo o reacción de extensión, en la que los cebadores específicos de alelo se utilizan para que la extensión de cebador ocurra sólo si el alelo diana está presente. Normalmente, un cebador específico de alelo hibrida con el gen FRZB de forma que el nucleótido terminal 3' se alinea con una posición polimórfica. Las reacciones de amplificación específicas de alelo y las reacciones de extensión específicas de alelo son bien conocidas en la materia.

Otro aspecto de la invención está relacionada con un equipo útil para detectar la presencia de un polimorfismo de predisposición o protector en el locus FRZB en una muestra de ácido nucleico de un individuo cuyo riesgo de sufrir osteoporosis está siendo analizado. El equipo puede comprender uno o más oligonucleótidos capaces de detectar un polimorfismo de predisposición o protector en el locus FRZB así como instrucciones para utilizar el equipo para detectar susceptibilidad para osteoporosis. En realizaciones preferibles, el oligonucleótido o oligonucleótidos individualmente comprenden una secuencia que hibrida bajo condiciones de hibridación astringentes con al menos un polimorfismo de FRZB. En algunas realizaciones, el oligonucleótido o oligonucleótidos individualmente comprenden una secuencia que es totalmente complementaria con una secuencia de ácido nucleico que comprende un polimorfismo de FRZB.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido puede utilizarse para detectar la presencia del polimorfismo FRZB mediante la hibridación del polimorfismo bajo condiciones de hibridación astringentes. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pueden utilizarse como un cebador de extensión en cualquier reacción

de amplificación como PCR o una reacción de secuenciación, en la que el polimorfismo FRZB se detecta mediante amplificación o secuenciación.

5 En ciertas realizaciones, el equipo puede comprender además cebadores de amplificación o secuenciación que pueden, pero no necesariamente, ser específicos de secuencia. El equipo puede también comprender reactivos para marcar uno o más oligonucleótidos, o comprender oligonucleótidos marcados. Opcionalmente, el equipo puede comprender reactivos para detectar el marcaje.

10 En algunas realizaciones, el equipo puede comprender uno o más oligonucleótidos que pueden utilizarse para detectar la presencia de dos o más polimorfismos de FRZB de predisposición o protectores o combinaciones de polimorfismos de predisposición, polimorfismos protectores o ambos.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un chip útil para detectar la presencia de un polimorfismo de FRZB de predisposición o protector en una muestra de ácido nucleico de un individuo cuyo riesgo de sufrir osteoporosis está siendo evaluado. El chip puede comprender uno o más oligonucleótidos capaces de detectar  
20 un polimorfismo de FRZB de predisposición o protector. Los oligonucleótidos pueden inmovilizarse en un sustrato, por ejemplo, una membrana o vidrio. En realizaciones preferibles, el oligonucleótido o oligonucleótidos individualmente comprenden una secuencia que puede hibridar bajo condiciones de hibridación astringentes  
25 con la secuencia de ácido nucleico que comprende un polimorfismo de FRZB. En algunas realizaciones, el oligonucleótido o oligonucleótidos individualmente comprenden una secuencia que es totalmente complementaria con una secuencia de ácido nucleico compren-

de un polimorfismo de FRZB. El oligonucleótido o oligonucleótidos puede, pero no necesariamente, estar marcado. En algunas realizaciones, el chip puede ser un microchip.

En algunas realizaciones, el chip puede comprender uno o  
5 más oligonucleótidos utilizados para detectar la presencia de dos o más polimorfismos de FRZB de predisposición o protectores o combinaciones de polimorfismos de predisposición, polimorfismos protectores o ambos.

Un aspecto de la invención proporciona ácidos nucleicos,  
10 por ejemplo, ácidos nucleicos que comprenden uno o más nuevos polimorfismos en el gen FRZB y/o ácidos nucleicos útiles para detectar uno o más polimorfismos de FRZB. De acuerdo con esto, una realización de la invención es una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una porción del gen FRZB, su complementario,  
15 y/o a variante del mismo. Preferiblemente dicha variante comprende al menos un polimorfismo identificado en este documento. Aún más preferiblemente, dicha variante comprende al menos uno de los polimorfismos identificados aquí por estar asociado con la osteoporosis. Así, en una realización, la molécula de ácido nucleico comprende al menos uno de los polimorfismos de FRZB  
20 proporcionados en la Tabla 1. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un cebador y/o una sonda específica de al menos uno de los polimorfismos identificados en el gen FRZB (por ejemplo, los identificados aquí por estar asociados con la osteoporosis).  
25

#### **SNP**

En un aspecto, la invención proporciona un método para detectar un aumento o descenso del riesgo de un individuo para su-

frir osteoporosis mediante la detección de la presencia de uno o más SNP de FRZB en una muestra de ácido nucleico del individuo, en el que la presencia de dicho SNP indica el aumento o descenso del riesgo del individuo de sufrir osteoporosis. Los SNP pueden ser cualquier SNP en el locus de FRZB incluyendo SNP en exones, intrones y/o regiones corriente arriba y/o corriente abajo. Ejemplos de dichos SNP incluye, pero no se limita a, los proporcionados en la Tabla 1, a continuación, y se discuten en detalle en los Ejemplos. En una realización, el SNP presente en el locus FRZB se identifica mediante la genotipificación de los SNP de FRZB.

**Tabla 1: SNP de FRZB**

FRZB SNP	Nombre estándar	Posición en NT_005403	Fuente de SNP	Pos. en Gen/Cambio
FRZB1_T23 03723C	NT_005265.11_23 03723	NT_005403_3393 3138	rs6433992	Intron 1/T-C
FRZB_C186 79T	NT_005100.3_186 79	NT005403_33917 116	rs288330	Intron 2/C-T
FRZB_G195 24A	NT_005100.3_195 24	Z005403_339162 71	rs2242070	Intron 3/G-A
FRZB_T195 75G	NT_005100.3_195 75	Z005403_339162 20	RMSSNP	Intron 3/T-G
FRZB_T222 42A	NT_005100.3_222 42	NT005403_33913 553	rs288327	Intron 3/T-A
FRZB_G230 43A	NT_005100.3_230 43	NT005403_33912 752	rs288326	Exon 4/G-A- >Arg200Trp

FRZB_G234 15A	NT_005100.3_234 15	NT005403_33912 380	rs1561369	Intron 4/G-A
FRZB_T235 49C	NT_005100.3_235 49	NT005403_33912 246	rs288325	Intron 4/T-C
FRZB_A247 91G	NT_005100.3_247 91	NT005403_33911 004	rs288324	Intron 5/A-G
FRZB_C267 94G	NT_005100.3_267 94	NT005403_33909 000	rs7775	Exon 6/C-G - >Arg324Gly
FRZB_G270 14A	NT_005100.3_270 14	NT005403_33908 780	rs13009	3' UTR/G-A

En ciertas realizaciones, el genotipo de un SNP de FRZB puede utilizarse para determinar el riesgo de que un individuo sufra una enfermedad osteoporótica. En otras realizaciones, pueden utilizarse los genotipos de un grupo de SNP de FRZB. En otras 5 realizaciones, pueden utilizarse ciertas combinaciones de SNP en el mismo o diferente loci.

#### MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN

En los métodos de la invención, los alelos presentes en una muestra se identifican mediante la identificación del nucleótido presente en uno o más sitios polimórficos en una muestra de ácido 10 nucleico de un individuo. Son conocidos un número de métodos en la materia para identificar el nucleótido presente en los sitios polimórficos. El método particular utilizado para identificar el genotipo no es un aspecto crítico de la invención. Aunque las 15 consideraciones de rendimiento, coste, y conveniencia harán más deseables unos métodos en particular que otros, quedará claro que cualquier método que pueda identificar el nucleótido presente proporcionará la información necesaria para identificar el geno-

tipo. Los métodos de genotipificación preferibles involucran la secuenciación de DNA, amplificación específica de alelo, o detección basada en sondas de ácidos nucleicos amplificados.

Los alelos de FRZB pueden identificarse mediante métodos de  
5 secuenciación de DNA, como el método de terminación de la cadena (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5463-5467), que son bien conocidos en la materia. En una realización, se amplifica una porción del gen que comprende el sitio polimórfico y o bien se clona en un plásmido adecuado y luego se secuencía, o  
10 bien se secuencía directamente. La secuenciación basada en la PCR se describe en la patente estadounidense N° 5.075.216; Brow, en PCR Protocols, 1990, (Innis et al., Ed. Academic Press, San Diego), capítulo 24; y Gyllensten, en PCR Technology, 1989 (Erlich, ed., Stockton Press, New York), capítulo 5. Normalmente, la secuenciación se realiza utilizando un secuenciador de DNA automático, que está are disponible a nivel comercial en, por ejemplo, PE Biosystems (Foster City, CA), Pharmacia (Piscataway, NJ), Genomyx Corp. (Foster City, CA), LI-COR Biotech (Lincoln, NE), GeneSys technologies (Sauk City, WI), y Visible Genetics, Inc. (To-  
15 ronto, Canadá).  
20

Los alelos de FRZB también pueden identificarse utilizando métodos de genotipificación basada en la amplificación. Pueden utilizarse varios métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la materia para detectar cambios de nucleótido en un  
25 ácido nucleico diana. Un método preferible es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que actualmente es bien conocido en la materia, y se describe en las patentes estadounidenses N° 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188. Ejemplos de los numerosos artí-

culos publicados que describen los métodos y aplicaciones de la PCR se encuentran en PCR Applications, 1999, (Innis et al., Ed., Academic Press, San Diego), PCR Strategies, 1995, (Innis et al., Ed., Academic Press, San Diego); PCR Protocols, 1990, (Innis et al., Ed., Academic Press, San Diego); y PCR Technology, 1989, (Erlich, Ed., Stockton Press, New York). Los distribuidores comerciales, como PE Biosystems (Foster City, CA) comercializan reactivos de PCR y publican protocolos de PCR.

Otros métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (Wu y Wallace, 1988, Genomics 4: 560-569); el ensayo de desplazamiento de la cadena (Walker et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-396, Walker et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20:1691-1696, y la patente estadounidense N° 5.455.166); y varios sistemas de amplificación basada en la transcripción, lo que incluye los métodos descritos en las patentes estadounidenses N° 5.437.990, 5.409.818 y 5.399.491, el sistema de amplificación transcripción (TAS) (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173-1177) y de replicación de secuencia automantenida (3SR) (Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874-1878 y WO 92/08800). Alternativamente, pueden utilizarse métodos que amplifican la sonda hasta niveles detectables, como la amplificación de la Q $\beta$ -replicasa (Kramer et al., 1989, Nature, 339:401-402, y Lomeli et al., 1989, Clin. Chem., 35:1826-1831). Una revisión de los métodos de amplificación conocidos se proporciona en Abramson et al., 1993, Current Opinion in Biotechnology, 4:41-47.

La genotipificación también puede realizarse detectando y analizando el mRNA de FRZB bajo condiciones en las que se trans-

criben tanto el cromosoma materno como el paterno. La amplificación de RNA puede realizarse con una transcripción reversa inicial del RNA diana utilizando, por ejemplo, una transcriptasa reversa viral, y luego amplificando el cDNA resultante, o utilizando una reacción en cadena de la polimerasa con una transcripción reversa a elevada temperatura (RT-PCR) combinadas, como se describe en las patentes estadounidenses 5.310.652, 5.322.770, 5.561.058, 5.641.864 y 5.693.517 (véase también Myers y Sigua, 1995, en PCR Strategies, supra, capítulo 5).

10 Los alelos de FRZB también pueden identificarse utilizando métodos de amplificación específica de alelo o de extensión del cebador, que se basan en el efecto inhibitorio de un desemparejamiento terminal del cebador de la capacidad de la polimerasa de DNA de extender el cebador. Para detectar una secuencia alélica  
15 utilizando un método de amplificación específica de alelo o basado en la extensión, se escoge un cebador complementario a los genes FRZB de forma que el nucleótido en 3' terminal hibrida en la posición polimórfica. En presencia del alelo a identificar, el cebador es complementario de la secuencia diana en el extremo 3'  
20 terminal y el cebador puede extenderse. En presencia de sólo el otro alelo, el cebador posee un desemparejamiento en 3' en relación a la secuencia diana y la extensión del cebador se evita o se reduce significativamente. Los métodos de amplificación específica de alelo o basados en la extensión se describen en, por  
25 ejemplo, las patentes estadounidenses N° 5.137.806, 5.595.890, 5.639.611 y la patente estadounidense N° 4.851.331.

Utilizando la genotipificación basada en la amplificación específica de alelo, la identificación de los alelos requiere sólo

lo la detección de la presencia o ausencia de secuencias diana  
amplificadas. Los métodos de detección de secuencias diana ampli-  
ficadas son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la elec-  
troforesis en gel (véase Sambrook et al., 1989, infra) y los en-  
sayos de hibridación de sonda descritos anteriormente se han uti-  
lizado ampliamente para detectar la presencia de ácidos nucleí-  
cos.

Los métodos de genotipificación basados en la amplificación  
específica de alelo pueden facilitar la identificación de haplo-  
tipos, como se describe en los ejemplos. Esencialmente, la ampli-  
ficación específica de alelo se utiliza para amplificar una re-  
gión que incluye múltiples sitios polimórficos de sólo uno de los  
alelos en una muestra heterocigota. Las variantes SNP presen-  
tes dentro de la secuencia amplificada se identifican a continua-  
ción, mediante la hibridación de sondas o por secuenciación.

Un método alternativo sin sondas es el aquí denominado mé-  
todo de PCR cinética, en el que la generación de ácidos nucleicos  
amplificados se detecta monitorizando el aumento de la cantidad  
total de DNA de doble cadena en la mezcla de reacción, se descri-  
be en Higuchi et al., 1992, *Bio/Technology*, 10:413-417, Higuchi  
et al., 1993, *Bio/Technology*, 11:1026-1030, Higuchi y Watson, en  
*PCR Applications*, supra, capítulo 16, las patentes estadouniden-  
ses N° 5.994.056 y 6.171.785 y las publicaciones de patente euro-  
pea N° 487.218 y 512.334. La detección del DNA de doble cadena  
diana se basa en el aumento de la fluorescencia que muestran los  
colorantes que se unen al DNA, como el bromuro de etidio o SYBR™  
Green, cuando se unen al DNA de doble cadena. El aumento del DNA  
de doble cadena que resulta de la síntesis de las secuencias di-

ana resulta en un aumento en la cantidad de colorante unido al DNA de doble cadena y en un aumento detectable concomitante de la fluorescencia. En la genotipificación que se realiza utilizando métodos de PCR cinética, las reacciones de amplificación se rea-  
5 lizan utilizando un par de cebadores específicos de uno de los alelos, de forma que cada amplificación puede indicar la presencia de un alelo particular. Por ejemplo, puede determinarse el genotipo de la muestra respecto a un SNP realizando dos amplifi-  
caciones, una utilizando cebadores específicos del alelo salvaje  
10 y una utilizando cebadores específicos del alelo mutante. De forma similar, puede determinarse el genotipo de la muestra respecto a dos SNP realizando cuatro amplificaciones, cada una de ella con uno de los posibles pares y utilizando cebadores específicos de alelo tanto para los cebadores directos como reversos. Esto pro-  
porciona información del haplotipo de un par de SNP.  
15

También pueden identificarse los alelos utilizando métodos basados en sondas, que se basan en la diferencia de estabilidad de la hibridación de los dúplex formados entre una sonda y su correspondiente secuencia diana que comprende un alelo de FRZB. Ba-  
20 jo condiciones de hibridación suficientemente astringentes, se forman dúplex estables sólo entre una sonda y su secuencia de alelo diana y no con otras secuencias de alelo. La presencia de dúplex de hibridación estable puede detectarse mediante cualquiera de una serie de métodos bien conocidos. En general, es preferible amplificar un ácido nucleico que incluye un sitio polimórfico de interés previamente a su hibridación para facilitar su  
25 detección. sin embargo, esto no es necesario si puede obtenerse suficiente ácido nucleico sin una amplificación.

Una sonda adecuada para su utilización en los métodos basados en sondas de la invención, que contiene una región de hibridación sustancialmente complementaria o exactamente complementaria a la región diana del gen FRZB o de la cadena complementaria del mismo, en la que la región diana incluye el sitio polimórfico, y es exactamente complementaria a una de las dos secuencias del alelo en el sitio polimórfico, puede seleccionarse utilizando las guías que aquí se proporcionan y que son bien conocidas en la materia. De forma similar, las condiciones de hibridación adecuadas (por ejemplo, condiciones de hibridación astringentes), que dependen del tamaño exacto y de la secuencia de la sonda, pueden seleccionarse de forma empírica utilizando las guías que aquí se proporcionan y que son bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, *Nucleic Acids Hybridization* (B.D. Hames y S.J. Higgins. Ed., 1984) y Sambrook et al., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2000). La utilización de sondas de oligonucleótidos para detectar las variaciones de nucleótido, lo que incluye diferencias de un único par de bases en la secuencia se describe en, por ejemplo, Conner et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:278-282, y en las patentes estadounidenses N° 5.468.613 y 5.604.099.

En algunas realizaciones de los métodos basados en sondas para la determinación de los genotipos de FRZB, se amplifican múltiples secuencias de ácido nucleico de los genes FRZB que incluyen los sitios polimórficos y se hibridan con un conjunto de sondas bajo condiciones de hibridación suficientemente astringentes. Los alelos presentes se infieren a partir del patrón de

unión de las sondas a las secuencias diana amplificadas. En esta realización, se realiza una amplificación para proporcionar suficiente ácido nucleico para el análisis mediante hibridación de una sonda. Por lo tanto, los cebadores están diseñados de forma  
5 que las regiones de los genes FRZB que incluyen los sitios polimórficos se amplifiquen independientemente del alelo presente en la muestra. La amplificación independiente de alelo se consigue utilizando cebadores que hibridan con regiones conservadas de los genes FRZB. Los genes FRZB contienen muchas regiones invariables  
10 o monomórficas, y pueden seleccionarse cebadores independientes de alelo adecuados de forma rutinaria a partir del Id. de Sec. N°:1 o los números de registro de GenBank NT 005100.3, NT 005265 o NT 005403.

Los formatos de ensayo adecuados para detectar los híbridos  
15 formados entre las sondas y las secuencias de ácido nucleico diana en una muestra son conocidos en la materia e incluyen el formato de diana inmovilizada (*dot-blot*) y los formatos de ensayo de sonda inmovilizada (*dot-blot* reverso o *line-blot*). Los formatos de ensayo de *dot-blot* y *dot-blot* reverso se describen en las pa-  
20 tentes estadounidenses N° 5.310.893, 5.451.512, 5.468.613 y 5.604.099.

En un formato de *dot-blot*, el DNA diana amplificado se in-  
moviliza en un soporte sólido, como una membrana de nylon. El  
complejo membrana-diana se incuba con una sonda marcada bajo con-  
25 diciones de hibridación adecuadas, la sonda no hibridada se elimina mediante lavados en condiciones de astringencia adecuada, y se detecta la presencia de sonda unida en la membrana. Un ensayo de detección de *dot-blot* preferible se describe en los ejemplos.

En el formato de *dot-blot* reverso (o *line-blot*), las sondas están inmovilizadas en un soporte sólido, como una membrana de nilón o una placa microtitulada. El DNA diana se marca, normalmente durante la amplificación mediante la incorporación de cebadores marcados. Uno o ambos cebadores pueden estar marcados. El complejo membrana-sonda se incuba con el DNA diana amplificado marcado bajo condiciones de hibridación adecuadas, el DNA diana no hibridado se elimina mediante lavados en condiciones de astringencia adecuada, y se detecta la presencia de DNA diana unido en la membrana. Un ensayo de detección de *line-blot* reverso preferible se describe en los ejemplos.

La genotipificación basada en sondas puede realizarse utilizando el ensayo de la 5'-nucleasa, como se describe en las patentes estadounidenses N° 5.210.015, 5.487.972 y 5.804.375, y en Holland et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7276-7280. En el ensayo de la 5'-nucleasa, se añaden en la mezcla de la reacción de amplificación sondas de detección marcadas que hibridan en la región amplificada. Las sondas están modificadas de forma que se evita que las sondas actúen como cebadores para la síntesis de DNA. La amplificación se realiza utilizando una polimerasa de DNA que posee actividad exonucleasa de 5' a 3', por ejemplo, la polimerasa de DNA Tth. Durante cada paso de síntesis de la amplificación, cualquier sonda que hibride con el ácido nucleico diana corriente abajo del cebador que se extiende se degradará mediante la actividad exonucleasa de 5' a 3' de la polimerasa de DNA. Por lo tanto, la síntesis de una nueva cadena diana también resulta en la degradación de una sonda, y la acumulación de producto de degradación proporciona una medida de la síntesis de se-

cuencias diana.

Puede utilizarse cualquier método adecuado para detectar el producto de degradación en el ensayo de la 5'-nucleasa. En un método preferible, las sondas de detección están marcadas con dos colorantes fluorescentes, uno de los cuales es capaz de bloquear la fluorescencia del otro colorante. Los colorantes están unidos a la sonda, preferiblemente uno unido al extremo 5' y el otro unido en un punto interno, de forma que el bloqueo aparezca cuando la sonda se encuentra en estado no hibridado y de forma que la escisión de la sonda por la actividad exonucleasa de 5' a 3' de la polimerasa de DNA ocurra entre los dos colorantes. La amplificación resulta en la escisión de la sonda entre los colorantes con una eliminación concomitante del bloqueo de la fluorescencia y un aumento de fluorescencia observable en referencia al colorante inicialmente bloqueado. La acumulación de producto de degradación se controla midiendo el aumento de fluorescencia en la reacción. Las patentes estadounidenses N° 5.491.063 y 5.571.673, describen métodos alternativos de detección de degradación de la sonda que ocurre de forma concomitante a la amplificación.

El ensayo de la 5'-nucleasa puede utilizarse con cebadores de amplificación específicos de alelo de forma que la sonda se utiliza sólo para detectar la presencia de producto amplificado. Tal ensayo se realiza como se ha descrito para los métodos basados en la PCR cinética descritos anteriormente. Alternativamente, el ensayo de la 5'-nucleasa puede utilizarse con una sonda específica de diana.

Ejemplos de otras técnicas que pueden utilizarse para la genotipificación basada en sondas incluyen, pero no se limitan

al, Amplifluor™, intercalado de colorantes de unión, transferencia de la energía de resonancia de la fluorescencia (FRET), método de amplificación de la señal de hibridación (HSAM), sondas HYB™, tecnología invasor/ escindasa (Invader/CFLP™), balizas moleculares™, Origen™, amplificación-ramificación basada en el DNA (RAM™), amplificación de círculo rodante (RCA™), Scorpions™, amplificación con desplazamiento de cadena (SDA).

Los formatos de ensayo descritos anteriormente normalmente utilizan oligonucleótidos marcados para facilitar la detección de los dúplex de hibridación. Los oligonucleótidos pueden estar marcados al incorporar un marcaje detectable mediante métodos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, radiológicos, radioquímicos o químicos. Los marcajes útiles incluyen el <sup>32</sup>P, colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (como se utilizan habitualmente en los ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que se encuentren disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales. Los oligonucleótidos marcados de la invención pueden sintetizarse y marcarse utilizando las técnicas descritas anteriormente para la síntesis de oligonucleótidos. Por ejemplo, un ensayo de *dot-blot* puede realizarse utilizando sondas marcadas con biotina, como se describe en Levenson et al., 1989, en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., Ed., Academic Press. San Diego), págs. 99-112. Tras la hibridación del DNA diana inmovilizado con las sondas biotiniladas bajo condiciones específicas de secuencia, las sondas que permanecen unidas se detectan uniendo en primer lugar la biotina a avidina-peroxidasa de rábano picante (A-HRP) o estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP), que luego se detecta rea-

lizando una reacción en la que la HRP cataliza un cambio de color de un cromógeno.

Sea cual sea el método para determinar que oligonucleótidos de la invención hibridan selectivamente con las secuencias alélicas de FRZB en una muestra, la característica central del método de tipificación involucra la identificación de los alelos de FRZB presentes en la muestra detectando las variantes de secuencias presentes. Más detalles de la genotipificación de SNP están disponibles en la bibliografía, véase por ejemplo, Lindblad-Toh et al., 2000, *Nature Genetics* 24:381-386; *Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants*, 2001, CABI Publishing; Syvanen, 2001, *Nat. Rev. Genet.* 2:930-942; Kuklin et al., 1998, *Genetic Testing* 1: 201-206; Gut, 2001, *Hum. Mutat.* 17:475-492; Ahmadian et al., 2000, *Anal. Biochem.* 280:103-110; Useche et al., 2001, *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* 12:194-203; Pastinen et al., 2000, *Genome Res.* 10: 1031-1042; Hacia, 1999, *Nature Genet.* 22:164-167; y Chen et al., 2000, *Genome Res.* 10:549-557.

#### **OTROS MARCADORES**

Otros marcadores genéticos y métodos de detección de los polimorfismos de secuencia son conocidos en la materia y pueden utilizarse en la práctica de la presente invención, lo que incluye, pero no se limita a, los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismos en la longitud de fragmentos arbitrarios (AFLP), repeticiones simples de secuencia (SSR), polimorfismos en la conformación de la cadena sencilla (SSCP) y secuencias variables de amplificación. El descubrimiento, detección y genotipificación de estos y otros tipos de marcadores genéticos está

bien establecido en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Orita et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766-2770; USPN 6.399.855; Henry, Ed., 2001, Plant Genotyping. The DNA Fingerprinting of Plants Wallingford: CABI Publishing; Phillips y Vasil, Ed., 2001, DNA-based Markers in Plants Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; Pejic et al., 1998, Theor. App. Genet. 97:1248-1255; Bhatramakki et al., 2002, Plant Mol. Biol. 48:539-47; Nickerson et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:2745-2751; Underhill et al., 1997, Genome Res. 7:996-1005; Shi, 2001, Clin. Chem. 47:164-172; Kwok, 2000, Pharmacogenomics 1:95-100; Rafalski et al., 2002, Cell Mol Biol Lett 7:471-5; Ching y Rafalski, 2002, Cell Mol Biol Lett. 7:803-10; Powell et al., 1996, Mol. Breeding 2:225-238; Vos et al., 1995, Nucl. Acids Res. 23:4407; Becker et al., 1995, Mol. Gen. Genet. 249: 65; Meksem et al., 1995, Mol. Gen. Genet. 249:74; Huys et al., 1996, Int'l J. Systematic Bacteriol. 46:572; Jacob et al., 1991, Cell 67:213; Taramino y Tingey, 1996, Genome 39:277-287; Condit y Hubbell, 1991, Genome 34:66; y Zietkiewicz et al., 1994, Genomics 20:176-83.

#### **ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN**

En los ejemplos se describe la evaluación de la asociación del gen candidato FRZB con varios fenotipos de obesidad y osteoporosis. Además, se han descrito en la materia el diseño y ejecución de varios tipos de estudios de asociación; véase, por ejemplo, Rao y Province, Ed., 2001, Advances in Genetics volumen 42, Genetic Dissection of Complex Traits; Balding et al., Ed., 2001, Handbook of Statistical Genetics, John Wiley and Sons Ltd.; Borecki y Suarez, 2001, Adv Genet 42:45-66; Cardon y Bell, 2001, Nat Rev Genet 2:91-99; y Risch, 2000, Nature 405:847-856. Los es-

tudios de asociación se han utilizado tanto para evaluar la asociación de los genes candidatos con una característica fenotípica (por ejemplo, Thornsberry et al., 2001, Nature Genetics 28:286-289) y para realizar un cribado del genoma completo para identificar los genes que contribuyen a la variación fenotípica.

#### **EQUIPOS**

La invención también está relacionada con un equipo que comprende una unidad contenedora y los componentes para practicar el presente método. Un equipo puede contener sondas de oligonucleótido específicas de los alelos de FRZB así como las instrucciones para su utilización para determinar el riesgo de padecer osteoporosis. En algunos casos, un equipo puede comprender sondas de detección fijadas a una membrana de soporte apropiada. El equipo también puede contener cebadores de amplificación para amplificar las regiones del locus FRZB que incluyen los sitios polimórficos, siendo tales cebadores útiles en la realización preferible de la invención. Alternativamente, los equipos útiles pueden contener un conjunto de cebadores que comprende un cebador específico de alelo para la amplificación específica de los alelos de FRZB. Otros componentes opcionales de los equipos incluyen reactivos adicionales utilizados en los métodos de genotipificación aquí descritos. Por ejemplo, un equipo puede contener adicionalmente un agente para catalizar la síntesis de productos de extensión del cebador, nucleósidos trifosfato sustrato, reactivos para el marcaje y/o detección de ácidos nucleicos (por ejemplo, un conjugado de avidina-enzima y el sustrato de la enzima y cromógeno si el marcaje es biotina) y tampones apropiados para las reacciones de amplificación o hibridación.

Un aspecto de la invención proporciona equipos para la detección de la presencia de un primer polimorfismo de predisposición o protector en el gen FRZB, por ejemplo, en una muestra de ácido nucleico de un individuo cuyo riesgo de padecer osteoporosis se está valorando. Por lo tanto, una clase general de realizaciones proporciona un equipo que incluye uno o más oligonucleótidos iniciales capaces de detectar el primer polimorfismo y las instrucciones para detectar el primer polimorfismo con uno o más de los oligonucleótidos iniciales y para correlacionar dicha detección con el riesgo de un individuo de padecer osteoporosis, empacutado en uno o más contenedores.

Esencialmente todas las características mencionadas en las realizaciones anteriores del método aplican también a esta realización y son relevantes. Por ejemplo, en una clase preferible de realizaciones, el primer polimorfismo es un polimorfismo de un único nucleótido, por ejemplo, un SNP seleccionado de entre el grupo que consiste en: el alelo T de T2303723C, el alelo C de T2303723C, el alelo C de C18679T, el alelo T de C18679T, el alelo G de G19524A, el alelo A de G19524A, el alelo T de T22242A, el alelo A de T22242A, el alelo A de A24791G, el alelo G de A24791G, el alelo C de C26794G, el alelo G de C26794G, el alelo G de G27014A, y el alelo A de G27014A. Otros SNP potenciales incluyen, pero no se limitan al alelo de T19575G, G23043A, G23415A y T23549C.

En un aspecto, el equipo puede utilizarse para detectar la presencia del primer polimorfismo mediante la hibridación de una sonda de ácido nucleico con el polimorfismo. Por lo tanto, en una clase de realizaciones, el conjunto de uno o más oligonucleótidos

iniciales comprende al menos una sonda. En ciertas realizaciones, el primer oligonucleótido hibrida bajo condiciones astringentes con una región del gen FRZB que comprende el primer polimorfismo. En una clase de realizaciones, el primer polimorfismo es un primer polimorfismo de un único nucleótido que comprende un primer nucleótido en una primera posición de nucleótido. En esta clase de realizaciones, bajo condiciones astringentes, el primer oligonucleótido hibrida con una región del gen FRZB que comprende el primer polimorfismo de un único nucleótido con una proporción entre señal y ruido que es de al menos 2x (por ejemplo, al menos 5x o al menos 10x) la proporción entre señal y ruido a la que el primer oligonucleótido hibrida con la región del gen FRZB que comprende un segundo nucleótido en la primera posición de nucleótido. El primer oligonucleótido normalmente es completamente complementario a la región del gen FRZB que comprende el primer polimorfismo, y normalmente comprende al menos alrededor de 10 nucleótidos contiguos complementarios al gen FRZB.

Para facilitar la detección del polimorfismo (por ejemplo, mediante la detección de la hibridación entre el conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales y un ácido nucleico que comprende el polimorfismo), por ejemplo, el conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales opcionalmente comprende un marcaje, por ejemplo, un marcaje isotópico, fluorescente, fluorogénico, luminescente o colorimétrico. En algunas realizaciones, el marcaje en sí mismo provoca directamente una señal detectable (por ejemplo, un marcaje fluorescente). En otras realizaciones, el equipo también incluye un reactivo que detecta el marcaje (por ejemplo, una enzima que escinde un marcaje colorimétrico, una porción de unión

o similares).

en un aspecto, el conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales comprende uno o más cebadores. El(los) cebador(es) puede(n) utilizarse para detectar el polimorfismo, por ejemplo, en una reacción de amplificación o extensión específica de alelo. Por ejemplo, en una clase de realizaciones, el primer polimorfismo es un primer polimorfismo de un único nucleótido que comprende un primer nucleótido en una primera posición de nucleótido, y el nucleótido en 3' de uno del conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales es complementario del primer nucleótido.

El(los) cebador(es) puede(n) utilizarse para amplificar una región de FRZB que comprende el polimorfismo, por ejemplo, para la subsiguiente detección del polimorfismo mediante hibridación, secuenciación o similares. En una clase de realizaciones, el conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales comprende cebadores de amplificación, y los cebadores de amplificación amplifican una secuencia de ácido nucleico que comprende el primer polimorfismo. En una clase relacionada de realizaciones, el conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales comprende cebadores de secuenciación que flanquean el primer polimorfismo.

El conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales se encuentran opcionalmente inmovilizados sobre un sustrato. El sustrato puede ser, por ejemplo, un sustrato plano o un sustrato en forma de cuenta. El(los) oligonucleótido(s) puede(n) colocarse en un chip junto con otros oligonucleótidos utilizados para detectar otros polimorfismos, por ejemplo, otros polimorfismos en FRZB.

El equipo puede utilizarse opcionalmente para detectar más de un polimorfismo (de forma simultanea o secuencial). Por lo

tanto, en una clase de realizaciones, el equipo también incluye un segundo conjunto de uno o más oligonucleótidos capaces de detectar un segundo polimorfismo (y opcionalmente un tercer, cuarto, quinto, etc. conjunto de oligonucleótidos capaces de detectar un tercer, cuarto, quinto, etc. polimorfismo). El segundo polimorfismo puede estar en el mismo sitio polimórfico que el primero o en un sitio polimórfico diferente (en FRZB o en un gen diferente), y puede ser protector o de predisposición.

#### **CHIPS y SISTEMAS**

10 La invención también está relacionada con un chip, un soporte con oligonucleótidos inmovilizados útil para poner en práctica el presente método. Un chip útil puede contener sondas de oligonucleótido específicas de alelos de FRZB o ciertas combinaciones de alelos de FRZB. Los oligonucleótidos pueden estar inmovilizados sobre un sustrato, por ejemplo, una membrana o vidrio. 15 Los oligonucleótidos pueden estar marcados, aunque no es necesario. En algunas realizaciones, el chip puede ser un microchip. En algunas realizaciones, el chip puede comprender uno o más oligonucleótidos utilizados para detectar la presencia de dos o más 20 alelos de FRZB o ciertas combinaciones de los alelos de FRZB.

Una clase general de realizaciones proporciona chips para detectar la presencia de uno o más polimorfismos de predisposición y/o protectores en un gen FRZB, por ejemplo, en una muestra de ácido nucleico de un individuo cuyo riesgo de padecer osteoporosis se desea valorar. En una clase de realizaciones, el chip 25 comprende un sustrato y una serie de oligonucleótidos, y cada uno de los oligonucleótidos hibrida con una región del gen FRZB que comprende al menos uno de los polimorfismos. La hibridación de-

5 tecta la presencia del polimorfismo, y esta detección proporciona una indicación del riesgo de un individuo de padecer osteoporosis. Normalmente, el chip se utiliza para detectar la presencia de una serie de polimorfismos, por ejemplo, múltiples alelos en un único sitio polimórfico y/o diferentes sitios polimórficos.

10 Esencialmente todas las características mencionadas anteriormente para las realizaciones del método y el equipo también se aplican a esta realización como relevantes. Por ejemplo, el conjunto de uno o más polimorfismos preferiblemente comprende uno o más polimorfismos de un único nucleótido. Por ejemplo, puede seleccionarse al menos uno del conjunto de uno o más polimorfismos de entre el grupo que consiste en: el alelo T de T2303723C, el alelo C de T2303723C, el alelo C de C18679T, el alelo T de C18679T, el alelo G de G19524A, el alelo A de G19524A, el alelo T de 15 de T22242A, el alelo A de T22242A, el alelo A de A24791G, el alelo G de A24791G, el alelo C de C26794G, el alelo G de C26794G, el alelo G de G27014A y el alelo A de G27014A. Otros SNP potenciales incluyen, pero no se limitan al alelo de T19575G, G23043A, G23415A o T23549C.

20 En una clase de realizaciones en las que el chip puede utilizarse para detectar la presencia de uno o más SNP, cada uno de los oligonucleótidos en el chip hibrida bajo condiciones astringentes con una región del gen FRZB que comprende uno de los polimorfismos de un único nucleótido con una proporción entre señal y 25 ruido que es de al menos 2x (por ejemplo, al menos 5x o al menos 10x) la del oligonucleótido que hibrida con una región del gen FRZB que comprende cualquiera de los polimorfismos de un único nucleótido restantes. Normalmente se utiliza un oligonucleótido

para detectar un SNP, es decir, cada uno de los oligonucleótidos normalmente hibrida con un polimorfismo de un único nucleótido distinto.

5 Como se ha indicado, la serie de oligonucleótidos están inmovilizados en un sustrato, por ejemplo, un sustrato plano, una membrana, un portaobjetos de vidrio o similares. Normalmente, cada uno de los oligonucleótidos de la serie está inmovilizado en una posición conocida, predeterminada sobre el sustrato.

10 Para facilitar la detección de polimorfismos mediante hibridación específica con los oligonucleótidos, cada uno de los oligonucleótidos de la serie normalmente es completamente complementario a una región del gen FRZB que comprende uno de los polimorfismos, y cada uno de los oligonucleótidos de la serie normalmente comprende al menos alrededor de 10 nucleótidos contiguos  
15 complementarios al gen FRZB. Cada uno de los oligonucleótidos de la serie comprende opcionalmente un marcaje, por ejemplo, un marcaje que facilita la detección de la hibridación entre los oligonucleótidos y los polimorfismos.

20 El chip forma parte opcionalmente de un sistema. por lo tanto, una clase de realizaciones proporciona un sistema que comprende un chip de la invención y las instrucciones del sistema para correlacionar la detección de la presencia de uno o más polimorfismos de predisposición o protectores del riesgo de un individuo de padecer osteoporosis. Los sistemas, por ejemplo, sistemas digitales, se describen en mayor detalle a continuación.  
25

En un chip sobre un sustrato, normalmente cada oligonucleótido está unido (por ejemplo, unido electrostáticamente o covalentemente, directamente o a través de un enlazante) al sustrato

en una localización única.

Los métodos para obtener, utilizar y analizar tales chips (por ejemplo microchips) son bien conocidos en la materia. Véanse, por ejemplo, Wang et al., 1998, Science 280:1077-82; Lockhart y Winzeler, 2000, Nature 405:827-836; y Scherf et al., 2000, Nat Genet. 24:236-44. Los chips pueden estar formados (por ejemplo, impresos), por ejemplo, utilizando instrumentos disponibles a nivel comercial como un GMS 417 Arrayer (Affymetrix, Santa Clara, CA). Los soportes sólidos adecuados están disponibles a nivel comercial fácilmente. Por ejemplo, una serie de membranas (por ejemplo, membranas de nylon, PVDF y nitrocelulosa) están disponibles a nivel comercial, por ejemplo, de Sigma-Aldrich, Inc. ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)). Como otro ejemplo, los portaobjetos con la superficie modificada y portaobjetos pre-recubiertos con una gran variedad de químicas en su superficie están disponibles a nivel comercial, por ejemplo, de TeleChem International ([www.arrayit.com](http://www.arrayit.com)), Corning, Inc. (Corning, NY), o Greiner Bio-One, Inc. ([www.greinerbiooneinc.com](http://www.greinerbiooneinc.com)). Por ejemplo, están disponibles los portaobjetos silanizados y silicatados con grupos libres amino y aldehído, respectivamente, que permiten el acoplamiento covalente de moléculas (por ejemplo, oligos) a los portaobjetos. Están disponibles portaobjetos con estreptavidina en la superficie que pueden unir oligos biotinilados. Además, están disponibles a nivel comercial servicios que fabrican chips de ácidos nucleicos personalizados, por ejemplo, de TeleChem International ([www.arrayit.com](http://www.arrayit.com)).

#### **SISTEMAS DIGITALES**

En general, pueden utilizarse varios sistemas automatizados

para realizar algunos pasos o la totalidad del método aquí indicado. Además de poner en práctica algunos pasos o la totalidad del método aquí indicado, los sistemas digitales o análogos, por ejemplo, los que comprenden una computadora digital o análoga, también pueden controlar una variedad de otras funciones como una pantalla visualizable por el usuario (por ejemplo, que permita visualizar al usuario los resultados del método) y/o controlar los datos de salida.

Por ejemplo, algunos de los métodos descritos anteriormente se implementan opcionalmente a través de un programa o programas informáticos (que por ejemplo, correlacionan la detección de la presencia de el conjunto de uno o más polimorfismos de predisposición o protectores con el riesgo de un individuo de padecer osteoporosis). Por lo tanto, la presente invención proporciona sistemas digitales, por ejemplo, computadoras, medios legibles en una computadora y/o sistemas integrados que comprenden las instrucciones (por ejemplo, incorporadas en un programa apropiado) para realizar los métodos aquí descritos. Por ejemplo, un sistema digital que comprende las instrucciones para correlacionar la detección de la presencia de uno o más polimorfismos de predisposición o protectores con el riesgo de un individuo de padecer osteoporosis, como se describe aquí, es una característica de la invención. El sistema digital también puede incluir información (datos) correspondientes a los genotipos individuales de un conjunto de marcadores genéticos, valores fenotípicos y/o similares. El sistema también ayudar en la detección de uno o más polimorfismos (por ejemplo, controlando un escáner de microchips o similares).

Las aplicaciones estándar de escritorio, como un programa procesador de textos (por ejemplo, Microsoft Word™ o Corel Word-Perfect™) y/o un programa de bases de datos (por ejemplo, programas de hoja de cálculo como Microsoft Excel™, Corel Quattro Pro™ o programas de bases de datos como Microsoft Access™ o Paradox™) pueden adaptarse a la presente invención introduciendo los datos que están cargados en la memoria de un sistema digital, y realizando una operación como la que se indica aquí con los datos. Por ejemplo, los sistemas pueden incluir los programas anteriores con la información genotípica apropiada, asociaciones entre fenotipo y genotipo, etc., por ejemplo, utilizados junto con una interfaz de usuario (por ejemplo, una GUI en un sistema operativo estándar como los sistemas Windows, Macintosh o LINUX) para realizar cualquier análisis aquí indicado, o simplemente para adquirir los datos (por ejemplo, en una hoja de cálculo) para utilizarla en los métodos aquí descritos.

Los sistemas normalmente incluyen, por ejemplo, una computadora digital con programas para realizar análisis de asociación y/o predicción del riesgo, así como datos introducidos en el sistema de programas que comprenden los genotipos de un conjunto de marcadores genéticos, valores fenotípicos y/o similares. La computadora puede ser, por ejemplo, un PC (una máquina Intel x86 o con chip compatible con Pentium DOS™, OS2™, WINDOWS™, WINDOWS NT™, WINDOWS95™, WINDOWS98™, LINUX, compatible con Apple, compatible con MACINTOSH™, compatible con Power PC o compatible con UNIX (por ejemplo, estación de trabajo SUN™) u otras computadoras comunes a nivel comercial que son conocidas para el experto en la materia. Un experto puede generar programas para realizar análisis

sis de asociación y/o predicción del riesgo utilizando un lenguaje de programación estándar como Visualbasic, Fortran, Basic, Java o similares, de acuerdo con los métodos aquí descritos.

Cualquier sistema controlador o computadora opcionalmente  
5 incluye un monitor que puede incluir, por ejemplo, una pantalla con tubo de rayos catódicos ("CRT"), una pantalla de panel plano (por ejemplo, pantalla de cristal líquido de matriz activa, pantalla de cristal líquido) u otras. Los circuitos de la computadora a menudado están situados en una caja que incluye numerosas  
10 tarjetas de circuitos integrados, como un microprocesador, memoria, circuitos de interfaz y otros. LA caja también incluye opcionalmente un directorio de disco duro, un directorio de disco flexible, un directorio externo de alta capacidad como un CD-ROM gravable y otros elementos periféricos comunes. Los dispositivos  
15 de entrada como un teclado o un ratón opcionalmente proporcionan la entrada desde el usuario y la selección del usuario del genotipo del marcador genético, valor fenotípico o similares en el sistema de computadora relevante.

La computadora normalmente incluye programas adecuados para  
20 recibir instrucciones del usuario, en forma de información introducida por el usuario en un conjunto de campos de parámetros, por ejemplo, en una GUI, o en forma de instrucciones preprogramadas, por ejemplo, preprogramadas para una serie de operaciones específicas diferentes. El programa luego convierte estas instrucciones  
25 al lenguaje apropiado para que el sistema realice cualquier operación deseada. Por ejemplo, además de realizar una predicción del riesgo, un sistema digital puede controlar el equipo para detectar los polimorfismos de acuerdo con el método relevante aquí

descrito.

La invención también puede realizarse con el grupo de circuitos de un circuito integrado específico de aplicación (ASIC) o dispositivo lógico programable (PLD). En tal caso, la invención se realiza en un lenguaje descriptor legible por una computadora que puede utilizarse para crear un ASIC o PLD. La invención también puede realizarse con el grupo de circuitos o procesadores lógicos de una variedad de aparatos digitales distintos, como PDA, sistemas de computadora portátil, pantallas, equipo de edición de imágenes, etc.

#### **TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

Las técnicas convencionales de biología molecular y química de los ácidos nucleicos, que son habituales en la materia, están explicadas en detalle en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, Ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames y S.J. Higgins. Ed., 1984); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); la serie *Current Protocols in Human Genetics* (Dracopoli et al., Ed., 1984 con actualizaciones trimestrales, John Wiley & Sons, Inc.); Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, *Methods in Enzymology* volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA; Sambrook et al., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2000; *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., Ed., *Current Protocols*, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplementado durante

2004); Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, tercera edición, Wiley- Liss, New York y las referencias que allí se citan; Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; 5 Gamborg y Phillips (Ed.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual*, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York); y Atlas y Parks (Ed.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

#### **EJEMPLOS**

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

#### **Ejemplo 1: Protocolo de genotipificación: PCR específica de alelo de los alelos de FRZB**

Este ejemplo describe un método de genotipificación de SNP 15 (y/o la determinación de la frecuencia de los alelos en muestras de DNA agrupadas) en el locus de FRZB, por ejemplo, los SNP que están asociados con la osteoporosis. El método utilizado es básicamente el de Germer, et al., *Genome Research*, 10:258-266 (2000). El método y los cebadores se probaron inicialmente en las líneas 20 celulares listadas en la Tabla 2. Los genotipos de FRZB de estas líneas celulares se habían determinado previamente mediante secuenciación de DNA para algunas de las líneas, otras líneas se genotipificaron mediante secuenciación con posterioridad y algunas no se han secuenciado hasta la fecha.

25 Se diseñaron y probaron cebadores específicos de alelo y cebadores comunes. La PCR específica de alelo se realizó utilizando los pares de cebadores listados en la Tabla 2 (Id. de Sec. N°:3-29). Todos los cebadores se muestran en orientación de 5' a

3'. Además de los cebadores, en la Tabla 2 también se muestra el genotipo control de cada línea celular control para SNP particulares utilizados en los ensayos de prueba.

Tabla 2: Información del ensayo específico de alelo

SNP	Línea celular control	Genotipo control	Cebador	Alelo	Secuencias cebador (Id. de Sec. N°)
FRZB C18679T	GM15890	A1/A1	AS1	C	ATAGTAGGAGGAGTACTGTGTCG (Id. de Sec. N°:3)
FRZB C18679T	GM15892	A1/A2	AS2	T	AATAGTAGGAGGAGTACTGTGTCA (Id. de Sec. N°:4)
FRZB C18679T	GM15891	A2/A2	Común		CCCTGTGGACTATCACCTAATGTT (Id. de Sec. N°:5)
FRZB G19524A	GM15890	A1/A1	AS1	G	ATAGGCCATCAGTTGTGC (Id. de Sec. N°: 6)
FRZB G19524A	GM15208	A1/A2	AS2	A	CATAGGCCATCAGTTGTGT (Id. de Sec. N°: 7)
FRZB G19524A	GM15206	A2/A2	Común		TCAAAGTGCTCTGCTGTTAC (Id. de Sec. N°:8)
FRZB T22242A	GM15207	A1/A1	AS1	T	GATCTTATTTCTCCATCTGCT (Id. de Sec. N°:9)
FRZB T22242A	GM15889	A1/A2	AS2	A	ATCTTATTTCTCCATCTGCA (Id. de Sec. N°:10)
FRZB T22242A	GM15206	A2/A2	Común		CGTGAGGGAAAGGAATGTTG (Id. de Sec. N°:11)
FRZB G23043A	GM15888	A1/A1	AS1	G	TTGTCTTTTATCCCAGTCATTC (Id. de Sec. N°:12)

FRZB G23043A	GM15890	A1/A2	AS2	A	TTGTCTTTTATCCCAGTCATTT (Id. de Sec. N°:13)
FRZB G23043A	GM13626	A1/A2	Común		CATCATGGCACTTAGTCTTTATCTC (Id. de Sec. N°:14)
FRZB G23415A	GM15888	A1/A1	AS1	G	AAAAATGTAAACCTATAAACTACACG (Id. de Sec. N°:15)
FRZB G23415A	GM15890	A1/A2	AS2	A	GAAAAATGTAAACCTATAAACTACACA (Id. de Sec. N°:16)
FRZB G23415A	GM13626	A1/A2	Común		TCTTGATTTTATATATGGAATGGGT (Id. de Sec. N°:17)
FRZB T23549C	GM15204	A1/A1	AS1	T	ACAGTACTTGAACAAGAAAGACTTAT (Id. de Sec. N°:18)
FRZB T23549C	GM15889	A1/A2	AS2	C	ACAGTACTTGAACAAGAAAGACTTAC (Id. de Sec. N°:19)
FRZB T23549C	NA14700	A1/A2	Común		ACTGTTCTAAATCTTAGCTGTCCTATTC (Id. de Sec. N°:20)
FRZB G24791A	GM10347	A1/A1	AS1	G	CTCCCTTTTGACAAATCTACTG (Id. de Sec. N°:21)
FRZB G24791A	GM11235	A1/A2	AS2	A	TCTCCCTTTTGACAAATCTACTA (Id. de Sec. N°:22)
FRZB G24791A	GM13625	A2/A2	Común		GAAACTACCCTCCAGTAAGTTCTTC (Id. de Sec. N°:23)
FRZB C26794G	GM11318	A1/A1	AS1	C	TTCGGGATTTAGTTGCG (Id. de Sec. N°:24)
FRZB C26794G	GM10873	A1/A2	AS2	G	TTCGGGATTTAGTTGCC (Id. de Sec. N°:25)

FRZB C26794G	NA14683	A2/A2	Común		GTCTGGCAGGAACTCGAACC (Id. de Sec. N°:26)
FRZB G27014A	GM05045	A1/A1	AS1	G	TGGGGGCAGACTCTTAAG (Id. de Sec. N°: 27)
FRZB G27014A	GM10873	A1/A2	AS2	A	TGGGGGCAGACTCTTAAA(Id. de Sec. N°: 28)
FRZB G27014A	NA14683	A1/A2	Común		CATGATTAGTGAAATAGAAAACCTCACA (Id. de Sec. N°:29)
FRZB T19575G	GM10347	A1/A1	AS1	T	GACTGAAGAAGTCAAGTTTGAGT (Id. de Sec. N°:30)
FRZB T19575G	GM04340	A1/A2	AS2	G	ACTGAAGAAGTCAAGTTTGAGG (Id. de Sec. N°:31)
FRZB T19575G	GM13626	A1/A2	Común		TGAACAGCAGAGCACTTTGAT (Id. de Sec. N°:32)
FRZB T2303723C	GM12548	A1/A1	AS1	T	GTCGGCATTCTTATCATTCA (Id. de Sec. N°:33)
FRZB T2303723C	GM14663	A1/A2	AS2	C	CGGCATTCTTATCATTCTG (Id. de Sec. N°: 34)
FRZB T2303723C	GM14667	A2/A2	Común		AATAAGTCTCATCCATACTCAACCC (Id. de Sec. N°:35)

La amplificación de PCR se realizó en un volumen total de reacción de 50 µl que contenían los siguientes reactivos: 3,5 ng de DNA genómico humano purificado, 0,2 µM de cada cebador (un cebador común y un cebador específico de alelo), 50 µM de dATP, 5 dCTP, dGTP, 25 µM de dTTP, 75 µM de dUTP, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,02U UNG (uracil-n-glucosilasa), DMSO al 4%, glicerol al 2%, 0,2X SYBR™ Green, 12 unidades CEA2 DNA polimerasa

Gold™\*. \*desarrollada y fabricada por Hoffmann-La Roche. Con la CEA2 Gold se añade 0,5% de glicerol. Con el SYBR Green se añade 1% de DMSO.

La PCR se analizó en un sistema de detección de secuencia  
5 GeneAmp 5700 (ABI) midiendo la fluorescencia del SYBR™ Green I (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) a tiempo real (Higuchi, R. et al., 1993, Biotechnology 11:1026-30), como sigue: 50°C durante 2 min., 95°C durante 12 min., 95°C durante 20 s. y 58°C durante 20 s. repetido durante 45 ciclos.

10 Todos los cebadores que se muestran en la Tabla 2 utilizados bajo estas condiciones resultaron en el genotipo correcto conocido de cada SNP para cada línea celular. Por lo tanto, el ensayo de genotipificación puede utilizarse para un posterior análisis de los SNP. Las líneas celulares se utilizaron como controles  
15 positivos en un posterior análisis.

**Ejemplo 2: Análisis de agrupamiento para identificar enfermedades asociadas con SNP de FRZB conocidos**

El análisis de agrupamiento se utilizó para facilitar el cribaje de genes candidatos (por ejemplo, el gen FRZB) que se  
20 cree que está asociado con la osteoporosis. Una gran diferencia de la frecuencia de alelos entre los grupos de DNA de pacientes y de los controles es indicativo de una posible implicación de un gen en estas condiciones. En lugar de genotipar un gran número de muestras, medir la frecuencia de alelo de un conjunto único com-  
25 puesto de las mismas cantidades de estas muestras permite el análisis rápido de un gran número de genes candidatos.

En la Tabla 1 se listan once ejemplos de SNP en el gen humano FRZB. Las frecuencias de alelo de estos SNP se midieron

utilizando PCR cuantitativa específica de alelo, en conjuntos de muestras del Estudio de Fracturas Osteoporóticas (EFO), utilizando el método de Germer, et al., Genome Research, 10:258-266 (2000) como se describe en el Ejemplo 1. El Estudio de Fracturas Osteoporóticas (Kado, et al., Arch. Intern. Med. 159:1215-1220 (1999)) incluye DNA obtenidos de mujeres de 65 años o más que presentan fracturas de cadera, fracturas vertebrales, baja densidad mineral ósea (BMD) o un índice de masa corporal alto (IMC), así como muestras control. El grupo en estudio comprende 1042 muestras de DNA en total.

Determinación de la frecuencia de alelo:

Para medir una frecuencia de alelo de SNP en una mezcla de DNA agrupadas de muestras de individuos, se dividieron las mismas alícuotas del conjunto entre dos reacciones de PCR, cada una de las cuales contiene un primer par específico con una o la otra variante alélica de SNP (por ejemplo, un cebador específico de alelo y un cebador común para cada SNP, como se describe en el Ejemplo 1). La especificidad de la amplificación de PCR se confiere al situar el extremo 3' de uno de los cebadores (el cebador específico de alelo) directamente sobre y emparejando con una u otra de las variantes de nucleótidos. Esta especificidad puede aumentarse en particular utilizando el fragmento Stoffel de la polimerasa de DNA Taq o variantes de las mismas. Idealmente, sólo los cebadores completamente emparejados se extienden, y sólo el alelo emparejado se amplifica. En la práctica, no obstante, habrá normalmente la amplificación del alelo desemparejado, pero esto debe ocurrir menos eficientemente ya que son necesarias muchos ciclos de amplificación para generar niveles detectables de pro-

ducto. La amplificación de desemparejamientos se retrasa frecuentemente en > 10 ciclos cuando la amplificación se monitoriza en un régimen de ciclo tras ciclo utilizando tinciones fluorescentes de unión a dsDNA como el SYBR Green I. Un retraso de alrededor de  
 5 seis ciclos es adecuado para la determinación de frecuencias de alelo de SNP para los que la frecuencia del alelo menor es superior que un pequeño porcentaje.

Cuando la frecuencia de alelo es del 50%, se espera que cada una de las dos amplificaciones de PCR requieran el mismo número de ciclos para producir la misma señal fluorescente, asumiendo  
 10 que ambos cebadores específicos de alelo amplifiquen con la misma eficiencia. El número de ciclos antes de que la reacción cruce un umbral predeterminado, el Ct, puede ser una fracción. Cuando un alelo es más frecuente, la amplificación del alelo alcanzará el  
 15 umbral en un ciclo más temprano, esto es, posee un Ct más pequeña. La diferencia de Ct entre las dos reacciones de PCR, el  $\Delta Ct$ , es una medida del sesgo y así de la frecuencia de alelo. Un retraso de un ciclo indica que la proporción de la cantidad de un alelo respecto al otro es de 1:2, un retraso de dos ciclos, 1:4,  
 20 o en general,  $1:2^{\Delta Ct}$ . Al convertir una proporción en una frecuencia añadiendo el numerador al denominador resulta en la ecuación

$$\text{Frecuencia de alelo}_1 = 1 / (2^{\Delta Ct} + 1),$$

En la que  $\Delta Ct = (\text{Ct de PCR específica del alelo}_1) - (\text{Ct de PCR específica del alelo}_2)$ .  
 25

Debe notarse que el  $\Delta Ct$  puede ser positivo o negativo, dependiendo de la PCR específica que presenta el Ct más bajo. El "2" en el denominador es se forma adecuada "1 + la eficiencia

inicial de replicación". No obstante, eficiencia inicial de replicación está normalmente cercana al 100% por lo que el "2" es una aproximación adecuada. Las eficiencias de amplificación para las dos PCR específicas de alelo pueden diferir ligeramente. Tal como se discute en Germer et al. (supra), puede medirse y compensarse para realizar el ensayo con un DNA conocido por ser heterocigoto para el SNP de interés. El  $\Delta C_t$  para este DNA puede ser igual a cero si la PCR son igualmente eficientes. Cualquier desviación del cero indica que no lo son. Esta desviación puede sus-  
traerse de todas las mediciones de  $\Delta C_t$  para compensar las eficiencias de amplificación diferenciales.

Cada SNP excepto T2303723C se describieron por esta posición en la referencia del GenBank de la secuencia NT\_005100.3. Esta secuencia (con tan sólo 4 exones) se archivó y sustituyó en GenBank con una secuencia más completa que contenía 6 exones (NT\_005265), que a su vez se sustituyó por NT\_005403. No obstante, la secuencia original en la que se basa la numeración (NT\_005100.3) puede obtenerse del GenBank, y los primeros 30.000 nucleótidos de esta secuencia se presentan como Id. de Sec. N°:1. Así, por ejemplo, el segundo SNP listado en la Tabla 1 se encuentra en la posición 18679 de NT\_005100.3 (y de Id. de Sec. N°:1), en la que un nucleótido "T" está presente como el complementario del nucleótido 18679 de Id. de Sec. N°:1. El alelo común posee un nucleótido "C" en esta posición. El SNP T2303723C se describió en su posición en la secuencia del GenBank con número de acceso NT\_005265. Los SNP están referidos por el N° de SNP (es decir, por la posición del nucleótido en Id. de Sec. N°:1 o NT\_005265, como se la indicado antes, aunque el(los) nucleótido(s) indicados

ocupen la posición indicada o su complementario, dependiendo del SNP en particular; véase la Figura 1) en el texto posterior. De forma similar, los SNP pueden localizarse en cualquier secuencia FRZB realizando un alineamiento de secuencia con las secuencias de cebadores específicas de alelo listadas en la Tabla 2. Los SNP pueden también localizarse de forma inequívoca en la base de datos del NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>) a través del número de fuente de SNP listado en la Tabla 1.

Las muestras agrupadas se denominaron de la A a la D (véase, por ejemplo, la Tabla 3). El criterio de agrupamiento de A fue fractura de cadera (cualquier incidente de fractura de cadera desde línea de base, con exclusión de fractura de cadera anterior a los 50 años). El criterio de agrupamiento de B fue fractura vertebral (cualquier incidente de fractura mediante morfometría entre la línea basal y la visita 3). El criterio de agrupamiento de C fue DMO baja (densidad mineral ósea, definida como tener una DMO de cadera de puntuación  $T < -2,5$ ). El criterio de agrupamiento de D (control) fue ausencia de fractura desde los 50 años y DMO de cadera de puntuación  $Z > 1,285$ . El criterio de agrupamiento de IMC alto fue un índice de masa corporal dentro del 5% de mayor índice de entre los participantes del SOF y el criterio para el agrupamiento de IMC bajo fue un índice de masa corporal dentro del 5% de menor índice de entre los participantes del SOF.

Los grupos involucrados que combinan las mismas cantidades de DNA de pacientes con cada criterio específico. El grupo A incluye 275 muestras de pacientes; el grupo B contiene 262 muestras de pacientes; el grupo C incluye 276 muestras de pacientes; y el grupo D contiene 278 muestras de pacientes. El grupo de IMC alto

contiene 141 muestras y el grupo de IMC bajo contiene 82 muestras. Las PCR se realizaron en 4 réplicas utilizando los cebadores y el protocolo descrito en el Ejemplo 1 excepto que las PCR contenían 10 ng de DNA genómico humano purificado y 2 uM de Rox.

- 5 Las medias de las cuatro réplicas se calcularon, y las frecuencias de alelo se calcularon entonces siguiendo el método anterior y se compararon con los controles. Un cambio en la frecuencia de alelo de más de aproximadamente 4-5% se consideró significativo. Los resultados de agrupamiento para cada SNP de FRZB se muestran
- 10 en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Resultados de agrupamiento de FRZB

Frecuencia media de alelo I (%)							Cambio en la Frecuencia de alelo I (%)			
Grupo	A	B	C	D	IMC bajo	IMC alto	A-D	B-D	C-D	IMC bajo- IMC alto
FRZB_ C18679T	66,38	61,81	69,06	63,79	71,02	65,75	2,59	-1,98	5,27	5,27
FRZB_ G19524A	74,12	68,57	71,49	68,6	81,69	67,6	5,52	-0,03	2,89	14,09
FRZB_ T22242A	74,66	69,91	72,74	70,14	82,27	72,18	4,52	-0,23	2,60	10,09
FRZB_ G23043A	88,01	91,66	91,15	88,65	88,79	88,89	-0,63	3,01	2,50	-0,10
FRZB_ G23415A	83,69	89,48	88,86	84,90	85,30	86,26	-1,21	4,58	3,96	-0,96
FRZB_ T23549C	98,30	97,89	97,33	98,56	97,77	97,02	-0,26	-0,67	-1,22	0,75

FRZB_ A24791G	50,53	56,92	55,67	56,26	46,12	61,57	-5,73	0,66	-0,59	-15,45
FRZB_ C26794G	82,22	81,82	78,24	82,23	80,5	76,66	0,0	-0,41	-3,99	3,84
FRZB_ G27014A	96,79	98,69	96,54	95,5	98,62	96,1	1,29	3,2	1,04	2,52
A Fractura de cadera B Fractura Vertebral C DMO bajo D Control										

### **Ejemplo 3: Genotipificación de individuos**

Debido a las diferencias significativas en la frecuencia de alelo entre algunos casos osteoporóticos y grupos control y entre los grupos de IMC alto y bajo, las muestras de individuo se genotiparon para verificar las diferencias en la frecuencia de alelo y para determinar las frecuencias de genotipo en estos grupos. El mismo protocolo específico de alelo se utilizó en las muestras de DNA de los individuos para determinar sus genotipos. Las amplificaciones de PCR se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

Los cebadores utilizados para genotipar los SNP de FRZB son los que se muestran en la Tabla 2. Estos resultados se analizaron utilizando la Chi cuadrado de Pearson (o un Test Exacto si el número de sujetos con uno de los genotipos fue de 10 o menos) para determinar si la distribución de las frecuencias de genotipo fueron significativamente diferentes entre los grupos de individuos que poseen cualquiera de los fenotipos osteoporóticos y controles y entre los grupos de individuos con IMC alto (es decir, obesidad) e IMC bajo.

Se demostró una asociación significativa entre un IMC alto y los SNP de FRZB\_T2303723C, FRZB\_C18679T, FRZB\_G19524A y FRZB\_T22242A ( $p < 0,45$ ). También se demostró una asociación menor entre un IMC alto y el SNP FRZB\_A24791G ( $p < 0,1$ ). Se demostró que cada uno de los alelos T de T2303723C, el alelo T de C18679T, el alelo A de G19524A, el alelo A de T22242A, y el alelo G de A24791G estaban asociados con un IMC alto (y así, con un riesgo alto de padecer obesidad). La asociación es más estadísticamente significativa si el efecto de cada uno de los alelos se asume que es recesivo.

Respecto a la osteoporosis, se demostraron asociaciones significativas entre el aumento de la incidencia de fractura vertebral y los SNP FRZB\_C26794G y FRZB\_G27014A ( $p < 0,05$ ). También se demostró una asociación menor entre una incidencia alta de fractura de cadera y el SNP FRZB\_C18679T ( $p < 0,1$ ), así como entre una incidencia alta de fractura de cadera y el SNP FRZB\_G19524A ( $p < 0,1$ ). Se demostró que cada uno de los alelos C de C18679T, el alelo G de G19524A, el alelo C de C26794G, y el alelo G de G27014A estaban asociados con una incidencia alta de fractura de cadera o fractura vertebral (y así, con un riesgo alto de sufrir osteoporosis). La asociación es más estadísticamente significativa si el efecto de cada uno de estos alelos se asume que es recesivo.

Además, vale la pena señalar que tras el ajuste de peso y edad de los pacientes, el alelo A de A24791G está asociado con un aumento de la incidencia de fractura de cadera ( $p < 0,1$ , asumiendo que el alelo A es recesivo). De forma similar, al utilizar un grupo control alternativo (definido como ausencia de fractura

desde los 50 años y el 5% mayor de DMO de cadera en los individuos del grupo de edad de 5 años), el alelo T de T22242A está asociado con un aumento de la incidencia de fractura de cadera. De nuevo, la asociación es más estadísticamente significativa si el efecto de este alelo se asume que es recesivo.

Asociación de los SNP de FRZB con la obesidad en mujeres

Este ejemplo demuestra la asociación de los SNP de FRZB con la obesidad en mujeres.

Como se ha señalado anteriormente, la genotipificación de FRZB se llevó a cabo en mujeres del Estudio de Fracturas Osteoporóticas (SOF), utilizando un método de genotipificación esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 1. La Tabla 4 describe los resultados de genotipificación para los cuatro SNP de FRZB indicados y los números y porcentajes de individuos en cada categoría de IMC para cada genotipo.

Tabla 4: Asociación del genotipo FRZB con el IMC

	C18679T					G19524A			
	IMC	Nº	%			IMC	Nº	%	Distribución total de G19524A P=,0051
T/T	Alto	18	12,8		A/A	Alto	14	10,0	
	Bajo	3	3,7			Bajo	0	0,0	
T/C	Alto	55	39,0		A/G	Alto	50	35,5	
	Bajo	38	46,3			Bajo	30	36,6	Modelo en que 19524A es alelo recesivo P=,0032
C/C	Alto	68	48,2		G/G	Alto	77	54,6	
	Bajo	41	50,0			Bajo	52	63,4	
Nº Total IMC alto=141; Nº Total IMC bajo=82									
	T22242A					A24791G			
	IMC	Nº	%			IMC	Nº	%	
A/A	Alto	15	10,7		G/G	Alto	36	25,5	
	Bajo	2	2,4			Bajo	13	15,9	
A/T	Alto	57	40,4		G/A	Alto	69	48,9	
	Bajo	32	39,0			Low	43	52,4	
T/T	Alto	69	48,9		A/A	Alto	36	25,5	

	Bajo	48	58,5		Bajo	26	31,7	
--	------	----	------	--	------	----	------	--

Análisis estadístico, métodos y algoritmos: Se evaluó la asociación de los genotipos de FRZB con la obesidad utilizando un test de Chi-cuadrado de Pearson o, si el número de sujetos con uno de los genotipos fue de 10 o menos, el test exacto de Fisher.

5 La Tabla 4 muestra los valores p (probabilidades) de la distribución de genotipos en el SNP G19524A entre los grupos de IMC alto y baja que pueden obtenerlo meramente por probabilidad. Esto se ha visto que es bastante improbable. Así existe una asociación estadística entre G19524A y el IMC. El valor p es aún inferior si

10 se asume que los alelos minoritarios, 19524A, ejercen su efecto genético de forma recesiva (son necesarios dos alelos 19524A).

Asociación de FRZB con osteoporosis en muestras de SOF

Este ejemplo demuestra la asociación de SNP de FRZB con la osteoporosis en muestras de SOF.

15 La Tabla 5 describe los resultados de la genotipificación de SNP C26794G de FRZB y los números y porcentajes de individuos en la categoría de fractura vertebral y control para cada genotipo.

20 Tabla 5: Asociación del genotipo FRZB con la fractura vertebral

	C26794G (Arg -> Gly)			Distribución total P=,025
	fractura	Nº	%	
G/G	No	1	0,4	
	Sí	2	0,8	
G/C	No	52	18,7	
	Sí	29	11,1	
C/C	No	225	80,9	
	Sí	231	88,1	
Nº Total de fracturas vertebrales =262; Nº Total de control =278				

Análisis estadístico, métodos y algoritmos: Se evaluó la

asociación de los genotipos de FRZB con la osteoporosis utilizando un test de Chi-cuadrado de Pearson o, si el número de sujetos con uno de los genotipos fue de 10 o menos, el test exacto de Fisher. La Tabla 5 muestra los valores p (probabilidades) de la  
5 distribución de genotipos de C26794G entre la fractura vertebral y los grupos control que pueden obtenerlo meramente por probabilidad. Esto se ha visto que es bastante improbable. Así existe una asociación estadística entre C26794G y la fractura vertebral. C26794G imparte una sustitución (aminoácido) de código (arginina  
10 por glicina) en la secuencia de proteínas de FRZB.

Como FRZB es un componente pequeños del sistema complejo de genes asociados con la obesidad y/o osteoporosis (que se cree que está relacionada ya que las células óseas y adiposas se originan de las mismas ramas de la ruta de desarrollo), el efecto del locus  
15 FRZB se espera que sea variable. Otros factores, como los hábitos alimentarios, ejercicio, dieta, salud general y la presencia de enfermedades asociadas, pueden ejercer un efecto dominante que, en algunos casos, pueden enmascarar el efecto de los genotipos FRZB. Además, ya que las frecuencias de alelo en otros  
20 loci relevantes para las enfermedades relacionadas con el peso y los huesos difieren entre poblaciones y, así, las poblaciones presentan diferentes riesgos para dichas enfermedades, se espera que el efecto del genotipo FRZB pueda ser de diferente magnitud en algunas poblaciones. Aunque la contribución del genotipo FRZB  
25 pueda, en ciertas poblaciones, ser relativamente menor por sí misma, la genotipificación en el locus FRZB proporciona información que es, sin embargo, útil para una caracterización de la predisposición de un individuo hacia la obesidad y/o osteoporosis.

sis. La información del genotipo de FRZB puede ser particularmente útil cuando se combina con la información del genotipo de otro loci y/o análisis clínico para la obesidad y/o osteoporosis, por ejemplo.

5 Aunque la invención se ha descrito en el contexto de ciertas realizaciones y ejemplos, los expertos en la materia entenderán que la invención se extiende más allá de las realizaciones específicamente descritas incluyendo realizaciones y/o usos alternativos y modificaciones evidentes y equivalentes de los mismos. De acuerdo con esto, la invención no pretende limitar mediante las descripciones específicas de realizaciones preferibles de este documento, sino en referencia a las reivindicaciones ad-  
10 juntas.

## LISTADO DE SECUENCIAS

&lt;110&gt; F. Hoffmann-La Roche AG

<120> **ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN FRZB CON LA****OBESIDAD Y LA OSTEOPOROSIS**

- 5           <130> 21634 WO  
            <150> US 60/464,372  
            <151> 2003-04-21  
            <150> US 60/526,689  
            <151> 2003-12-01
- 10           <160> 35  
            <170> PatentIn versión 3.3  
            <210> 1  
            <211> 30000  
            <212> DNA
- 15           <213> Homo sapiens  
            <220>  
            <221> característica miscelánea  
            <222> (7061)..(7160)  
            <223> n sin identificar (a, c, g o t)
- 20           <220>  
            <221> característica miscelánea  
            <222> (7344)..(7344)  
            <223> n sin identificar (a, c, g o t)  
            <220>
- 25           <221> característica miscelánea  
            <222> (7438)..(7438)  
            <223> n sin identificar (a, c, g o t)  
            <220>

<221> característica miscelánea

<222> (7509)..(7608)

<223> n sin identificar (a, c, g o t)

<220>

5

<221> característica miscelánea

<222> (28902)..(28902)

<223> n sin identificar (a, c, g o t)

<220>

<221> característica miscelánea

10

<222> (28954)..(28954)

<223> n sin identificar (a, c, g o t)

<400> 1

gaattctaga	tttgccatta	atdddgtaca	ctgaactagt	cgcttgacat	tgacattcat	60
tagggattgt	gaagaacaaa	agaaatagta	atatgaagtt	actgataaac	ggtaaagcac	120
aatataaatg	tttaacaaca	acgtcattgg	ggagaggacg	tgatcatcctc	aggacaggaa	180

ccattagcaa	cacaataaaa	gcaaccaaca	cttatgttct	aggtgctgtc	ctgagtgcac	240
tttgcacatt	cattattatt	cccatttttg	agaaaaggaa	gccaaggcat	atagagaagc	300
taagttactg	tccaagttag	cagagctagt	aagaaaaaga	gaattcgaag	cagagcctgt	360
tctacactac	actttgtccc	ttaagaaatg	taattcctaa	ctttctagag	aatctgttat	420
tctttgccta	gcagattgca	gttaaaggaa	caaaggtttt	ctcattgtat	tttgaagtac	480
acttatctat	ggcttaagag	aataaaaggt	ggcttctaga	caatggattc	aaagagataa	540
gagattctga	cttactgca	attttgagat	agtagagatt	atacattcca	gattctcatg	600
tccctagtct	ctcggctca	gcatgcccc	gcgtgaactc	atcatttccc	catagtcatg	660
cacttgtttc	tttctagtat	tttctatatt	gttgaaagg	accaccatac	cttagtagtc	720
caggcctggg	aggcagtctt	ttttttttt	tttttttgag	acagtctcgc	tctgtcactc	780
agactggagt	gcagtggcgt	gatctctgct	cactgcaacc	tctgcctcca	aggttcaagc	840
aattctcctg	tctcagcctc	ctgagtagct	gggactacag	gtgcatgcca	ccacgcccag	900
ctaatttttg	tatttctgtt	agagatgggt	tttcgccatg	ttggccaggc	tggctctgaa	960
ctcctgacct	cagatgatct	gcctgccttg	gcctcgcagt	gctgagatta	cagggtgag	1020
tcaccatacc	tggctgtggg	aagcagtctt	gattctacct	tttctctcat	tcccctcact	1080
caataggat	cacatgctgt	ttggctctact	ctgactcaaa	ttccctctc	tccctcteta	1140
atgctacttt	cttagtttg	accttaccat	ttctcaccag	gattatggcc	ataggatgat	1200
aatggctctc	cttatctcca	gtatttcccc	tccatattcc	aatagacatt	ttttctgaaa	1260
tgcaaactct	ttgcttaaaa	tccttactaa	taatataat	tttcatttag	ggtaatttgt	1320
tgttagaatt	cctaagtta	actttctgac	aataattttt	tgatcaatta	ttagaaaatt	1380
tttgttttct	gtcttacagt	tctaacaatt	gacttotaag	catttgtaa	agcgtagaaa	1440
cattttcctt	tgaataagaa	tggaagaagt	aaaacactct	ccttggctta	gctattttga	1500
agtgattccc	ttcaccaag	caaagtttta	ttttcactc	ttatttctac	ctttgaacaa	1560
taaacatttc	aaatagggc	caatataatt	tcttccttta	tgaagacatt	atttttgtat	1620
gtagtttatc	acatgattat	tcagaaatag	aaaaaccact	ggcacgttac	tgtaataactt	1680
gggtacattt	atcatgaata	aatgtttgaa	tataatgaaa	gtattagtaa	ttaatagttt	1740
atgcccaagt	tgagccaaat	gttttagaat	tagtgtttgt	tacttgctta	tctgtttgtt	1800
tgctgactgc	tgtcttttct	tggatattgc	tttttaata	cttgctgatg	attactaaac	1860
ctgggaaagt	aattcattaa	ttgtaattgt	gggtgttata	gtcctaaaat	agtattaacc	1920

ccttgtttaa	tttattcctg	ataggaccta	taaacaaaa	ggacaaagga	agaatactat	1980
tttctcctag	aataaataga	ggcattaat	tagtttagca	taaagtgtta	ctacaaatgt	2040
aaaactctta	tataaagtac	taaattggag	tgtcaataag	gatatattgc	taggtacagc	2100
atctctcagc	acgggtgtcc	gctgggtcac	tgttattcat	tagaggctgc	tttcttaatt	2160
agaacacaga	aaacctttat	cattactatt	ttctgggatt	atggcatcct	aaaaagaatc	2220
aatagcaatt	tctaattatt	gtcacatcta	ttaattgcac	tggtctgaat	agtcacctgaa	2280
tagtaggttt	cttttctggt	gaagaattat	ttagcctgca	gttaaaggac	atgagaatga	2340
tttctgagtg	ttcgtttagg	aactaaggat	ttaaataat	accagttcag	tgtgatatgt	2400
ccatttattg	aagatgcgtt	tggttttttt	tttgtcatca	agtcataagt	gttggatgag	2460
tgcttaatat	ttgcataggc	tttatcatga	taggatgctt	atcatttaca	aattttgtga	2520
aattcaaata	aattattaaa	ttctaaaatt	ttatgcacag	ttgagtattc	agaagagtat	2580
ttccttataa	ccacatgaaa	aaataagtct	catccatact	caacctatga	atgataagaa	2640
tgccgacctc	atgacgttaa	taaaaatcta	cttccttcag	acaattggat	tcttacccaa	2700
atcaaacttg	tgactgagtt	agatttttat	cttttagaat	tcttgaaata	gatatgttat	2760
agttcttttt	totgtcacct	cctttcagat	tttcctatgg	attctagtaa	cggaaactgt	2820
agaggggcaa	gcagtgggtga	gtatatcatt	atcttctcgg	ttttcatttg	tggtcagatt	2880
agtcattgat	gtaatttaga	tacttaagtc	attcatgggg	aagcttgtgc	cctacatttt	2940
acaagtaaac	tttttaaaat	tccctcattt	atattaattt	tattttttaa	attagcacgt	3000
agtaaaatg	gacttttatt	tgacatata	gtttgggtaca	gatgaatttt	aatattatgt	3060
agagatttat	gtaaccacca	ccacatcagg	atacagaaca	attccatcac	ctccaaaac	3120
tccttcaagc	tgtatccctt	tataattaca	agttttccct	atcttcatcc	actggcaatc	3180
actcatcttt	tctttatcac	tatagttttc	tctatttgag	gttcgattgt	ccatatagac	3240
agactgacag	tacgcctttg	agacttaacc	aattgctgca	tatatcaatg	gtgcattcct	3300
ttttattaca	gaatatttta	ttacttggat	gtatgaccat	ttgttcaccc	attcactcct	3360
tcaaggaagt	ttgggttgtc	tccagtttgg	agcaatcgcg	aatagagcta	ctataaacat	3420
tccagtacag	gtttttgtgg	gaatgtaagt	ttttatttct	ctaggctaaa	taagtaggaa	3480
taggatcact	gggttatatg	gtaagtatat	gttttagcttt	gtaaaaaagt	gccaaactgt	3540
ttccaagatg	gctgttcaat	tttgtgctag	taatgtataa	gagttccagt	tgttctatat	3600
ctttgcgagc	ccttggtatt	atcaatatat	tttattgtta	gccattttaa	taggtatgtg	3660
ataatagctc	atcatggttt	taaattgcat	ttccctaattg	gctaattgatg	ctgaatacat	3720

tttcatgtgt ttatttgcta tccacatata tgctttttgg taaaatgttc aataattttg	3780
cccattttaa gttgggttgt tttcttaatg agttctgagg gttctttaca tattctggat	3840
acaaaaaaca tcttttggtt ttattcattt tctctattgt ttcactgttt tcaattttat	3900
tgattatttc cttctgcttg cttgctttag aggtttatth tgctttttct tttgtttctt	3960
agagtagaag cttatattgt gttttgagac tttttttttt tttttgagat ggagtcttgc	4020
tctgttgccc aggctggagt gccgtgatgc aatctcagct caccacaacc tccacttctt	4080
gggttcaagc aattctgcct cagcctccca actagctagg attacagggtg tgcaccacca	4140
caccagcta atttttgtat tattagtaga gacaagattt caccatgttg gccagctggg	4200
ctctaact tgatctcagg tgatccacc accttggcct tacagagtgc tgggattaca	4260
cacgtgagcc accatgtccg gccaaagacct tttcttaat ataatgtaat gctataaata	4320
cccatctaag aatgacttta gttgcatctc acaaattttg atagtttcat tttcttcag	4380
ttcaaaatat tttatatttt tccttgatat ttcctttgac ttgtgcatca tttgggatta	4440
tgctgtttaa tttgctgctt tttgaggatt ttcctattat ctttgctatt tttcaaattc	4500
tactgttgaa gaatatactt tgtgtgattt cagttctttt agatttatta aggtttattc	4560
tctgatccag gatataatct gtcttggtga atgttccatg tacacttaga aaaaagagta	4620
ttttgctggt ggggtggaatg tcctttaaat gtcaattcaa tttagttgat taatactggt	4680
atthagttct tttatattct tgctgatttt ctgtctacta gatctattga ttaccgagag	4740
aagggtgatt aggtctccaa atattgtgga tttttctatt tcttttttca gtctgtcagt	4800
tttgcttcat gtattttgaa gctctgtttg gtacatactt gtttaatatt ttttatgtct	4860
tattggtgaa ttgatgtttt cattatgtag tgtcctttta tccttggtaa tttctctgc	4920
tctaaattat attttttctg atattgctat aggtaattca gctgtcattt gattagtggt	4980
tgcagggcaa aactttttct atcctacttt taacatactt aagtcattgt gttttaaata	5040
catttcttgt agacatcata tagttgggtc tttttaaaaa aatccatact gttgatcttt	5100
gtcttttgat tgggatgttt tgaccatttg cagetaatgt agttattcat atttgtattt	5160
agatctactg ttttattttc tgtttggtgc ctctcctttt tattcacatt ctcttctttc	5220
ttttggattg tatctctctc tctctctctc acacacacac acgtatgtga gatatatata	5280
tatcctcatg agataatttt atattttttc ttttaacaat tacatatctt ttaaacaact	5340
tgaggagaat agtagcctac tgtatthtta cagatgtttt aatttctatt attcttctt	5400
cttttccaac attccatact tcttctggtt attctttctc ttctgttctt cagacagaag	5460
ttctgtctga agaactttct taagtatttt ttgtacttgt tttaaagcag ttctgctggc	5520

aaaaacttct	tttttccttt	acctgaaaat	attctcattt	caccttcatt	cctaaaggat	5580
attttcaactg	catacagaat	tctaggtttg	cagtacattt	agcacataaa	aaatattcca	5640
cttctctctg	gcttcaatgt	ttctcatggg	aaattggcag	tcttgcaaat	aattgtttcc	5700
ctgtaagtaa	tacatcagtt	ttctttgggt	gcatttgatt	tttttttcoct	gtgtctttag	5760
tttttagtgc	tttaattatt	acatgtctgg	gcattgattc	ctttgagttt	accctgttta	5820
gggttatctg	agcttcttga	atctataaat	ttataatggt	agccaaattt	gagaagtgc	5880
taggaattat	ttcttcaaat	acttgctttt	tacacaatag	tctcttctat	gatgatatga	5940
atgtagatc	ttctgatatt	gttccacagg	cccagagag	gctctgtaa	ttttttctcc	6000
taatcttttt	tctctcttgt	ttagattagg	taatttctat	tggcctagcg	acaagttcat	6060
tgactctttc	gttggctctg	ttcaatctcc	tactctctga	aacacatcca	gatagttttt	6120
atgtgtagt	atatttttca	aagttaaaag	ttccatttga	ttcttcatta	tattttgtat	6180
ttctttggta	agactttcta	tctttccatt	tatttcaagg	gtattcacc	ttaatttgtg	6240
aggcatttta	atcatagcta	ccgtaaagtc	atctgtgtca	cctaattgtc	ttgtcccact	6300
caagtcaaca	tttttttctc	tacatcttca	tgtgtagagt	aattttgggt	tgaatcctgg	6360
acattttgaa	tatcatgcaa	taaagctttg	ggctctgttt	acttaaagtt	atatggaaaa	6420
tgctgatttt	ctttttttaa	tttttagcaac	agttaacct	gtaggatta	ggctgcaaat	6480
tctgactgg	cttctgtggg	ttgtgatttt	aatgtcagtt	ccatttccaa	agccttcgaa	6540
gtaccttcca	tatctatccc	acatgtatac	cactcagtgg	ccagtatgag	gtcagagcaa	6600
tactttatcc	tacagtgcag	tttttgaaat	ctgtgataca	ctgttttatg	tcagagtcc	6660
acatgcccag	gggtgacttc	agtagttcat	aaacaacttt	acaaaatcct	ttcccaggct	6720
cctttatctc	tctgatctcc	cttgcacttt	tcagttcctt	ggaattcccc	cgttttggtc	6780
ctttggctag	aaagctttat	cctactctgt	gatttgcttc	ttgtgactgc	tccttccctat	6840
ggggccaagt	gggtgggagga	cagagaaaga	gagagagaga	caaagtaatg	gggatttgcc	6900
ccagtctttt	ggaactacaa	gtcctccaat	cagagggtaa	gattctctcc	ttcatcaaag	6960
ttttgggctc	ctgagggctc	cccttggtgc	agccgttgc	gttaccacag	tcccaggatg	7020
cctggaggaa	tggaatgcaa	gaggtgata	tgtagagat	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	7080
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	7140
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	gaattctacc	agatgtacaa	aaaagagctg	gtaccatacc	7200
tactaaaatt	atccccaaaa	ttgaagagga	gggactcctc	cccaactcac	tggcaggcca	7260
gcatcatcct	gataccaaaa	tctgacaaca	gacacaacag	aaaataaaat	ttcaggccaa	7320

tatcattaat	gaacattgat	atanaaatca	tcaataaaaat	actttccagc	cgaatccagc	7380
agcacatcat	aaaagtaatc	caccatgagc	aagtaggctt	ccttcccaga	tgcaaggntg	7440
gttcacatat	gcaatcataa	atggattctt	cactaagaga	ctaagacaaa	acaatgatat	7500
ctcatgagnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	7560
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnga	attctacagt	7620
atgtattttt	gtatatgcat	gtgacttcct	atgcttttca	ttaggetgtg	tatagcagta	7680
gtttttcact	ttaattgcta	tattgtattc	tatcattgaa	tgtggtacac	tttattcatt	7740
ctaattgtca	tggatatttg	ggttgttttc	agtttttggt	acaatgacta	atgctgcatt	7800
tattttctaca	atatgatagc	tgcgatgagt	accatatatt	ccatttcact	ttcctgtagt	7860
attttgcact	gattttgggtg	agtatgtcct	gccttataag	gtgtcttate	tgtggaaatg	7920
gaacatttat	tttattaagt	tgtaataag	tttgaaatat	caactttcat	tacattggga	7980
cagttttctc	tgttgacttc	cactgaatct	tatcatgggtg	atatgtttga	tctgagggaa	8040
tgtctaccaa	aggtgtccca	acaaatattt	atcccattaa	atacataagt	aaattaaat	8100
tatttttagaa	ttgttttggt	actttatata	attgataatg	tttttcaata	tcatgaaatc	8160
agttggaaat	cattgctgtc	cagtaatggt	gctatttgaa	gggtcactcc	ttctattatg	8220
ttttctcaac	ccgaactgaa	aaactcattt	gtataaaaact	gcaattgggtg	gggtcaaaatt	8280
tctggccaag	gacatgtata	tgttaccaat	ttgttccaaa	ggtatgggta	gagtaatata	8340
gcacttcaat	gtatgaaaga	aagaaaacac	atcaacaaca	ctatcaacaa	tatacaaaaa	8400
acagttcaac	atgtaaaaact	acctagaacg	aatgtgggtg	tctcagagtc	agtgtttact	8460
gttcgtcttt	taaaaatggt	ttccagttct	ctggcataat	gagagtgatg	aaaacaataa	8520
ggcaaaaacca	aagctcattc	tgtttggtgaa	aaaaacacta	acatgttcac	atgttctgaa	8580
aaggaaatat	aatttgttca	cactcaaaaa	tttatgcttt	ggagaaatgt	aacagctgag	8640
gttgatcatg	ataaaacagg	aatgaggaa	ggcatgaaaa	cactgtaacc	cacataagga	8700
cctctttcca	aagtgcaag	ctgtttctgt	ctggaatttg	gaaaagaaat	tctttcactc	8760
tagttaatat	attctttgcc	tcaaagctta	actatttttt	ctttttcttt	ttttgagata	8820
atgactctga	acagatcca	actgtacgtt	ttactgttgc	aaattcacta	ttgtaataag	8880
gaatagatgc	tctttatttc	catagcgtgt	aatatggagg	aaaacaattt	ttgttctatt	8940
tcacctagtc	acttgatcta	tcaaatcagc	acacagaaaa	ttaaagcaga	tattcaagtg	9000
gtccaatgca	aagggttttt	tttaattaaa	ataattccaa	aaagtaattc	ttccaatttt	9060

ctgctttgtg	agggtgacca	atztatgaac	tttcacattt	gaaaaacaca	aatgtctcca	9120
gagcggagat	agagttggta	aattctgaca	ctaaatatat	aaatgtgacc	aaattatttc	9180
ttggggectg	tttcctaata	taaaatcaga	ttgtattgat	ctgagttccc	ttctgattta	9240
tcttaaatta	gggaacatta	gtgtaagtca	gatgetctcc	cagagttttc	actaacctgt	9300
tcttggecgt	gttccaaagg	tgctccagag	aagctcctct	gggtagctgc	ctgggtggcca	9360
ctgagcaact	ggagattcct	gatgactgca	gctgccaggc	ctgcccagcc	actcccactt	9420
ttgctgacat	gatttatgct	tagcttgggt	agtatagacc	cattccctct	ctttctttct	9480
attacacttc	tttcctccct	tctggcttac	taccaatttt	gggaagaagt	tcagtttttt	9540
tctttggtac	aaatgtttac	tgactgtaga	gccaaactcc	acaccttatt	ggaaaaaaaa	9600
ggatagacaa	atagtatttt	tgtgatttta	cagtagctta	aaactatagg	atTTTTTTTc	9660
cccattactt	tgcaacaact	gatacttttg	accagttctc	tttcctaagc	atTTctctcc	9720
ttgagctatt	acccaaattg	tcctagttct	tctctgcttg	tcctcagct	atagacagtc	9780
actgaggctc	tgTgcttggc	ttctgttctc	ctctcctcat	agggattcct	cctgttggag	9840
ttcatcaagc	tacataggct	gaattatcat	ttttatgact	ctagttgtga	ttactcteta	9900
ggaccacatt	tcctcctgt	aacacttcta	cctgggtact	ctttgagtac	ttcaaaaata	9960
atgtatthaa	ttactgaagt	tgTTTTTTTT	ttgTTTTTg	ttttgtttg	TTTTTTTgag	10020
atggagtctc	actctgttgc	tcaggctgga	gtgcaatagc	acgatctcag	ctcactgcaa	10080
cctccatgtc	ctgggttcaa	gcaattctcc	tgtcttagcc	tcctgagtag	ctgtgattac	10140
aggcaccgc	caccacgcct	ggctaatttt	tgtattttta	atagagaagg	ggtttcacca	10200
tgttggccag	gctggctctc	aactcctgat	ctcaggtgat	ccaaccacct	cagcctccca	10260
gagtgctggg	attacaggcg	tgagccaccg	tgcccagccc	tgaagtaatt	gtttaattaa	10320
aaactttctc	tttgtaactt	tctcatttaa	gtatgtgaca	ccattgcttt	tctaagtecc	10380
tagtactgaa	actttatttg	gttttagtcc	accgatctca	ccattcatta	gaaatgtaat	10440
gatttgtcct	gccaaaaagc	ttctgcacat	caaaggaaac	aatcaacaaa	gtgaaaagac	10500
aatccataga	atgagggaaa	atatttgcaa	agtatctggc	aagagcttaa	taaccagaat	10560
atataagcaa	ctctgacaat	tcaatagcaa	aaacaaaaca	aaaaacaaca	aataatctaa	10620
aaatgggcaa	aagatctgag	cagacatttc	tcaaaagaag	acttacaat	ggccaacagg	10680
tatacgaaaa	cattttcaac	atcactaatc	agataaatgc	aatcaaaac	cacagtgaga	10740
tatctcacc	cagtttgaat	ggcttttata	aaaaagatgg	aacaatagac	ggtagcgagg	10800
atgtggaaaa	aggggaactc	tagtatactg	ttgggtggaa	tgtaaattag	tatagccact	10860

aaggaaaaca atagggagtt cttcaaaaaa ctaaaaatag aactaccata tgatccagca 10920  
atatttattac tgggtatata tccaaaagaa agggaattaa tacattgaag aatatctgta 10980  
ttccaatggt tactgcagtg ctattcacia tagccaaaat gtagaatcaa cctaagtgct 11040  
gattagtgga tgaatggata aagagaatgt agtatatatg cacaatgaca tattgttcag 11100  
ctattaaaaa aaagtgaat cctgtcattt gaaggaaaat ggaactggag gtcattatgt 11160  
taaatgaaat aagccaagcc cagaaagacc aatatcacac gttctccttc atatatggga 11220  
gctaaaaaca gaaaaaagtg aatctcatgg agctggagag tagatttgtg gttatcagag 11280  
gctgggaatg gtacgctgga ggagggaaatg aagagaggat gattaatgag gacaaatata 11340  
cagttagtta ggaggaagac ctagtgtttg atagatcagt atggagacta tagttaacaa 11400  
taatctactt gtacatttca atatgtacaa taattcacat gttcacagca taaagaggaa 11460  
tgtttaatgt ggtggatatt accctaactt gatatttaca cattatatga atgtatgaaa 11520  
atatcaatgt actctgaaa tatgtccatc tattatgtat taataaaaa tataagggac 11580  
acttactcgt atcaggcaca atatgtgcca atgacatgga atgaaagagc aaataggatga 11640  
ctggcaectc ctttccttcc acctcttttc aatacttggc attgagtgga cacatgggtg 11700  
tctagaggct gtgaagcccc cttttctttt tgttaattga cttccttaga gtctatctca 11760  
aaacaacact tcagaagtca tgagggaaaa caagcataat tgtattgact ctttctatat 11820  
tttggatatt ctgaataact cttggatgca gaaaacttgt gaaaggcagt ttatttgaaa 11880  
ttttccaaag acaaaaagga ataaactgaa tttcctttc ttattaatat agcgttagtt 11940  
ctgtcagttc taagcaattt cttttacaaa gtgcaaatga ctgtgaattg agtcctttat 12000  
tacaatattt gaggtttggt tttacagcta agttgagcaa atgttacttt tactttgtaa 12060  
agccttgta tatgcctag gttcaccagt caacttcac acattttcca tatactggtg 12120  
taatccaaaa taaaatttaa tatgatattc tttgcctgt gtatagggtg aggaaataaa 12180  
tattgtttta cataggtaat gaatggttac taagtcaaga cacacttctc ttataaaaa 12240  
aatgaaagaa atgtcttatt ttttgtaat aggactttat taaggataaa tttatttaca 12300  
gtaaaatact acaaatctta agtgtatgct gcatttaaat tttgacaaat gtatatattt 12360  
  
atgtaacat catccagatc aagataaaga acatttattt atttatttat ttatttattt 12420  
tgagacggag tcttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tggcgcgatc tcagctcact 12480  
gcaagctcca cccccgggt tcacaccatt ctctgcctc agcctcccga gtactggtgga 12540  
ctacaggcac ctgccaccac gccgggctaa tttgttgtat ttttagtaga gacggggttt 12600  
caccgtgta gccaggatgg tctcgatctc ctgacctcat gatccaccgc cctcggcctc 12660

ccaaagtgct gggattacag acgtgagcca cgcacccccg gcctaaagaa catttcttta 12720  
 aattgtctgg tgtcttatca cccattctgc cctgaggcaa gcacagttct gattttcatt 12780  
 gccatagatg ggtgtcgta ttcagcttca cgtaaattga agcatactgt acacacttgg 12840  
 gactggctgc tttggcatac catggcattt ttgagacttt gagttctgtg catcatttta 12900  
 ttctatttct aattgtgtaa aagtacacc ttgtatgagc ataataccaa tatgacttct 12960  
 .atattggtcc tagtttaata tagttgattt ctgaatctgc aggagtgtg ctggtgtgtg 13020  
 tgttgtgtgt gttcgttttc ttcctttca tcattgacac caggactcta gggttcgggt 13080  
 gttttgtttg tttgttaatg ccctaggaac aataagaacc tgtcggtttt ccattaagtg 13140  
 tccatttgat gacttgcaat tttgggaaga gggaatgtgt tccatggggg ggaatctagg 13200  
 gatgttttac tatcgcttg tttctagaag gatagtggaa ttgacctgct gaatggccaa 13260  
 gtggtatatt gcccatcttc tgttttaagg actatctgaa caagttccac catggcatcc 13320  
 attcctgctg ctgttttgat agctgtgatg ataaggtaga tgatccatct agtgcactga 13380  
 tttcttcact ttactaacct gcttgtctat tctaccccag ccaactcactt ccatgagcag 13440  
 ttctgggect ttcagagggtg ctgacagtgg tgccagcatt gtaatattaa ttctaagaat 13500  
 cccatacttt gcctgctgcc tctttacatt tcacatgatt tgatgacaca tcatcactgc 13560  
 tgctactgat tgttttctta ccatgttgag attacctatc catcagctac tgcttactat 13620  
 ctgctaagcc actggccttc ttgtctatgt gagatatcat ggtctactgc aatactgata 13680  
 ccoctgaaga taccctcaat ttctttgctt tctcttctc tccatactc atctggcaaa 13740  
 tcccaactcc agttatttga gaaaattact caactgaggt gactggtttc actttaaat 13800  
 caagatagaa aattcaaata gacaatcaag attgccaagc attcttacc actataaggt 13860  
 ttgcctttct atttgatgaa ataactgctt tatactttct ttgcttacat gccacatcc 13920  
 tgcttttctg agccctcat tcccatagc tgatgacttc acttcattct tcaatgagaa 13980  
 ggtaaaagcc attggaaga acaccctcat tattccacca accaatttat aaacttgtca 14040  
 atatcagtac cttctctctc ttttcttct tgtgtagtgg ataaagtctt ctagctttca 14100  
 aagtcttatt ctctcttttg ctcagggctc agtcatcagc ttgccagttg aatttagtgg 14160  
 acccttttct ctctgaactc attttagctc tgagggctcat ttgacacaga ggactaccct 14220  
 gcttttattt tggaagacgc tttttcaatt ccacactctc ctgtatttcc ttccacatca 14280  
 ctggatgctg ctctcagtc tctttatgg acttcatatt ctctgtctta tatataaaga 14340  
 tgtagttcct gcctagagaa ctacaactca ccaaagctt taaatatcat tttctcacgg 14400  
 tatattggag gccagactag tttaggctcat taagttatat gttcttatta cacatataca 14460

ttgtgtttta	atctcatgtc	atgtatcaca	tgtgacaaat	tattttgtgt	gtacttttctt	14520
tgttcaatgt	ctttatcctc	ttctggattg	tctgtagtgc	ccatcatgtg	tcctacatgc	14580
ctatcacaga	gcctggaatg	tagcagatgc	ccaatatttg	cagaatgaat	gaattcatat	14640
gtaagtgact	gaaagagttc	aacaaatggt	agttctcttt	ccctttctca	tctcatattt	14700
acagaagaat	ggatacacca	gagttatgga	gtcagaagat	actactatca	gttctacaga	14760
agaaagacaa	atctcatggtg	tgatggatgt	taccagatgt	taaaaattat	ggaactgtta	14820
aaaatttttg	aactgctcat	agatacctcg	tacaggcagt	tggaatata	gatctagagc	14880
tcagtaaaaa	agtcatagtt	aaggacctgg	atcttcaa	tataaaattt	tattttttat	14940
atcttttaaa	atgtgttgtg	ttttgctcct	atgtgtttta	aatggagga	aaagaggaca	15000
attgggattc	aggggtcaaa	tgccaggata	tgagacttac	agtgcatctg	gtaaaaatta	15060
aaatgattta	aactctgata	tgattagaaa	aggtcagtct	tgaaaaagt	ataaaggaga	15120
ttgtaacaca	aatacaattg	tattttcttc	tctccttccc	catagttttt	gacaataaat	15180
cctaagcaca	gatctgaggc	ttttttcct	agaaaaaca	gaaaaatct	cactcaaaca	15240
tagtagtcct	ccaaagtc	ggtacatgaa	aggttatgag	agtttgggga	tctgatgaag	15300
ttaattatag	tcttacacct	ctggataaga	ccaaaagca	ttcaatttca	aacaaaggtc	15360
agggatagtt	agaaagtttt	atcacacgta	agcttgaact	caacaatgt	tgcatataat	15420
agtgacggtc	cagtgagtgt	catatttcat	agctgtatca	gggacttaga	cttctttaga	15480
tcttctaaga	tcatatcaaa	aatactagta	tccttttggt	tttaaaaaat	aatgagcat	15540
atgtgatga	gcaaaactga	ataaagaagg	ctaagattct	tgtctcctct	gaactatttt	15600
gatctttata	agaagctact	ctgaggcagc	aaggctgttc	actgctcggg	cactgcgtgt	15660
atcatggggc	atctccctg	agctgcagac	taacttctgc	gaagtactgg	gcatgttaac	15720
tttgcaaact	cagatttctt	tctactaggg	tgataaaact	atgtttctat	gaaataaaca	15780
gtctccaggt	tcattagcag	atagtagga	gatcattagt	ataggagag	tcactagaaa	15840
aatcaagcaa	gaggagtgga	aggaatgtga	ggaagaacta	agctgaaaat	agttttctgt	15900
cctttccatg	gctgctggta	aatgtagcac	tgactctgt	cccacaattg	aaggattgt	15960
attaatttca	ggctttgagg	taaatgaatt	gctaattgta	aaactgccca	tgtttgaaga	16020
tctctttgtc	actacttage	ctattttgtc	aaaaccaact	cctttaactt	ttaaagtatt	16080
tttttttctt	tacataaagc	accaaggcag	atgctaattc	atctataagc	ttttcttctc	16140
aacagtgaaa	tacagaaaaa	tcaatatcta	atggtttttg	tgcaaagctc	agtaaataat	16200

agatttcatt	ttccattcta	aaaaacttgt	gccattagga	agttgggaga	ggaagattac	16260
tagcaattaa	acaagaaatg	atggtaatgc	tacaggcccc	ccaaaaagag	tatcaagaaa	16320
tcaactatag	gtaataaaaa	taaactgtta	catctgattt	agggtagcag	gcacaaaaaa	16380
ggtgacagct	aatgcatgca	acatacctct	ctctgattct	tcacaatttc	acagttcttg	16440
ggcttgtggg	gatgtgtacg	ttgatgtgtg	taaacataat	tcagatgagg	attatgtttc	16500
agatctattg	atctaagata	cccttttcat	gaataaccta	agatatgaat	ttttgggttg	16560
agtaagcata	aatgagagga	ggttctttca	tatttgagct	ttgtggatat	aaactcagct	16620
tctccttatt	actgttattt	tatcgagcta	cttgaactat	acagataatt	tgcttatggc	16680
aagagctagg	gattgggaca	tattgtccca	tataaatatt	taaaatatat	athtagtatg	16740
gcattgtcac	cttggagacc	agcagaaata	agaagtatat	tgcatgatgag	caaaatttag	16800
tcccgagaat	atctgcttag	ctcattagct	gttaggtaat	agtctagcta	tgtatatgta	16860
gttgtatgca	tagctttgta	aatgcctact	tgaaatatta	ctaaatcatt	ttgtaatata	16920
atthaaaaaa	atccctgcct	ggaaagtttt	atggaatcca	tttgtttatg	ctccaagcaa	16980
agatatgtaa	gtaacaacat	caaattagac	tcaattcagt	gacagttgct	atagtttttg	17040
ccaaaatttt	ttatcttgagc	acatgcaaat	ttctgaagaa	ttacaaatgt	gtaatttatt	17100
tacatgactt	atcttttgata	gatatttatt	tttaagtaga	aaaatcacia	gtctatatat	17160
ggatgaggat	aatttataaa	cctaatacca	taaaatttta	cgtcttcaga	aatattctca	17220
tctcaagaat	atctctttta	aaatacatgt	aacattttta	tacagaataa	aatacagaac	17280
gccaaaagct	aggtaacttt	ttgttctctt	ttaaatagata	atacaatcat	tttgctaata	17340
aagttatctt	tggaatagtt	tttgtcaaaa	tagcaacaag	cactaatggt	actcattggt	17400
tattggctga	gatcttcaca	gaaattgtgt	gctaaaaatt	atcaggagaa	caaggggaagg	17460
agctgtgtgt	ggtattgagg	aattctcatt	tctgtcatgg	gcaagagcaa	cagttgctgc	17520
tgctacctat	ccccagtaga	gatacttatt	tctctggcag	gaagggtgat	actcttttcg	17580
ggactgctat	gttaaagtgt	attattgaca	agttcaactg	gaaataaaat	ttattttcat	17640
tagaaaatac	aagtggtaaa	caaaagcttc	tgccctttat	tggtccocat	gtaaacataa	17700
aacaactttt	tttttttttt	gagacggggt	cttactctat	cacccagtct	ggagtgcagt	17760
ggcttgagct	tggtcactg	cagctttgac	ttccagggct	caagtgatcc	tcccaactca	17820
gtctcctgaa	tagctgaaac	tacaggcaca	tgccaccaca	ccagctgatt	tttgcatctt	17880
ttgtagagac	ggggttttgc	cacattgccc	agactggctc	tgaactcctg	ggctaagaca	17940
atcttttttc	ccccaccatg	ttggcctccc	aaagtgagtg	ctgggattac	aggcgtgagc	18000

gcttgtgccc agccataaaa tgccttttaa gtgaaacttt ttttgttgat gtcctttctc 18060  
taatttatgt gttcttattt cctttctgtg tcaaaagaga agcacatacc atttaatttt 18120  
tactaaagct ttctcagggg cattatttaa agaaatcttt acatataatt aaatatttta 18180  
aggtaatgtg gtattatttt ctacttttat attgacatta attcctgaca atttgccatg 18240  
cttatgatgt atatgtctta gctaagtaat attagctttg tagctcttct ataaaaggta 18300  
taataatcta ctcttcaagg tgtcaaatga atctacceta tagatgaaac attttgagat 18360  
aattagaatt gttattatta tgatggccaa aaccacaact ccttttgtac caacctaata 18420  
tatacataaa atatgcattc tggtcactac tcaccaaata ttgttaaaaa atgaaatttc 18480  
tcttttcaaa atacctgcat aatttcctcc aacaagcaca aaaataccat tgagttgaat 18540  
ggtagctatt ttacctatag aaggggctca ctgccctct taagaacttc accaagtca 18600  
ctgggttgta ataacacttg cttatctctt tgagttgctt tcagatctag gagctaatag 18660  
taggaggagt actgtgtcgt ctgttaaaag taaaaaaca ttaggtgata gtccacaggg 18720  
caaaccagct acctgagcat aggcagaaaa ttgcctcca gttggtattc ataataataa 18780  
tacttccata agcataaagc atacctcttt caggattaag gggcatgct cttctcatgc 18840  
atgggggtga acagcatttc ctcaggattt ggggtggttg ttgagaatgg aaactcgttc 18900  
tcatgagcat actgacattg aataagagga catgtagata gaataaacat gaatgtagtt 18960  
ccaggagaaa aaattcagac acacagaatt gacaagagcc ttctcaccac caaattgaga 19020  
tctagtctga gcaaaaaatg tgagtctgag caaaacaaaa gaaagctaatt attggaaatg 19080  
tgcttataac taaaatgtgt ttttcagaac gctgtaaag taagcctatt agagctacac 19140  
agaagaccta tttccggaac aattacaact atggtaagga aaatttcatg gttgatgtat 19200  
aaactgctgt gttaagagag gtgtgtggat gcacctatga ggatgtgcac atgtaaacga 19260  
gtggagccat ttaagaataa ggcttaaaaa cagaaggact atttttagga gcatagtccc 19320  
tctgccccga ccaattaaaa tgtctcacac gggcaaatg cttaacactt ggttgatggt 19380  
gaagcacatc aagcagtatt gtcactctag agccatgcac ttaagtacac agagataagt 19440  
atcaagatac atgggactct tccctgctg gaggctgaag gaggatttga gctcaagttg 19500  
ggttgcatag gccatcagtt gtgcttcaet gagtgaacag cagagcactt tgatgcataa 19560  
ggaactgtta aaagactcaa acttgacttc ttcagtcagt ctatcccatg aaaaactg 19620  
acagatttgg aaagtaacac ttgtagaagt tgctggtatt cagcgaagga aatgtgtttg 19680  
tatctagctt gacttaaaat cegacattct aataaactaa atattaattg aagagccacc 19740  
aatccaaatg tagctgacaa acttaactga aggattaataa agcctgcat ttttgcata 19800

gggactgtgc taagtgattt ccatacatta tctttaattt tctcagctgc cccatgagat 19860  
 atattaccat cttgatttta tcaatgatta tcgaacctaa gtagtccctt ctttgattgt 19920  
 tcacaatgta ctttggatgc tgggtatata tttagagtca taaattcatt tatacagtca 19980  
 ttatatntag aaagggcaat taacagagct ttcccgttga cacataaggg actgatattt 20040  
  
 actgtattcc atatgcattt tgattttttc taatatctat ggtattaata aaaggtatgt 20100  
 tactatctct gcataagact attgatggtg agtcaatgag taaacatgga gattaaacag 20160  
 acttttacag tgaaccttat taaaataaga gttttattat tacatttatg tacgctattt 20220  
 taaagtatat aggatatata cagcagattt atttcttcta tacttttggg aattgaaagg 20280  
 agagaaatga ataagactgt aaaagttagc ttcaatatct tcaaaatgc agtgtattaa 20340  
 .aaaatataaa gttgaaaatt ttgggttttag ttaaactctt ttaaaacaaa tccacctgt 20400  
 ttcccaaatt tttcttcaat ggaattaatt tctatgtttt gctgtctact cctcttaaga 20460  
 ggattgtagc tttcttagt caatgatgga tgctctttct aagtttghta gcttatgttt 20520  
 atgtaagaag tcaaatgcct ggctgcttat ctaagaacc gcttctttac agattgatgt 20580  
 gaagaagcct agggaaaagg gagcccttaa tttctaggag attagcttgt taagattgaa 20640  
 aatgctttc tgaactttta tatactgtaa cactaagaat aaaaacatat caattttata 20700  
 tcagggaaat gtaattattt atatttaatt tatgtatcct attatcaagt tttattttat 20760  
 ctagcttctg tagtgcttca atggttggtg ctgttatttt tgttaaaaat tgaatgacaa 20820  
 gtcatggaaa gtgaaggtct tagagaaagt agctgaatga atatcataat aaaatgggat 20880  
 atggattata attaatggaa aggagcagat aatttctttt ttgtagccaa gtaatagcta 20940  
 agttgatcat agtttcagga ttgccatttg tctgggattt cttacagttt ctttggggaa 21000  
 gggaggcact caaatggtta aatagaagga agaactctga aaaggaagta tattttactt 21060  
 ccaaaatatt tttatcttct atatctgcat gtcaaggtgg gagcagttgg aaattcagac 21120  
 aaaacctcta cttcatttag attaattctg ggaaaaactc ctttaagtgtt aaccaaat 21180  
 cttgagttaa aaagtaggtc ttgtagaaag atatttattt tggagtgggt acatgtgcta 21240  
 aacatttcta atgaaaatag tagacactgg gtaaataaat cattagtttg agaacatttg 21300  
 cacagttcac taatctctaa tagttgatgg atgctatgaa gcacgttcac ttaagccagg 21360  
 acacacaaaa atgcctgcta gctgggggtg tgaatttctc atctgattct gccaaatggc 21420  
 atttcaaaaa gggcaatctt atcttttggt aaatacagaa tagggagaac atgaatagaa 21480  
 agaggtcca cttgccagtc aaaccaagcg aggacagttg ggtagttaca gtttgtttgc 21540  
 tacacgttct catacttgag gcaactaatt ctcggaagac tgaaatgtga agctttttaga 21600

attccttagt aactaatttc tgtcatgtgt gttgtactgg tagaataagt ttttgtgacg 21660  
 aaattggaac attaatgggg ggaatggttg attagctggt tttatatttt tcaaggatta 21720  
 ctttcttcta atcctttata gtccaaaatc tctaaaatat gtgggaaagt actcagatta 21780  
 aagtggtttg caattatgtg cctaagaagt ttttgaaatg ttgactcatt tggataaacg 21840  
 gtgttttctc ctatataatg tccatggata gtgaaactgga gcaatgaggg tactggggaga 21900  
 aatgccactg gctttttact gatattttta cttctttctt ggtgttttaa aacttctctt 21960  
 tttaaaagct catttactag aagcaggaat ctgaacaact tgactctttt aaaggggaga 22020  
 gatacagaaa agaagcagat ctgtactttc tagattctga gtcacatact ttaactttgc 22080  
 aactgaaggc aatttgttgt tacattgata agtaaagcaa gtcttgtag atagattggg 22140  
 tgccaatata tccattgaga gaggtagaat aatgccattg acacgtgaga atatattcca 22200  
 tagcacgtga gggaaaggaa tgttgagtg tctgacttca atgcagatgg aggaaataag 22260  
 atctagtggt gaccattttt attcaagaag taaatatagc ccacttagag gagaatataa 22320  
 aagataatct gtactgaaca caaaggaaaa aaggacctaa tatccgaaca aagaagaaaa 22380  
 tgtagccac ctaaaggaga atataaaaga taatctgtac tgaccacaaa gaaagaaagg 22440  
 agctaatac tgaacagtga gccaagatga ggaaggtgaa aagattgcag aaccagtttg 22500  
 ggaacactac tgagcaggac aattttataa cattacagag gccactact tgagaaaacc 22560  
 tgtaaatgga cctgataaaa cagtgtcgac aaggaataaa gcatatttaa gtattaggtc 22620  
 ttttcatata gtaaaattaa catagttaa attcctcttg gcagcaattg gaactgcaca 22680  
 tgcatatata cacatccaaa atggaatttt agagaaaaat tgtatcagat tgttgactca 22740  
 atctttgatt ctctaaatgg atttctcaaa agcacatgca cacacatgca taaatacatg 22800  
 caaatatata cacagccaca aattggaaag agagcagggc tgagcattag gtcaggtgtg 22860  
 ttgttttatg tcacacacta cagtctaagg caaaaatc tggctgactt ttctgttcca 22920  
 ttcgttgaat atcaagtgga taagaattaa ctaaagagaa gcctactttg gcttttttg 22980  
 aatgggtag ctattatgtg tcatattatt atcagctttt cttgtctttt atcccagtca 23040  
 tttgggctaa agttaaagag ataaagacta agtgccatga tgtgactgca gtagtggagg 23100  
 tgaaggagat tctaaagtcc tctctggtaa acattccacg ggacactgtc aacctctata 23160  
 ccagctctgg ctgcctctgc cctccactta atgttaatga ggaatatatc atcatgggct 23220  
 atgaagatga ggaacgttcc aggtaattca ctctttaagg atacagaata actactttgc 23280  
 ttatcctact ctcattaat ttgtctctag agatgctacc ctgcatttt tacattggga 23340  
 tctgtctacc ttcttgggga ttacagataa gttttagttg ggtttcttga tttcatatat 23400

ggaatgggtg tatgcgtgta gtttataggt ttacatTTTT cttgggagag gggccataac 23460  
 ttcatttggt tcttaaagggt gtctgtgact taaaaatggt taataattac tgttctaaat 23520  
 cttagctgtc ctattcaaga ataaacatgt aagtctttct tgttcaagta ctgtttcctt 23580  
 gtacttttca gtaacaggtt ttaatttttc aaaaatgttt gcttctttca aaaatacaga 23640  
 ttactcttgg tggaaggctc tatagctgag aagtggagg atcgacttgg taaaaagtt 23700  
 aaggtaagcc tgtattttat gtttgaagta atacacagaa aacaaaacaa aagtagaaaa 23760  
 ccagccatct gtcattgaaa tgaaatagct gccttcaacc atatgagaaa tattaaaatt 23820  
 tagtatgcat atatttatat actccaagag ctgaatttgt ctttaatgtc tatttttattt 23880  
  
 aaggaatgag ttcctgtat gtgtatcaaa gatctaacta cagttgcctt aatgtctctt 23940  
 cacaaggagt ctagctgtag tccagtctcg gtagggtggt ttcattgtgt caggctcctt 24000  
 ctagcttata actctacat ttttaaaggc atcgctttca tactcatgtt cacctggagg 24060  
 tcacaagatg gctgctctgc ctctagtata acatgtacat ttcaggcagg aaaaagagga 24120  
 ggtaaaagggt atttccaaga gcctcatcaa gcagttttta cttagctgca aacaggcta 24180  
 gaaaatgtag tctttttaa cctggggata ttgcttcttt gaacaaactg cagtttgtga 24240  
 gaaggggaga ataatgatg ggaaggaaaa taaacaatga tgtccgatga ataaacagca 24300  
 attcctatgt acaaagtga gctacattca tctgtataga agagatctga ataaattagg 24360  
 tccttagagc agtaatgtag ccttattttt aagccaaata actcttagat tgtggaattg 24420  
 atacatTTTT taaaatcaca tagtacagta ctgtattata gaaggttttg tttcttctta 24480  
 ctgcactaag caaatctgtt ttaaagaaaa gaatgggggtg ggggaatgca tggggggaca 24540  
 aaaaaatctc aaaggatgtg tgggtgggtg gggggagtgg gaactgtacc aacataata 24600  
 catcctcttc cttctgcaag tttgaaggct tgggaaacat ttacatggta agttaaacac 24660  
 ccctgggagg tttatcttat acatctggca cttgacacgg cagacacgtt tgggtttaag 24720  
 tgacctaaa aatgtagag ggcattattt tgtaaggaga aactaccctc cagtaagttc 24780  
 ttctcccctt cagtagattt gtcaaaagggt agatgcattt caagttcaga cttgcgggca 24840  
 ttctctctgc atctctcttc aattagtttg gtgtttatta aagaaaaaag tggctcttgt 24900  
 tcagtatggt ggaatctctt actgtcttta atttggtttt ctgcttgcta atgcagaact 24960  
 ggaatttgtc ctaaattcct gtaccagttg gaaaagcttt caatatccct gctgcgaagc 25020  
 atgtaacaag gcttactgct cctcttttgg taccaaaaca atatcattgt gttgttgaca 25080  
 ggacacatgg cttgtttgtc ctgtttccca ttgctttctg caatatttcc cattgttttc 25140

cgcaggggac	ttgcagagtt	attattgtaa	agtcatttat	attctcagtc	tggatttaaa	25200
tattctaaag	gaaagaaacc	aataatttga	acaattttta	attcatatgc	agatattgag	25260
ggctaaagag	tttgggtaga	aaatctcctt	tggccagaat	tattgagatt	cctatttttag	25320
ttttccagtc	aatttgaaga	tgtgtaaaaa	gagttttatg	gaggatgtta	ttttttcaat	25380
cagatttgct	cttagctgag	ttttgctctc	agtggatgaa	tcaataattt	tataagaaac	25440
attattatgt	ttttttcatg	caaatggttg	ttcacctgag	tctcttatag	cagacgattc	25500
aagatgtttg	gtcttccttg	ggaagttgag	aatcagactg	tttttaaaat	atgaagacaa	25560
gattgtggag	taaagaatac	tgaaatgaag	aattaccttc	agtaacagaa	aaacaataac	25620
acatttacta	tgtgctaagc	actttatatt	tttattaatc	ttcagatgta	tctacttata	25680
agtagattct	attatcagtt	ccaacatata	catgatgaaa	atgaggtcta	gtaagttcaa	25740
gaaacttcat	acagtaagtg	gtggagttag	aatttgaact	tgggccatct	gaccaagga	25800
tctgatggtg	cttgctcttt	aaagtgtggt	ccctggatca	gcaacatagg	tatcacctgg	25860
gagcttgtta	gtaatgaaaa	tcttcggccc	tgtctcagac	ctgctaaatg	agaatttgca	25920
attttaacaa	attccccata	tgatatccgt	gtttgaagtt	tgggaagtac	agctgtagtt	25980
cgtattccct	acctatcctc	atgtaatata	acttccattt	aacttaaatt	acatgaaaat	26040
attattgaca	ttgttaatat	gaaatattac	taaacttgat	tgtgtttatt	aaaaacattg	26100
ctaatacctg	ctttgtaaca	cttagaacga	gggcaggacc	ttgtctgttt	tattcattgt	26160
acttagtgga	tattacttag	aaaaatattt	ttgagacccc	cccatccctc	aaaaaaattt	26220
ccattttttt	ttcactgctc	aaatcacata	gactttaaaa	ggctatgttc	ttatgtgtat	26280
taagagagga	tgttgaaaaa	tagccttccc	ttcaaattct	gtgtgtaaat	cttccatttg	26340
ttgagtatct	gtgaagcact	agcctcctgt	atgttacctc	aggaaatacc	cagagatata	26400
gggagatatt	tctgtcatca	tttatagaca	tggacathtt	aagtttaagg	tttgataaga	26460
aagcattact	aaatacatta	tagatgttgc	gcttgttaaa	gtcagagaat	aatgttcata	26520
ttgcatcagt	tttcttgtta	ccctgggaaa	tagattgata	cttttgaaa	agtagcaaaa	26580
tgcttcagag	atctgaactt	gcagtctgac	ccagttgtta	gaatcatgga	aataatgacc	26640
ctggtgatat	gtgcttgatg	ctattttcta	ttttaaattt	cacagecctg	ggatatgaag	26700
cttcgtcatc	ttggactcag	taaaagtgat	tctagcaata	gtgattccac	tcagagtcag	26760
aagtctggca	ggaactcgaa	cccccgcaa	gcacgcaact	aatcccga	atacaaaaag	26820
taacacagtg	gacttctctat	taagacttac	ttgcattgct	ggactagcaa	aggaaaattg	26880
cactattgca	catcatattc	tattgtttac	tataaaaaatc	atgtgataac	tgattattac	26940

ttctgtttct	cttttggttt	ctgcttctct	cttctctcaa	cccctttgta	atggtttggg	27000
ggcagactct	taagtatatt	gtgagttttc	tatttcacta	atcatgagaa	aaactgttct	27060
tttgcaataa	taataaatta	aacatgctgt	taccagagcc	tctttgctgg	agtctccaga	27120
tgtaattta	ctttctgcac	cccaattggg	aatgcaatat	tggatgaaaa	gagaggtttc	27180
tggatttcac	agaaagctag	atatgcctta	aaacatactc	tgccgatcta	attacagcct	27240
tatttttgta	tgcttttgg	gcattctcct	catgcttaga	aagttccaaa	tgtttataaa	27300
ggtaaaatgg	cagtttgaag	tcaaatgtca	cataggcaaa	gcaatcaagc	accaggaagt	27360
gtttatgagg	aaacaacacc	caagatgaat	tatttttgag	actgtcagga	agtaaaataa	27420
ataggagcct	aagaaagaac	attttgctg	attgagaagc	acaactgaaa	ccagtagccg	27480
ctgggggtgt	aatggtagca	ttcttctttt	ggcaatacat	ttgatttgtt	catgaatata	27540
ttaatcagca	ttagagaaat	gaattataac	tagacatctg	ctgttatcac	catagttttg	27600
tttaatttgc	ttccttttaa	ataaacccat	tggtgaaagt	cttttttttt	ctcttctttt	27660
aaaataaatc	agaattgccg	tattgaccag	gaaaagatta	tgtatgcacg	tgaccaggg	27720
ttagttttta	aaagtacatg	gctccataaa	aatgctgtag	attacagagt	gataaaatat	27780
gcaggttttt	ttgtttttgt	ttttctgtt	gtgtgtgtgt	ctgtatttgt	gtacatgtgt	27840
gtccttgcac	tcacacccaa	gggtggatta	aaatacaggc	ctgcaaaactg	gcctgcactt	27900
tatcatttgg	gatttgtgct	gcttaatgct	cagcgaaaaa	tgtctagtaa	aatgaattat	27960
ggttgtcagg	agagaggtta	tttcgacttt	tgaaccaatt	gcacatttct	cattacccaa	28020
gctgtggtga	gatcccaggg	gctgtggtga	acaaatgatg	cttttataga	tggcccttag	28080
cttacaatga	ttcaatttac	aatgcttcaa	tttaacaatt	tgttgactta	caatgggttt	28140
atcaggttgt	aacccaatgc	atttcaactt	acgatatttt	cagtttogaa	tgggtttatc	28200
cagatgtaac	cccacgtaa	atggcggagc	atctgtactt	ccttctctctg	gcagagttcc	28260
ttagagcctg	tgccaattac	ttgaaagttt	cattctctgc	catttacatg	tgtgctatta	28320
gtagaaccaa	atttctaagc	tgtggcgtgc	tgaaaataaa	atgcttatga	agcaaaaatc	28380
gtgctatggt	tccttctaca	aggataatca	agcaaggatg	aaattcattc	ctgaacaaaa	28440
gtttcctaaa	atggtaaata	atcatctatc	taaatgttct	attttaaaag	tgtgagctgg	28500
gtgtggtgag	tgacacctga	atccccacta	cttgggaggc	tgaggaagga	agacggctag	28560
agcccatgag	gttgaagctg	cagtaagcta	tgattgcggc	cactgtactc	cagcgtaggc	28620
gatagagcat	gaccctgtct	ctgtaacaac	aacaaaagtg	tgaaagttea	ttctacaaat	28680
tggagtcact	catatcatc	ccaactaaaa	tggagttggg	aggccatggg	gaaaggcacc	28740

caggtcacctg ttccaggaac catttttgca gttcaacaga aaaatcacga agacctaaact 28800  
 ctaaccttaa gataaagtta cctagctgct gccactcacc aatcagaact tgctagatcc 28860  
 tacaagacgc gcctgctcca gtgactttca ttcaaaacca tntagatcac ctctctctct 28920  
 tccccataa aacccagcc tttctcttg tctntgaaca caactagagg ctacactggg 28980  
 ttgtgtgccc agaattaca ttccaattct tatattccca aataaacctt ttacttggag 29040  
 atttatctcc ctatatntaa aggtgacaga gtaaggaac attcctgctt tctgattgac 29100  
 tctccaaagc caacaatttc cccagcccca gaagaaaaca tccccacctt tgcctatagg 29160  
 actgcatagt cttttgagct tccaaaagac cacttccaaa gggcttgcca tctgcccatt 29220  
 gttgctatat tctcagatgg caaggacatc tcttttgagg tgctgatgct ctacccttaa 29280  
 aagggtgagtt ggggtgctact ggggagtaat gaagcgccac cgtggatgga ctgcccctga 29340  
 gaatctctct tcttggtatg taagcctcaa cttgagcctg aggacagagg ggtggaaagt 29400  
 agtgcctggtg cctcagcctg ttttctcag gctttctcac gttaactctg taaagaagga 29460  
 caagaattga ctacaggaga ggtttaaagg aaccgttata tcaaatccac aaacctcaac 29520  
 tctctcaatg cacagtaagc aatgtaagt aaggaactct tttgatgtat aaaagctgca 29580  
 gatgtttcca gcttctgcag ttttttttg ggggtggggg ttgggtaaag ggggtatgat 29640  
 cagtttctgt gtaggaattt gacacacttt atgcttaata taaacaaaac acggccagat 29700  
 tcttagattc agcagttttt tttttttta aaccaccttc cattcggtgc cattttaca 29760  
 cctactgttt taccactacc atctatagt gcaatgtttg attttctca cctatatgag 29820  
 gcttctgtca gctgtttaaa catttcta at ggtataaagc ccatgaataa agtacatttg 29880  
 gtttttcagt ttgatagcta caatatcttc attaataaac tgtgcagacc tcttttggga 29940  
 ggatggcgtg atttatcatg atggtcacgt ttctcaggag actgcaaac catttctact 30000

<210> 2

<211> 2058

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5

<400> 2

gttgggaaag agcagcctgg gcggcagggg cgggtggctgg agctcggtaa agctcgtggg	60
accccatggg gggaaattga tccaaggaag cggtgattgc cgggggagga gaagctccca	120
gatccttggtg tccacttgca gcgggggaggg cggagacggc ggagcgggcc ttttggcgtc	180
cactgcgcgg ctgcaccctg ccccatcctg ccgggatcat ggtctgcggc agcccgggag	240
ggatgctgct gctgcgggcc gggctgcttg ccctggctgc tctctgcctg ctccgggtgc	300
ccggggctcg ggctgcagcc tgtgagcccg tccgcatccc cctgtgcaag tccctgcect	360
ggaacatgac taagatgccc aaccacctgc accacagcac tcaggccaac gccatcctgg	420
ccatcgagca gttcgaagggt ctgctgggca cccactgcag ccccgatctg ctcttcttcc	480
tctgtgccat gtacgcgccc atctgcacca ttgacttcca gcacgagccc atcaagccct	540
gtaagtctgt gtgcgagcgg gcccggcagg gctgtgagcc catactcatc aagtaccgcc	600
actcgtggcc ggagaacctg gcctgcgagg agctgccagt gtacgacagg ggcgtgtgca	660
tctctcccgga ggccatogtt actgcggacg gagctgattt tcctatggat tctagtaacg	720
gaaactgtag aggggcaagc agtgaacgct gtaaattgtaa gcctattaga gctacacaga	780
agacctatth cgggaacaat tacaactatg tcattcgggc taaagttaaa gagataaaga	840
ctaagtgccca tgatgtgact gcagtagtgg aggtgaagga gattctaaag tcctctctgg	900
taaacattcc acgggacact gtcaacctct ataccagctc tggtctgcctc tgccctccac	960
ttaatgttaa tgaggaatat atcatcatgg gctatgaaga tgaggaacgt tccagattac	1020
tcttgggtgga aggctctata gctgagaagt ggaaggatcg actcggtaaa aaagttaagc	1080
gctgggatat gaagcttctg catcttggac tcagtaaaag tgattctagc aatagtgatt	1140
ccactcagag tcagaagtct ggcaggaact cgaacccccg gcaagcacgc aactaaatcc	1200
cgaaatacaa aaagtaacac agtggacttc ctattaagac ttacttgcac tgctggacta	1260
gcaaaggaaa attgcactat tgcacatcat attctattgt ttactataaa aatcatgtga	1320
taactgatta ttacttctgt ttctcttttg gtttctgctt ctctcttctc tcaaccctt	1380
tgtaatggtt tgggggcaga ctcttaagta tattgtgagt tttctatttc actaatcatg	1440
agaaaaactg ttctttttgca ataataataa attaaacatg ctgtaaccag agcctctttg	1500
ctggagtctc cagatgttaa tttactttct gcacccaat tgggaatgca atattggatg	1560
aaaagagagg tttctgggat tcacagaaaag ctagatatgc cttaaaacat actctgccga	1620
tctaattaca gccttatttt tgtatgcctt ttgggcatte tcctcatgct tagaaagttc	1680
caaatgttta taaaggtaaa atggcagttt gaagtcaaat gtcacatagg caaagcaatc	1740
aagcaccagg aagtgtttat gaggaacaaa cacccaagat gaattatttt tgagactgtc	1800
aggaagtaaa ataaatagga gcttaagaaa gaacattttg cctgattgag aagcacaact	1860
gaaaccagta gccgctgggg tgtaaatggt agcattcttc ttttggcaat acatttgatt	1920
tgttcatgaa tatattaatc agcattagag aaatgaatta taactagaca tctgctgtta	1980
tcaccatagt tttgtttaat ttgcttcctt ttaaataaac ccattgggtga aagtcccaaa	2040
aaaaaaaaa aaaaaaaaa	2058

<210> 3  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
5 <400> 3  
atagtaggag gagtactgtg tcg 23  
<210> 4  
<211> 24  
<212> DNA  
10 <213> Homo sapiens  
<400> 4  
aatagtagga ggagtactgt gtca 24  
<210> 5  
<211> 24  
15 <212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 5  
ccctgtggac tatcacctaa tggt 24  
<210> 6  
20 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 6  
ataggccatc agttgtgc 18  
25 <210> 7  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
cataggccat cagttgtgt 19  
<210> 8  
<211> 21  
5 <212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 8  
tcaaagtgct ctgctgttca c 21  
<210> 9  
10 <211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 9  
gatccttattt cctccatctg ct 22  
15 <210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 10  
20 atccttatttc ctccatctgc a 21  
<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
25 <400> 11  
cgtgagggaa aggaatgttg 20  
<210> 12  
<211> 22

<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 12  
ttgtctttta tcccagtcac tc 22

5 <210> 13  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 13  
10 ttgtctttta tcccagtcac tt 22  
<210> 14  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
15 <400> 14  
catcatggca cttagtcttt atctc 25  
<210> 15  
<211> 26  
<212> DNA  
20 <213> Homo sapiens  
<400> 15  
aaaaatgtaa acctataaac tacacg 26  
<210> 16  
<211> 27  
25 <212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 16  
gaaaaatgta aacctataaa ctacaca 27

<210> 17  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
5 <400> 17  
tcttgatttc atatatggaa tgggt 25  
<210> 18  
<211> 26  
<212> DNA  
10 <213> Homo sapiens  
<400> 18  
acagtacttg aacaagaaag acttat 26  
<210> 19  
<211> 26  
15 <212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 19  
acagtacttg aacaagaaag acttac 26  
<210> 20  
20 <211> 28  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 20  
actgttctaa atcttagctg tcctattc 28  
25 <210> 21  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 21  
ctcccttttg acaaactctac tg 22  
<210> 22  
<211> 23  
5 <212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 22  
tctccctttt gacaaactcta cta 23  
<210> 23  
10 <211> 25  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 23  
gaaactaccc tccagtaagt tcttc 25  
15 <210> 24  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 24  
20 ttcgggattt agttgcg 17  
<210> 25  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
25 <400> 25  
ttcgggattt agttgcc 17  
<210> 26  
<211> 20

<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 26  
gtctggcagg aactcgaacc 20

5 <210> 27  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 27

10 tgggggcaga ctcttaag 18  
<210> 28  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

15 <400> 28  
tgggggcaga ctcttaaa 18  
<210> 29  
<211> 27  
<212> DNA

20 <213> Homo sapiens  
<400> 29  
catgattagt gaaatagaaa actcaca 27  
<210> 30  
<211> 23

25 <212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 30  
gactgaagaa gtcaagtttg agt 23

<210> 31  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
5 <400> 31  
actgaagaag tcaagtttga gg 22  
<210> 32  
<211> 21  
<212> DNA  
10 <213> Homo sapiens  
<400> 32  
tgaacagcag agcactttga t 21  
<210> 33  
<211> 20  
15 <212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 33  
gtcggcattc ttatcattca 20  
<210> 34  
20 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 34  
cggcattctt atcattcg 18  
25 <210> 35  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 35

aataagtctc atccatactc aacc 25

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar el riesgo de un individuo de padecer osteoporosis, que comprende: la detección de la presencia de al menos un polimorfismo relacionado con la osteoporosis en un gen FRZB en una muestra de ácido nucleico del individuo, en el que la presencia de al menos dicho polimorfismo proporciona una indicación del riesgo del individuo de padecer osteoporosis, y en el que al menos un polimorfismo se selecciona de entre el grupo que consiste en: alelo C de C18679T, alelo T de C18679T, alelo G de G19524A, alelo A de G19524A, alelo A de A24791G, alelo G de A24791G, alelo C de C26794G, alelo G de C26794G, alelo G de G27014A y alelo A de G27014A.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el conjunto de al menos un polimorfismo comprende dos o más polimorfismos.

3. El método de la reivindicación 2, en el que los dos o más polimorfismos se seleccionan de entre el grupo que consiste en: alelo C de C18679T, alelo T de C18679T, alelo G de G19524A, alelo A de G19524A, alelo A de A24791G, alelo G de A24791G, alelo C de C26794G, alelo G de C26794G, alelo G de G27014A y alelo A de G27014A.

4. El método de la reivindicación 1, en el que el conjunto de al menos un polimorfismo se detecta mediante secuenciación.

5. El método de la reivindicación 1, en el que el conjunto de al menos un polimorfismo se detecta mediante amplificación.

6. El método de la reivindicación 1, en el que la detección comprende:

- poner en contacto la muestra de ácido nucleico con al menos un oligonucleótido específico de secuencia bajo  
5 condiciones que permiten la unión del oligonucleótido a la muestra de ácido nucleico, en el que el conjunto de al menos un oligonucleótido específico de secuencia hibrida bajo condiciones astringentes con una región del gen FRZB que comprende el conjunto de al menos un polimorfismo relacionado con la osteoporosis; y,

- detectar la hibridación del conjunto de al menos un oligonucleótido específico de secuencia con la muestra de ácido nucleico.

7. El método de la reivindicación 1, en el que la detección comprende:

- amplificar la muestra de ácido nucleico, proporcionando así una muestra de ácido nucleico amplificado;

- poner en contacto la muestra de ácido nucleico amplificado con al menos un oligonucleótido específico de secuencia bajo condiciones que permiten la unión del oligonucleótido a la muestra de ácido nucleico amplificado, en el que el conjunto de al menos un oligonucleótido específico de secuencia hibrida bajo condiciones astringentes con una región del gen FRZB que comprende el conjunto de al menos  
20 un polimorfismo relacionado con la osteoporosis; y,

- detectar la hibridación del conjunto de al menos un oligonucleótido específico de secuencia con la muestra de ácido nucleico amplificado.

8. Un método para determinar el riesgo de un individuo de padecer osteoporosis, método que comprende: determinar el genotipo del individuo en uno o más sitios polimórficos en un gen FRZB, en el que un primer genotipo en dichos uno  
5 o más sitios polimórficos está asociado estadísticamente con un aumento del riesgo de padecer osteoporosis comparado con un segundo genotipo en dichos uno o más sitios polimórficos, y en el que dicho primer genotipo comprende dos alelos C y dicho segundo genotipo comprende dos alelos T o un  
10 alelo T y un alelo C del SNP C18679T, dicho primer genotipo comprende dos alelos G y dicho segundo genotipo comprende dos alelos A o un alelo A y un alelo G del SNP G 19524A, dicho primer genotipo comprende dos alelos A y dicho segundo genotipo comprende dos alelos G o un alelo G y un alelo  
15 A del SNP A24791G, dicho primer genotipo comprende dos alelos C y dicho segundo genotipo comprende dos alelos G o un alelo C y un alelo G del SNP C26794G, y/o dicho primer genotipo comprende dos alelos G y dicho segundo genotipo comprende dos alelos A o un alelo G y un alelo A del SNP  
20 G27014A.

9. Un equipo para detectar la presencia de un primer polimorfismo de predisposición o protector en un gen FRZB en una muestra de ácido nucleico de un individuo cuyo riesgo de padecer osteoporosis se está valorando, y el equipo  
25 comprende: uno o más oligonucleótidos iniciales capaces de detectar dicho primer polimorfismo e instrucciones para detectar dicho primer polimorfismo con dicho conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales y para correlacionar dicha

detección con el riesgo del individuo de padecer osteoporosis, empaquetado en uno o más contenedores; en el que dicho primer polimorfismo se selecciona de entre el grupo que consiste en: alelo C de C18679T, alelo T de C18679T, alelo G de G19524A, alelo A de G19524A, alelo A de A24791G, alelo G de A24791G, alelo C de C26794G, alelo G de C26794G, alelo G de G27014A y alelo A de G27014A, y en el que dicho polimorfismo de predisposición comprende el alelo C del SNP C18679T, el alelo G del SNP G19524A, el alelo A del SNP A24791G, el alelo C del SNP C26794G, y/o el alelo G del SNP G27014A y/o dicho polimorfismo protector comprende el alelo T del SNP C18679T, el alelo A del SNP G19524A, el alelo G del SNP A24791G, el alelo G del SNP C26794G y/o el alelo A del SNP G27014A.

15           **10.** El equipo de la reivindicación 9, en el que el conjunto de uno o más oligonucleótidos iniciales comprende al menos una sonda.

**11.** El equipo de cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que los oligonucleótidos iniciales son completamente complementarios a la región del gen FRZB que comprende el primer polimorfismo.

**12.** El equipo de cualquiera de las reivindicaciones de 9 a 11, en el que el conjunto de uno o más de los oligonucleótidos iniciales comprende uno o más cebadores.

25           **13.** Un chip para detectar la presencia de uno o más polimorfismos de predisposición y/o protectores en un gen FRZB en una muestra de ácido nucleico de un individuo cuyo riesgo de padecer osteoporosis se está valorando, y que

comprende:

- una serie de oligonucleótidos, en la que cada uno de los oligonucleótidos hibrida con una región del gen FRZB que comprende al menos uno de los polimorfismos, en la que  
5 dicha hibridación detecta la presencia del polimorfismo, y en la que dicha detección proporciona una indicación del riesgo del individuo de padecer osteoporosis; y,

- un sustrato sobre el que se inmovilizan la serie de oligonucleótidos y en el que se selecciona al menos uno de  
10 entre el conjunto de uno o más polimorfismos del grupo que consiste en: alelo C de C18679T, alelo T de C18679T, alelo G de G19524A, alelo A de G19524A, alelo A de A24791G, alelo G de A24791G, alelo C de C26794G, alelo G de C26794G, alelo G de G27014A y alelo A de G27014A.

15 **14.** Un sistema, que comprende: el chip de la reivindicación 13 y las instrucciones del sistema para correlacionar dicha detección de la presencia de uno o más polimorfismos de predisposición o protectores con el riesgo del individuo de padecer osteoporosis.