



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 266 432**

⑤1 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **02293085 .3**

⑧6 Fecha de presentación : **13.12.2002**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1428875**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2004**

⑤4 Título: **Procedimiento para el diagnóstico de la obesidad.**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

⑦3 Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR**

⑦2 Inventor/es: **Boutin, Philippe;
Dubois, Séverine;
Dina, Christian y
Froguel, Philippe**

⑦4 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el diagnóstico de la obesidad.

5 La invención se encuentra comprendida en el campo de la genética humana y se refiere a nuevos procedimientos para el diagnóstico y la terapia de la obesidad, en particular de la obesidad mórbida, basados en la identificación de polimorfismos en la región 5' del gen *gad2*.

10 La obesidad mórbida es un proceso patológico grave, en el que la acumulación de tejido graso en el cuerpo se convierte en excesiva, interfiere o daña los demás órganos corporales, y crea (o creará previsiblemente) problemas de salud graves y potencialmente letales, denominados comorbilidades.

Se dice que una persona es mórbidamente obesa cuando su índice de masa corporal ($IMC = \text{altura (cm)} / (\text{masa (kg)})^2$) es igual o superior a 40.

15 Numerosos estudios científicos han establecido que existe una predisposición genética a la obesidad mórbida.

Se ha implicado en la obesidad una región del cromosoma 10 (Hager *et al.*, Nature Genetics 20:304-38, 1998), confirmada recientemente en una cohorte de sujetos jóvenes obesos alemanes (Hinney *et al.*, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 85(8):2962-5, 2000), así como en caucasianos blancos y en afroamericanos (Price *et al.*, 2001, Diabetologia 42:555-9, 1999) y en la vieja sociedad de los Amish (Hsueh *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 86(3):1199-1205, 2001).

25 Se han identificado tres nuevos polimorfismos de nucleótidos (SNP) en el marco de la invención, localizados en esta región, y más particularmente en la región 5' del gen *gad2*. Estos SNP muestran una asociación positiva con la obesidad en los sujetos mórbidamente obesos, mientras que otros SNP en esta región no muestran esta asociación.

En el marco de la presente invención, la expresión "gen *gad2*" pretende indicar un gen cuya secuencia codificante se encuentra representada por la SEC ID n° 1.

30 La región 5' flanqueante del gen *gad2* pretende indicar la región que comprende los nucleótidos 1-2.379 de la SEC ID n° 2, y especialmente la región que consiste en los nucleótidos 1-2.379 de la SEC ID n° 2. Los nucleótidos 2.380-2.382 de la SEC ID n° 2 representan el codón de inicio del gen *gad2* (ATG).

35 De esta manera, en una primera forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de la predisposición a la obesidad, y en particular a la obesidad mórbida, en un sujeto humano, que comprende determinar si existe una alteración de la línea germinal en la secuencia de la región 5' flanqueante del gen *gad2*, en el que dicha alteración es la presencia de por lo menos una de las mutaciones siguientes: -243 A>G en el nucleótido 2.137 de la SEC ID n° 2, -1,6 kb G>A en el nucleótido 780 de la SEC ID n° 2, -2004 A>T en el nucleótido 376 de la SEC ID n° 2, siendo dicha alteración indicativa de una predisposición a la obesidad.

40 La región 5' flanqueante del gen *gad2* se encuentra representada por los nucleótidos 1 a 2.379 de la SEC ID n° 2, y los SNP de acuerdo con la invención se encuentran localizados en los nucleótidos 376 (presencia de una T en pacientes predispuestos, y una A en los pacientes no predispuestos), 780 (presencia de una A en pacientes predispuestos, y una G en pacientes no predispuestos), y 2.137 (presencia de una G en pacientes predispuestos, y de una A en pacientes no predispuestos) de la SEC ID n° 2.

45 La invención se refiere de manera más general al estudio de la región promotora 5' del gen *gad2*. En efecto, los inventores han demostrado que la presencia de los SNP específicos indicados en la presente solicitud conducen a una unión incrementada de los factores nucleares a la región 5' del gen *gad2*, conduciendo de esta manera a un incremento de la transcripción.

55 De esta manera, resulta creíble especular que otras modificaciones en la región promotora del gen *gad2*, conduciendo a una expresión más elevada de la proteína *GAD2* también conducirán a una predisposición a la obesidad, debido al incremento en la reserva de GABA. Debido al efecto orexigénico de GABA, esto puede alterar el comportamiento de alimentación.

60 De esta manera, en una forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de una predisposición a la obesidad en un sujeto humano, en el que se investiga el nivel de un producto de expresión del gen *gad2* en dicha muestra.

65 Los productos de expresión de acuerdo con la invención deben comprender ARN o proteína, o lo que podría llamarse producto de expresión "secundario", tal como GABA. Este último de hecho no es realmente un producto de expresión del gen *gad2*, pero el incremento de la producción de la proteína *GAD2* conduce al incremento de la concentración de GABA.

La alteración de la expresión de ARNm puede detectarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica. Entre éstas pueden incluirse el análisis de transferencia northern, la amplificación por PCR y la protección frente a ARNasas.

En una forma de realización, el ARNm de la muestra se pone en contacto con una sonda de gen *gad2* bajo condiciones adecuadas para la hibridación de dicha sonda con un ARN correspondiente a dicho gen *gad2* y la hibridación de dicha sonda se determina, y el nivel de señal tras la hibridación se compara con una señal estándar (de referencia) (que se obtiene de un paciente no obeso, o de un paciente obeso).

El complejo de hibridación emite una señal, que puede deberse al marcaje de la sonda, o del ARNm. Los diferentes marcajes que pueden utilizarse son bien conocidos por el experto en la materia, y pueden indicarse ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H o ^{125}I . Pueden seleccionarse marcajes no radioactivos de entre los ligantes, tales como biotina, avidina, estreptavidina, dioxigenina, haptenos, pigmentos, agentes luminiscentes, tales como agentes radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, fluorescentes o fosforescentes.

Con el fin de identificar los SNP indicados en la presente solicitud, resulta posible poner en contacto una sonda de región 5' del gen *gad2* con ADN genómico aislado de dicha muestra bajo condiciones adecuadas para la hibridación de dicha sonda con dicho gen y se determina la hibridación de dicha sonda.

Dicha sonda de región 5' del gen *gad2* es un ADN de "tipo salvaje" (es decir, el SNP buscado no se encuentra presente en la sonda, y la hibridación se produce cuando no se encuentra presente ningún SNP de acuerdo con la invención en el ADN en la muestra) o un ADN "mutante" (es decir, que porta el SNP buscado, y la hibridación sólo se produce si el SNP se encuentra presente en el ADN en la muestra).

El experto en la materia conoce las técnicas para determinar las sondas específicas de alelo a utilizar en la presente forma de realización, sus longitudes, o las condiciones de hibridación. Resultan preferidas las condiciones de elevada astringencia para evitar los falsos positivos, por ejemplo bajo las condiciones de elevada astringencia siguientes: 0,2 x SSC y SDS al 0,1% a una temperatura comprendida entre 55°C y 65°C, o bajo condiciones tales como las que se indican posteriormente.

Las condiciones astringentes de hibridación pueden definirse tal como se describen en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: a laboratory manual, 2a edición, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1989), con las condiciones siguientes: 5 x o 6 x SSC, 50°C a 65°C. Las condiciones altamente astringentes que pueden asimismo utilizarse para la hibridación se definen como las condiciones siguientes: 6 x SSC, 60°C a 65°C.

La hibridación ADN-ADN o ADN-ARN puede llevarse a cabo en dos etapas: (1) prehibridación a 42°C durante 3 horas en tampón fosfato (20 mM, pH 7,5) que contiene 5 ó 6 x SSC (1 x SSC corresponde a una solución 0,15 M de NaCl + citrato sódico 0,015 M), formamida al 50%, dodecil sulfato sódico (SDS) al 7%, 10 x solución de Denhardt, dextrán sulfato al 5% y ADN de esperma de salmón al 1%; (2) hibridación durante 20 minutos como máximo a una temperatura comprendida entre 50°C y 65°C, más preferentemente comprendida entre 60°C y 65°C, seguido de diferentes lavados (aproximadamente 20 minutos en 2 x SSC + SDS al 2%, a continuación 0,1 x SSC + SDS al 0,1%). El último lavado se lleva a cabo en 0,2 x SSC + SDS al 0,1% durante aproximadamente 30 minutos a una temperatura comprendida entre aproximadamente 50°C y 65°C, y/o en 0,1 x SSC + SDS al 0,1% a la misma temperatura. Estas condiciones de hibridación de elevada astringencia pueden ser adaptadas por un experto en la materia. En efecto, el experto en la materia podrá determinar las mejores condiciones de astringencia mediante la variación de las concentraciones en SSC y SDS, y la temperatura de hibridación y los lavados.

En otra forma de realización, dicho producto de expresión es el polipéptido codificado por el gen *gad2* en dicha muestra. En particular, dicho polipéptido puede detectarse mediante inmunotransferencia o mediante inmunocitoquímica.

Los anticuerpos específicos para *GAD2* pueden utilizarse para detectar la expresión incrementada de *GAD2*. Pueden llevarse a cabo ensayos inmunológicos en cualquier formato conveniente conocido en la técnica. Entre éstos se incluyen las transferencias western, los ensayos inmunohistoquímicos y los ensayos ELISA.

De esta manera, los anticuerpos que reaccionan con el polipéptido *GAD2*, así como los fragmentos reactivos de estos anticuerpos, también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales, recombinantes, quiméricos, de cadena única y/o biespecíficos. En la forma de realización preferida, el anticuerpo o fragmento del mismo puede ser de origen humano, o "humanizado", es decir, preparado para prevenir o minimizar una reacción inmunológica contra el anticuerpo cuando se administran a un paciente.

El fragmento de anticuerpo puede ser cualquier fragmento que sea reactivo con los polipéptidos de la presente invención. La invención comprende además los hibridomas generados mediante la presentación del polipéptido de acuerdo con la invención, o un fragmento del mismo, como antígeno a un mamífero seleccionado, seguido de la fusión de células (por ejemplo células de bazo) del mamífero con determinadas células de cáncer para crear líneas celulares inmortalizadas mediante técnicas conocidas, tales como la técnica de Köhler y Milstein (Nature 256:495, 1975).

Los anticuerpos de acuerdo con la invención son, por ejemplo, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados y los fragmentos Fab o F(ab')₂. Pueden ser inmunconjugados o anticuerpos marcados, con fines de detección.

En otra forma de realización, la invención se lleva a cabo determinando si existe una alteración de la secuencia de línea germinal en la región 5' del gen *gad2* en dicha muestra mediante la observación de los desplazamientos en la

movilidad electroforética del ADN de cadena única de dicha muestra en geles de poliacrilamida desnaturalizantes o no desnaturalizantes. Dichos ácidos nucleicos de cadena única pueden ser obtenidos tras amplificación del ADN genómico, utilizando cebadores adecuados, y desnaturalización (el gel y las condiciones de electroforesis habitualmente son desnaturalizantes para este fin).

En otra forma de realización, la invención se lleva a cabo mediante amplificación de la totalidad o parte de la región 5' del gen *gad2* de dicha muestra, y mediante la determinación de la secuencia de dicho ADN amplificado, por ejemplo mediante la extensión de la terminación de cadena.

En otra forma de realización, los cebadores oligonucleótidos específicos de alelo se utilizan para determinar si se encuentra presente un alelo mutante *gad2* específico en dicha muestra, produciéndose únicamente la amplificación en este caso. Este procedimiento es bien conocido en la técnica.

En otra forma de realización, la totalidad o parte de la región 5' del gen *gad2* de dicha muestra se clona para producir una secuencia clonada y se determina la secuencia de dicha secuencia clonada. La clonación se lleva a cabo en vectores conocidos en la técnica, tales como los vectores pUC o pBR.

En general, la invención se refiere a un procedimiento para la determinación de una predisposición a la obesidad, en particular a la obesidad mórbida, en un sujeto, a partir de una muestra de dicho sujeto, que comprende determinar si existe un desapareamiento entre (1) la región 5' del ADN genómico del gen *gad2* aislado de dicha muestra, y (2) una sonda de ácidos nucleicos complementaria a la región 5' de tipo salvaje humana del ADN del gen *gad2*, según representa la SEC ID n° 2, cuando las moléculas (1) y (2) se hibridan entre sí para formar un dúplex, siendo debido dicho desapareamiento a la presencia de por lo menos uno de los 3 SNP identificados, presentando los nucleótidos 376, 780 ó 2.137 de la SEC ID n° 2.

En otra forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento en el que se lleva a cabo la amplificación de las secuencias 5' flanqueantes del gen *gad2* en dicha muestra y se determina la hibridación de las secuencias amplificadas con una o más sondas de ácidos nucleicos producidas a partir de la secuencia de la región 5' flanqueante del gen *gad2* de tipo salvaje (según representa la SEC ID n° 2) o una secuencia mutante de región 5' flanqueante del gen *gad2* (en la que por lo menos uno de los tres SNP localizado en los nucleótidos 376, 780 o 2.137 de la SEC ID n° 2 se encuentra presente).

La invención se refiere asimismo a un procedimiento que comprende determinar la hibridación *in situ* de la región 5' flanqueante del gen *gad2* en dicha muestra con una o más sondas de ácidos nucleicos producidas a partir de una secuencia mutante o de tipo salvaje de la región 5' flanqueante del gen *gad2*.

La invención abre un nuevo área en el tratamiento y/o en la prevención de la obesidad, en particular de la obesidad mórbida, especialmente para pacientes en familias en las que se sospecha susceptibilidad genética.

En efecto, la presencia de los SNP en la región 5' del gen *gad2*, y los datos que muestran una unión incrementada de factores nucleares a dicha región cuando se encuentran presentes los polimorfismos identificados en el marco de la invención, hacen probable y creíble que la presencia de estos polimorfismos incrementa la expresión de *gad2*, probablemente a través del incremento de la transcripción. Además, la actividad incrementada del gen *gad2* conduce a un incremento de la reserva de GABA, del efecto orexigénico de GABA, que podría alterar el comportamiento de alimentación y contribuir al desarrollo de la obesidad mórbida en los portadores de las mutaciones identificadas.

De esta manera, la invención se refiere asimismo a un procedimiento para cribar para fármacos potenciales para la obesidad que comprenden: combinar (i) un compuesto que se sospecha que es un fármaco para la obesidad, (ii) un polipéptido *GAD2*, y determinar la cantidad de unión del polipéptido *GAD2* a dicho compuesto. En efecto, los inhibidores del enzima *GAD2* interfieren con la formación de GABA y pueden considerarse fármacos útiles para tratar la obesidad, solos o asociados a otros tratamientos.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para el cribado de terapias potenciales para la obesidad, que comprende: combinar (i) una pareja de unión a GABA, (ii) un polipéptido *GAD2*, y (iii) un compuesto que se sospecha que es un agente terapéutico de la obesidad, y determinar la cantidad de unión del polipéptido *GAD2* a su pareja de unión.

En una forma de realización particular, dicha pareja de unión es el ácido L-glutámico.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para el cribado de compuestos terapéuticos potenciales para la obesidad, que comprende: combinar (i) una pareja de unión al gen *gad2*, (ii) un gen *gad2*, y (iii) un compuesto que se sospecha que es un agente terapéutico para la obesidad, y determinar la cantidad de unión del gen *gad2* a su pareja de unión. En la presente forma de realización, la expresión "gen *gad2*" debe interpretarse que incluye la región 5' flanqueante en el locus *gad2*, que comprende los polimorfismos de la invención, especialmente -243 A>G.

En particular, dicha pareja de unión al gen *gad2* es IK2 (Ikaros 2), la secuencia de aminoácidos de la cual se encuentra representada por la SEC ID n° 3.

Los procedimientos para la evaluación de la unión de un compuesto a un ácido nucleico o a una proteína son bien conocidos en la técnica, y se llevan a cabo preferentemente *in vitro*. Un procedimiento para conseguir este objetivo podría ser unir el ácido nucleico o la proteína a un soporte sólido sobre el que se hace fluir el compuesto que se va a ensayar, y comprobar la recuperación del compuesto tras el paso sobre el soporte. Mediante el ajuste de los parámetros, resulta posible asimismo determinar la afinidad de unión. Los compuestos pueden encontrarse asimismo mediante otros procedimientos, incluyendo FRET, SPA, etc., cuando los compuestos y el ácido nucleico o la proteína se marcan. El ensayo puede llevarse a cabo asimismo en las células que contienen el ácido nucleico de la invención, por ejemplo en un vector de acuerdo con la invención y/o que expresa la proteína de acuerdo con la invención. Esto también proporciona información sobre la capacidad del compuesto de atravesar la membrana y de penetrar dentro de las células. Estas células pueden ser células bacterianas, o células de mamífero.

El procedimiento de la invención permite asimismo el cribado, la detección y/o la identificación de compuestos capaces de inhibir la actividad biológica de la proteína *GAD2*, y en particular el incremento de la cantidad de GABA producido.

La presente invención permite de esta manera la detección, la identificación y/o el cribado de compuestos que pueden resultar útiles para el tratamiento de enfermedades en las que se encuentra implicada la recombinación de V(D)J y/o la reparación del ADN. Sin embargo, los compuestos identificados mediante el procedimiento de acuerdo con la invención, con el fin de poder ser utilizados en un tratamiento terapéutico, podrían requerir su optimización, con el fin de presentar una actividad superior y/o una toxicidad menor.

En efecto, el desarrollo de nuevos fármacos con frecuencia se lleva a cabo sobre la base siguiente:

- cribado de compuestos con la actividad buscada, en un modelo relevante, mediante un procedimiento apropiado,
- selección de los compuestos que presentan las propiedades requeridas del primer ensayo de cribado (en la presente invención, la modulación de *GAD2* o la producción de GABA),
- determinación de la estructura (en particular la secuencia (si resulta posible, la secuencia terciaria) si son péptidos, proteínas o ácidos nucleicos, la fórmula y el esqueleto si son compuestos químicos) de los compuestos seleccionados,
- optimización de los compuestos seleccionados, mediante modificación de la estructura (por ejemplo mediante el cambio de la conformación estereoquímica, por ejemplo el paso de los aminoácidos en un péptido de L a D, la adición de sustituyentes en los esqueletos peptídicos o químicos, en particular mediante la injertación de grupos o radicales en el esqueleto, la modificación de los péptidos (ver, en particular, Gante, "Peptidomimetics", en Angewandte Chemie-International Edition Engl. 33:1699-1720, 1994),
- ensayo y cribado de los compuestos "optimizados" en modelos apropiados que con frecuencia son modelos más cercanos a la patología estudiada. En esta etapa, con frecuencia se utilizan modelos animales, en particular roedores (ratas o ratones), o perros o primates no humanos, que son buenos modelos de obesidad, y se buscan cambios fenotípicos en dichos modelos tras la administración del compuesto.

La invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto según se define en la reivindicación 10, y a la utilización de un compuesto identificado mediante un procedimiento de acuerdo con la invención según se define en la reivindicación 11 ó 12, para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento y/o a la prevención de la obesidad, especialmente de la obesidad mórbida.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para la terapia de la obesidad, en particular de la obesidad mórbida, que comprende la administración de un compuesto o de una composición farmacéutica de la invención.

Con el fin de reducir la actividad del gen *gad2* y la proteína, resulta posible utilizar una molécula antisentido, en particular complementaria al ARNm de *gad2*, en una composición farmacéutica para el tratamiento de la obesidad. La invención se refiere a un procedimiento para la terapia de la obesidad, que comprende la administración de una molécula antisentido anti-*gad2* o cualquier medio para reducir la cantidad de la proteína *GAD2*. El experto en la materia conoce medios para diseñar moléculas antisentido, y las modificaciones que pueden inducirse en los esqueletos de las moléculas (fosforotioatos, metilfosfonatos, etc.).

Las secuencias de polinucleótidos antisentido resultan útiles en la prevención o en la reducción de la expresión del gen *gad2*, tal como apreciarán los expertos en la materia. Por ejemplo, los vectores polinucleótido que contienen la totalidad o parte del gen *gad2* (u otras secuencias del locus *gad2*, especialmente la región 5' flanqueante), pueden situarse bajo el control de un promotor en una orientación antisentido e introducirse en una célula. La expresión de este constructo antisentido dentro de una célula interferirá con la transcripción y/o con la traducción de *gad2*.

Alternativamente, puede contemplarse una estrategia "sentido", en la que un oligonucleótido o sonda de ácidos nucleicos que comprende parte de la región 5' del gen *gad2* (especialmente que comprende la variante -243 A>G en el nucleótido 2.137 de la SEC ID n° 2) se introduce dentro de las células, con el fin de competir por la unión con los

factores nucleares que activan la transcripción. El tamaño del fragmento de la región 5' flanqueante del gen *gad2* que puede utilizarse en la estrategia sentida es preferentemente de entre aproximadamente 50 y 150 bases.

La invención se refiere asimismo a la utilización de modelos animales para el estudio de la obesidad, en la que se incrementa la expresión del gen *gad2*. En particular, puede incrementarse la expresión de este gen sólo condicionalmente, utilizando promotores que son específicos de sitio o de tiempo, o promotores inducibles. De esta manera, resulta posible incrementar la expresión de *gad2* únicamente en el páncreas de los animales de acuerdo con la invención, o en el cerebro. Los procedimientos para obtener animales de acuerdo con la invención son conocidos por los expertos en la materia, y resultan útiles en particular para someter a ensayo algunos fármacos que pueden identificarse de acuerdo con los procedimientos de la invención.

La inserción de un constructo en un genoma de un animal para obtener un animal transgénico puede llevarse a cabo mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, y pueden ser aleatorios o dirigidos. En resumen, el experto en la materia construye un vector que contiene la secuencia que se debe insertar dentro del genoma, con un promotor apropiado, y un marcador de selección (por ejemplo el gen que codifica la proteína que proporciona resistencia a la neomicina) y puede provocar que entre en las células madre embrionarias (ES) de un animal. A continuación, se seleccionan las células con el marcador de selección, y se incorporan a un embrión, por ejemplo mediante microinyección en un blastocito, que puede recolectarse mediante perfusión del útero de hembras embarazadas. El reimplante del embrión y la selección de los animales transformados, seguido del retrocruzamiento permite obtener este animal transgénico. Para obtener un animal "más limpio", puede extraerse el gen del marcador de selección mediante la utilización de una recombinasa específica de sitio, si se encuentra flanqueada por las secuencias correctas.

De acuerdo con una forma de realización, el mamífero no humano transgénico ha integrado en su genoma la secuencia de ácidos nucleicos del gen *gad2* o la secuencia codificante del mismo, ligada funcionalmente a elementos reguladores, en la que la expresión de dicha secuencia codificante incrementa el nivel de la proteína *GAD2* y/o la reserva de GABA en dicho mamífero respecto a un animal no transgénico de la misma especie. Los ratones transgénicos que presentan una expresión incrementada de *gad2* se describen en el documento WO-A-98/37224 o en Geng *et al.*, PNAS vol. 95:10055-10060, 1995.

La secuencia *gad2* prevista para la forma de realización anterior puede ser una secuencia humana de gen *gad2* introducida dentro del genoma del animal de la invención, o la secuencia endógena del gen *gad2*, el promotor de la cual se ha modificado con el fin de que induzca la sobreexpresión. Por ejemplo, la secuencia codificante *gad2* para el ratón es conocida y puede encontrarse en GenBank bajo el número NM_008078. Pueden identificarse otros genes endógenos *gad2* en otros animales utilizando las homologías entre secuencias.

Alternativamente, un mamífero no humano transgénico cuyo genoma comprende una alteración del gen endógeno *gad2* se utiliza como animal modelo para analizar la relación entre *GAD2* y la obesidad. En particular, la alteración comprende la inserción de una secuencia de marcador seleccionable, y dicha alteración resulta en que dicho mamífero no humano manifiesta un defecto en el nivel de GABA en comparación con un mamífero no humano de tipo salvaje.

En particular, dicha alteración es una alteración homocigótica, y dicha alteración homocigótica resulta en una mutación nula del gen endógeno que codifica *GAD2*.

La patente US nº 6.087.555 describe una manera de obtener un ratón knockout, y la enseñanza general de esta patente se incorpora a la presente memoria como referencia (columna 5, línea 54 a columna 10, línea 13). En esta patente, se describe un ratón knockout OPG, pero el mismo procedimiento se aplica a un ratón knockout *GAD2*. El experto en la materia también encontrará información en Hogan *et al.* (Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1986).

El mamífero de la invención preferentemente es un roedor, especialmente una rata o un ratón. Los ratones knockout *GAD65* (*gad2*) se describen en Fagiolini y Hensch, Nature vol. 404:183-186, 2000.

Descripción de las figuras

Figura 1: representación esquemática del gen *gad2*, y de la frecuencia de los SNP identificados en el marco de la invención.

Figura 2: ensayo de desplazamiento en gel, ensayo de la unión de proteína nuclear en la región 5' del gen *gad2*, dependiente de la naturaleza del nucleótido en la posición nº -243. mt = mutante (G); wt = tipo salvaje (A).

Figura 3: efecto de la variante -243 A>G de *gad2* sobre la actividad transcripcional en las células β TC3. Las unidades relativas de luciferasa se expresan como medias $\pm$ S.D.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Asociación entre la obesidad y los SNP

El gen *gad2* codifica una isoforma de la ácido glutámico descarboxilasa (GAD65), que cataliza la formación de ácido gamma-aminobutírico (GABA) a partir del ácido L-glutámico, y se expresa en células tanto del cerebro como de los islotes pancreáticos. GABA es uno de los neurotransmisores inhibitorios más potentes del sistema nervioso central (SNC). GABA modula la secreción de gastrina y de somatostatina y puede estimular la incorporación de glucosa a varios tejidos (Erdo y Wolff, J. Neurochem. 54(2):363-72, 1990).

Tres SNP (variante -243 A>G (5' UTRI); -1,6 kb G>A (SNP 668); -2004 A>T (SNP 669)), situados en la región 5' flanqueante del gen *gad2* revelaron una asociación positiva con la obesidad en los sujetos mórbidamente obesos.

Los fragmentos de ADN que portaban estos polimorfismos pueden amplificarse con los conjuntos siguientes de cebadores.

Los polimorfismos del gen *gad2* se genotiparon mediante secuenciación directa o mediante la tecnología LightCycler™ (Roche, Mannheim, Alemania). El ensayo LightCycler se basa en sondas de hibridación marcadas con pigmentos fluorescentes que permiten la transferencia de energía de resonancia fluorescente (Blomeke *et al.*, Anal. Biochem. 275:93-7, 1999). El genotipado del SNP se llevó a cabo utilizando análisis de curvas de fusión. Se llevó a cabo PCR en un aparato 9700 (Applied Biosystems, Foster city, USA) antes del análisis en el LightCycler. Las secuencias de los cebadores utilizados para el PCR y para los ensayos del LightCycler se describen en la tabla siguiente.

25

SNP	cebadores de PCR	cebadores para el ensayo del Light cycler
-243 A>G	F: 5'cctcaaatgctctggggctc3' R: 5'ggtgtcacgcaggaacagaa3'	Red640-gtctcttttaagctccccggct cgggctccgaggaccttaggtagctcc-F
-1600 G>A	F 5'ctgaggcgtattaggag R: 5'ctcctaatacgcctcag	Red640-ggaaagcagccgcctc tggaatgacaggcgccttgccaggcgcg-F
-2004 A>T	F: 5'tgttttcaaccactcatcat R: 5'agggacagttatgtctcg	Red640-acagcctggtacagactt tgagtttgcaccaccgggctc-F
(F representa la etiqueta de fluoresceína)		

40

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 20 µl de tampón para PCR, que contenía 50 ng de ADN genómico humano, 10 pmoles de cada cebador, 2,5 mmoles/l de MgCl₂, 2,5 mmoles/l de dNTP y 0,2 U de polimerasa Taq Gold. Las condiciones de ciclado térmico para el producto de PCR eran: 1 ciclo de 95°C durante 12 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 15 segundos; 55°C, 15 segundos; 72°C, 30 segundos; 1 ciclo, 72°C, 10 minutos; 1 ciclo, 15°C, 15 minutos.

45

Además, con el fin de estudiar la contención de la alimentación y la “obesidad latente”, la contención cognitiva en la alimentación, se analizaron la desinhibición y el hambre de acuerdo con el “Cuestionario de alimentación de tres factores, o TFEQ” (Stunkard, A.J. y Messick, S., J. Psychosom. Res. 29(1):71-83, 1985).

50

Se llevaron a cabo estudios de asociación en 369 pacientes mórbidamente obesos no relacionados (media de IMC: 47,3 ± 7,4 kg/m²; media de edad: 46 ± 12 años; mujeres/hombres: 294/75).

55

Se utilizó un conjunto de 381 sujetos no diabéticos no obesos no relacionados (IMC media: 22,8 ± 2,44 kg/m²; media de edad: 58,3 ± 14,1 años; mujeres/hombres: 228/152) como grupo de control. La Tabla 1 muestra la distribución de genotipos y las frecuencias de alelos de los 3 SNP (variante -243 A>G (5'UTRI); -1,6 kb G>A (SNP 668); -2004 A>T (SNP 669)).

60

65

ES 2 266 432 T3

TABLA 1

Distribución de genotipos y frecuencias de alelos de los SNP 242 A>G, 1,6 kb G>A y 1,7 kb A>T

5	Modelo de codominancia		Obesos mórbidos IMC>40		Controles		Valor de p
10	SNP	Genotipo	Número de genotipos	Frec. de los alelos	Número de genotipos	Frec. de los alelos	
15	5'UTR: -243 A>G	AA	233	A: 79,9%	270	A: 84,5%	p=0,05
		AG	117	G: 20,1%	92	G: 15,5%	
		GG	15		12		
20	SNP668: -1,6kb G>A	GG	229	G: 80,2%	255	G: 84,8%	p=0,06
		GA	113	A: 19,8%	87	A: 15,2%	
		AA	14		10		
25	SNP669: -2004 A>T	AA	221	A: 80,4%	254	A: 83,8%	p=0,19
		AT	105	T: 19,6%	89	T: 16,2%	
		AA	14		13		
30							
	Modelo de dominancia		Obesos mórbidos IMC>40		Controles		Valor de p
35	SNP	Genotipo	Número de genotipos	Frec. de los alelos	Número de genotipos	Frec. de los alelos	
	5'UTR: - 243 A>G	AA	233	A: 79,9%	270	A: 84,5%	p=0,004
		AG/GG	132	G: 20,1%	104	G: 15,5%	
	SNP668: - 1,6kb G>A	GG	229	G: 80,2%	255	G: 84,8%	p=0,02
		GA/AA	127	A: 19,8%	97	A: 15,2%	
40	SNP669: - 2004 A>T	AA	221	A: 80,4%	254	A: 83,8%	p=0,07
		AT/AA	119	T: 19,6%	102	T: 16,2%	

45 Bajo los modelos de codominancia y de dominancia, los SNP -243 A>G y -1,6 kb G>A se encontraban asociados a la obesidad mórbida (valores respectivos de p de 0,004 y 0,2 bajo un modelo de dominancia). Se observó una tendencia hacia la asociación para la variante -2004 A>T.

50 El riesgo relativo de estos 3 SNP se estimó en: R.R.=1,55 (IC al 95% de 1,14 a 2,12) (UTR5I; -243); R.R.=1,45 (IC al 95% de 1,06 a 2) (SNP668; -1,6 kb); R.R.=1,34 (IC al 95% de 0,97 a 1,84) (SNP669; -2004).

Con el fin de replicar estos resultados, se genotiparon los 3 SNP en otro conjunto de 316 sujetos mórbidamente obesos no relacionados. Se obtuvo un resultado similar para la variante -243 A>G (bajo el modelo de dominancia, p=0,009) y se obtuvo una tendencia para el SNP -1,6 kb G>A (bajo el modelo de dominancia, p=0,06).

55 Se llevó a cabo un análisis de la varianza para los fenotipos relacionados con la obesidad (IMC, leptina, porcentaje de masa grasa, insulinemia, etc.) y se encontró una asociación significativa entre los 3 SNP y los tres factores de comportamiento de alimentación.

60 Para someter a ensayo el comportamiento de alimentación humano, los sujetos cumplieron el cuestionario TFEQ (cuestionario de alimentación de tres factores) establecido por Stunkard *et al.* (op. cit.). El análisis de la varianza para los tres factores estables medidos por TFEQ: contención cognitiva de la alimentación (Qres), desinhibición (Qdis) y hambre (Qhun) se muestra en la Tabla 2. El desequilibrio de ligamiento entre los 3 SNP era significativo ($X^2 = 174$, $p < 10^{-10}$).

65 El desequilibrio de ligamiento entre cada SNP se estimó mediante un programa de estimación de haplotipos (EH). $D' = 0,84$ (SNP -243 A>G y -1,6 kb G>T), $D' = 0,84$ (SNP -243 A>G y -2004 kb G>A), $D' = 0,87$ (SNP -1,6 kb G>T y -2004 kb G>A).

ES 2 266 432 T3

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos para la variante -243 A>G (5'UTR). Se obtuvieron resultados similares para las variantes -1,6 kb G>A (SNP 668) y -2004 A>T (SNP 669).

TABLA 2

Análisis de la varianza para parámetros del comportamiento de ingesta de alimento

-243 A>G (5'UTR)				
	AA	AG	GG	P
N	233	117	15	
Edad	46,02 ± 0,78	47,82 ± 1,1	39,9 ± 3,1	0,04
Edad-Pmax	43,5 ± 0,79	44,3 ± 1,1	35,76 ± 3,1	0,03
Qres	9,53 ± 0,31	9 ± 0,45	6,53 ± 1,28	0,06
Qdis	8,38 ± 0,24	8,71 ± 0,34	10,9 ± 0,96	0,03
Qhun	5,29 ± 0,24	6,49 ± 0,35	7,95 ± 0,95	0,001

Mediante la utilización de un modelo codominante, se descubrió que los portadores de GG presentaban una puntuación más baja de contención que los sujetos heterocigóticos y de tipo salvaje (valor de $p = 0,06$). También presentaban una desinhibición más alta (valor de $p = 0,03$) y puntuaciones de hambre más elevadas (valor de $p = 0,001$) que los sujetos heterocigóticos y de tipo salvaje. Además, se observó que los portadores de GG eran más jóvenes (valor de $p = 0,04$) y alcanzaban aparentemente el peso máximo en edades más tempranas que los portadores de AG y de AA (valor de $p = 0,03$). Estos datos sugieren que las alteraciones del comportamiento de alimentación de las variantes de *gad2* pueden contribuir al desarrollo de una aparición más temprana de la obesidad mórbida.

Los estudios de haplotipos se llevaron a cabo con las variantes -243 A>G, -1,6 kb G>A y -2004 A>T (programa EHplus). Se observó una diferencia significativa en las frecuencia de los haplotipos de sujetos obesos y no obesos ($p < 10^{-10}$). El haplotipo ATG se demostró que era más frecuente en los obesos (16,9%) comparado con los controles (8%) (figura 1).

Ejemplo 2

*Estudio funcional de una variante de promotor del gen *gad2**

Para buscar sitios potenciales de unión, se envió la región 5' flanqueante del gen *gad2* al servidor transfac: <http://transfac.gbf.de/cgi-bin/mat>.

Los análisis *in silico* demostraron que -243 A>G (localizado en el nucleótido 2.137 de la SEC ID nº 2) y -1,6 kb G>A (localizado en el nucleótido 780 de la SEC ID nº 2) se encontraban situados cerca de un sitio de elemento de respuesta previsto, Ikaros 2 (IK2). IK2 es un factor de transcripción que se encuentra altamente expresado en los linfocitos humanos, y su secuencia de aminoácidos se encuentra representada por la SEC ID nº 3.

Con el fin de someter a ensayo que la variante -243 A>G altera la unión de proteínas nucleares al ADN, se llevó a cabo un ensayo de desplazamiento en gel utilizando cebadores con secuencias del tipo salvaje y del sitio mutado y un extracto nuclear de células MIN6 (figura 2).

Los resultados del ensayo de desplazamiento en gel demostraron que se produce la unión *in vitro* de las proteínas nucleares al sitio del elemento sensible IK2. Aparentemente, las proteínas nucleares presentan una mayor afinidad por la variante del elemento de respuesta G (línea 6 frente a 1). Se obtuvo un resultado similar con la competición entre los alelos A y G (línea 2 frente a 3; 6 frente a 8; 7 frente a 9).

Con el fin de investigar si la variante alélica en la posición -243 influye sobre el nivel de transcripción de *GAD2*, se llevaron a cabo cotransfecciones transitorias utilizando constructo de informador de luciferasa de luciérnaga para medir la actividad proximal del promotor de tipo salvaje y de los promotores variantes en células β TC3 (línea celular del insulinoma murino). Se utilizó el vector Renilla para normalizar la eficiencia de transfección. La actividad transcripcional del constructo mutante -243 A>G era 8,61 veces más elevada comparado con el constructo de tipo salvaje ($n=8$, $p<0,0001$) (figura 3).

El incremento observado de la actividad transcripcional inducido por el alelo G de -243 A>G concuerda con los resultados genéticos:

ES 2 266 432 T3

- asociación de la variante -243 A>G con la obesidad ($p=0,004$; R.R.=1,55 (IC al 95% de 1,14 a 2,12).
- los portadores de GG presentaban una puntuación más baja de contención en la alimentación ($p=0,06$), una puntuación más elevada de desinhibición ($p=0,03$) y un parámetro de puntuación de hambre más elevado ($p=0,001$).

Estos resultados indican que la unión de proteínas nucleares (potencialmente el factor de transcripción IK2) en presencia de alelo variante se encontraba incrementada y podría transactivar el gen *gad2*, y de esta manera la reserva de GABA. Por lo tanto, el efecto orexigénico de GABA podría encontrarse incrementado y podría alterar el comportamiento de alimentación y contribuir al desarrollo de la obesidad mórbida en los portadores de G de la variante -243 A>G.

El resultado podría generalizarse a los demás SNP, que también se encuentran próximos al elemento de respuesta IK2.

La evidencia presentada en la presente solicitud apunta a la implicación de la ruta de GABA en la obesidad en el ser humano. Esto constituye una etapa importante hacia una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que conducen a las formas comunes de obesidad. Aparentemente resulta claro que las neuronas GABAérgicas se encuentran implicadas en la integración de la señales que modulan la ingesta de alimento. La identificación de los SNP en la región 5' del gen *gad2* y la demostración de que su presencia modula la expresión de un enzima clave (*GAD2*), que a su vez modifica la reserva de GABA abre nuevas perspectivas para fármacos contra la obesidad.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el diagnóstico de una predisposición a la obesidad, y en particular a la obesidad mórbida, en un sujeto humano, que comprende determinar si existe una alteración en la línea germinal en la secuencia de la región 5' flanqueante del gen *gad2*, la secuencia codificante del cual se encuentra representada por la SEC ID nº 1, en la que dicha alteración es la presencia de por lo menos una de las mutaciones siguientes: -243 A>G en el nucleótido 2.137 de la SEC ID nº 2, -1,6 kb G>A en el nucleótido 780 de la SEC ID nº 2, -2004 A>T en el nucleótido 376 de la SEC ID nº 2, siendo indicativa dicha alteración de una predisposición a la obesidad.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha obesidad es la obesidad mórbida.

3. Procedimiento para el diagnóstico de una predisposición a la obesidad en un sujeto humano, a partir de una muestra de dicho sujeto, en la que se investiga el nivel de un producto de expresión del gen *gad2* en dicha muestra.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicho producto de expresión es ARN o proteína, o GABA.

5. Procedimiento para el cribado de fármacos potenciales para la obesidad, que comprende: combinar (i) un compuesto que se sospecha que es un fármaco para la obesidad, (ii) un polipéptido *GAD2*, y determinar la cantidad de unión del polipéptido *GAD2* a dicho compuesto.

6. Procedimiento para el cribado de agentes terapéuticos potenciales para la obesidad, que comprende: combinar (i) una pareja de unión a *GAD2*, (ii) un polipéptido *GAD2*, y (iii) un compuesto que se sospecha que es un agente terapéutico para la obesidad, y determinar la cantidad de unión del polipéptido *GAD2* a su pareja de unión.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha pareja de unión a *GAD2* es el ácido L-glutámico.

8. Procedimiento para el cribado de agentes terapéuticos potenciales para la obesidad, que comprende: combinar (i) una pareja de unión al gen *gad2*, (ii) un gen *gad2*, y (iii) un compuesto que se sospecha que es un agente terapéutico para la obesidad, y determinar la cantidad de unión del gen *gad2* a su pareja de unión.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha pareja de unión al gen *gad2* es IK2 (Ikaros 2).

10. Composición farmacéutica que comprende una molécula sentido que comprende un fragmento de la región 5' flanqueante del gen *gad2*, que comprende especialmente la variante -243 A>G (en el nucleótido 2.137 de la SEC ID nº 2) dentro de dicha región, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Utilización de una molécula antisentido complementaria al ARNm de *gad2*, para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento de la obesidad, en particular de la obesidad mórbida.

12. Utilización de una molécula sentido que comprende un fragmento de la región 5' flanqueante del gen *gad2*, que comprende especialmente la variante -243 A>G (en el nucleótido 2.137 de la SEC ID nº 2) dentro de dicha región, para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento de la obesidad.

13. Utilización de un mamífero no humano transgénico en el que se ha integrado en su genoma la secuencia de ácidos nucleicos de *gad2*, o secuencia codificante del mismo, ligada funcionalmente a elementos reguladores, en el que la expresión de dicha secuencia incrementa el nivel de la proteína *GAD2* y/o de la reserva de GABA, en dicho mamífero respecto a un mamífero no transgénico de la misma especie, como modelo para el estudio de la obesidad, o para el ensayo de fármacos potenciales antiobesidad.

14. Utilización de un mamífero no humano transgénico cuyo genoma comprende una ruptura del gen endógeno *gad2*, en el que dicha ruptura comprende la inserción de una secuencia de marcador seleccionable, y en el que dicha ruptura resulta en que dicho mamífero no humano muestre un defecto en el nivel de GABA en comparación con un mamífero no humano de tipo salvaje, como modelo para el estudio de la obesidad, o para el ensayo de fármacos potenciales antiobesidad.

15. Utilización según la reivindicación 13 ó 14, en el que el mamífero es un ratón.

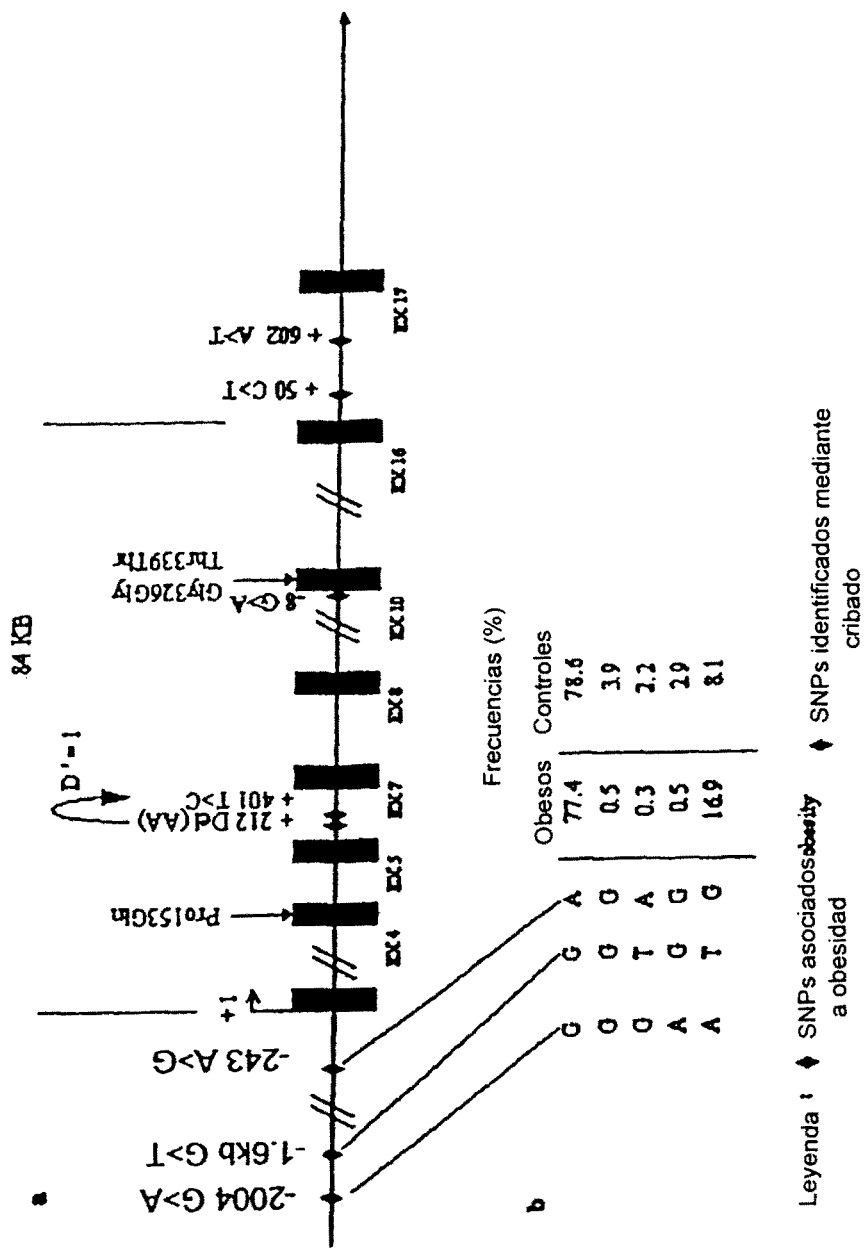


Figura 1

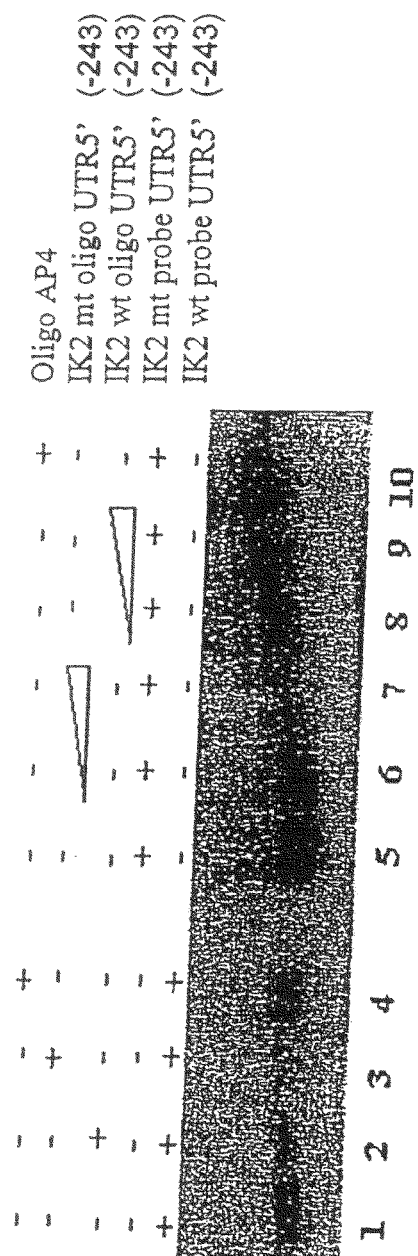


Figura 2

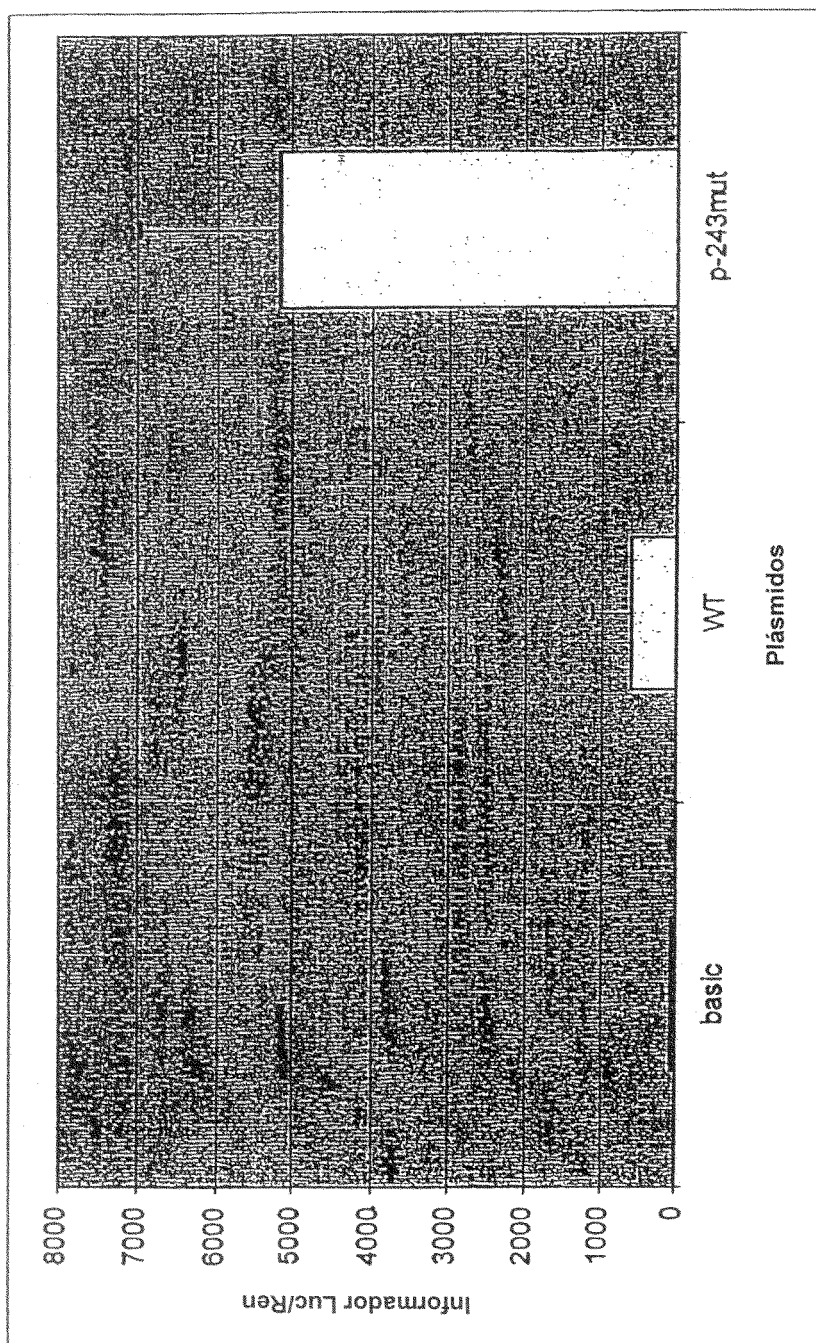


Figura 3

ES 2 266 432 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

<120> PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA OBESIDAD

<130> 64 808 - EP

<140>

<141>

<160> 15

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 1758

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> gen *gad2*

<400> 1

```

atggcatctc cgggctctgg cttttggtct ttccgggtcgg aagatggctc tggggattcc 60
gagaatcccg gcacagcgcg agcctggtgc caagtggctc agaagttcac gggcggcac 120
ggaacaacac tgtgcgccct gctctacgga gacgccgaga agccggcgga gageggcg 180
agccaacccc cgcggggcgc cgccgggaag gcgcctgcg cctgcgacca gaagccctgc 240
agctgctcca aagtggatgt caactacgcg tttctccatg caacagacct gctgcggcg 300
tgtgatggag aaaggcccac ttggcggtt ctgcaagatg ttatgaacat tttacttcag 360
tatgtggtga aaagtttcga tagatcaacc aaagtgattg atttccatta tcctaataag 420
cttctccaag aatataattg ggaattggca gaccaaccac aaaatttggg ggaattttg 480
atgcattgcc aaacaactct aaaatatgca attaaaacag ggcacctag atacttcaat 540
caactttcta ctggtttggg tatggttggg ttagcagcag actggctgac atcaacagca 600
aatactaaca tggtcaccta tgaaattgct ccagtatttg tgcttttggg atatgtcaca 660
ctaaagaaaa tgagagaaat cattggctgg ccagggggct ctggcgatgg gatattttct 720
cccgggtggc ccatatctaa catgtatgcc atgatgatcg cacgctttaa gatgttccca 780
gaagtcaagg agaaaggaat ggctgctctt ccagggctca ttgccttcac gtctgaacat 840
agtcattttt ctctcaagaa gggagctgca gccttaggga ttggaacaga cagcgtgatt 900
ctgattaaat gtgatgagag agggaaaatg attccatctg atcttgaaag aaggattctt 960
gaagccaaac agaaagggtt tgttcccttc ctctgagtg ccacagctgg aaccaccgtg 1020
tacggagcat ttgacccctt cttagctgtc ctgacatgt gcaaaaagta taagatctgg 1080
atgcattggg atgcagcttg ggggtgggga ttactgatgt cccgaaaaca caagtggaaa 1140
ctgagtggcg tggagagggc caactctgtg acgtggaatc cacacaagat gatgggagtc 1200
cctttgcagt gctctgctct cctggttaga gaagagggat tgatgcagaa ttgcaaccaa 1260
atgcatgcct cctacctctt tcagcaagat aaacattatg acctgtccta tgacactgga 1320
gacaaggcct tacagtgcgg acgccacgtt gatgttttta aactatggct gatgtggagg 1380
gcaaaagggg ctaccgggtt tgaagcgcat gttgataaat gtttgaggtt ggcagagtat 1440
ttatacaaca tcataaaaaa ccgagaagga tatgagatgg tgtttgatgg gaagcctcag 1500
cacacaaatg tctgcttctg gtacattcct ccaagcttgc gtactctgga agacaatgaa 1560
gagagaatga gtcgcctctc gaaggtggct ccagtgatta aagccagaat gatggagtat 1620
ggaaccacaa tggtcagcta ccaacccttg ggagacaagg tcaatttctt ccgcatggct 1680
atctcaaac cagcggcaac tcaccaagac attgacttcc tgattgaaga aatagaacgc 1740
cttggaacag atttataa

```

ES 2 266 432 T3

<210> 2
 <211> 2382
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <223> región 5' flanqueante de los nucleótidos del gen *gad2*
 10
 <220>
 <223> R = G o A

 15 <220>
 <223> Y = T o C

 <220>
 20 <223> M = A o C

 <220>
 25 <223> W = A o T

 <220>
 <223> S = G o C

 30 <400> 2

 35 gaaaaaaaaa tcagttaaata tcaggtgttt taatccgttt cttctttggg ggttttgtgt 60
 gatttaaacy cttgctttta agaaccttta tgttttcaac cactcatcca tagtagaaaa 120
 gttctgcaac cctagactgc tggcttgaag gaaaaccttt gcaggatttg atatggattt 180
 caacaaagaa ccagcctctg cgaggctgga gagagctgag gagctgccat gcctgaagtg 240
 cagatggctg aaccacaagt ctttaggttt ccggagttgt tattgtggtg acctagagtg 300
 tcagagccag gagagcaaga aagaggagcc aaactgagcc ctgagttttc gaccacccgg 360
 40 gctcccacag cctggwacag acttcaccta gcaagctcag tgccagcctt cggcaggacg 420
 ctatcaacgc ccgactggwt tcytgctctc atcctggcgc ctgggccag ttgccatagt 480
 gtggatccca tgactcctca gggaaccctt ggactcaggc acgcgagaag aagacagcgc 540
 tttgtggaga gaattgacca gggacagtta tgctcgagca cacaggactt gggcctgtat 600
 gcgtccagca tgggcccccag gatgtccctt ctaagcgagg gtcgaggggt gctcgcccag 660
 45 acgggatccc cgggtctctg ctttgtttag agctttggtg gctggttcag gaggtcagag 720
 aaataaaacy acttgtgaac acaatggaaa tgacaggcgc tctggccagg cgcggggaar 780
 gcagccgcct cggaagccg acctcagccc ttctctctct ctcctccctt ccgtctcccc 840
 cagagccccg gagctccgag gtgcacttga agttcatctc cactgccagg agaacgcagc 900
 50 gcaaaactgtc aaagggctcc caatccttag ggcgtctctc ctgtctgcaa tagctttttg 960
 tagaaaggaa atcatcagaa mgattctgac tttctctctc tttctttatt agaaaaagag 1020

 55

 60

 65

ES 2 266 432 T3

```

aaaccgcctc ctaatacgcc tcagagagaa ccaatctcgc gcttccgggt caccogetac 1080
cgcgaagatt ctctgggggc gagggggggc attgggtttga agccccttaa aacgagggcc 1140
ctgcaggcga tgccttcttt cctactcgga tttgtaaagc cgagattgct tagttggaaa 1200
ccctgttctc ccctcccagg cgcacacaga tcccccttac acgcaagcag cgggcgcttc 1260
cacgcctccg cgggccaaag tcaccaaagt ccctgattcc atccccacc cgccatcaat 1320
cctgccgact ctggccgctc tgcctcattc tcttccaaga agtttccatt cgttttattt 1380
ttttttcccc agcccgaggc cctcagtaga ctccagcggt gattttaatt gcctcaatca 1440
gcagtcattc tccccagccg tcaactcagag cctggacggg ggggtcccgc atctagccct 1500
tggctacgca ggaacgggtg gcccccggtt acggcgcggt tcagcaggca ggcgtcaggc 1560
tctaccaagg cgctgaaatg agcccatcag cgggtaggag cccttcccc gccgtccct 1620
ccccaggctc gtgaacggcg cctgatgccg gcccggggcg cgagctctcg aggtcgagc 1680
gacctcagca cctgcttgga ggaaaacggc gcgggaaccc cgcttccttc ccctcagctg 1740
gagccagacc tcaaacaaaa cccaatcga tgcacacaga aaactcctct gggccacgct 1800
tcccgcctcg ccgaggtctc ccagctctgc ccctcgctga cgctggcgcg cagcsgctgt 1860
ggcagcaccg gggacagcgg ccgcccgcac ttccgcctc tggctcgccc gaggacgcgc 1920
tggcacgcct cccacccctt cactctgact ccagctggcg tgcattggtc gcctcgcatc 1980
ctcacgactc agctccctcc ctctctcgtg ttttttctt ccgccgcccc ctcatcctc 2040
cccactgggc tccctttccc tcaaagtctc tggggtcttc cgcgctttcc tgagtcggg 2100
ctccgaggac ccttaggtag tcccggtctc ttttaargt ccccggttc caaagggtt 2160
ccacgtccct aaacctgtc tccagctcgc atacacacac gcacagacac gcacgttttc 2220
tgttctcgcg tgacacccgc cctcgccgct cgccccgcg ggtccccgcg cggtgccctc 2280
ctccgcacac acgggcacgc acgcgcgcgc agggccaagc ccgaggcagc tcgccgcgag 2340
ctcgcaactc caggcgacct gctccagtct ccaaagccga tg 2382

```

<210> 3

<211> 519

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Proteína Ikaros de unión a ADN (factor de transcripción linfocitario LyF-1)

<400> 3

```

Met Asp Ala Asp Glu Gly Gln Asp Met Ser Gln Val Ser Gly Lys Glu
 1             5             10             15

Ser Pro Pro Val Ser Asp Thr Pro Asp Glu Gly Asp Glu Pro Met Pro
45             20             25             30

Ile Pro Glu Asp Leu Ser Thr Thr Ser Gly Gly Gln Gln Ser Ser Lys
35             40             45

Ser Asp Arg Val Val Ala Ser Asn Val Lys Val Glu Thr Gln Ser Asp
50             55             60

Glu Glu Asn Gly Arg Ala Cys Glu Met Asn Gly Glu Glu Cys Ala Glu
55             65             70             75             80

Asp Leu Arg Met Leu Asp Ala Ser Gly Glu Lys Met Asn Gly Ser His
85             90             95

Arg Asp Gln Gly Ser Ser Ala Leu Ser Gly Val Gly Gly Ile Arg Leu
60             100            105            110

Pro Asn Gly Lys Leu Lys Cys Asp Ile Cys Gly Ile Ile Cys Ile Gly
65             115            120            125

```

ES 2 266 432 T3

5 Pro Asn Val Leu Met Val His Lys Arg Ser His Thr Gly Glu Arg Pro
 130 135 140
 Phe Gln Cys Asn Gln Cys Gly Ala Ser Phe Thr Gln Lys Gly Asn Leu
 145 150 155 160
 10 Leu Arg His Ile Lys Leu His Ser Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys His
 165 170 175
 Leu Cys Asn Tyr Ala Cys Arg Arg Arg Asp Ala Leu Thr Gly His Leu
 180 185 190
 15 Arg Thr His Ser Val Gly Lys Pro His Lys Cys Gly Tyr Cys Gly Arg
 195 200 205
 Ser Tyr Lys Gln Arg Ser Ser Leu Glu Glu His Lys Glu Arg Cys His
 210 215 220
 20 Asn Tyr Leu Glu Ser Met Gly Leu Pro Gly Thr Leu Tyr Pro Val Ile
 225 230 235 240
 25 Lys Glu Glu Thr Asn His Ser Glu Met Ala Glu Asp Leu Cys Lys Ile
 245 250 255
 Gly Ser Glu Arg Ser Leu Val Leu Asp Arg Leu Ala Ser Asn Val Ala
 260 265 270
 30 Lys Arg Lys Ser Ser Met Pro Gln Lys Phe Leu Gly Asp Lys Gly Leu
 275 280 285
 Ser Asp Thr Pro Tyr Asp Ser Ser Ala Ser Tyr Glu Lys Glu Asn Glu
 290 295 300
 35 Met Met Lys Ser His Val Met Asp Gln Ala Ile Asn Asn Ala Ile Asn
 305 310 315 320
 40 Tyr Leu Gly Ala Glu Ser Leu Arg Pro Leu Val Gln Thr Pro Pro Gly
 325 330 335
 Gly Ser Glu Val Val Pro Val Ile Ser Pro Met Tyr Gln Leu His Lys
 340 345 350
 45 Pro Leu Ala Glu Gly Thr Pro Arg Ser Asn His Ser Ala Gln Asp Ser
 355 360 365
 50 Ala Val Glu Asn Leu Leu Leu Leu Ser Lys Ala Lys Leu Val Pro Ser
 370 375 380

55

60

65

ES 2 266 432 T3

Glu Arg Glu Ala Ser Pro Ser Asn Ser Cys Gln Asp Ser Thr Asp Thr
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Asn Glu Glu Gln Arg Ser Gly Leu Ile Tyr Leu Thr Asn
 405 410 415
 5 His Ile Ala Pro His Ala Arg Asn Gly Leu Ser Leu Lys Glu Glu His
 420 425 430
 Arg Ala Tyr Asp Leu Leu Arg Ala Ala Ser Glu Asn Ser Gln Asp Ala
 435 440 445
 10 Leu Arg Val Val Ser Thr Ser Gly Glu Gln Met Lys Val Tyr Lys Cys
 450 455 460
 Glu His Cys Arg Val Leu Phe Leu Asp His Val Met Tyr Thr Ile His
 465 470 475 480
 15 Met Gly Cys His Gly Phe Arg Asp Pro Phe Glu Cys Asn Met Cys Gly
 485 490 495
 Tyr His Ser Gln Asp Arg Tyr Glu Phe Ser Ser His Ile Thr Arg Gly
 500 505 510
 20 Glu His Arg Phe His Met Ser
 515

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP -243

<400> 4

cctcaaatgc tctggggctc

20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP - 243

<400> 5

ggtgtcacgc aggaacagaa

20

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP -243

<400> 6

gtctctttta aagctccccg gct

23

ES 2 266 432 T3

	<210> 7	
	<211> 28	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP -243	
10	<400> 7	
	cgggctccga ggacccttag gtagtccc	28
15	<210> 8	
	<211> 17	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP -1,6 kb	
25	<400> 8	
	ctgaggcgta ttaggag	17
30	<210> 9	
	<211> 17	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP -1,6 kb	
40	<400> 9	
	ctcctaatac gcctcag	17
45	<210> 10	
	<211> 16	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP -1,6 kb	
55	<400> 10	
	ggaaagcagc cgcctc	16
60	<210> 11	
	<211> 30	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 266 432 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP -1,6 kb	
5	<400> 11	
	tggaatgac aggcgctctg gccaggcgcg	30
10	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP - 2004	
20	<400> 12	
	tgttttcaac cactcatcca t	21
25	<210> 13	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP - 2004	
35	<400> 13	
	agggacagtt atgctcg	17
40	<210> 14	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP - 2004	
50	<400> 14	
	acagcctggt acagactt	18
55	<210> 15	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar SNP - 2004	
65	<400> 15	
	tgagttttcg accaccggg ctc	23