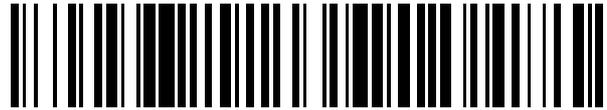


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 671**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2007 E 07862097 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2089538**

54 Título: **El complejo génico de IL-1 y resistencia a la insulina: polimorfismos asociados, haplotipos y métodos para usarlos**

30 Prioridad:

**15.11.2006 US 865988 P**

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

**27.11.2013**

73 Titular/es:

**INTERLEUKIN GENETICS, INC. (100.0%)  
135 BEAVER STREET  
WALTHAM, MA 02452, US**

72 Inventor/es:

**KORNMAN, KENNETH S. y  
HUTTNER, KENNETH**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 431 671 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

El complejo génico de IL-1 y resistencia a la insulina: polimorfismos asociados, haplotipos y métodos para usarlos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en parte a métodos y composiciones que se refieren a la identificación y el uso de información genética del complejo génico de IL-1, incluyendo la estructura y la organización de nuevos genes de tipo IL-1 que se hallan dentro del locus de IL-1, como también a polimorfismos y haplotipos asociados con estos genes.

Antecedentes de la invención

10 La IL-1 es una citocina inflamatoria primaria y ha sido implicada en la mediación de enfermedades inflamatorias patológicas tanto agudas como crónicas. Dos moléculas funcionalmente similares, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , están codificadas por genes separados (respectivamente, IL1A e IL1B). El tercer gen de la familia (IL1RN) codifica el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), una molécula de no señalización anti-inflamatoria que compite por la unión del receptor con IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . La comparación por emparejamiento de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1ra produce <25% de identidad en cada caso, incluso la cristalografía de rayos X de IL-1 $\beta$  e IL-1ra revela pliegues muy similares (Priestle et al. (1989) PNAS USA 86: 9667-967); Vigers et al. (1994) Biol Chem 269: 12874-12879). Estructuralmente, las proteínas consisten en un dominio sencillo de 12 láminas  $\beta$  incorporadas, conocidas como beta-tresbolillo. Dado que la mayoría de las interacciones empaquetadas exhiben átomos de cadena principal, se ha argumentado que algunos aminoácidos invariables son residuos requeridos para producir el pliegue de IL-1, en consecuencia, ha sido posible la diversificación extensa de las secuencias codificantes de los genes. Un pliegue muy similar se logra en un inhibidor de tripsina de soja sin ninguna similitud de secuencia detectable. Las tres proteínas se unen al único receptor de señalización funcional para IL-1, el receptor de IL-1 de tipo I (IL-1R1) (véase Sims et al. (1993) PNAS USA 90: 6155-6159).

25 La IL-1 se ha caracterizado principalmente como el producto de monocitos estimulados, macrófagos y queratinocitos, pero se han sugerido funciones importantes para IL-1 liberada de células endoteliales y músculo liso (revisado por Ross (1993) Nature 362: 801-9). La señalización a través de IL-1R1 implica el dominio de tipo Toll citoplásmico del receptor (Heguy et al. (1992) J Biol Chem 267: 2605-2609). Los receptores de IL-1 funcionales se distribuyen ampliamente en los tejidos. Actualmente, se cree que IL-1ra difiere de IL-1 en su incapacidad de activar la interacción entre IL-1R1 y el segundo componente del receptor, la proteína accesoria del receptor de IL-1, IL-1RacP. Ésta es una proteína transmembrana que es un pariente lejano de IL-1R1, que tiene una estructura de dominio similar, pero no tiene afinidad intrínseca para IL-1 (Greenfeder et al. (1995) J Biol Chem 270: 13757-13756; Wesche et al. (1997) J Biol Chem 272: 7727-7731).

35 El complejo génico de IL-1 se encuentra en la rama larga del cromosoma 2 (2q13) y contiene por lo menos los genes para IL-1 $\alpha$  (IL-1A), IL-1 $\beta$  (IL-1B), y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RN), dentro de una región de 430 Kb (Nicklin, et al. (1994) Genomics, 19: 382-4). La separación máxima de los genes distales IL1A e IL1RN se ha estimado que es de 430 kb por electroforesis de gel de campo de pulso de digestos de restricción de DNA genómico humano (Nicklin, et al. (1994) Genomics, 19: 382-4), y la orientación de los tres genes se ha determinado por análisis de secuencias de clones físicos (Nothwang et al. (1997) Genomics 41: 370-378).

40 En Estados Unidos hay más de cinco millones de personas diagnosticadas con diabetes de tipo II (diabetes del adulto). La enfermedad de tipo II por lo general comienza durante la madurez; se desconoce la causa exacta. En personas con diabetes de tipo II, los niveles en aumento de glucemia después de las comidas no estimulan correctamente la producción de insulina por parte del páncreas. A su vez, los tejidos periféricos en general son resistentes a los efectos de la insulina. Los niveles de hiperglucemia resultantes pueden causar un gran daño a los tejidos. Las personas con diabetes de tipo II por lo general se denominan diabéticos resistentes a la insulina. Con frecuencia tienen niveles de insulina en plasma superiores a los normales (hiperinsulinemia), ya que el organismo intenta superar su resistencia a la insulina. Algunos investigadores creen ahora que la hiperinsulinemia puede ser un factor causal en el desarrollo de la hipertensión arterial, en los altos niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes y en los niveles inferiores a los normales de lipoproteínas de alta densidad (HDL) beneficiosas. Si bien la resistencia a insulina moderada puede compensarse en las primeras etapas de la diabetes de tipo II por un aumento en la segregación de insulina, en estados de enfermedad avanzada la segregación de insulina también se debilita.

50 La resistencia a insulina y la hiperinsulinemia se han asociado también a otros dos trastornos metabólicos que conllevan importantes riesgos sanitarios: intolerancia a la glucosa y obesidad metabólica. La intolerancia a la glucosa se caracteriza por niveles normales de glucosa antes de comer, con una tendencia a niveles elevados (hiperglucemia) después de una comida. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se estima que aproximadamente 11% de la población estadounidense entre las edades de 20 y 74 años tiene intolerancia a la glucosa. Se considera que estas personas conllevan un mayor riesgo de diabetes y arteriopatía coronaria.

55 La obesidad puede también asociarse con la resistencia a la insulina. Se ha propuesto un vínculo causal entre obesidad, intolerancia a la glucosa y diabetes de tipo II, pero todavía no se ha establecido una base fisiológica. Algunos investigadores creen la intolerancia a la glucosa y la diabetes se observan clínicamente y se diagnostican

solamente más tarde en el proceso de la enfermedad después de que una persona ya ha desarrollado resistencia a la insulina e hiperinsulinemia.

5 La resistencia a la insulina se asocia frecuentemente con hipertensión, arteriopatía coronaria (arteriosclerosis) y acidosis láctica, como también con enfermedades relacionadas. La relación fundamental entre estas enfermedades, y un método de tratamiento, no se ha establecido.

El síndrome metabólico se asocia a la resistencia a la insulina. El síndrome metabólico describe varios factores de riesgo cardiovascular que se asocian con anomalías metabólicas e inflamatorias, incluyendo la resistencia a la insulina y la obesidad. Se cree que este síndrome puede tener un componente genético.

10 Reconociendo que todo el locus del gen de IL-1 está centralmente implicado en la enfermedad inflamatoria, damos a conocer en detalle en la presente memoria el polimorfismo del locus de IL-1, el enlace, la asociación de la enfermedad y el análisis funcional que soporta las composiciones para detectar la identidad genética en el locus de IL-1 humano y su uso para la predicción, el diagnóstico y la terapia de la resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y trastorno metabólico.

#### Sumario de la invención

15 La invención da a conocer un método para determinar si un sujeto es más propenso a tener o está predispuesto a desarrollar resistencia a la insulina, que comprende detectar por lo menos un alelo de cada uno de los siguientes: alelo 2 de IL-1A (+4845) y alelo 2 de IL-1B (+3954), en donde el sujeto que posee los alelos es más propenso a tener o está predispuesto a desarrollar diabetes en comparación con personas que no poseen los alelos. En una realización del método para determinar si un sujeto es más propenso a tener o está predispuesto a desarrollar resistencia a la insulina, la resistencia a la insulina se asocia con diabetes de tipo 2 o con el síndrome metabólico.

20 En otra realización del método para determinar si un sujeto es propenso a tener o está predispuesto a desarrollar resistencia a la insulina a través de un aumento en la expresión del nivel de IL-1 $\beta$ , el alelo 1 1/1 del bloque de LD se efectúa detectando dos copias del alelo 1 de IL-1B (-511).

25 En otra realización del método para determinar si un sujeto es propenso a tener o está predispuesto a desarrollar resistencia a la insulina a través de un aumento en la expresión del nivel de proteína reactiva C, el Bloque LD 2 + alelo se efectúa detectando por lo menos un alelo 2 de IL-1A (+4845) e IL-1B (+3954) y dos copias del alelo 1 de IL-1B (+3877).

#### Breve descripción de los dibujos

30 La presente invención se describe con referencia a los dibujos anejos. En los dibujos, los números de referencia similares indican elementos idénticos o funcionalmente similares.

Asimismo, el dígito(s) a la izquierda de un número de referencia identifica el dibujo en el que aparece por primera vez el número de referencia.

La Figura 1 es un gráfico ilustrativo que ilustra el porcentaje de aumento de IL-1p y proteína C reactiva para pares de haplotipos de IL1B pro-inflamatorios en relación con todos los otros.

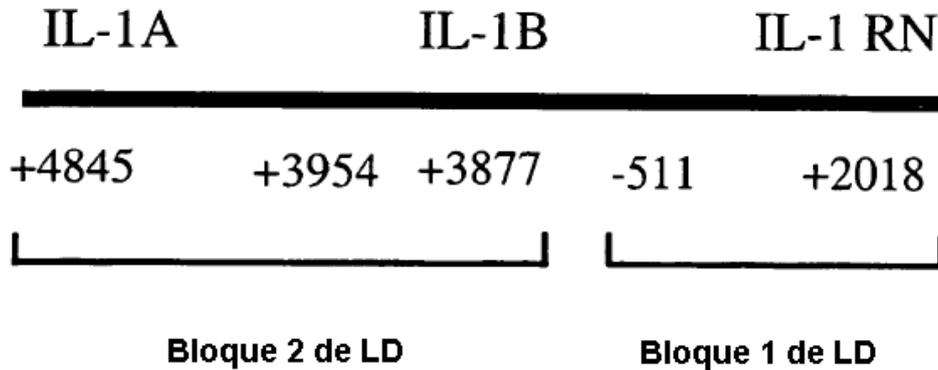
#### 35 Descripción detallada de la invención

Los métodos y composiciones de la invención dan a conocer correlaciones entre la existencia de ciertos genotipos de IL-1 en un sujeto y la predisposición de los sujetos con estos genotipos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico.

40 La interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) es una potente citocina implicada en procesos patobiológicos críticos de inflamación, incluyendo la activación de mediadores en dirección 3' tales como IL-6 y CRP. La liberación extracelular de IL-1 $\beta$  es regulada por bucles de retroalimentación complejos que implican tanto al gen de IL-1B, codificando la citocina pro-inflamatoria, como también al gen de IL-1RN, codificando su antagonista natural.

45 Existen principalmente dos regiones dentro del complejo génico de IL-1 que controlan el nivel de inflamación en un sujeto. Los SNP en el complejo de IL-1 exhiben un fuerte desequilibrio de ligamiento (LD). La Tabla 1 expone dos bloques de SNP en LD.

Tabla 1



- 5 El Bloque de LD 1 contiene IL-1B (-511), que se asocia con el riesgo de infarto de miocardio y liberación de IL-1 $\beta$  por parte de PBMC (Iacoviello, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* enero 2005;25(1):222-7.). El Bloque de LD 2 contiene los SNP asociados con proteína C reactiva (CRP) y/o fibrinógeno elevado (Berger, *Cytokine.* 2002 Feb 21;17(4): 171-4; Latkovskis, *Eur J Immunogenet.* 2004 Oct; 31(5):207-13). El genotipo del Bloque de LD 1 (LD #1) es 1/1, 1/2 o 2/2, generalmente asociado con el genotipo (1/1, 1/2 o 2/2) de IL-1B (-511). No obstante, el genotipo de LD #1 es más matizado, como se describe en más detalle a continuación.
- 10 El genotipo del Bloque de LD 2 (LD #2) "+" contiene el alelo 2 tanto en IL-1A(+4845) como en IL-1B(+3954) y el patrón del alelo de 1/1 en IL-1B(+3877). Todos los otros genotipos en estas posiciones se consideran "-".
- LD #1 se ha asociado a dos marcadores sanguíneos de inflamación, IL-1 $\beta$  y CRP. LD #2 está asociado solamente a CRP. Específicamente, dos genotipos compuestos, ambos con 1/1 en el Bloque de LD 1, se asocian con altos niveles de IL-1 $\beta$ . Además, dos genotipos compuestos, ambos con "+" en el Bloque de LD 2, se asocian con altos niveles de CRP. En determinadas realizaciones, estos genotipos también incluyen el alelo de IL-RN (+2018).
- 15 La Tabla 2 resume los resultados previos con respecto a IL-1 $\beta$  y a proteína C reactiva (CRP) (U.S.S.N. 11/586,995, presentado el 25 de octubre de 2006).

Tabla 2			
Bloque de LD 1	Bloque de LD 2	IL-1 $\beta$	CRP
1/1	+	↑	↑
1/1	-	↑	
1/2	+		↑
1/2	-		
2/2	+		
2/2	-		

- 20 LD #1 también puede analizarse en un modo más detallado. LD #1 consiste básicamente en la variación en 3 sitios del gen de IL-1B, y los patrones que representan estas variaciones se han marcado como B1, B2, B3, tal como se indica a continuación.

Tabla 3. Haplotipos promotores.

	IL1B(-511)	IL1B(-1464)	IL1B(-3737)
Haplotipo	(C a T)	(G a C)	(C a T)
B1	1	1	2
B2	2	2	1
B3	1	1	1
B4	2	1	1
B5	1	2	1
B6	1	2	2
B7	2	1	2
B8	2	2	2

Dados los cuatro haplotipos observados, hay diez patrones de genotipos con tres SNP (fase de ignorancia) que surgen de estos haplotipos (Tabla 4).

5 Tabla 4. Posibles genotipos compuestos de cuatro haplotipos observados.

Pares de haplotipos	IL-1B(-511)	IL-1B(-1464)	IL-1B(-3737)
B1 / B1	1.1	1.1	2.2
B1/B2	1.2	1.2	1.2
B1/B3	1.1	1.1	1.2
B1/B4	1.2	1.1	1.2
B2/B2	2.2	2.2	1.1
B2/B3	1.2	1.2	1.1
B2/B4	2.2	1.2	1.1
B3/B3	1.1	1.1	1.1
B3/B4	1.2	1.1	1-1
B4/B4	2.2	1.1	1.1

Se ha descubierto que los pares de haplotipos se dividen en tres grupos. El primer grupo comprende cualquier combinación de los haplotipos B1 y B3. El segundo grupo incluye individuos con una copia de B3 y una copia o bien de B2 o de B4. El tercer grupo incluye todas las demás combinaciones.

- 10 El primer grupo, es decir, los individuos con cualquier combinación de B1 y B3, se asocia con la mayor expresión de IL-1 $\beta$ . El segundo grupo tiene una expresión menor de IL-1 $\beta$  que el primer grupo pero una expresión mayor que el tercer grupo. La regresión lineal reveló que, en relación con el tercer grupo (42,6% de frecuencia), el primer grupo (42,7% de frecuencia) posee un 33% de aumento de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,0001$ ) y el segundo grupo (14,8% de frecuencia) posee un 28% de aumento de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ). (U.S.S.N. 11/586,995, presentado el 25 de octubre de 2006).
- 15 Como se describió anteriormente, los patrones de LD #1 y LD #2 específicos de IL-1, o bien solos o combinados, se asocian con mayores niveles sanguíneos de marcadores clave de inflamación.

Algunos datos indican que los altos niveles de IL-1 $\beta$  y CRP se asocian con el inicio del síndrome metabólico (Austin *et al.* Diabetes 53:1166-1169 (Abril 2004), Gonzalez *et al.* Eur. J. Clin. Nutr. 1-8 (2006), Tang *et al.* Diabetes Care 29(3):631-636 Mar. 2006)) y la diabetes (Thomas *et al.* Diabetes 53:113-121 (Jan. 2004)).

- 20 La presente solicitud demuestra que los mismos genotipos, descritos anteriormente, que confieren a los sujetos una predisposición a niveles mayores de citocinas inflamatorias, también se correlacionan con una predisposición a resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que poseen el patrón del

5 alelo 1/1 o 1/2 de LD #1 y/o el patrón de LD #2 + alelo están predispuestos a tener resistencia a la insulina, diabetes tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Además, los sujetos que tienen cualquier combinación de los alelos B1 y B3 están predispuestos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen cualquier combinación de los alelos B2 y B3, o B3 y B4 también están predispuestos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico.

10 Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845), una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954), una o más copias del alelo 1 de IL-1B (+3877) o una o más copias del alelo 1 de IL-1B (-511) están predispuestos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Asimismo, los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845) y una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954) están predispuestos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845) y una o más copias del alelo 1 de IL-1B (-511) también están predispuestos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954) y una o más copias del alelo 1 de IL-1B (-511) están predispuestos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845), una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954) y una o más copias del alelo 1 de IL-1B (-511) también están predispuestos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845), una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954) y dos copias del alelo 1 de IL-1B (-511) también están predispuestos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico.

20 Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845), una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954), una o más copias del alelo 1 de IL-1B (+3877) o una o más copias del alelo 1 de IL-1B (-511) son más propensos que aquellos sin uno o más de estos alelos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. A su vez, los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845) y una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954) son más propensos que aquellos sin uno o más de estos alelos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845) y una o más copias del alelo 1 de IL-1B (-511) son también más propensos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954) y una o más copias del alelo 1 de IL-1B (-511) son también más propensos que aquellos sin uno o más de estos alelos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845), una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954) y dos copias del alelo 1 de IL-1B (-511) son también más propensos que aquellos sin uno o más de estos alelos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico.

40 Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845), una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954), una o más copias del alelo 1 de IL-1B (+3877) o una o más copias del alelo 1 de IL-1B (-511) son más propensos que aquellos sin estos alelos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Además, los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845) y una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954) son más propensos que aquellos sin estos alelos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845) y una o más copias del alelo 1 de IL-1B (-511) son también más propensos que aquellos sin estos alelos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845) y una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954) y una o más copias del alelo 1 de IL-1B (-511) son también más propensos que aquellos sin estos alelos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845), una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954) y una o más copias del alelo 1 de IL-1B (-511) son también más propensos que aquellos sin estos alelos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los sujetos que tienen una o más copias del alelo 2 de IL-1A (+4845), una o más copias del alelo 2 de IL-1B (+3954) y dos copias del alelo 1 de IL-1B (-511) son también más propensos que aquellos sin estos alelos a tener resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico.

55 Los sujetos con el haplotipo B212, es decir, IL-1B (-511) es el alelo 2 o "T"; IL-1B (-1464) es el alelo 1 o "G" y IL-1B (-3737) es el alelo 2 o "T", tienen rasgos que indican que están protegidos del síndrome metabólico y por lo tanto de diabetes y aumento de intensidad y aparición de arteriopatía coronaria (CAD). El haplotipo B212 se ha asociado con menor cantidad de triglicéridos y mayor HDL, que es el opuesto al síndrome metabólico, caracterizado por grandes cantidades de triglicéridos y bajo HDL. El haplotipo B212 también se asocia con niveles inferiores de CRP, indicando que los sujetos con este haplotipo tienen menos inflamación y por ende menos aparición de diabetes y CAD.

60 La presente solicitud también demuestra que los sujetos con una predisposición genética para resistencia a insulina, diabetes de tipo II, obesidad y trastorno metabólico también tienen mayores niveles iniciales de los marcadores inflamatorios de CRP, IL-6 e IL-1Ra. Como se explicó anteriormente, estos sujetos también deberán tener un nivel inicial superior de IL-1β. Por consiguiente, los sujetos con resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o

trastorno metabólico pueden tomar compuestos farmacéuticos que bloqueen o disminuyan los efectos de CRP, IL-6, IL-1Ra o IL-1 $\beta$  con el fin de tratar la resistencia a la insulina, la diabetes de tipo II, la obesidad o el trastorno metabólico. Estos tratamientos deberían ser particularmente eficaces en sujetos que tienen uno de los altos genotipos de inflamación anteriormente descritos, que asocia a estos sujetos con una predisposición a la resistencia a insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Los compuestos farmacéuticos incluyen productos nutricéuticos, agonistas y antagonistas de CRP, IL-6, IL-1Ra o IL-1 $\beta$ , y moléculas de RNAi y antisentido que reducen la expresión de CRP, IL-6, IL-1Ra o IL-1 $\beta$ .

#### Definiciones

Para comodidad, el significado de ciertos términos y expresiones empleados en la memoria, los ejemplos y las reivindicaciones anejas se da a conocer a continuación.

El término "alelo" se refiere a las distintas variantes de secuencia encontradas en diferentes regiones polimorfas. Las variantes de secuencia pueden ser cambios de bases sencillos o múltiples, incluyendo sin limitación, inserciones, eliminaciones o sustituciones, o pueden ser un número variable de repeticiones de secuencias.

La expresión "patrón alélico" se refiere a la identidad de un alelo o alelos en una o más regiones polimorfas. Por ejemplo, un patrón alélico puede consistir en un solo alelo en un sitio polimorfo; como para el alelo 1 de IL-1A (+4845), que es un patrón alélico que tiene por lo menos una copia del alelo 1 de IL-1A (+4845) en los locus del gen de IL-1A (+4845). Alternativamente, un patrón alélico puede consistir o bien en un estado homocigótico o heterocigótico en un sitio polimorfo individual. Por ejemplo, el alelo 171 de IL-1A (+4845) es un patrón alélico en el que hay dos copias del primer alelo de IL-1A (+4845) que se corresponde con el estado del alelo 1 de IL-1A (+4845) homocigoto. Alternativamente, un patrón alélico puede consistir en la identidad de alelos en más de un sitio polimorfo.

El término "anticuerpo", tal como se emplea en la presente memoria, tiene como fin referirse a un agente de unión que incluye un anticuerpo entero o su fragmento de unión que es específicamente reactivo con un polipéptido de IL-1 $\beta$ , IL-6 o CRP. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos detectados para utilidad en el mismo modo anteriormente descrito para los anticuerpos enteros. Por ejemplo, los fragmentos F(ab)<sub>2</sub> pueden generarse tratando un anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)<sub>2</sub> resultante puede tratarse para reducir puentes disulfuro para producir fragmentos Fab. El anticuerpo de la presente invención tiene también como fin incluir moléculas biespecíficas, monocatenarias, quiméricas y humanizadas que tienen afinidad hacia un polipéptido de IL-1 $\beta$ , IL-6 o CRP conferida por al menos una región CDR del anticuerpo.

"Actividad biológica" o "bioactividad" o "actividad" o "función biológica", que se utilizan intercambiamente para los propósitos de la presente memoria, significa un efecto o función antigénica que es efectuado directa o indirectamente por un polipéptido de IL-1 $\beta$ , IL-6 o CRP (o bien en su conformación nativa o desnaturalizada), o por cualquiera de sus subsecuencias. Las actividades biológicas incluyen la unión a un péptido diana, p. ej., un receptor de IL-1 o causan síntomas asociados con resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Una bioactividad de IL-1 $\beta$ , IL-6 o CRP puede modularse afectando directamente un polipéptido de IL-1 $\beta$ , IL-6 o CRP. Alternativamente, una bioactividad de IL-1 $\beta$ , IL-6 o CRP puede modularse modulando el nivel de un polipéptido de IL-1 $\beta$ , IL-6 o CRP, tal como modulando la expresión de un gen de IL-1 $\beta$ , IL-6 o CRP.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "fragmento bioactivo de un polipéptido de IL-1 $\beta$ , IL-6 o CRP" se refiere a un fragmento de un polipéptido de IL-1 de longitud total, en donde el fragmento imita o antagoniza específicamente la actividad de un polipéptido de IL-1 de tipo salvaje. El fragmento bioactivo preferiblemente es un fragmento capaz de interactuar con un receptor de interleucina.

"Células", "células hospedantes" o "células hospedantes recombinantes" son términos y expresiones que se emplean de manera intercambiable en esta memoria para hacer referencia no solamente a la célula del sujeto particular, sino a la descendencia o descendencia potencial de dicha célula. Dado que pueden ocurrir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido o bien a la mutación o a influencias del medio ambiente, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula original, pero se incluyen dentro del alcance del término tal como se emplea en esta memoria.

Una "quimera," "mosaico," "mamífero quimérico" y similar se refiere a un mamífero transgénico con un constructo inactivado o insertado en por lo menos algunas de sus células que contienen genomas.

El término "control" o la expresión "muestra control" se refieren a cualquier muestra apropiada para la técnica de detección empleada. La muestra control puede contener los productos de la técnica para detección de alelos o el material que se va a ensayar. Además, los controles pueden ser controles positivos o negativos. A modo de ejemplo, si la técnica de detección de alelos es ampliación por PCR, seguida por fraccionamiento de tamaño, la muestra control puede comprender fragmentos de DNA de un tamaño apropiado. Asimismo, si la técnica de detección de alelos implica la detección de una proteína mutada, la muestra control puede comprender una muestra de una proteína mutante. No obstante, se prefiere que la muestra control comprenda el material que se ha de ensayar. Por ejemplo, los controles pueden ser una muestra de DNA genómico o una porción clonada del complejo génico de IL-

1. No obstante, si la muestra que se va a ensayar es de DNA genómico, la muestra control es preferiblemente una muestra altamente purificada de DNA genómico.

Las frases "ruptura del gen" y "ruptura dirigida" o cualquier frase similar se refieren a la interrupción específica del sitio de una secuencia de DNA nativo como para prevenir la expresión de ese gen en la célula en comparación con la copia de tipo salvaje del gen. La interrupción puede ser causada por eliminaciones, inserciones o modificaciones del gen, o cualquier combinación de éstos.

El término "haplotipo", tal como se emplea en esta memoria, tiene como fin hacer referencia a un conjunto de alelos que son heredados juntos como un grupo (están en desequilibrio de ligamiento) en niveles estadísticamente significativos ( $P_{corr} < 0,05$ ). Tal como se emplea en la presente memoria, la frase "un haplotipo de IL-1" se refiere a un haplotipo en los locus de IL-1. Un haplotipo inflamatorio o antiinflamatorio de IL-1 se refiere a un haplotipo que es indicativo de un aumento de la actividad agonista y/o una reducción de la actividad antagonista.

Las expresiones "complejo génico de IL-1" y "locus de IL-1", tal como se emplean en la presente memoria, incluyen todo el ácido nucleico en o cerca de la región 2q13 del cromosoma 2, incluyendo por lo menos los genes de IL-1A, IL-1B y IL-1RN y cualquier otra secuencia ligada (Nicklin *et al.*, Genomics 19:382-84, 1994). Los términos "IL-1A", "IL-1B" y "IL-1RN" tal como se emplean en la presente memoria, se refieren a los genes que codifican el antagonista de los receptores de IL-1, IL-1 y IL-1, respectivamente. Los números de acceso de los genes para IL-1A, IL-1B y IL-1RN son X03833, X04500 y X64532, respectivamente.

"Mutación funcional de L-1" se refiere a una mutación dentro del complejo génico de IL-1 que resulta en un fenotipo alterado (es decir, efectúa la función de un gen o proteína de IL-1).

Los ejemplos incluyen: el alelo 2 de IL-1A (+4845), el alelo 2 de IL-1B (+3954) y el alelo 1 de IL-1B (-511).

"El alelo Y de IL-1X (Z)" se refiere a una forma alélica particular, designada Y, que ocurre en un sitio polimorfo del locus de IL-1 en el gen X, en donde X es IL-1A, B o RN y está posicionado en o cerca del nucleótido Z, en donde el nucleótido Z está numerado en relación con el sitio de inicio de transcripción principal, que es el nucleótido +1, del gen de IL-1 particular X. Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "alelo de IL-1X (Z)" se refiere a todos los alelos de un sitio polimorfo de IL-1 en el gen X posicionado en o cerca del nucleótido Z. Por ejemplo, la expresión "alelo de IL-1A (+4845)" se refiere a formas alternativas del gen de IL-1A en el marcador +4845. "Alelo de IL-1A (+4845)" se refiere a una forma del gen de IL-1RN que contiene una citocina (G) en la posición +4845 de la cadena sentido. "Alelo de IL-1A (+4845) 2" se refiere a una forma del gen de IL-1RN que contiene una tiamina (T) en la posición +4845 de la cadena más. Cuando un sujeto tiene dos alelos de IL-1A idénticos, se dice que el sujeto es homocigótico, o que tiene el estado de homocigoto. Cuando un sujeto tiene dos alelos de IL-1A distintos, se dice que el sujeto es heterocigótico o que tiene el estado de heterocigoto. La expresión "alelo de IL-1A (+4845) 2/2" se refiere al estado homocigótico del alelo 2 de IL-1A (+4845). A la inversa, la expresión "alelo de IL-1A (+4845) 1/1" se refiere al estado homocigótico del alelo 1 de IL-1A (+4845) homocigoto. La expresión "alelo de IL-1A (+4845) 1/2" se refiere al estado heterocigótico del alelo 1 y 2.

La expresión "fenotipo de IL-1" se refiere a cualquier fenotipo que resulta de una identidad genética del locus del gen de IL-1 es decir, incluyendo un aumento una reducción de las predisposiciones a una afección o enfermedad inflamatoria, como también una probabilidad "normal" (p. ej., promedio o "salvaje") asociada de una enfermedad o trastorno inflamatorio.

"Relacionado/a con IL-1" tal como se emplea en esta memoria tiene como fin incluir todos los genes relacionados con los genes del locus de IL-1 humano en el cromosoma humano 2 (2q 12-14). Éstos incluyen los genes de IL-1 del complejo génico de IL-1 humano situado en el cromosoma 2 (2q 13-14) que incluyen el gen de IL-1A que codifica interleucina 1 $\alpha$ , el gen de IL-1B que codifica interleucina el gen de 1 $\beta$  y IL-1RN (o IL-1ra) que codifica el antagonista del receptor de interleucina 1. Asimismo, estos genes relacionados de IL-1 incluyen los genes del receptor de IL-1 humano de tipo I y de tipo II situados en el cromosoma humano 2 (2q12) y sus homólogos de ratón situados en el cromosoma de ratón 1 en la posición 19.5 cM. La interleucina-1 $\alpha$ , interleucina-1J3 e interleucina-1RN se relacionan en gran medida ya que todas se unen a los receptores de IL-1 de tipo I, no obstante, solamente la interleucina-1 $\alpha$  y la interleucina-1 $\beta$  son ligandos de agonistas que activan los receptores de IL-1 de tipo I, mientras que la interleucina-1RN es un ligando del antagonista que ocurre naturalmente. En los casos en los que el término "IL-1" se usa en referencia a un producto génico o a un polipéptido, tiene como fin referirse a todos los productos génicos codificados por el locus de interleucina-1 en el cromosoma humano 2 (2q 12-14) y sus correspondientes homólogos de otras especies o sus variantes funcionales. El término IL-1 incluye por lo tanto polipéptidos segregados que promueven una respuesta inflamatoria, tal como IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , como también un polipéptido segregado que antagoniza respuestas inflamatorias, tal como el antagonista del receptor de IL-1 y el receptor de IL-1 de tipo II (señuelo).

Un "receptor de IL-1" o "IL-1R" se refiere a diversos receptores de proteínas unidos a la membrana celular capaz de unirse a y/o transducir una señal desde un ligando codificado por el locus de IL-1. El término se aplica a cualquiera de las proteínas capaces de unirse a moléculas de interleucina-1 (IL-1) y que en su configuración nativa como proteínas de membrana plasmática de mamíferos, probablemente cumplen una función de transducir la señal provista por IL-1 a una célula. Tal como se emplea en esta memoria, el término incluye análogos de proteínas

nativas con actividad de unión a IL-1 o transducción de señales. Los ejemplos incluyen los receptores de IL-1 murinos y humanos descritos en la patente de Estados Unidos núm. 4.968.607. La expresión "ácido nucleico de IL-1" se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína de IL-1.

5 Un "polipéptido de IL-1" y "proteína de IL-1" tienen como fin abarcar polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias de DNA genómico de IL-1 como se indica en las FIG. 1, 2 y 3, o sus fragmentos y sus homólogos, e incluyen polipéptidos de agonistas y antagonistas.

"Aumento del riesgo" se refiere a una frecuencia estadísticamente superior de aparición de la enfermedad o afección en un individuo que porta un alelo polimorfo particular en comparación con la frecuencia de aparición de la enfermedad o afección en un miembro de la población que no porta el alelo polimorfo particular.

10 "Reducción del riesgo" se refiere a una frecuencia estadísticamente inferior de aparición de la enfermedad o la afección en un individuo que porta un alelo polimorfo particular en comparación con la frecuencia de aparición de la enfermedad o la afección en un miembro de la población que no porta el alelo polimorfo particular o en la población como un todo.

15 El término "interactuar", tal como se emplea en la presente memoria, tiene como fin incluir relaciones o asociaciones detectables (p. ej., interacciones bioquímicas) entre moléculas, tal como interacciones entre proteína-proteína, proteína-ácido nucleico, ácido nucleico-ácido nucleico y proteína-molécula pequeña o ácido nucleico-molécula pequeña por naturaleza.

20 El término "aislado", tal como se emplea en la presente memoria con respecto a ácidos nucleicos, tales como DNA o RNA, se refiere a moléculas separadas de otros DNA o RNA, respectivamente, que están presentes en la fuente natural de la macromolécula. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado que codifica uno de los polipéptidos de IL-1 del sujeto preferiblemente incluye no más de 10 kilobases (kb) de la secuencia de ácido nucleico que flanquea natural e inmediatamente el gen de IL-1 en DNA genómico, más preferiblemente no más de 5 kb de dichas secuencias flanqueadoras naturales, y lo más preferiblemente menos de 1,5 kb de dichas secuencias flanqueadoras naturales.

25 El término aislado, tal como se emplea en la presente memoria, se refiere también a un ácido nucleico o polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, material vírico o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de DNA recombinante, o precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Asimismo, un "ácido nucleico aislado" tiene como fin incluir fragmentos de ácido nucleico que no ocurren naturalmente como fragmentos y no se hallarían en el estado natural. El término "aislado" se emplea también en esta memoria para referirse a polipéptidos que se aíslan de otras proteínas celulares y que tiene como fin abarcar

30 tanto polipéptidos purificados como recombinantes.

Un animal transgénico "con genes insertados" se refiere a un animal al que se le ha introducido un gen modificado en su genoma, y el gen modificado puede ser de origen exógeno o endógeno.

35 Un animal transgénico "con genes inactivados" se refiere a un animal en el que hay supresión parcial o completa de la expresión de un gen endógeno (p. ej., en base a la eliminación de por lo menos una porción del gen, reemplazo de por lo menos una porción del gen con una segunda secuencia, introducción de codones de terminación, la mutación de bases que codifican aminoácidos críticos o la eliminación de la unión de un intrón, etc.).

40 Un constructo "inactivado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que puede utilizarse para reducir o suprimir la expresión de una proteína codificada por secuencias de DNA endógeno en una célula. En un ejemplo sencillo, el constructo inactivado está compuesto por un gen, tal como el gen de IL-1RN, con una eliminación en una porción crítica del gen, de modo que la proteína activa no puede expresarse a partir de allí. Alternativamente, un número de codones de terminación puede añadirse al gen nativo para causar la terminación temprana de la proteína o inactivar la unión de un intrón. En un constructo inactivado típico, alguna porción del gen se reemplaza con un marcador seleccionable (tal como el gen de neo) de modo que el gen puede representarse de la siguiente manera: IL-1RN 5'/neo/IL-1RN 3', en donde IL-1RN5' y IL-1RN 3' se refieren a secuencias genómicas o de cDNA que están,

45 respectivamente, en dirección 5' y 3' en relación a la porción del gen de IL-1RN, y en donde neo se refiere a un gen de resistencia a la neomicina. En otro constructo inactivado, se añade un segundo marcador seleccionable en una posición flanqueadora, de forma tal que el gen puede representarse como: IL-1RN/neo/IL-1RN/TK, en donde TK es un gen de timidina cinasa que puede añadirse o bien a la secuencia de IL-1RN5' o de IL-1RN3' del constructo precedente y que además puede seleccionarse en contra (es decir, es un marcador seleccionable negativo) en un

50 medio apropiado. Este constructo de dos marcadores permite la selección de eventos de recombinación homólogos, lo cual elimina el marcador de TK flanqueador de los eventos de recombinación no homólogos que típicamente retienen las secuencias de TK. La eliminación y/o el reemplazo del gen pueden ser a partir de exones, intrones, especialmente uniones de intrones, y/o de las regiones reguladoras tales como promotores.

55 "Desequilibrio de ligamiento" se refiere a la co-herencia de dos alelos en frecuencias mayores a lo que se esperaría de frecuencias separadas de aparición de cada alelo en una población control determinada. La frecuencia esperada de aparición de dos alelos que son heredados independientemente es la frecuencia del primer alelo multiplicada por la frecuencia del segundo alelo. Se dice que los alelos que ocurren conjuntamente en frecuencias esperadas están en "desequilibrio de ligamiento". La causa del desequilibrio de ligamiento por lo general no es clara. Se puede deber

a la selección de ciertas combinaciones de alelos o a una mezcla reciente de poblaciones genéticamente heterogéneas. Además, en el caso de marcadores que están muy firmemente unidos a un gen de enfermedad, se espera la asociación de un alelo (o grupo de alelos unidos) con el gen de enfermedad, si la mutación de la enfermedad ocurrió en un pasado próximo, de forma tal de que no haya transcurrido tiempo suficiente para lograr el equilibrio a través de eventos de recombinación en la región cromosómica específica. Cuando se hace referencia a patrones alélicos que están comprendidos por más de un alelo, un primer patrón alélico está en desequilibrio de ligamiento con un segundo patrón alélico, si todos los alelos que comprenden el primer patrón alélico están en desequilibrio de ligamiento con por lo menos uno de los alelos del segundo patrón alélico. Un ejemplo de desequilibrio de ligamiento es aquel que ocurre entre los alelos en los sitios polimorfos IL-1RN (+2018) e IL-1RN (VNTR). Los dos alelos en IL-1RN (+2018) están 100% en desequilibrio de ligamiento con los dos alelos más frecuentes de 1L-1RN (VNTR), que son el alelo 1 y el alelo 2.

El término "marcador" se refiere a una secuencia en el genoma que se conoce por variar entre individuos. Por ejemplo, el gen de IL-1RN tiene un marcador que consiste en un número variable de repeticiones en tándem (VNTR).

Un "gen mutado" o "mutación" o "mutación funcional" se refiere a una forma alélica de un gen, que es capaz de alterar el fenotipo de un sujeto que tiene el gen mutado en relación con un sujeto que no tiene el gen mutado. El fenotipo alterado causado por una mutación puede ser corregido o compensado por determinados agentes. Si un sujeto debe ser homocigótico para que esta mutación tenga un fenotipo alterado, se dice que la mutación es recesiva. Si una copia del gen mutado es suficiente para alterar el fenotipo del sujeto, se dice que la mutación es dominante. Si un sujeto tiene una copia del gen mutado y tiene un fenotipo que es intermedio entre aquel de un sujeto homocigótico y aquel de un heterocigótico (para ese gen), se dice que la mutación es co-dominante.

Un "animal no humano" incluye mamíferos tales como roedores, primates no humanos, ovejas, perros, vacas, cabras, etc. anfibios, tales como los miembros del género *Xenopus*, y aves transgénicas (p. ej., pollos, pájaros, etc.). La expresión "animal quimérico" se utiliza en la presente memoria para referirse a animales en los que se halla el gen recombinante, o en los que se expresa el gen recombinante en algunas pero no en todas las células del animal. La expresión "animal quimérico específico de tejido" indica que uno de los genes de IL-1 recombinantes está presente y/o expresado o interrumpido en algunos tejidos pero no en otros. La expresión "mamífero no humano" se refiere a cualquier miembro de la clase Mammalia, excepto seres humanos.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos u oligonucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (DNA), y, cuando corresponde, a ácido ribonucleico (RNA). Se entenderá que la expresión incluye, como equivalentes, análogos o bien de RNA o de DNA preparados a partir de análogos de nucleótidos (p. ej., ácidos nucleicos de péptido) y según corresponde a la realización que se está describiendo, polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios (sentido o antisentido).

La expresión "producto nutricional", tal como se emplea en la presente memoria, incluye las definiciones de la FDA de alimentos y suplementos dietarios que pueden ser de valor para tratar una enfermedad o trastorno, particularmente una enfermedad o trastorno asociado con una enfermedad inflamatoria. Por consiguiente, los "productos nutricionales" incluyen ingredientes nutricionales que se pueden utilizar para lograr beneficios de salud. Estos ingredientes pueden estar contenidos en "alimentos", es decir, "alimentos funcionales" o en suplementos dietarios. En octubre de 1994, la Ley sobre Educación y Suplementos Dietarios para la Salud (Dietary Supplement Health and Education Act o "DSHEA") se aprobó como ley. DSHEA reconoce que millones de consumidores creen que los suplementos dietarios pueden proporcionar beneficios de salud. La intención del Congreso de aprobarla fue establecer un equilibrio entre el acceso de los consumidores a los suplementos dietarios y la autoridad de la FDA de actuar contra los suplementos que presentan problemas de seguridad o contienen etiquetas falsas o engañosas. DSHEA crea un nuevo marco regulador para la seguridad y el etiquetado de suplementos dietarios. La FDA se compromete a hacer cumplir la ley DSHEA en un modo que ejecute DSHEA. Por ende, "productos nutricionales", tal como se emplea en la presente memoria, incluye suplementos dietarios conocidos en la técnica (p. ej., vitaminas, minerales, hierbas, fitoestrógenos, flavonoides, fenólicos, antocianinas, carotenoides, polímeros de los anteriormente mencionados y otros suplementos) que se ingieren y tienen como fin complementar la dieta, e incluyen un "ingrediente dietario". Los ingredientes dietarios pueden incluir vitaminas, minerales, hierbas u otros productos botánicos, aminoácidos y sustancias dietarias tales como enzimas. Los ingredientes dietarios también pueden ser metabolitos, constituyentes, extractos, concentrados o combinaciones de estos ingredientes. Los suplementos nutricionales vienen en comprimidos, cápsulas, líquidos y barras.

El término "polimorfismo" se refiere a la coexistencia de más de una forma de un gen o su porción (p. ej., variante alélica). Una porción de un gen del cual existen por lo menos dos formas distintas, es decir, dos secuencias nucleotídicas distintas, se denomina "región polimérica de un gen". Una secuencia genética específica en una región polimorfa de un gen es un alelo. Una región polimorfa puede ser un nucleótido sencillo, cuya identidad difiere en distintos alelos. Una región polimorfa puede tener varios nucleótidos de longitud.

La expresión "propensión a una enfermedad", también "predisposición" o "susceptibilidad" a una enfermedad o cualquier frase similar, significa que ciertos alelos son aquí descubiertos como asociados con o predictivos de la incidencia de un sujeto a desarrollar una enfermedad particular (p. ej., una enfermedad vascular). Los alelos son por

lo tanto representados en exceso en frecuencia en individuos con enfermedad, en comparación con individuos sanos. Por ende, estos alelos se pueden utilizar para predecir una enfermedad, incluso en individuos en una instancia previa a los síntomas o en una instancia previa a la enfermedad.

5 "Molécula pequeña", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una composición que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 5 kD y lo más preferiblemente inferior a aproximadamente 4 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas.

10 Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "se hibrida específicamente" o "detecta específicamente" se refiere a la capacidad de una molécula de ácido nucleico de hibridarse a por lo menos aproximadamente 6 nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico de muestra.

"Secuencia reguladora de transcripción" es una expresión utilizada en toda la memoria para hacer referencia a secuencias de DNA, tales como señales de inicio, potenciadores y promotores, que inducen o controlan la transcripción de secuencias que codifican proteínas con las que están operativamente enlazadas.

15 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "transgén" significa una secuencia de ácido nucleico (que codifica, p. ej., uno de los polipéptidos de IL-1, o un transcripto antisentido) que se ha introducido en una célula. Un transgén podría ser parcial o totalmente heterólogo, es decir, exógeno, a la célula o animal transgénico al que se introduce, o ser homólogo a un gen endógeno de la célula o el animal transgénico al que se introduce, pero que está diseñado para ser insertado, o se inserta, en el genoma del animal en un modo tal que altera el genoma de la célula a la cual se inserta (p. ej., se inserta en un sitio que difiere de aquel del gen natural o su inserción resulta en un gen inactivado). Un transgén puede también estar presente en una célula en la forma de un episoma. Un transgén puede incluir una o más secuencias reguladoras de transcripción y cualquier otro ácido nucleico, tal como intrones, que pueden ser necesarias para la expresión óptima de un ácido nucleico seleccionado.

20 Un "animal transgénico" se refiere a cualquier mamífero, pájaro o anfibio no humano, en donde una o más de las células del animal contienen ácido nucleico heterólogo introducido por intervención humana, tal como por técnicas transgénicas conocidas en el campo. En el resto de la memoria, cada vez que se haga referencia a un animal transgénico, se tendrá como fin un animal "no humano". El ácido nucleico se introduce en la célula, directa o indirectamente por introducción en un precursor de la célula, a modo de manipulación genética intencionada, tal como por microinyección o por infección con un virus recombinante. La expresión manipulación genética no incluye la cruce clásica entre razas ni fertilización *in vitro*, en cambio se refiere a la introducción de una molécula de DNA recombinante. Esta molécula puede integrarse dentro de un cromosoma, o puede ser DNA que se replica de manera extracromosómica. En los animales transgénicos típicos descritos en este documento, el transgén causa que las células expresen una forma recombinante de uno de un polipéptido de IL-1, p. ej., o bien formas agonistas o antagonistas. No obstante, los animales transgénicos en los que el gen recombinante es silencioso también se contemplan, como por ejemplo, los constructos dependientes de FLP o CRE recombinasa descritos a continuación.

30 A su vez, "animal transgénico" también incluye aquellos animales recombinantes en los que la ruptura génica de uno o más genes es causada por la intervención humana, incluyendo tanto técnicas de recombinación como antisentido. El término tiene como fin incluir todas las generaciones de descendencia. Por ende, se incluye el animal fundador y todos los F1, F2, F3, etc y su descendencia.

40 El término "tratar", tal como se emplea en la presente memoria, tiene como fin abarcar la cura como también aliviar por lo menos un síntoma de una afección o enfermedad.

45 El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, que es capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector preferido es un episoma, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extracromosómica. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación y/o expresión autónoma de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos se denominan en esta memoria "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de DNA recombinantes por lo general tienen la forma de "plásmidos" que se refieren en general a bucles de DNA bicatenarios circulares que, en su forma de vector no se unen al cromosoma. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" se utilizan de manera intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector más frecuentemente utilizada. Sin embargo, la descripción tiene como fin incluir dichas otras formas de vectores de expresión que cumplan funciones equivalentes y que se conozcan en la técnica con posterioridad al presente documento.

55 La expresión "alelo de tipo salvaje" se refiere a un alelo de un gen que, cuando está presente en dos copias en un sujeto, resulta en un fenotipo de tipo salvaje. Puede haber varios alelos de tipo salvaje distintos de un gen específico, ya que ciertos cambios nucleotídicos en un gen pueden no afectar el fenotipo de un sujeto que tiene dos copias del gen con los cambios nucleotídicos.

## Detección de alelos

Existen muchos métodos para detectar alelos específicos en locus polimorfos humanos. El método preferido para detectar un alelo polimorfo específico dependerá, en parte, de la naturaleza molecular del polimorfismo. Por ejemplo, las diversas formas alélicas del locus polimorfo pueden diferir por un par de bases sencillo del DNA. Dichos polimorfismos de nucleótidos sencillos (o SNP) son contribuyentes importantes para la variación genética, que comprenden un 80% de todos los polimorfismos conocidos, y se estima que su densidad en el genoma humano es en promedio de 1 por 1.000 pares de bases. Los SNP son más frecuentemente bialélicos y ocurren en solamente dos formas distintas (aunque hasta cuatro formas distintas de un SNP, correspondientes a las cuatro bases de nucleótidos distintas que ocurren en el DNA son teóricamente posibles). No obstante, los SNP son más estables desde el punto de vista de la mutación que otros polimorfismos, convirtiéndolos en adecuados para estudios de asociación en los que el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores y una variante desconocida se utiliza para mapear las mutaciones causantes de enfermedad. A su vez, ya que los SNP típicamente tienen solamente dos alelos, pueden ser genotipificados por un simple ensayo más/menos en lugar de una medición de longitud, haciendo que sean más susceptibles a automatización.

Existe una diversidad de métodos para detectar la presencia de un alelo polimorfo de un solo nucleótido particular en un individuo. Los avances en este campo han proporcionado genotipificación de SNP a gran escala precisa, fácil y económica. Más recientemente, por ejemplo, se han descrito varias técnicas nuevas que incluyen hibridación dinámica específica de alelos (DASH), electroforesis en gel diagonal con ordenación en microplacas (MADGE), pirosecuenciamiento, ligadura específica de oligonucleótidos, el sistema TaqMan, como también diversas tecnologías de "chip" de DNA tales como los chips de SNP Affymetrix. Estos métodos requieren la ampliación de la región genética diana, típicamente por PCR. Incluso otros métodos recientemente desarrollados, basados en la generación de pequeñas moléculas de señalización por escisión invasiva seguida de espectrometría de masas o sondas candado (*padlock*) inmovilizadas y ampliación por círculo rodante (*rolling-circle*), podrían eventualmente eliminar la necesidad de PCR. Varios de los métodos conocidos en la técnica para detectar polimorfismos de nucleótidos sencillos específicos se resumen a continuación.

Se han desarrollado varios métodos para facilitar el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido. En una realización, el polimorfismo de una sola base puede detectarse usando un nucleótido resistente a exonucleasa especializado, como se describe, p. ej., en Mundy, C. R. (patente de Estados Unidos núm. 4.656.127). De acuerdo con el método, un cebador complementario a la secuencia alélica inmediatamente 3' al sitio polimorfo se permite para hibridar una molécula diana obtenida de un animal o ser humano particular. Si el sitio polimorfo en la molécula diana contiene un nucleótido que es complementario al derivado de nucleótido resistente a exonucleasa particular, entonces ese derivado se incorporará hacia el final del cebador hibridado. Dicha incorporación torna el cebador resistente a exonucleasa, y de este modo permite su detección. Ya que se conoce la identidad del derivado resistente a exonucleasa de la muestra, un hallazgo de que el cebador se torna resistente a exonucleasas revela que el nucleótido presente en el sitio polimorfo de la molécula diana fue complementario a aquel del derivado de nucleótidos utilizado en la reacción. Este método tiene la ventaja de que no requiere la determinación de gran cantidad de datos de secuencia exógenos.

En otra realización de la descripción, se emplea un método basado en disolución para determinar la identidad del nucleótido de un sitio polimorfo. Cohen, D. *et al.* (patente francesa 2.650.840; solicitud PCT núm. W091/02087). Como en el método de Mundy de la patente de Estados Unidos núm. 4.656.127, se emplea un cebador que es complementario a las secuencias alélicas inmediatamente 3' a un sitio polimorfo. El método determina la identidad del nucleótido de ese sitio usando derivados de dideoxinucleótidos marcados que, si son complementarios al nucleótido del sitio polimorfo, se incorporarán al término del cebador.

Un método alternativo, conocido como Genetic Bit Analysis o GBA™, es descrito por Goelet, P. *et al.* (solicitud PCT núm. 92/15712). El método de Goelet, P. *et al.* usa mezclas de terminadores marcados y un cebador que es complementario a la secuencia 3' a un sitio polimorfo. El terminador marcado que se incorpora es por ende determinado por, y la complementariedad al nucleótido presente en el sitio polimorfo de la molécula diana que se están evaluando. En contraste con el método de Cohen *et al.* (patente francesa 2.650.840; solicitud PCT núm. W091/02087), el método de Goelet, P. *et al.* es preferiblemente un ensayo de fase heterogénea, en donde el cebador o la molécula diana se inmoviliza a una fase sólida.

Recientemente, se han descrito varios procedimientos para incorporación de nucleótidos guiados por cebadores en DNA (Komher, J. S. *et al.*, Nucl. Acids. Res. 17:7779-7784 (1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18:3671 (1990); Syvanen, A.-C., *et al.*, Genomics 8:684-692 (1990); Kuppaswamy, M. N. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 88:1143-1147 (1991); Prezant, T. R. *et al.*, Hum. Mutat. 1:159-164 (1992); Ugozzoli, L. *et al.*, GATA 9:107-112 (1992); Nyren, P. *et al.*, Anal. Biochem. 208:171-175 (1993)). Estos métodos difieren del GBA™ en el sentido de que dependen de la incorporación de desoxinucleótidos marcados para discriminar entre bases en un sitio polimorfo. En dicho formato, ya que la señal es proporcional al número de desoxinucleótidos incorporados, los polimorfismos que ocurren en pasadas del mismo nucleótido pueden resultar en señales que son proporcionales a la longitud de la pasada (Syvanen, A.-C., *et al.*, Amer. J. Hum. Genet. 52:46-59 (1993)).

Para formulaciones que producen la terminación prematura de traducción de proteínas, la prueba de truncación de proteínas (PTT) ofrece un planteamiento diagnóstico eficiente (Roest, et. al., (1993) Hum. Mol Genet. 2:1719-21; van der Luijt, et. al., (1994) Genomics 20:1-4). Para PTT, el RNA se aísla inicialmente de tejido disponible y se transcribe inversamente, y el segmento de interés se amplía por PCR. Los productos de PCR por transcripción inversa se utilizan luego como molde para la ampliación PCR interna con un cebador que contiene un promotor de RNA polimerasa y una secuencia para iniciar la traducción eucariótica. Después de la ampliación de la región de interés, los motivos únicos incorporados al cebador permiten la transcripción secuencial *in vitro* y la traducción de los productos de PCR. Tras la electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida de los productos de traducción, el aspecto de polipéptidos truncados indica la presencia de una mutación que causa la terminación prematura de la traducción. En una variación de esta técnica, el DNA (en oposición al RNA) se usa como molde de PCR cuando la región diana de interés deriva de un solo axón.

Cualquier tipo de célula o tejido puede utilizarse para obtener muestras de ácido nucleico para uso en los diagnósticos descritos en este documento. En una realización preferida, la muestra de DNA se obtiene de un fluido corporal, p. ej., sangre obtenida por técnicas conocidas (p. ej., punción en la vena) o saliva. Alternativamente, las pruebas de ácido nucleico pueden efectuarse en muestras secas (p. ej., cabello o piel). Cuando se usa RNA o proteína, las células o los tejidos que pueden utilizarse deben expresar un gen de IL-1.

Los procedimientos diagnósticos también pueden llevarse a cabo *in situ* directamente en cortes de tejido (fijos y/o congelados) del tejido de un paciente obtenido por biopsias o resecciones, de modo tal que no se necesita purificación de ácido nucleico. Se pueden utilizar reactivos de ácido nucleico, como sondas y/o cebadores para dichos procedimientos *in situ* (véase, por ejemplo, Nuovo, G. J., 1992, PCR in situ hybridization: protocols and applications, Raven Press, N.Y.).

Además de los métodos que se centran principalmente en la detección de una secuencia de ácido nucleico, se pueden también evaluar perfiles en dichos esquemas de detección. Los perfiles de huellas dactilares pueden generarse, por ejemplo, utilizando un procedimiento de exhibición diferencial, análisis Northern y/o RT-PCR.

Un método de detección preferido es la hibridación específica de alelos que emplea sondas que superponen una región de por lo menos un alelo de un haplotipo proinflamatorio de IL-1 y que tienen aproximadamente 5, 10, 20, 25 o 30 nucleótidos alrededor de la mutación o la región polimorfa. En una realización preferida de la descripción, varias sondas capaces de hibridarse específicamente a otras variantes alélicas implicadas en una restenosis se unen a un soporte de fase sólida, p. ej., un "chip" (que puede albergar hasta aproximadamente 250.000 oligonucleótidos). Los oligonucleótidos pueden unirse a un soporte sólido por una diversidad de procedimientos, incluyendo litografía. Los análisis de detección de mutaciones que usan estos chips que comprenden oligonucleótidos, también denominados "ordenaciones de sondas de DNA" se describen, p. ej., en Cronin *et al.* (1996) Human Mutation 7:244. En una realización, un chip comprende todas las variantes alélicas de por lo menos una región polimorfa de un gen. El soporte de fase sólida se pone luego en contacto con un ácido nucleico de prueba y se detecta la hibridación a las sondas específicas. Por consiguiente, la identidad de numerosas variantes alélicas de uno o más genes puede identificarse en un experimento de hibridación simple.

Estas técnicas también pueden comprender la etapa de ampliar el ácido nucleico antes del análisis. Los expertos en la materia conocen las técnicas de ampliación, e incluyen, aunque sin limitarse a ello, clonación, reacción de la polimerasa en cadena (PCR), reacción de la polimerasa en cada de alelos específicos (ASA), reacción de ligasa en cadena (LCR), reacción en cadena de la polimerasa con cebadores internos, replicación de secuencia auto-sostenida (Guatelli, J. C. *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de ampliación de transcripción (Kwoh, D. Y. *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177) y Q-Beta Replicasa (Lizardi, P. M. *et al.*, 1988, Bio/Technology 6:1197).

Los productos de ampliación pueden ensayarse en una diversidad de formas, incluyendo análisis de tamaño, digestión de restricción seguida por análisis de tamaño, detección de cebadores de oligonucleótidos marcados específicos en los productos de reacción, hibridación de oligonucleótidos específicos de alelos (ASO), detección de exonucleasa 5' específica, secuenciamiento, hibridación y similares.

Los medios para detección basada en PCR pueden incluir ampliación múltiple de una pluralidad de marcadores simultáneamente. Por ejemplo, se conoce en la técnica la selección de cebadores PCR para generar productos PCR que no se superponen en tamaño y pueden analizarse simultáneamente. Alternativamente, es posible ampliar diferentes marcadores con cebadores que están marcados diferencialmente y por lo tanto cada uno puede detectarse diferencialmente. Desde ya, los medios basados en hibridación permiten la detección diferencial de múltiples productos PCR en una muestra. Se conocen en el campo otras técnicas que permiten el análisis múltiple de una pluralidad de marcadores.

En una realización absolutamente ilustrativa, el método incluye las etapas de (i) recoger una muestra de células de un paciente, (ii) aislar ácido nucleico (p. ej., genómico, mRNA o ambos) de las células de la muestra, (iii) contactar la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que se hibridan específicamente en 5' y 3' a por lo menos un alelo de un haplotipo proinflamatorio de IL-1 bajo condiciones tales que ocurre la hibridación y la ampliación del

alelo, y (iv) detectar el producto de ampliación. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico, si dichas moléculas están presentes en muy bajos números.

En una realización preferida del ensayo, el alelo de un haplotipo proinflamatorio de IL-1 se identifica por alteraciones en los patrones de escisión de enzimas de restricción. Por ejemplo, la muestra y el DNA control se aíslan, se amplían (opcionalmente), se digieren con una o más endonucleasas de restricción, y se determinan los tamaños de longitud de los fragmentos por electroforesis en gel.

Incluso en otra realización, cualquiera de una diversidad de reacciones de secuenciamiento conocidas en la técnica se puede utilizar para secuenciar directamente el alelo. Las reacciones de secuenciamiento ilustrativas incluyen aquellas basadas en técnicas desarrolladas por Maxim y Gilbert ((1977) Proc. Natl Acad Sci USA 74:560) o Sanger (Sanger et al (1977) Proc. Nat. Acad. Sci USA 74:5463). También se contempla que cualquiera de una diversidad de procedimientos de secuenciamiento automáticos se puede utilizar cuando se efectúan estos ensayos (véase, por ejemplo, Biotechniques (1995) 19:448), incluyendo el secuenciamiento por espectrometría de masas (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/16101; Cohen *et al.* (1996) Adv Chromatogr 36:127-162; y Griffin *et al.* (1993) Appl Biochem Biotechnol 38:147-159). Será obvio para el experto en la técnica que, para ciertas realizaciones, la aparición de solamente una, dos o tres de las bases de ácido nucleico deberá determinarse en la reacción de secuenciamiento. Por ejemplo, se puede llevar a cabo *A-track* o similar, p. ej., donde se detecta solamente un ácido nucleico.

En otra realización, la protección de agentes de escisión (como una nucleasa, hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina) se puede emplear para detectar bases de apareamiento incorrecto en heterodúplex de RNA/RNA o RNA/DNA o DNA/DNA (Myers, *et al.* (1985) Science 230:1242). En general, la técnica de "escisión de apareamiento incorrecto" comienza proporcionando heterodúplex formados hibridando RNA o DNA (marcado) que contiene el alelo de tipo salvaje con la muestra. Los dúplex bicatenarios se tratan con un agente que escinde las regiones monocatenarias del dúplex, tales como las que existirán debido al apareamiento incorrecto de bases entre las cadenas del control y la muestra. Por ejemplo, se pueden tratar dúplex de RNA/DNA con RNase, y tratar híbridos de DNA/DNA con nucleasa S1 para digerir enzimáticamente las regiones de apareamiento incorrecto. En otras realizaciones, dúplex o bien de DNA/DNA o de RNA/DNA, se pueden tratar con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina para digerir regiones de apareamiento incorrecto. Después de la digestión de las regiones de apareamiento incorrecto, el material resultante se separa luego por tamaño sobre geles de poliacrilamida desnaturizantes para determinar el sitio de mutación. Véanse, por ejemplo, Cotton et al (1988) Proc. Natl Acad Sci USA 85:4397; y Saleeba et al (1992) Methods Enzymol. 217:286-295. En una realización preferida, el DNA o RNA control puede marcarse para detección.

Incluso en otra realización, la reacción de escisión de apareamiento incorrecto emplea una o más proteínas que reconocen los pares de bases incorrectamente apareados en DNA bicatenario (llamadas enzimas de "reparación de apareamiento incorrecto de DNA"). Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde apareamientos incorrectos A en G/A, y la timidina DNA glucosilasa de las células HeLa escinde apareamientos incorrectos de T en G/T (Hsu *et al.* (1994) Carcinogenesis 15:1657-1662). De acuerdo con una realización ilustrativa, una sonda basada en un alelo de un haplotipo del locus de IL-1 se hibrida a un cDNA u otro producto de DNA de una célula(s) de ensayo. El dúplex se trata con una enzima de reparación de apareamiento incorrecto de DNA, y los productos de escisión, si los hay, pueden detectarse por protocolos de electroforesis o similares. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5.459.039.

En otras realizaciones, las alteraciones en la movilidad electroforética se usarán para identificar un alelo del locus de IL-1. Por ejemplo, el polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP) se puede usar para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y de tipo salvaje (Orita *et al.* (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA 86:2766, véanse también Cotton (1993) Mutat Res 285:125-144; y Hayashi (1992) Genet Anal Tech Appl 9:73-79). Los fragmentos de DNA monocatenario de alelos del locus de IL-1 de la muestra y el control se desnaturizan y se dejan renaturalizar. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos monocatenarios varía de acuerdo a la secuencia. La alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un solo cambio de base. Los fragmentos de DNA pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas.

La sensibilidad del ensayo puede potenciarse usando RNA (en lugar de DNA), en donde la estructura secundaria es más sensible a cambiar en secuencia. En una realización preferida, el método utiliza análisis heterodúplex para separar moléculas heterodúplex bicatenarias en base a los cambios en la movilidad electroforética (Keen *et al.* (1991) Trends Genet 7:5).

Incluso en otra realización, se ensaya el movimiento de alelos en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturizante, usando electroforesis en gel con gradiente de desnaturización (DGGE) (Myers *et al.* (1985) Nature 313:495). Cuando se utiliza DGGE como el método de análisis, el DNA se modifica para asegurar que no se desnaturalice completamente, por ejemplo añadiendo un anclaje GC de aproximadamente 40 bp de DNA rico en GC de alta fusión por PCR. En otra realización, se emplea un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente de agente de desnaturización para identificar diferencias en la movilidad del DNA control y de muestra (Rosenbaum y Reissner (1987) Biophys Chem 265:12753).

Los ejemplos de otras técnicas para detectar alelos incluyen, aunque sin limitarse a ello, hibridación selectiva de oligonucleótidos, ampliación selectiva o extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, se pueden preparar cebadores de oligonucleótidos en los que la mutación conocida o la diferencia de nucleótidos (p. ej., en variantes alélicas) se dispone centralmente y luego se hibrida a una DNA diana bajo condiciones que permiten la hibridación solamente si se encuentra un apareamiento perfecto (Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163); Saiki *et al.* (1989) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 86:6230). Dichas técnicas de hibridación de oligonucleótidos específica de alelos pueden usarse para ensayar una mutación o región polimorfa por reacción cuando se hibridan oligonucleótidos a DNA diana ampliado por PCR, o un número de mutaciones o regiones polimorfas distintas cuando los oligonucleótidos se acoplan a la membrana de hibridación y se hibridan con el DNA diana marcado.

Alternativamente, la tecnología de ampliación específica de alelos que depende de la ampliación selectiva de PCR se puede usar junto con la presente invención. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para ampliación específica pueden portar la mutación o región polimorfa de interés en el centro de la molécula (de modo que la ampliación depende de la hibridación diferencial) (Gibbs *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) o en el extremo 3' de un cebador en donde, bajo condiciones apropiadas, el apareamiento incorrecto puede prevenir o reducir la extensión de la polimerasa (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238. Además puede ser conveniente introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación para crear una detección basada en escisión (Gasparini *et al.* (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). Se anticipa que en determinadas realizaciones, la ampliación puede también efectuarse usando Taq ligasa para ampliación (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:189). En tales casos, la ligadura ocurrirá solamente si hay un apareamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia 5', posibilitando la detección de la presencia de una mutación conocida en un sitio específico, buscando la presencia o ausencia de ampliación.

En otra realización, la identificación de la variante alélica se lleva a cabo usando un ensayo de ligadura de oligonucleótidos (OLA), como se describe, p. ej., en la patente de Estados Unidos núm. 4.998.617 y en Landegren, U. *et al.* ((1988) *Science* 241:1077-1080). El protocolo de OLA utiliza dos oligonucleótidos que están diseñados para poder hibridarse a secuencias salientes de una sola cadena de una diana. Uno de los oligonucleótidos está unido a un marcador de separación, p. ej., biotinilado, y el otro está detectablemente marcado. Si se halla la secuencia complementaria precisa en una molécula diana, los oligonucleótidos se hibridan de forma tal que sus términos se empalman, y se crea un sustrato de ligadura. La ligadura permite entonces que el oligonucleótido marcado sea recuperado usando avidina u otro ligando de biotina. Nickerson, D. A. *et al.* han descrito un ensayo para detección de ácido nucleico que combina atributos de PCR y OLA (Nickerson, D. A. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8923-27). En este método, se utiliza PCR para lograr la ampliación exponencial del DNA diana, que luego se detecta usando OLA.

Se han desarrollado varias técnicas basadas en este método OLA y se pueden usar para detectar alelos de un haplotipo del locus de IL-1. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5.593.826 describe un ensayo OLA que emplea un oligonucleótido que tiene un grupo 3'-amino y un oligonucleótido 5'-fosforilado para formar un conjugado que tiene un enlace fosforoamidato. En otra variación de OLA descrita en Tobe *et al.* ((1996) *Nucleic Acids Res* 24:3728), OLA combinado con PCR permite la tipificación de dos alelos en un solo pocillo de microtitulación. Marcando cada uno de los cebadores específicos de alelos con un único hapteno, es decir, digoxigenina y fluoresceína, cada reacción del OLA puede detectarse usando anticuerpos específicos de hapteno marcados con distintos indicadores enzimáticos, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante. Este sistema permite la detección de los dos alelos usando un formato de rendimiento que lleva a la producción de dos colores distintos.

El diseño de los oligonucleótidos para uso en la ampliación y detección de alelos polimorfos de IL-1 por el método de la invención se facilita mediante la disponibilidad de información de secuencias actualizada del cromosoma humano 2q13, que contiene el locus de IL-1 humano, e información actualizada del polimorfismo humano disponible para este locus, por ejemplo, la secuencia de DNA para IL-1A, IL-1B y IL-1RN (núm. de acceso en GenBank. X03833), 2 (núm. de acceso en GenBank. X04500) y 3 (núm. de acceso en GenBank X64532) respectivamente. Los cebadores adecuados para detección de un polimorfismo humano en estos genes pueden diseñarse fácilmente usando esta información de secuencia y técnicas estándar conocidas para el diseño y la optimización de secuencias de cebadores. El diseño óptimo de dichas secuencias de cebadores puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de programas de selección de cebadores comerciales tales como Primer 2.1, Primer 3 o GeneFisher (véanse también Nicklin M. H. J., Weith A. Duff G. W., "A Physical Map of the Region Encompassing the Human Interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and Interleukin-1 Receptor Antagonist Genes" *Genomics* 19: 382 (1995); Nothwang H. G., *et al.* "Molecular Cloning of the Interleukin-1 gene Cluster: Construction of an Integrated YAC/PAC Contig and a partial transcriptional Map in the Region of Chromosome 2q13" *Genomics* 41:370 (1997); Clark, *et al.* (1986) *Nucl. Acids. Res.*, 14:7897-7914 [fe de erratas en *Nucleic Acids Res.*, 15:868 (1987) y en el proyecto Genome Database (GDB) ingresando en [www.gdb.org](http://www.gdb.org)).

#### Farmacogenómica

El conocimiento de los alelos particulares con una susceptibilidad a desarrollar una enfermedad o afección particular, solo o en conjunto con información sobre otros defectos genéticos que contribuyen a la enfermedad o afección particular, permite una adaptación personalizada de la prevención o el tratamiento según el perfil genético del individuo, la meta de la "farmacogenómica". Por lo tanto, la comparación del perfil de IL-1 de un individuo para

resistencia a insulina, diabetes de tipo II, obesidad o trastorno metabólico, permite la selección o el diseño de fármacos u otros regímenes terapéuticos que se espera sean seguros y eficaces para un paciente en particular o para una población de pacientes (es decir, un grupo de pacientes que tienen la misma alteración genética).

- Además, la capacidad de dirigirse a poblaciones que se espera que muestren el mayor beneficio clínico, en base al perfil genético, puede permitir: 1) el reposicionamiento de fármacos ya comercializados; 2) el rescate de candidatos a fármacos cuyo desarrollo clínico se ha discontinuado como consecuencia de limitaciones de seguridad o eficacia que son específicas de subgrupos de pacientes; y 3) un desarrollo acelerado y menos costoso para compuestos terapéuticos candidatos y un etiquetado de fármacos más óptimo (p. ej., ya que la medición del efecto de diversas dosis de un agente sobre la mutación causal es útil para optimizar la dosis eficaz).
- 5 El tratamiento de un individuo con un compuesto terapéutico particular puede vigilarse determinando el nivel de proteína (p. ej., IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-1a), mRNA y/o el nivel de transcripción. Dependiendo del nivel detectado, el régimen terapéutico puede entonces mantenerse o ajustarse (un aumento o una reducción de la dosis). En una realización preferida, la eficacia de tratar a un sujeto con un agente comprende las etapas de: (i) obtener una muestra de preadministración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel o la cantidad de una proteína, mRNA o DNA genómico en la muestra de preadministración; (iii) obtener una o más muestras post-administración del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión o actividad de la proteína, mRNA o DNA genómico en la muestra post-administración; (v) comparar el nivel de expresión o actividad de la proteína, mRNA o DNA genómico en la muestra de preadministración con la correspondiente proteína, mRNA o DNA genómico en la muestra postadministración, respectivamente; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto de manera acorde.
- 10 Las células de un sujeto pueden también obtenerse antes y después de la administración de un compuesto terapéutico para detectar el nivel de expresión de genes distintos del gen de IL-1, a fin de verificar que el compuesto terapéutico no aumente ni reduzca la expresión de genes que podrían ser perjudiciales. Esto se puede lograr, p. ej., usando el método de perfil de transcripción. Por lo tanto, el mRNA de células expuestas *in vivo* a un compuesto terapéutico, y el mRNA del mismo tipo de células que no se expusieron al compuesto terapéutico, podrían transcribirse inversamente e hibridarse a un chip que contenga DNA de diversos genes, para comparar así la expresión de genes en células tratadas y no tratadas con el compuesto terapéutico.
- 15 20 25

Compuestos terapéuticos para resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y trastorno metabólico

- Compuestos terapéuticos para resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad, y/o trastorno metabólico hace referencia a cualquier agente o régimen terapéutico (incluyendo compuestos farmacéuticos, productos nutracéuticos y medios quirúrgicos) que previene o pospone el desarrollo, o alivia, los síntomas de resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. El compuesto terapéutico puede ser un polipéptido, peptidomimético, ácido nucleico u otra molécula inorgánica u orgánica, preferiblemente una "molécula pequeña" incluyendo vitaminas, minerales u otros nutrientes. Preferiblemente, el compuesto terapéutico puede modular por lo menos una actividad de un polipéptido de IL-1, por ejemplo IL-1 $\beta$ , CRP o IL-6, p. ej., por interacción con un receptor, imitando o potenciando (agonizando) o inhibiendo (antagonizando) los efectos de un polipéptido natural. Un agonista puede ser una proteína de tipo salvaje o su derivado que tenga por lo menos una bioactividad de tipo salvaje, p. ej., actividad de unión al receptor. Un agonista puede también ser un compuesto que aumente la expresión de un gen o que aumente por lo menos una bioactividad de una proteína. Un agonista puede también ser un compuesto que aumente la interacción de un polipéptido con otra molécula, p. ej., un receptor. Un antagonista puede ser un compuesto que inhiba o reduzca la interacción entre una proteína y otra molécula, p. ej., un receptor o un agente que bloquee la transducción de señales o el procesamiento post-traducción (p. ej., un inhibidor de la enzima convertidora (ICE) de IL-1). Por consiguiente, un antagonista preferido es un compuesto que inhibe o reduce la unión a un receptor y bloquea de esta forma la activación subsiguiente del receptor. Un antagonista puede ser también un compuesto que reduzca la expresión de un gen o que reduzca la cantidad de una proteína presente. El antagonista puede ser una forma negativa dominante de un polipéptido, p. ej., una forma de un polipéptido que sea capaz de interactuar con un péptido diana, p. ej., un receptor, pero que no promueva la activación del receptor.
- 30 35 40 45

- El antagonista puede ser también un ácido nucleico que codifica una forma negativa dominante de un polipéptido, un ácido nucleico antisentido o un ribosoma capaz de interactuar específicamente con un RNA. Incluso otros antagonistas consisten en moléculas que se unen a un polipéptido e inhiben su acción. Dichas moléculas incluyen péptidos, p. ej., formas de péptidos diana que no tienen actividad biológica y que inhiben la unión a los receptores. Por ende, dichos péptidos se unirán al sitio activo de una proteína y evitarán que interactúe con los péptidos diana. Incluso otros antagonistas incluyen anticuerpos que interactúan específicamente con un epítipo de una molécula, de modo tal que la unión interfiere con la función biológica del polipéptido. Incluso en otra realización preferida, el antagonista es una molécula pequeña, tal como una molécula capaz de inhibir la interacción entre un polipéptido y un receptor diana. Alternativamente, la molécula pequeña puede funcionar como antagonista, interactuando con sitios distintos al sitio de unión al receptor.
- 50 55

- Los moduladores de IL-1 (p. ej., un antagonista del receptor de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-1), CRP o IL-6 o una proteína codificada por un gen que está en desequilibrio de ligamiento con un gen de IL-1 pueden comprender cualquier tipo de compuesto, incluida una proteína, péptido, peptidomimético, molécula pequeña o ácido nucleico. Los agonistas preferidos incluyen ácidos nucleicos (p. ej., que codifican una proteína de IL-1, CRP o IL-6 o un gen que es
- 60

5 aumentado o reducido por una proteína de IL-1, CRP o IL-6), proteínas (p. ej., proteínas de IL-1, CRP o IL-6, o una proteína que es aumentada o reducida de este modo) o una molécula pequeña (p. ej., que regula la expresión o la unión de una proteína de IL-1, CRP o IL-6). Los antagonistas preferidos, que pueden identificarse, por ejemplo, usando los ensayos descritos en esta memoria, incluyen ácidos nucleicos (p. ej., DNA o PNA y ribozimas de una sola cadena (antisentido) o de doble cadena (tríplex)), proteína (p. ej., anticuerpos) y moléculas pequeñas que actúan para suprimir o inhibir la transcripción de IL-1, CRP o IL-6 y/o la actividad de la proteína.

10 Los compuestos terapéuticos para resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico son eficaces para aliviar cualquier síntoma asociado con resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, obesidad y/o trastorno metabólico. Estos síntomas incluyen frecuencia urinaria, sed excesiva, hambre extrema, adelgazamiento inusual, aumento de fatiga, irritabilidad, visión borrosa, obesidad, sobrepeso, hiperglucemia, enfermedad cardiovascular, ceguera, retinopatía, neuropatía, hiperinsulinemia, acidosis láctica, hipertensión, intolerancia a la glucosa y daño renal.

Dosis y formulaciones eficaces, y su uso

15 La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos puede determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la LD<sub>50</sub> (dosis letal hasta en 50% de la población) y la ED<sub>50</sub> (dosis terapéuticamente eficaz hasta en 50% de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Se prefieren los compuestos que exhiben grandes índices terapéuticos. Si bien se pueden utilizar los compuestos que exhiben efectos colaterales tóxicos, se deben tomar precauciones de diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio de tejidos afectados con el fin de minimizar el daño potencial a las células no afectadas y reducir de este modo los efectos colaterales.

20 Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y de los estudios animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosis de dichos compuestos yace preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración que se utilice. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la IC<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semi-máxima de los síntomas) según lo determinado en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar de manera más precisa las dosis útiles para seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Ensayos para identificar compuestos terapéuticos

35 En base a la identificación de mutaciones que causan o que contribuyen al desarrollo de una enfermedad o trastorno asociado con un polimorfismo o haplotipo de IL-1, la descripción describe además ensayos basados en células o libres de células para identificar compuestos terapéuticos. En una realización, una célula que expresa un receptor de IL-1, o un receptor para una proteína codificada por un gen que está en desequilibrio de ligamiento con un gen de IL-1, en la superficie externa de su membrana celular se incuba en presencia de un compuesto de ensayo solo o en presencia de un compuesto de ensayo y otra proteína, y se detecta la interacción entre el compuesto de ensayo y el receptor o entre la proteína (preferiblemente una proteína marcada) y el receptor, p. ej., usando un microfisiómetro (McConnell *et al.* (1992) *Science* 257:1906). Una interacción entre el receptor y o bien el compuesto de ensayo o la proteína es detectada por el microfisiómetro como un cambio en la acidificación del medio. Este sistema de ensayo proporciona así un medio para identificar antagonistas moleculares que, por ejemplo, funcionan interfiriendo con interacciones proteína-receptor, como también un agonista molecular que, por ejemplo, funciona activando un receptor.

45 Los ensayos basados en células o libres de células también se pueden emplear para identificar compuestos que modulan la expresión de genes de IL-1 (p. ej., IL-1 $\beta$ ), CRP o IL-6, o un gen en desequilibrio de ligamiento con éstos, que modulan la traducción de un mRNA o que modulan la estabilidad de un mRNA o una proteína. Por consiguiente, en una realización, una célula capaz de producir un IL-1 (p. ej., IL-1 $\beta$ ), CRP o IL-6, u otra proteína, se incuba con un compuesto de ensayo, y la cantidad de proteína producida en el medio celular se mide y compara con aquella producida a partir de una célula que no se ha puesto en contacto con el compuesto de ensayo. La especificidad del compuesto frente a la proteína puede confirmarse con diversos análisis de control, p. ej., midiendo la expresión de uno o más genes de control. En particular, este ensayo puede utilizarse para determinar la eficacia de compuestos antisentido, ribozima y tríplex.

55 Los ensayos libres de células pueden también emplearse para identificar compuestos capaces de interactuar con una proteína, para modificar así la actividad de la proteína. Dicho compuesto puede, p. ej., modificar la estructura de una proteína, afectando así su capacidad de unirse a un receptor.

En una realización preferida, los ensayos libres de células para identificar dichos compuestos consisten esencialmente en una mezcla de reacción que contiene una proteína y un compuesto de ensayo o una quimioteca de ensayo en presencia o ausencia de un ligando. Un compuesto de ensayo puede ser, p. ej., un derivado de un ligando, p. ej., un péptido diana biológicamente inactivo o una molécula pequeña.

5 Por consiguiente, un ensayo de detección ilustrativo de la presente descripción incluye las etapas de contactar una proteína o su fragmento funcional con un compuesto de ensayo o una quimioteca de ensayo y detectar la formación de complejos. Para propósitos de detección, la molécula puede etiquetarse con un marcador específico y el compuesto de ensayo o la quimioteca de ensayo etiquetarse con un marcador distinto. La interacción de un compuesto de ensayo con una proteína o su fragmento puede luego detectarse determinando el nivel de las dos  
10 etiquetas después de una etapa de incubación y una etapa de lavado. La presencia de dos etiquetas después de la etapa de lavado es indicativa de una interacción.

Una interacción entre moléculas también puede identificarse usando BIA en tiempo real (Biomolecular Interaction Analysis, Pharmacia Biosensor AB) que detecta la resonancia de plasmones superficiales (SPR), un fenómeno óptico. La detección depende de los cambios en la concentración de masas de las macromoléculas en la interfaz biospecífica, y no requiere ningún etiquetado de los entornos de interacción. En una realización, una quimioteca de ensayo puede inmovilizarse en una superficie sensora, p. ej., que forma una pared de una célula de microflujo. Una disolución que contiene la proteína o su fragmento funcional se hace fluir luego continuamente sobre la superficie sensora. Un cambio en el ángulo de resonancia según se indica en un registro de señales, indica que ha ocurrido una interacción. Esta técnica se describe en más detalles, p. ej., en BIAtechnology Handbook de Pharmacia.

20 Otro ensayo de detección ilustrativo de la presente descripción incluye las etapas de (a) formar una mezcla de reacción, incluyendo: (i) un IL-1 (p. ej., IL-1 $\beta$ ), CRP o IL-6 u otra proteína, (ii) un receptor apropiado y (iii) un compuesto de ensayo, y (b) detectar la interacción de la proteína y el receptor. Un cambio estadísticamente significativo (potenciación o inhibición) en la interacción de la proteína y el receptor en presencia del compuesto de ensayo, en relación con la interacción en ausencia del compuesto de ensayo, indica un antagonista potencial (inhibidor). Los compuestos de este ensayo pueden ponerse en contacto simultáneamente. Alternativamente, una proteína puede ponerse en contacto primero con un compuesto de ensayo por una cantidad de tiempo apropiada, después de lo cual se añade el receptor a la mezcla de reacción. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de dosis y respuesta a partir de los datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de ensayo. A su vez, puede también efectuarse un ensayo de control para proporcionar un punto de partida para comparación.

La formación de complejo entre una proteína y un receptor puede detectarse mediante una diversidad de técnicas. La modulación de la formación de complejos puede cuantificarse usando, por ejemplo, proteínas detectablemente etiquetadas, tal como proteínas o receptores radiomarcados, fluorescentemente etiquetados o enzimáticamente etiquetados, por inmunoensayo o por detección cromatográfica.

35 Típicamente, será conveniente inmovilizar o bien la proteína o el receptor para facilitar la separación de complejos de formas que no forman complejo de una o ambas proteínas, como también alojar la automatización del ensayo. La unión de la proteína y el receptor puede lograrse en un recipiente adecuado para contener los reaccionantes. Los ejemplos incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos micro-centrífugos. En una realización, se puede proveer una proteína de fusión que añade un dominio que permite que la proteína sea una a una matriz. Por ejemplo, las proteína de fusión glutatión-S-transferasa pueden adsorberse en esferas de glutatión sepharose (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivadas de glutatión, que luego se combinan con el receptor, p. ej., un receptor marcado con <sup>35</sup>S, y el compuesto de ensayo, y la mezcla se incuba bajo condiciones conductoras para la formación de complejo, p. ej., bajo condiciones fisiológicas para sal y pH, aunque pueden ser convenientes condiciones ligeramente más rigurosas. Tras la incubación, las esferas se lavan para eliminar cualquier etiqueta no unida, y la matriz se inmoviliza y se determina inmediatamente la radioetiqueta (p. ej., esferas dispuestas en centelleos), o en el sobrenadante después de que los complejos se disocian subsiguientemente. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz, separarse por SDS-PAGE, y el nivel de proteína o receptor encontrado en la fracción de esferas cuantificarse del gel usando técnicas electroforéticas estándar tales como aquellas descritas en los ejemplos anejos. Otras técnicas para inmovilizar proteínas sobre matrices están también disponibles para uso en el ensayo en cuestión. Por ejemplo, o bien la proteína o el receptor puede inmovilizarse utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. Los animales transgénicos pueden también estar hechos para identificar agonistas y antagonistas o para confirmar la seguridad y eficacia de un compuesto terapéutico candidato. Los animales transgénicos de la invención pueden incluir animales no humanos que contienen una mutación causante de restenosis bajo el control de un promotor endógeno apropiado o bajo el control de un promotor heterólogo.

55 Los animales transgénicos pueden también ser animales que contienen un transgén, tal como un gen indicador, bajo el control de un promotor apropiado o su fragmento. Estos animales son útiles, p. ej., para identificar fármacos que modulan la producción de proteínas de IL-1 (p. ej., IL-1 $\beta$ ), CRP o IL-6, tal como modulando la expresión génica. Los métodos para obtener animales no humanos transgénicos se conocen en la técnica. En realizaciones preferidas, la expresión de la mutación causante de restenosis se restringe a subconjuntos específicos de células, tejidos o etapas del desarrollo que utilizan, por ejemplo, secuencias de actuación en cis que controlan la expresión en el patrón deseado. En la presente invención, dicha expresión en mosaico de una proteína puede ser esencial para muchas

formas de análisis de linaje, y puede además proporcionar un medio para evaluar los efectos de, por ejemplo, el nivel de expresión que podría alterar en gran medida el desarrollo en parches pequeños de tejido dentro de un embrión que de lo contrario sería normal. Con este fin, se pueden usar secuencias reguladoras específicas de tejido y secuencias reguladoras condicionales para controlar la expresión de la mutación en ciertos patrones espaciales. Asimismo, los patrones temporales de expresión pueden proveerse, por ejemplo, por sistemas de recombinación condicional o secuencias reguladoras de transcripción procariótica. Las técnicas genéticas, que permiten la expresión de una mutación, pueden regularse mediante manipulación genética específica del *sitio in vivo*, como se conoce en la técnica.

Los animales transgénicos de la presente descripción incluyen dentro de una pluralidad de sus células un transgén causante de la presente invención, en donde el transgén altera el fenotipo de la "célula hospedante". En una realización ilustrativa, o bien el sistema de cre/loxP recombinasa del bacteriófago P1 (Lakso *et al.* (1992) PNAS 89:6232-6236; Orban *et al.* (1992) PNAS 89:6861-6865) o el sistema de FLP recombinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman *et al.* (1991) Science 251:1351-1355; publicación PCT WO 92/15694) se pueden usar para generar sistemas de recombinación genética específica del sitio *in vivo*. Cre recombinasa cataliza la recombinación específica del sitio de una secuencia diana interviniente situada entre las secuencias loxP. Las secuencias loxP son secuencias de repetición de nucleótidos de 34 pares de bases a las que se les une Cre recombinasa, y son requeridas para la recombinación genética mediada por Cre recombinasa. La orientación de las secuencias loxP determina si la secuencia diana interviniente es escindida o invertida cuando está presente la Cre recombinasa (Abremski *et al.* (1984) J Biol. Chem. 259:1509-1514); catalizando la escisión de la secuencia diana cuando las secuencias loxP están orientadas como repeticiones directas, y cataliza la inversión de la secuencia diana cuando las secuencias loxP están orientadas como repeticiones invertidas.

Por consiguiente, la recombinación genética de la secuencia diana depende de la expresión de la Cre recombinasa. La expresión de la recombinasa puede ser regulada por elementos promotores que están sujetos a control regulador, p. ej., específico de tejido, específico de la etapa del desarrollo, inducible o reprimible por agentes añadidos externamente. Este control regulado resultará en una recombinación genética de la secuencia diana solamente en células en las que la expresión de recombinasa está mediada por el elemento promotor. Por lo tanto, la activación de la expresión del transgén de mutación causal puede regularse mediante el control de la expresión de recombinasa.

El uso del sistema de cre/loxP recombinasa para regular la expresión de un transgén de mutación causal requiere la construcción de un animal transgénico que contiene transgenes que codifican tanto Cre recombinasa como la proteína en cuestión. Los animales que contienen tanto la Cre recombinasa como el transgén de mutación causante de restenosis pueden proveerse mediante la construcción de animales transgénicos "dobles". Un método conveniente para proveer dichos animales consiste en aparear dos animales transgénicos que contengan cada uno un transgén.

Pueden proveerse transgenes condicionales similares usando secuencias promotoras procarióticas que requieren proteínas procarióticas para expresarse simultáneamente con el fin de facilitar la expresión del transgén. Los promotores ilustrativos y las correspondientes proteínas procarióticas trans-activadoras se exponen en la patente de Estados Unidos núm. 4.833.080.

Asimismo, la expresión de los transgenes condicionales puede ser inducida por métodos del tipo terapia génica, en donde un gen que codifica la proteína transactivadora, p. ej., una recombinasa o proteína procariótica, se administra al tejido y causa que se exprese, tal como en un modo específico del tipo de célula. A través de este método, el transgén podría permanecer silencioso en la adultez hasta "activarse" por introducción del transactivador.

En una realización ilustrativa, los "animales no humanos transgénicos" de la descripción se producen introduciendo transgenes en la línea germinal del animal no humano. Se pueden utilizar células diana embrionarias en diversas etapas del desarrollo para introducir transgenes. Se usan distintos métodos, dependiendo de la etapa del desarrollo de la célula diana embrionaria. La línea(s) específica de cualquier animal utilizada para practicar la presente invención se selecciona para buena salud general, buenas producciones de embriones, buena visibilidad pronuclear en el embrión y buena aptitud reproductiva. Además, el haplotipo es un factor significativo. Por ejemplo, cuando se van a producir ratones transgénicos, por lo general se emplean cepas tales como C57BUJ6 o líneas FVB (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me.). Las cepas preferidas son aquellas con los haplotipos H-2<sup>b</sup>, H-2<sup>d</sup> o H-2<sup>q</sup> tales como C57BL/6 o DBA/1. La línea(s) que se usa para implementar esta invención puede por sí misma ser transgénica y/o puede tener genes inactivados (es decir, obtenerse de animales que tienen uno o más genes parcial o completamente suprimidos).

En una realización, el constructo de transgén se introduce en un embrión de una sola etapa. En el resto de la memoria, cada vez que se haga referencia a un embrión o a células embrionarias, se entenderá que son de origen "no humano". El cigoto es la mejor diana para microinyección. En el ratón, el pronúcleo masculino alcanza el tamaño de aproximadamente 20 micrómetros de diámetro, lo que permite la inyección reproducible de 1-2 pl de disolución de DNA. El uso de cigotos como dianas para la transferencia génica tiene una ventaja importante, ya que en la mayoría de los casos el DNA inyectado se incorporará en el gen hospedante antes de la primera escisión (Brinster *et al.* (1985) PNAS 82:4438-4442). En consecuencia, todas las células del animal transgénico portarán el transgén

incorporado. Esto en general también se reflejará en la transmisión eficiente del transgén a la cría del fundador, ya que 50% de las células germinales albergarán el transgén.

Normalmente, los embriones fertilizados se incuban en un medio adecuado hasta que aparecen los pronúcleos. Aproximadamente en este momento, la secuencia de nucleótidos que comprende el transgén se introduce en el pronúcleo femenino o masculino, como se describe a continuación. En algunas especies tales como ratones, se prefiere el pronúcleo masculino. Se prefiere más que el material genético exógeno se añada al complemento de DNA masculino del cigoto antes de que sea procesado por el núcleo del óvulo o el pronúcleo femenino del cigoto. Se cree que el núcleo del óvulo o las moléculas de liberación del pronúcleo femenino afectan el complemento de DNA masculino, tal vez reemplazando las protaminas del DNA masculino con histonas, facilitando así la combinación de los complementos de DNA femeninos y masculinos para formar el cigoto diploide. Por lo tanto, se prefiere que el material genético exógeno se añada al complemento masculino de DNA o a cualquier otro complemento de DNA antes de ser afectado por el pronúcleo femenino. Por ejemplo, el material genético exógeno se añade al pronúcleo masculino temprano, lo antes posible después de la formación del pronúcleo masculino, que es cuando los pronúcleos masculino y femenino están bien separados y ambos están situados cerca de la membrana celular. Alternativamente, el material genético exógeno podría añadirse al núcleo del espermatozoides después de que se ha inducido a someterse a descondensación. El espermatozoides que contiene el material genético exógeno puede entonces añadirse al óvulo, o el espermatozoides descondensado podría añadirse al óvulo, añadiendo los constructos transgénicos lo antes posible de allí en más.

La introducción de la secuencia de nucleótidos transgénicos en el embrión puede lograrse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, microinyección, electroporación o lipofección. Después de la introducción de la secuencia de nucleótidos transgénica al embrión, el embrión puede incubarse *in vitro* por cantidades variables de tiempo, o reimplantarse en el hospedante sustituto, o ambos. La incubación *in vitro* hasta la madurez está dentro del alcance de la presente invención. Un método común es incubar los embriones *in vitro* durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de la especie, y luego reimplantarlos en el hospedante sustituto.

Para los propósitos de la presente invención, un cigoto es esencialmente la formación de una célula diploide capaz de desarrollarse en un organismo completo. En general, el cigoto estará comprendido por un huevo que contiene un núcleo formado, o bien natural o artificialmente, por la fusión de dos núcleos haploides de un gameto o gametos. Por ende, los núcleos de los gametos deben ser naturalmente compatibles, es decir, resultar en un cigoto viable capaz de someterse a diferenciación y desarrollarse en un organismo funcional. En general, se prefiere un cigoto euploide. Si se obtiene un cigoto aneuploide, entonces el número de cromosomas no deberá variar por más de uno con respecto al número de euploides del organismo del cual se originó alguno de los gametos.

Además de consideraciones biológicas similares, las físicas también rigen la cantidad (p. ej., el volumen) de material genético exógeno que puede añadirse al núcleo del cigoto o al material genético que forma una parte del núcleo del cigoto. Si no se extrae ningún material genético, entonces la cantidad de material genético exógeno que puede añadirse está limitada por la cantidad que será absorbida sin ser físicamente disruptiva. Generalmente, el volumen de material genético exógeno insertado no excederá aproximadamente 10 picolitros. Los efectos físicos de la adición no deben ser tan grandes como para destruir físicamente la viabilidad del cigoto. El límite biológico del número y la variedad de secuencias de DNA variará dependiendo del cigoto particular y de las funciones del material genético exógeno, y será obvio para el experto en la técnica, ya que el material genético, incluyendo el material genético exógeno, del cigoto resultante debe ser biológicamente capaz de iniciar y mantener la diferenciación y el desarrollo del cigoto en un organismo funcional.

El número de copias de constructos transgénicos que se añaden al cigoto depende de la cantidad total de material genético exógeno añadida y será la cantidad que permite que ocurra la transformación genética. Teóricamente, se requiere solamente una copia, no obstante, en general se utilizan numerosas copias, por ejemplo, 1.000-20.000 copias del constructo transgénico, con el fin de asegurar que una copia sea funcional. Con respecto a la presente invención, con frecuencia habrá una ventaja de tener más de una copia funcional de cada secuencia de DNA exógeno insertada para potenciar la expresión fenotípica de las secuencias de DNA exógeno.

Se puede emplear cualquier técnica que permita la adición del material genético exógeno al material genético nucleico, siempre y cuando no sea destructiva para la célula, la membrana nuclear u otras estructuras celulares o genéticas existentes. El material genético exógeno preferiblemente se inserta en el material genético nucleico por microinyección. La microinyección de las células y las estructuras celulares se conoce y se utiliza en la técnica.

El reimplante se logra usando métodos convencionales. Usualmente, el hospedante sustituto es anestesiado, y se insertan los embriones en el oviducto. El número de embriones implantados en un hospedante particular variará por especie, pero usualmente será comparable al número de crías que produce la especie naturalmente.

La descendencia transgénica del hospedante sustituto puede detectarse por la presencia y/o expresión del transgén a través de cualquier método adecuado. La detección por lo general se lleva a cabo por análisis Southern blot o Northern blot, utilizando una sonda que es complementaria a por lo menos una porción del transgén. El análisis Western blot que usa un anticuerpo contra la proteína codificada por el transgén puede emplearse como un método alternativo o adicional para detectar la presencia del producto transgénico. Típicamente, se prepara DNA del tejido

del rabo y se analiza por análisis Southern o PCR para el transgén. Alternativamente, los tejidos o células que se cree expresan el transgén en los más altos niveles se ensayan para detectar la presencia o expresión del transgén usando análisis Southern o PCR, aunque se puede usar cualquier tejido o tipo de célula para este análisis.

5 Los métodos alternativos o adicionales para evaluar la presencia del transgén incluyen, sin limitación, ensayos bioquímicos adecuados tales como ensayos enzimáticos y/o inmunológicos, tintes histológicos para actividades de marcadores o enzimas particulares, análisis citométricos de flujo y similares. El análisis de la sangre puede también ser útil para detectar la presencia del producto transgénico en la sangre, como también para evaluar el efecto del transgén sobre los niveles de diversos tipos de células sanguíneas y otros constituyentes sanguíneos.

10 La descendencia de los animales transgénicos puede obtenerse apareando el animal transgénico con una pareja adecuada, o por fertilización *in vitro* de huevos y/o espermatozoides obtenidos del animal transgénico. Si se va a aparear, la pareja puede o no ser transgénica y/o tener genes inactivados; si es transgénica, puede contener el mismo transgén o uno distinto, o ambos. Alternativamente, la pareja puede ser una línea parental. Si se usa fertilización *in vitro*, el embrión fertilizado puede implantarse en un hospedante sustituto o incubarse *in vitro*, o ambos. Usando cualquiera de los métodos puede evaluarse la descendencia para detectar la presencia del transgén utilizando los métodos descritos anteriormente, u otros métodos apropiados.

15 También puede usarse infección retroviral para introducir el transgén en un animal no humano. El desarrollo del embrión no humano puede cultivarse *in vitro* en el periodo de formación de blastocitos. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para infección retroviral (Jaenich, R. (1976) PNAS 73:1260-1264). La infección eficiente de los blastómeros se obtiene por tratamiento enzimático para eliminar la zona pelúcida (Manipulating the Mouse Embryo, Hogan eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986). El sistema del vector vírico utilizado para introducir el transgén es típicamente un retrovirus defectuoso de replicación que porta el transgén (Jahner *et al.* (1985) PNAS 82:6927-6931; Van der Putten *et al.* (1985) PNAS 82:6148- 6152). La transfección se obtiene fácil y eficientemente cultivando los blastómeros en una monocapa de células productoras del virus (Van der Putten, supra; Stewart *et al.* (1987) EMBO J 6:383-388). Alternativamente, la infección puede efectuarse en una etapa posterior. El virus o las células que producen el virus pueden inyectarse en el blastocelo (Jahner *et al.* (1982) Nature 298:623- 628). La mayoría de los fundadores serán mosaicos para el transgén, ya que la incorporación ocurre solamente en un subconjunto de las células que formaron el animal no humano transgénico. Además, el fundador puede contener varias inserciones retrovirales del transgén en diferentes posiciones del genoma que en general se segregarán en la prole. A su vez, es también posible introducir transgenes en la línea germinal por infección retroviral intrauterina del embrión en medio de la gestación (Jahner *et al.* (1982) supra).

20 Un tercer tipo de célula diana para la introducción de transgenes es la célula madre embrionaria (ES). Las células ES se obtienen de embriones de pre-implantación cultivados *in vitro* y condensados con embriones (Evans *et al.* (1981) Nature 292:154-156; Bradley *et al.* (1984) Nature 309:255- 258; Gossler *et al.* (1986) PNAS 83:9065-9069; y Robertson *et al.* (1986) Nature 322:445-448). Los transgenes pueden introducirse de modo eficiente en las células ES por transfección de DNA o por transducción mediada por retrovirus. Dichas células ES transformadas pueden de allí en más combinarse con blastocitos de un animal no humano. Las células ES de allí en más colonizan el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante. Para revisión, véase Jaenisch, R. (1988) Science 240:1468-1474. .

35 La práctica de la presente descripción empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales que están dentro de la experiencia en el campo. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, (2ª ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); patente de Estados Unidos núm. 4.683.195; patente de Estados Unidos núm. 4.683.202; y Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds., 1984).

#### 45 Ejemplos

Los siguientes ejemplos también validan, pero no representan de manera exclusiva, las realizaciones preferidas de la presente invención.

##### Ejemplo 1: Métodos de genotipificación

###### Preparación de DNA

50 Se extrae sangre por venopunción y se conserva sin coagular a -20°C antes de la extracción de DNA. Se añaden 10 ml de sangre a 40 ml de disolución de lisis de glóbulos rojos (RBC) hipotónicos (RBC) (Tris 10 mM, sacarosa 0,32, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, 1% Triton X-100) y se mezcla por inversión durante 4 minutos a temperatura ambiente (TA). Las muestras luego se centrifugan a 1300 g durante 15 minutos, se aspira el sobrenadante y se desecha, y se añaden otros 30 ml de disolución de lisis de RBC al sedimento celular. Después de la centrifugación, el sedimento se resuspende en 2 ml de disolución de lisis de glóbulos blancos (WBC) (Tris 0,4 M, EDTA 60 mM, NaCl 0,15, 10% SDS) y se transfiere a un nuevo tubo de polipropileno de 15 ml. Se añade perclorato sódico a una concentración final de 1M, y los tubos se invierten primero en un mezclador giratorio durante 15 minutos a TA, luego se incuban a

65°C durante 25 minutos, invirtiéndose periódicamente. Después de la adición de 2 ml de cloroformo (conservado a -20°C), las muestras se mezclan durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugan a 800 g por 3 minutos. En esta etapa, se puede obtener una distinción muy clara de fases usando suspensión de sílice 3001 Nucleon (Scotlab, Reino Unido) y centrifugación a 1400 g durante 5 minutos. La capa superior acuosa resultante se transfiere a un nuevo tubo de polipropileno de 15 ml y se añade etanol frío (conservado a -20° C) para precipitar el DNA.

Esto se bobina en un gancho de vidrio y se transfiere a un tubo eppendorf de 1,5 ml que contiene 500 µl TE o agua estéril. Después de la resuspensión en TE durante una noche, se calcula el rendimiento de DNA genómico por espectrometría a 260 nm. Se diluyen alícuotas de las muestras a 100 µg/ml, se transfieren a recipientes de microlitros y se conservan a 4° C. Se conservan las disoluciones madre a -20° C para referencia futura.

Reacción en cadena de la polimerasa

Los cebadores de oligonucleótidos diseñados para ampliar la región relevante del gen que abarca el sitio polimorfo (como se detalla a continuación) se sintetizan, resuspenden en tampón Tris- EDTA (TE) y se conservan a -20° C como disoluciones madre de 200 µM. Las alícuotas de las disoluciones de trabajo (mezcla 1:1 directa e inversa, 20 µM de cada una en agua) se preparan por adelantado.

Típicamente, las mezclas de reacción de PCR se preparan como se detalla a continuación.

	Concentración de disolución madre	Volumen	Concentración final Concentration
H <sub>2</sub> O estéril		29,5 µl	
Tampón PCR 10x	Tris-HCl 200 mM (pH 8,4)	5,00 µl	Tris-HCl 20 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,75 µl	1,75 mM
dNTP	Mezcla 10 mM de cada uno	4,00 µl	0,2 mM de cada uno
Cebador directo	20 µM	2,5 µl	1 µM
Cebador inverso	20 µM	2,5 µl	1 µM
Polimerasa <i>Taq</i> polymerase	5U/ µl	0,25 µl	1,25 unidades/50 µl
Detergente (p. ej., W-1, Gibco)	1%	2,5 µl	0,05%
Molde	200 ng/ µl	2,00 µl	2ng/l
Volumen final		50,00 µl	

El molde de DNA está punteado en la parte inferior de los tubos o micropocillos de 0,2 ml. El mismo volumen de agua o DNA de control negativo también se ensaya aleatoriamente. Se prepara una mezcla principal (incluyendo todos los reactivos, excepto moldes). Se añade a los pocillos o tubos, y las muestras se transfieren al termociclador para PCR.

La reacción PCR se puede llevar a cabo en tubos de 0,5 ml, tubos de 0,2 ml o micropocillos, de acuerdo con el termociclador disponible. La mezcla de reacción se cubre con aceite mineral si no hay una tapa caliente disponible (para prevenir la evaporación).

Digestión de enzimas de restricción

Se prepara una mezcla principal de tampón de enzimas de restricción y enzimas, y se vierte en alícuotas en volúmenes adecuados en micropocillos nuevos. La digestión se lleva a cabo en un baño de aceite o en microtubos con tapa a la temperatura apropiada para la enzima en un bloque seco.

Las diluciones de los tampones de restricción se calculan en todo el volumen de reacción (es decir, ignorando las concentraciones de sal del tampón de PCR). Las enzimas de restricción se usan 3-5 veces en exceso de la concentración recomendada para compensar las condiciones de tampón desfavorables y asegurar la digestión completa.

## Electroforesis

- 5 La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de la muestra de PCR se lleva a cabo en tampón de Tris-Borato-EDTA y a un voltaje constante. Dependiendo de la necesidad de discriminación de tamaño, se emplean distintas condiciones de PAGE (9 a 12% acrilamida, 1,5 mm x 200) y distintos marcadores de tamaño de DNA (X174-Hae III o X 174-Hinf 1). Se puede usar un gel horizontal de agarosa al 2% para genotipificar el marcador de IL-1RN (VNTR).

Los ejemplos de SNP de IL-1 se exponen en la Tabla 5.

Gen	Posición	Nucleótido
IL-1B	-511	1=C, 2=T
IL-1RN	+2018	1=T, 2=C
IL-1B	+3954	1=C, 2=T
IL-1B	+3877	1=G, 2=A
IL-1A	+4845	1=G, 2=T
IL-1B	-1464	1=G, 2=C
IL-1B	-3737	1=C, 2=T

En general, los alelos son detectados por PCR seguida por digestión de restricción o hibridación con una sonda. Los conjuntos de cebadores y análisis ilustrativos se presentan para locus ilustrativos.

- 10 IL-1A (+4845). El marcador de IL-1A (+4845) puede genotipificarse de acuerdo con el siguiente procedimiento. Los cebadores de PCR crean un sitio de restricción Fnu 4H1 en el alelo 1 para permitir el análisis RFLP. El número de acceso génico es X03833. Los cebadores de oligonucleótidos utilizados para la ampliación PCR son:

5' ATG GTT TTA GAA ATC ATC AAG CCT AGG GCA 3' (SEC ID NÚM: 1)

5' AAT GAA AGG AGG GGA GGA TGA CAG AAA TGT 3' (SEC ID NÚM:2)

- 15 MgCl<sub>2</sub> se usa a una concentración final de 1 mM, y los cebadores de PCR se usan a 0,8 μM. Se añade DMSO al 5% y molde de DNA a 150ng/50 μl PCR. La ciclización se realiza a [95°C, 1 min] x 1; [94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 2 min] x 35; [72°C, 5 min] x 1; 4°C.

Para cada reacción de PCR, se añaden 2,5 unidades de Fnu 4H1 además de 2 μl de tampón de restricción 10X específico. La incubación se realiza a 37°C durante una noche. La electroforesis se efectúa con 9% PAGE.

- 20 El digesto de Fnu 4H1 producirá una banda constante de 76 bp (presente independientemente del alelo), y otras dos bandas de 29 y 124 bp para el alelo 1, y otra banda individual de 153 bp para el alelo 2. Las frecuencias para los dos alelos son 0,71 y 0,29.

IL-1B (-511). El marcador de IL-1B (-511) puede genotipificarse de acuerdo con el siguiente procedimiento. El número de acceso génico es X04500. Los cebadores de oligonucleótidos utilizados para la ampliación PCR son:

- 25 5' TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC 3' (SEC ID NÚM:3)

5' GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT 3' (SEC ID NÚM:4)

- 30 MgCl<sub>2</sub> se usa en una concentración final de 2,5 mM, y los cebadores de PCR se usan a 1 μM. La ciclización se realiza a [95°C, 1 min] x 1; [95°C, 1 min; 53°C, 1 min; 72°C, 1 min] x 35; [72°C, 5 min] x 1; 4°C. Cada reacción de PCR se divide en dos alícuotas: a una alícuota se le añaden 3 unidades de Ava I, a la otra se le añaden 3,7 unidades de Bsu 361. A ambas alícuotas se le añaden 3 μl del tampón de restricción 10X específico. La incubación se efectúa a 37°C durante una noche. La electroforesis se lleva a cabo con 9% PAGE.

- 35 Cada una de las dos enzimas de restricción corta uno de los dos alelos, lo que permite el análisis RFLP. Ava I producirá dos fragmentos de 190 y 114 bp con el alelo 1, y no cortará el alelo 2 (304 bp). Bsu 361 producirá dos fragmentos de 190 y 11 pares de bases con el alelo 2, y no cortará el alelo 1 (304 bp). Las frecuencias de los dos alelos son 0,61 y 0,39.

## ES 2 431 671 T3

IL-1B (+3954). El marcador de IL-1B (+3954) puede genotipificarse de acuerdo con el siguiente procedimiento. El número de acceso génico es X04500. Los cebadores de oligonucleótidos utilizados para ampliación PCR son:

5' CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA A 3' (SEC ID NÚM:5)

5' GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG 3' (SEC ID NÚM:6)

5 MgCl<sub>2</sub> se usa en una concentración final de 2,5 mM, y el molde de DNA a 150 ng/50 µl PCR. La ciclización se realiza a [95°C, 2 min] x 1; [95°C, 1 min; 67,5°C, 1 min; 72°C, 1 min] x 35; [72°C, 5 min] x 1; 4°C. A cada reacción de PCR se le añaden 10 unidades de Taq I (Promega) además de 3 µl del tampón de restricción 10X específico. La incubación se efectúa a 65°C durante una noche. La electroforesis se lleva a cabo con 9% PAGE.

10 El digesto de la enzima de restricción produce una banda constante de 12 bp y o bien otras dos bandas de 85 y 97 bp correspondientes al alelo 1, o una sola banda de 182 bp correspondiente al alelo 2. Las frecuencias para los dos alelos son 0,82 y 0,18.

IL-1B (-3737): Los métodos para detección de este alelo se describen en detalle en la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 60/331,681, presentada el 19 de noviembre de 2001.

15 IL-1RN (+2018). Los cebadores de PCR se diseñan (se aparean incorrectamente a la secuencia genómica) para modificar genéticamente dos sitios de corte de enzimas en los dos alelos para permitir el análisis RFLP. El número de acceso génico es X64532. Los cebadores de oligonucleótidos son:

5' CTATCTGAGGAACAACCAACTAGTAGC 3' (SEC ID NÚM:7)

5' TAGGACATTGCACCTAGGGTTTGT 3' (SEC ID NÚM:8)

20 La ciclización se efectúa a [96°C, 1 min]; [94°C, 1 min; 57 °C, 1 min; 70°C, 2 min;] x 35; [70°C, 5 min] x 1; 4 °C. Cada reacción PCR se divide en dos alícuotas de 25 µl: a una se le añaden 5 unidades de Alu 1, a la otra 5 unidades de Msp 1, además de 3 µl del tampón de restricción 10X específico. La incubación se realiza a 37°C durante una noche. La electroforesis se efectúa con PAGE 9%.

25 Las dos enzimas cortan respectivamente los dos alelos distintos. Alu 1 producirá 126 y 28 bp fragmentos para el alelo 1, mientras que no digierirá el alelo 2 (154 bp). Msp 1 producirá 125 y 29 bp con el alelo 2, mientras que no cortará el alelo 1 (154 bp). En consecuencia, las dos reacciones (separadas de lado a lado en PAGE) proporcionarán patrones invertidos de digestión para homocigotos, y patrones idénticos en heterocigotos. Las frecuencias alélicas son 0,74 y 0,26. IL-1B (-3737) e IL-1B(-1464)

30 La genotipificación se logra efectuando reacciones de polimerasa en cadena (PCR) separadas que se dirigen específicamente a la secuencia circundante de cada SNP que se esté estudiando. Todos los productos de PCR de una muestra individual luego se combinaron, se trataron con exonucleasa I y fosfatasa alcalina de langostino (USB), y después se diluyeron con agua de Tipo I. Se efectuó entonces una reacción de extensión en base individual múltiple (SBE) empleando el kit Genome Lab SNPStart Primer Extension (Beckman-Coulter), los productos de PCR y una mezcla de cebadores SBE (donde cada uno se dirige específicamente a un SNP).

35 La reacción SBE añade una base marcada fluorescente específica de nucleótidos al extremo 3' del cebador específico de SNP. Dos láseres detectan subsiguientemente el cebador marcado después de la separación capilar dentro del instrumento Beckman Coulter CEQ8800. Los resultados se analizan con el software y se exhiben como picos coloreados, donde cada color representa una base distinta. La presencia de un pico de un solo color indica un homocigoto, mientras que dos picos de distintos colores indican un heterocigoto.

40 Las muestras se comparan con un estándar de tamaño comercial que se pasa como un marco de referencia. También se pasan una muestra de genotipo desconocido y un control sin molde con cada lote de muestras como medida del control de la calidad.

Los siguientes cebadores, que se exponen en la Tabla 6, se usaron para detectar los alelos de IL-1B (-3737) e IL-1B(-1464).

Tabla 6			
Nombre del cebador	Secuencia	Tipo	SEC ID NÚM:
3737_F1	ACATCAGGGAAAAGCCATTG	PCR	9
3737_R1	TGGGAATGGGCACTATGATT	PCR	10
1468_F1	AAATCAGAAGGCTGCTTGGA	PCR	11
1468_R1	ATGGGTGAATGGGAATTTGA	PCR	12
SBE_1468-F1	GCACAGAGGCTCACTCCCTTG	Genotipo	13
SBE_3737_R3	GATTGGGGACATGCAGAGTCCAAGG	Genotipo	14

5 Ejemplo 2: los sujetos con genotipos de gran inflamación y niveles mayores de proteína C reactiva (CRP), IL-6 e IL-1ra tuvieron niveles iniciales de insulina mayores que los sujetos con genotipos de poca inflamación.

10 Como se indicó previamente (U.S.S.N. documento 11/586,995, presentado el 25 de octubre de 2006), los alelos IL-1A (+4845) 1.2 o 2.2; IL-1B (+3954) 1.2 o 2.2; e IL-1B (-511) 1.1 se asocian con niveles de inflamación más altos, en oposición a los alelos IL-1A (+4845) 1.1; IL-1B (+3954) 1.1; IL-1B (-511) 1.2 o 2.2; y IL-1RN (+2018) 1.2 o 2.2. Se seleccionaron para este estudio mujeres con sobrepeso pero por lo demás con buena salud. Eran todas mujeres premenopáusicas entre 20 y 49 años de edad, y el grupo de mujeres tenía un IMC promedio de 29. Las mujeres se genotipificaron para clasificarlas dentro de los genotipos de inflamación mayor o menor anteriormente descritos. El grupo genéticamente predispuesto a niveles mayores de inflamación se denomina aquí grupo H y el grupo genéticamente predispuesto a niveles menores de inflamación se denomina aquí grupo L. Las mujeres que no calificaban para ninguno de los dos grupos fueron excluidas del estudio. El grupo H contenía 11 sujetos y el grupo L contenía 17 sujetos. Dos mujeres fueron excluidas del grupo H porque se descubrió posteriormente que deberían haber sido excluidas debido a sus genotipos.

15 Las mujeres ayunaron durante una noche y luego recibieron una comida rica en grasa y glucosa. Al inicio y durante las siguientes ocho horas, se les extrajo sangre y se les midieron los niveles de insulina. Las mujeres del grupo H mostraron un nivel de insulina inicial significativamente mayor en la sangre que las mujeres del grupo L (12,20 frente a 8,80  $\mu$ U/ml,  $p=0,046$ ). Las mujeres del grupo H también exhibieron resistencia a la insulina significativamente mayor que las mujeres del grupo L por dos cálculos que implican valores de insulina inicial +/- glucosa de Fórmula 1:  $1/\text{insulina en ayunas}$ ,  $p=0,01$ , y Fórmula 2:  $22,5/[\text{insulina en ayunas} \times (\text{glucosa en ayunas} / 18,01)]$ ,  $p=0,03$ ). (Florez JC, *et al.* N Engl J Med 2006;355:241-50). Las mujeres del grupo H no exhibieron segregación de insulina significativamente diferente a las mujeres del grupo L (fórmulas que implican puntos de tiempo inicial y a los 30 min).

20 Asimismo, las mujeres del grupo H tuvieron niveles de CRP, IL-6 e IL-1Ra superiores que las mujeres del grupo L. Además, las mujeres del grupo H tuvieron mayor estimulación de liberación de IL-6 a las 6 horas.

Ejemplo 3. Uso de genotipos de IL-1B para pronosticar niveles de IL-1 $\beta$  y proteína C reactiva.

25 La inflamación parece ser un mecanismo central en el inicio y el avance de múltiples enfermedades crónicas de envejecimiento. Entre las personas manifiestamente sanas, algunos individuos se encuentran consistentemente en el intervalo superior para ciertos mediadores inflamatorios, como IL-1 $\beta$  y proteína C reactiva (CRP). A su vez, en comparación con aquellos en el extremo inferior del espectro, estos individuos conllevan mayor riesgo de muchas enfermedades. Los factores tales como fumar, el índice de masa corporal y la terapia de reemplazo de hormonas explican una parte de la varianza de mediadores inflamatorios en individuos manifiestamente sanos, pero las diferencias genéticas también parecen ser un determinante importante de varianza inter-individual en los niveles de mediadores inflamatorios. Aquí demostramos haplotipos que se correlacionan con una mayor expresión de IL-1 $\beta$  y una mayor expresión de CRP, conduciendo a la correlación de estos haplotipos, y los alelos contenidos dentro de estos haplotipos con inflamación e inicio y progreso de muchas enfermedades crónicas asociadas con el envejecimiento.

30 La inflamación es un componente importante de múltiples enfermedades, y la interleucina-1, que es regulada por el complejo génico de IL-1, es un iniciador primario del proceso de inflamación. A continuación demostramos que ciertos pares de haplotipos de IL-1B son predictivos de una mayor expresión de IL-1 $\beta$  en fluido de surco gingival, como también de niveles más altos de CRP en suero.

La muestra del estudio se seleccionó del estudio Riesgo de Aterosclerosis en las Comunidades (*Atherosclerosis Risk in Communities* o *ARIC*), como se describe más abajo. La muestra del estudio que se utiliza a continuación comprende los 900 sujetos caucásicos del estudio ARIC tanto con exámenes odontológicos como con genotipos de IL-1. Se evaluaron los niveles de IL-1 $\beta$  de estos sujetos a partir de las muestras de fluido del surco gingival (GCF).  
 5 Ya que el epitelio del surco gingival está en contacto constante con una biopelícula microbiana, el nivel de IL-1 $\beta$  dentro del fluido del surco gingival representa un trasudado del suero que se enriquece con la respuesta del tejido gingival evocada que ha alcanzado un estado estable. Se recogió fluido del surco gingival como se describió previamente en detalle (Champagne et al., *Periodontology* 2000, 2003; 31: 167-180). En síntesis, se eluyeron cuatro tiras de GCF y se analizaron por separado (desde la superficie mesio-lingual de cada primer molar) de cada sujeto y  
 10 se combinaron para proporcionar un valor promedio de pacientes en pg/mL. Las concentraciones de IL-1 $\beta$  se midieron en la tira de GCF, usando enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA, Caymen Chemical Ann Arbor, MI).

La proteína C reactiva (CRP) en suero se midió, en estos sujetos, con un ensayo de alta sensibilidad. Se tomaron muestras de sangre en ayunas de todos los sujetos y se congeló el suero para posterior análisis, como se describió previamente (Papp et al. *Thrombosis & Haemostasis* 1989 61(1): 15-19). Las concentraciones de proteína C reactiva  
 15 (CRP) en suero se midieron por nefelometría potenciada por látex (ensayo de CRP de alta sensibilidad) en un nefelómetro BNII (Dade Behring, Deerfield, IL). El ensayo de CRP de alta sensibilidad en BN II utiliza un anticuerpo monoclonal acoplado a partículas de poliestireno y mediciones nefelométricas cinéticas en tiempo fijo. Este sistema totalmente automático crea una curva estándar de siete puntos desde 0,4975  $\mu$ g/ml (dilución 1:40 de Rh Standard SL) a 0,0078  $\mu$ g/ml (dilución 1:2560). BN II efectúa una dilución 1:400 para medir las concentraciones de CRP de la muestra entre 3,5 y 210 mg/L y una dilución 1:20 debajo de 3,5 mg/L. Éste es un ensayo que cumple con los  
 20 requisitos de la FDA y CLIA. Los individuos con valores por encima o debajo de los límites de detección se excluyeron del análisis.

Ya que el volumen de GCF y la composición de la proteína están influenciados por la inflamación del tejido local, se incluyeron dos criterios de valoración periodontales en el estudio como covariables. Un criterio de valoración fue la  
 25 determinación del porcentaje de profundidades de bolsas de 4 milímetros o más. La segunda variable es la medida compuesta de la enfermedad periodontal de la profundidad de la bolsa, hemorragia en el sondaje y nivel de fijación interproximal de 3 milímetros o más medidos en una escala ordinal de 6 puntos. Esta medida compuesta es una versión más detallada de un índice creado para determinar el estado inflamatorio de la interfaz tejido periodontal-biopelícula (Offenbacher et al., *Oral Biosci Med.* 2005; 213:215-220).

Se recogieron muestras de sangre en tubos que contenían ácido etilendiamintetracético (EDTA), y se extrajo DNA para genotipificación en Division of Genomic Medicine, University of Sheffield, Sheffield, Reino Unido. La sangre  
 30 usada para factores de plasma se centrifugó y congeló a -70° hasta ser analizada. Todos los análisis genéticos y de sangre fueron realizados por personas que desconocían otros datos.

Se ensayaron polimorfismos de nucleótidos sencillos (SNP) en tres sitios dentro del promotor de IL-1B, IL-1B(-511) (transición C $\rightarrow$ T), IL-1B(-1464) (transición G $\rightarrow$ C) e IL-1B(-3737) (transición C $\rightarrow$ T). También se genotipificaron dos  
 35 SNP adicionales, IL-1A(+4845) (transición G $\rightarrow$ T) e IL-1B(+3954) (transición C $\rightarrow$ T) para facilitar las comparaciones con otros estudios. El primer nucleótido diseñado para cada polimorfismo es el alelo común en personas caucásicas (p. ej., -511C) y se denomina "1", mientras que el segundo nucleótido (p. ej., -511T) es el alelo menos común y se denomina "2". La genotipificación se realiza con el ensayo Taqman™ de 5' nucleasa, como se describió previamente (diGiovine et al., 2000 *Detection and population analysis of IL-1 and TNF gene polymorphisms*. En: *Cytokine Molecular Biology*. Oxford University Press, Oxford, UK Practical Approach Series, Capítulo 2, pág. 21-46).

Se utilizó HAPLO.SCORE (Schaid, *Am J Hum Genet.* 2002; 70:425-434) para identificar las frecuencias de haplotipos con frecuencias no insignificantes (>0,5%). Después, se formó cada par posible de haplotipos extraído de  
 45 este conjunto, y se determinó si los grupos de pares de haplotipos resultantes podrían recrearse de forma no ambigua a partir de genotipos desconocidos de la fase de los SNP del individuo.

Se ensayó la hipótesis nula total de los niveles de IL-1 $\beta$  promedio equivalentes en todos los grupos de pares de haplotipos usando análisis de varianza (ANOVA) con grados de libertad equivalentes al número total de grupos  
 menos uno. Los valores transformados por logaritmos se usaron debido a una distorsión en la distribución de IL-1 $\beta$ .

Para identificar grupos de haplotipos específicos asociados con altos niveles de IL-1 $\beta$ , se compararon los niveles promedio de IL-1 $\beta$  entre cada pares de grupos de haplotipos. Después, se calcularon los valores p nominales para  
 50 cada comparación. Los pares se clasificaron del más significativo al menos significativo. Finalmente, se buscaron los patrones de complejos de haplotipos entre los pares más significativos.

Se usó regresión lineal para estimular la magnitud de diferencia en IL-1 $\beta$  para diferentes grupos de pares de haplotipos. Para esto, se identificó el conjunto de covariables no genéticas que se asocia con IL-1 $\beta$ . Luego, con  
 55 estas covariables en el modelo, se añadieron las variables indicadoras para los grupos de pares de haplotipos. Se tomó un planteamiento similar para el análisis de CRP, excepto que se calcularon valores p de un solo lado para reflejar una expectativa *a priori* de la dirección del efecto basado en los resultados de IL-1 $\beta$ .

Las características demográficas de los 900 participantes caucásicos del estudio se presentan en la Tabla 7. El grupo de estudio estuvo conformado por 900 sujetos caucásicos. Los valores más-menos son la  $\pm$  SD.

Tabla 7. Características de los sujetos.

Variables

Edad — años	61,7 $\pm$ 5.3
Sexo femenino — no. (%)	498 (55)
Fumadora actual— no. (%)	199 (22)
Diabetes — no. (%)	133(15)
Índice de masa corporal — kg/m <sup>2</sup>	27,9 $\pm$ 5,0
IL-1 $\beta$ — pg/ml	
Mediana	155
Rango intercuartílico	95-235
Proteína C reactiva — mg/L	
Mediana	4,2
Rango intercuartílico	1,9-8,9

5

Se ha notificado previamente que el gen para IL-1B no tuvo SNP exónicos no sinónimos detectables y tuvo cuatro SNP en la región potenciadora del promotor, lo que indicó que la actividad funcional dependía del contexto del haplotipo. En múltiples grupos étnicos estudiados, dos de los SNP funcionales, IL-1B(-31) e IL-1B(-511), concordaron perfectamente; por ende, usamos los tres SNP que se indican en la Tabla 8 para caracterizar la variación genética de IL-1B funcionalmente importante. La transición de nucleótidos en el locus indicado que se muestra tiene el primer nucleótido como el alelo más frecuente, es decir, el alelo 1, en poblaciones caucásicas. “ND” significa que no se detectó el alelo en la población de estudio.

10

Tabla 8. Frecuencias del haplotipo promotor

	IL-1B(-511)	IL-1B(-1464)	IL-1B(-3737)	Frecuencia
Haplotipo	(C a T)	(G a C)	(C a T)	
B1	1	1	2	46%
B2	2	2	1	28%
B3	1	1	1	20%
B4	2	1	1	6%
B5	1	2	1	ND
B6	1	2	2	ND
B7	2	1	2	ND
B8	2	2	2	ND

El análisis de la población conformada por 900 sujetos caucásicos que emplea HAPLO.SCORE (Schaid 2002) indicó que de los ocho haplotipos de tres SNP potenciales, solamente se detectaron cuatro haplotipos, que han denotado B1, B2, B3 y B4 (Tabla 8).

15

Dados los cuatro haplotipos observados, existen diez patrones posibles de genotipos de tres SNP (fase de ignorancia) que surgen de estos haplotipos (Tabla 9).

20

Tabla 9. Posibles genotipos compuestos de 4 haplotipos observados

Pares de haplotipos	IL-1B(-511)	IL-1B(-1464)	IL-1B(-3737)	Frecuencia
B1 / B1	1.1	1.1	2.2	22%
B1 / B2	1.2	1.2	1.2	25%
B1 / B3	1.1	1.1	1.2	17%
B1 / B4	1.2	1.1	1.2	8%
B2 / B2	2.2	2.2	1.1	7%
B2 / B3	1.2	1.2	1.1	12%
B2 / B4	2.2	1.2	1.1	3%
B3 / B3	1.1	1.1	1.1	4%
B3 / B4	1.2	1.1	1.1	2%
B4 / B4	2.2	1.1	1.1	<1%

5 Ya que cada uno de los diez pares de haplotipos es único, los haplotipos pueden asignarse de manera no ambigua para cualquier individuo. Se observaron los diez patrones de genotipos compuestos posibles en la población de estudio, pero menos de 1% de los individuos (n=3) eran homocigotos para el haplotipo B4 (Tabla 9). A su vez, señalamos que IL-1B(-511) e IL-1B(-1464) confieren en gran medida la misma información en esta población de sujetos caucásicos, ya que concuerdan con todos los haplotipos excepto el menos común, B4.

10 Se ensayaron primero los genotipos que se correlacionan con los niveles de expresión de IL-1 $\beta$ , la hipótesis nula de que los niveles de proteína de IL-1 $\beta$  promedio (logIL-1 $\beta$ ) fueron iguales en los diez pares de haplotipos que se indican en la Tabla 9. Se rechazó la hipótesis nula (ANOVA; 9 grados de libertad; p=0,005), indicando que había niveles de IL-1 significativamente diferentes (3 niveles basados en los pares de haplotipos. La exclusión del pequeño grupo de B4/B4 no impactó sobre esta conclusión (p=0,003).

15 Habiendo establecido una diferencia total en el logaritmo promedio de IL-1 $\beta$  en los grupos de pares de haplotipos, giramos la atención a la identificación de un conjunto específico de pares de haplotipos asociados con altos niveles de citocina. Para ello, comparamos cada par de haplotipos contra otro par, produciendo comparaciones y caracterizamos los dos terciles de comparaciones con los valores p más significativos (Tabla 10). La concentración de proteína IL-1 $\beta$  logarítmica de fluido gingival para individuos con cada uno de los diez pares de haplotipos de IL-1 posibles se comparó con otro par, y las comparaciones más significativas se enumeran en orden de valores p nominales. La primera columna desde la izquierda indica el par de haplotipos con la mayor proteína IL-1 $\beta$  en esta comparación específica. La segunda columna desde la izquierda indica el par de haplotipos con la menor proteína IL-1 $\beta$  en esta comparación específica. La columna marcada como "porcentaje más alto" indica que el porcentaje promedio aumenta en el nivel de proteína IL-1 $\beta$  en individuos con el más alto par de haplotipos de IL-1, en comparación con individuos con el más bajo par de haplotipos de IL-1. La columna marcada como "Rango" indica el rango relativo de las 30 comparaciones de pares de haplotipos más significativas. Los pares marcados con un asterisco (\*) son los pares de haplotipos en las comparaciones más significativas que están compuestos por el genotipo 1/1 en IL-1B(-511). Los pares marcados con una cruz (†) son los pares de haplotipos en las comparaciones más significativas que están compuestos por el genotipo 1/2 en IL-1B(-511) y 1/1 en IL-1B(-3737).

20

25

Tabla 10.

Par de haplotipos más altos	Par de haplotipos más bajos	Porcentaje más alto	Valor p nominal	Rango
B1/B1*	B1/B2	39%	0	1
B1/B3*	B1/B2	32%	0,002	2
B3/B3*	B1/B2	53%	0,006	3,5
B1/B1*	B1/B4	37%	0,006	3,5
B1/B1*	B2/B2	34%	0,008	5
B1/B3*	B1/B4	30%	0,025	6
B3/B3*	B1/B4	51%	0,027	7
B3/B3*	B2/B2	48%	0,032	8,5
B1/B3*	B2/B2	27%	0,032	8,5
B1/B1*	B2/B3†	19%	0,042	10
B3/B4†	B1/B2	47%	0,066	11
B3/B3*	B2/B3	32%	0,072	12
B3/B4†	B1/B4	46%	0,081	13,5
B2/B3†	B1/B2	17%	0,081	13,5
B3/B4†	B2/B2	42%	0,099	15
B1/B1*	B2/B4	24%	0,113	16
B3/B3*	B2/B4	37%	0,129	17
B1/B3*	B2/B3†	13%	0,132	18
B3/B4†	B2/B4	32%	0,151	19
B1/B1*	B4/B4	48%	0,169	20
B3/B3*	B1/B3*	16%	0,173	21
B2/B3†	B1/B4	15%	0,182	22
B3/B4†	B2/B3†	26%	0,19	23
B1/B3*	B2/B4	18%	0,191	24
B3/B4†	B4/B4	57%	0,196	25
B1/B3*	B4/B4	40%	0,214	26
B2/B3†	B2/B2	12%	0,217	27,5
B3/B3*	B4/B4	63%	0,217	27,5

A partir de esta evaluación, hallamos que los pares de haplotipos se dividen muy bien en tres grupos. El primer grupo comprende cualquier combinación de los haplotipos B1 y B3 (marcados con los asteriscos (\*) en la Tabla 10). El segundo grupo incluye individuos con una copia de B3 y una copia o bien de B2 o de B4 (marcados con cruces (†) en la Tabla 10). El tercer grupo incluye todas las demás combinaciones.

De las 28 comparaciones de pares de haplotipos más significativas, el primer grupo, es decir los individuos con cualquier combinación de B1 y B3, ocurre como el par de haplotipos de "IL-1β alto" 21 de 28 veces y nunca es un par de haplotipos de "IL-1β bajo" en relación con cualquier otro par de haplotipos. El segundo grupo, es decir, individuos con una copia de B3 y una copia o bien de B2 o de B4, ocurre las otras 9 de 28 veces como el par de

haplotipos de “IL-1 $\beta$  alto” y es el par de haplotipos de “IL-1 $\beta$  bajo” en las comparaciones más significativas solamente cuando se compara con los pares de haplotipos en el primer grupo. La regresión lineal reveló que, en relación con el tercer grupo (42,6% frecuencia), el primer grupo (42,7% frecuencia) tiene un 33% de aumento de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,0001$ ) y el segundo grupo (14,8% frecuencia) tiene un 28% de aumento de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ).

5 El fluido gingival es un trasudado de suero que también refleja la inflamación del tejido periodontal local. Ya que los niveles de IL-1 $\beta$  de fluido gingival se asocian fuertemente con la gravedad de la enfermedad periodontal local, el análisis incluyó el ajuste para dos criterios de valoración de intensidad de la enfermedad periodontal disponibles en esta base de datos: 1) porcentaje de profundidad de las bolsas periodontales que exceden los 4 mm, y 2) una medida compuesta de la enfermedad periodontal. Con los dos criterios de valoración periodontales incluidos en el modelo, ninguna otra covariable, excepto para los genotipos de IL-1, fue un factor pronóstico de los niveles de IL-1 $\beta$  en GCF.

10 El primer grupo de IL-1 $\beta$  que sobrexprende los pares de haplotipos se traduce más simplemente en portación de 1/1 en IL-1B(-511). De modo equivalente, el segundo grupo incluye aquellos que son tanto 1/2 en IL-1B(-511) como 1/1 en IL-1B(-3737). Dado que el grupo que comprende individuos con 1/1 en IL-1B(-511) es relativamente grande (>40% de esta población de estudio), repetimos nuestro análisis dividiendo en sus tres grupos de pares de haplotipos: B3/B3, B1/B3 y B1/B1. Cada uno de estos componentes, como también el grupo B2/B3+B4/B3, tuvo niveles significativamente más altos de IL-1 $\beta$  que el resto de los individuos (Figura 24). Cabe destacar que solamente dos de estos cuatro grupos se asociaron con un aumento de CRP en suero, a saber B3/B3 y B2/B3+B4/B3 (Figura 1).

15 Los dos grupos asociados con mayores niveles de CRP se distinguen de los otros patrones pro-inflamatorios por carácter de homocigoto para el alelo común (1/1) en IL-1B(-3737). El grupo de B3/B3 y B2/B3+B4/B3 combinado tuvo 33% de valores de CRP superiores frente a todos los demás ( $p = 0,007$ ) después del ajuste para IMC, cigarrillo y género.

20 Dos SNP adicionales en el complejo génico de IL-1, IL-1A(+4845) e IL-1B(-3954), se han asociado con expresión diferencial de mediadores inflamatorios (Berger 2002) y fenotipos clínicos, y típicamente la portación de los alelos menores se ha notificado como pro-inflamatoria. La frecuencia de portar un alelo menor tanto en IL-1A(+4845) como en IL-1B(-3954) es de 35% en nuestra población de estudio, pero esta frecuencia aumenta a 84% en el grupo de B3/B3 y B2/B3+B4/B3 en comparación con 23% en otros. En estos datos, el conjunto de CRP se asoció menos fuertemente con IL-1A(+4845), IL-1B(+3954) o compuestos de estos dos SNP que en el grupo combinado de B3/B3 y B2/B3+B4/B3.

25 Otro par de haplotipos pro-inflamatorio se caracteriza por un genotipo 1/2 en IL-1B(-511) junto con un genotipo 1/1 en IL-1B(-3737). Se ha notificado que los individuos con 1/2 en IL-1B(-511) también conllevan mayor riesgo de criterios de valoración clínicos y bioquímicos, pero menos significativamente que aquellos que portan 1/1 en IL-1B(-511). Como se indica en la presente memoria, este grupo de riesgo intermedio de heterocigotos está realmente comprendido por dos grupos distintos, uno con 1/1 en IL-1B(-3737) y el otro con 1/2 en IL-1B(-3737). El primero, especulamos, estaría asociado con criterios de valoración clínicos y mediciones bioquímicas, tal vez tan significativamente como aquellos que portan 1/1 en IL-1B(-511), y el segundo sería más similar a aquellos con 2/2 en IL-1B(-511). En esta población caucásica, aproximadamente 47% de los individuos portó IL-1B(-511) genotipo 1/2, que se dividió entre 14% de la población que también portó IL-1B(-3737) genotipo 1/1 y 33% que también portó IL-1B(-3737) genotipo 1/2. En esta población, ningún individuo portó IL-1B(-511) genotipo 1/2 ni IL-1B(-3737) genotipo 2/2.

30 El trabajo previo ha descubierto que los haplotipos con el alelo 2 (nucleótido C) en IL-1B(-1464) demuestra consistentemente una menor actividad del promotor en ambos constructos sencillos de SNP y haplotipo. En individuos caucásicos, la mayoría de los haplotipos con IL-1B(-511) alelo 2 también incluyeron IL-1B(-1464) alelo 2 (haplotipo B2 = 28% frente a B4 = 6%). Esto coincide con la observación en este estudio de que los genotipos compuestos por dos copias del haplotipo B2 tuvieron los niveles más bajos de IL-1 $\beta$ . A su vez, los genotipos que incluyeron una copia de B2 indicaron mayores niveles de IL-1 (3 solamente si también tenían el genotipo 1/1 (C/C) en IL-1B(-3737). Los componentes de NF- $\kappa$ B demuestran una mayor unión a IL-1B(-3737) alelo 1 en comparación con el alelo 2, y el alelo 1 en este locus aumentó la actividad de los constructos promotores en ciertos haplotipos.

35 IL-1B(-3737) también parece ser un determinante clave de si un patrón del promotor de IL-1 B asociado con alto IL-1 $\beta$  está también asociado o no con el aumento de los niveles de CRP en el suero. Específicamente, los individuos que portan por lo menos un alelo 2 en IL-1B(-3737) no parecen manifestar altos valores de CRP, incluso si tienen altos valores de IL-1 $\beta$ . Esto puede deberse a diferencias temporales potenciales en la expresión de IL-1 $\beta$ , y posteriores efectos diferenciales en dirección 3', con haplotipos que incluyen distintos alelos de IL-1B(-3737).

40 Múltiples estudios han reportado la asociación de otros SNP de IL-1 con resultados clínicos y mediciones bioquímicas. Frecuentemente, los autores han concluido que la portación de alelos menores en IL-1A(+4845) y/o IL-1B(+3954) representa un genotipo pro-inflamatorio. Por ejemplo, el alelo 2 en IL-1B(+3954) se asocia fuertemente con un aumento de CRP en individuos que presentan cateterismo cardíaco. No obstante, no todos los estudios demuestran dicha significación. Una posibilidad es que IL-1A(+4845) e IL-1B(+3954) actúen solamente como

sustitutos para las variantes genéticas causales, posiblemente definidas por grupos de pares de haplotipos de IL-1B. De hecho, entre nuestros grupos de pares de haplotipos asociados con una expresión de IL-1p logarítmica elevada, 84% portaron un alelo menor en IL-1A(+4845) y en IL-1B(-3954) en comparación con 23% en el resto de los grupos de pares de haplotipos.

- 5 A su vez, con el fin de validar el potencial pro-inflamatorio de los pares de haplotipos de IL-1 específicos que se asocian con niveles más altos de IL-1 p en trasudados gingivales, se recogieron las PBMC de una población separada de individuos (n=70). La producción de IL-1β por parte de las PBMC se analizó después de la estimulación con lipopolisacárido (LPS). Estos resultados se resumen en la Tabla 11.

10 Tabla 11. Producción de proteína de IL-1β por células mononucleares de sangre periférica de sujetos con distintos pares de haplotipos de IL-1B

Pares de haplotipos del promotor de IL-1B	N <sup>2</sup>	Diferencia media de IL-1β (ng/ml) después de la estimulación LPS <sup>3</sup>	SD <sup>4</sup>	Incremento sobre referencia	Valor p
B1/B1	20	2,51	3,18	199%	0,002
B1/B3	10	1,56	4,07	86%	0,33
B3/B3	4	3,25	2,11	287%	0,019
B3/B2 o B4	7	2,36	2,26	181%	0,012
<u>Grupo de referencia</u>	29	0,84	2,92		
Total	70				

<sup>1</sup>El grupo de referencia incluye todos los haplotipos posibles de IL-1B B1 a B4, distintos de los cuatro pares de haplotipos anteriormente especificados

<sup>2</sup>Número de sujetos con el par de haplotipos indicado

- 15 <sup>3</sup>Diferencia de la media geométrica de la proteína IL-1β producida por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas con lipopolisacárido (LPS) en comparación con una producción inicial no estimulada (estimulada menos no estimulada). Todos los ensayos se realizaron por duplicado por una persona que desconocía el genotipo.

<sup>4</sup>Desviación estándar

- 20 <sup>5</sup>Porcentaje de aumento de la producción de la proteína IL-1β por las PBMC del par de haplotipos de IL-1B indicado comparado con la producción por parte de las PBMC del grupo de referencia, p. ej., ((diferencia de B1/B1 después de la estimulación con LPS)- diferencia del grupo de referencia después de la estimulación con LPS) /(diferencia del grupo de referencia después de la estimulación con LPS) = % incremento; ((2,51-0,84)/0,84) = 1,99 x 100

- 25 Específicamente, se había determinado que los cuatro pares de haplotipos asociados con mayores niveles de IL-1β *in vivo* estimularon las PBMC. En tres de los cuatro grupos produjeron significativamente más proteína IL-1β que las células de aquellos con pares de haplotipos en el grupo de referencia. Las PBMC del cuarto grupo produjeron más proteína IL-1β que el grupo de referencia, pero la diferencia no fue significativa.

#### Materiales y métodos

- 30 Para estos experimentos, la muestra de estudio *in vivo* se seleccionó del estudio Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC), una investigación prospectiva de la aterosclerosis y sus secuelas clínicas. La cohorte basada en la población con ARIC contenía 15.792 sujetos de 45 a 65 años, seleccionados por muestreo de probabilidad de cuatro comunidades: Forsyth County, N.C.; Jackson, Miss.; Northwestern suburbs of Minneapolis, Minn.; y Washington County, Md. Se publica en otra parte una descripción detallada del diseño y los métodos del estudio ARIC (The ARIC Investigators, 1989). Como parte de un estudio complementario de enfermedad periodontal, un subconjunto de la población ARIC original se sometió a exámenes odontológicos y otro subconjunto se seleccionó para genotipificación de IL-1. La muestra del estudio comprendió los 900 sujetos caucásicos del estudio ARIC con ambos exámenes odontológicos y de genotipos de IL-1.

- Asimismo, se determinaron los niveles de IL-1 $\beta$  de muestras de fluido de surco gingival (GCF). Ya que el epitelio del surco gingival está en contacto constante con una biopelícula microbiana, el nivel de IL-1 $\beta$  dentro del GCF representa un trasudado de suero que está enriquecido por la respuesta del tejido gingival evocada local que ha alcanzado un estado estable. Por lo tanto, se recogió el GCF como se describió previamente en detalle. En síntesis, se eluyeron cuatro tiras de GCF y se analizaron por separado (desde la superficie mesio-lingual de cada primer molar) de cada sujeto y se combinaron para proporcionar un valor promedio del paciente en pg/mL. Las concentraciones de IL-1 $\beta$  se midieron en la tira de GCF, usando enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA, Caymen Chemical Ann Arbor, MI).
- Se vigiló otro marcador de respuesta inflamatoria, la proteína C reactiva (CRP), en el suero del sujeto con un ensayo de alta sensibilidad. Se tomaron muestras de sangre en ayunas de todos los sujetos, y se congeló el suero para posterior análisis como se describió previamente (Papp AC et al., *Thromb Haemost* 1989;61(1): 15-9.). Además, se midieron las concentraciones de proteína C reactiva (CRP) en suero por nefelometría potenciada con látex (ensayo de CRP de alta sensibilidad) en un nefelómetro BNII (Dade Behring, Deerfield, IL). El ensayo de CRP de alta sensibilidad en BNII utiliza un anticuerpo monoclonal unido a partículas de poliestireno y mediciones nefelométricas en tiempo fijo. Este sistema totalmente automático crea una curva estándar de siete puntos de 0,4975  $\mu$ g/ml (dilución 1:40 de Rh Standard SL) a 0,0078  $\mu$ g/ml (dilución 1:2560). El BNII efectúa una dilución 1:400 para medir las concentraciones de CRP en la muestra entre 3,5 y 210 mg/L, y una dilución 1:20 debajo de 3,5 mg/L. Este ensayo cumple con FDA, CLIA. Los individuos con valores por encima o debajo de los límites de detección se excluyeron del análisis.
- Ya que el volumen de GCF y la composición de la proteína pueden estar influenciados por inflamación del tejido local, se incluyeron en el estudio dos criterios de valoración periodontales como covariables. Un criterio de valoración fue la determinación del porcentaje de las profundidades de las bolsas de cuatro milímetros o más.
- La segunda variable fue una medida compuesta de la enfermedad periodontal de la profundidad de la bolsa, hemorragia en sondaje y nivel de sujeción interproximal de tres milímetros o más, medidos en una escala ordinal de seis puntos. Esta medida compuesta fue una versión más detallada de un índice desarrollado para determinar el estado inflamatorio de la interfaz tejido periodontal-biopelícula.
- Además, se recogieron muestras de sangre en tubos que contenían ácido etilendiamintetracético (EDTA), y se extrajo el DNA para genotipificación en Division of Genomic Medicine, University of Sheffield, Sheffield UK. La sangre usada para factores de plasma se centrifugó y congeló a -70° hasta que se analizó. Todos los análisis de sangre y genéticos fueron realizados por individuos que desconocían otros datos.
- Durante el curso de los experimentos, se ensayaron polimorfismos de nucleótidos sencillos (SNP) en tres sitios dentro del promotor de IL-1B, IL-1B(-511) (transición C $\rightarrow$ T), IL-1B(- 1464) (transición G $\rightarrow$ C) y IL-1B(-3737) (transición C $\rightarrow$ T). También se genotipificaron dos SNP adicionales, IL-1A(+4845) (transición G $\rightarrow$ T) e IL-1B(+3954) (transición C $\rightarrow$ T), para facilitar las comparaciones con otros estudios. El primer nucleótido designado para cada polimorfismo es el alelo común en individuos caucásicos (p. ej., -511C) y se denomina "1", mientras que el segundo nucleótido (p. ej., -511T) es el alelo menos común y se denomina "2". La genotipificación se realizó con el ensayo de 5' nucleasa TAQMAN™, como se describió previamente (di Giovine FS et al., *Cytokine Molecular Biology*. Oxford: Oxford University Press; 2000).
- La hipótesis nula de niveles de IL-1 $\beta$  promedio equivalentes se ensayó en todos los grupos de pares de haplotipos usando análisis de varianza (ANOVA) con grados de libertad equivalentes al número total de grupos menos uno. Para estos experimentos se usaron los valores transformados por logaritmos debido a una distorsión en la distribución de IL-1 $\beta$ .
- Asimismo, para identificar los grupos de haplotipos específicos asociados con altos niveles de IL-1 $\beta$ , los niveles promedio de IL-1 $\beta$  se compararon entre cada par de grupos de haplotipos. Luego, se calcularon los valores p nominales para cada comparación y se categorizaron los pares desde el más hasta el menos significativo. Finalmente, se buscaron los patrones de complejos de haplotipos entre los pares más significativos.
- Para analizar los datos, se usó la regresión lineal a fin de estimar la magnitud de diferencia en IL-1 $\beta$  para distintos grupos de pares de haplotipos. Para hacerlo, se necesitó identificar el conjunto de covariables no genéticas que se asocian con el IL-1 $\beta$ . Luego, con estas variables en el modelo, se añadieron las variables del indicador para los grupos de pares de haplotipos. Se tomó un planteamiento similar para análisis de CRP, excepto que se calcularon los valores p de un solo lado para reflejar una expectativa *a priori* de la dirección del efecto en base a los resultados de IL-1 $\beta$ .
- Para análisis estadístico, se usaron los valores P en tres modos distintos en este informe. Primero, para todo el ensayo de los niveles de IL-1 $\beta$  promedio equivalente, se usaron en el sentido de prueba de hipótesis tradicional. Es decir, el valor p reflejó la proporción de veces que uno esperaría una estadística tan grande o más grande que la observada si la hipótesis nula fuese verdadera. En segundo lugar, los valores p se usaron como un dispositivo para categorizar todas las comparaciones por emparejamiento de los grupos de pares de haplotipos. Esto permitió buscar patrones de haplotipos que subrayen cualquier diferencia significativa general. Finalmente, una vez que se

identificaron los grupos de pares de haplotipos (con optimismo con un patrón discernible de haplotipos constituyentes), se calcularon los valores p para el grupo de riesgo agregado en comparación con todos los otros grupos. Estos valores p no tomaron en cuenta la cuestión de comparación múltiple inherente en dicho procedimiento de agrupación.

- 5 Finalmente, el efecto de los pares de haplotipos de IL-1 $\beta$  sobre la liberación de IL-1 $\beta$  por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se determinó en voluntarios sanos, usando métodos similares a las descripciones anteriores (Iacovio L, *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2005;25(1):222-7). Además, las PBMC se obtuvieron de 75 voluntarios, de los cuales 70 habían completado los datos, y se les procesó sangre recién extraída como se describió anteriormente (Napoleone et al., *Circ Res* 2000;86(2): 139-43). La preparación de células mononucleares final se incubó con lipolisacárido (LPS; 0,1 microg/ml) durante 24 horas. Las células se sedimentaron y se midió el IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes por ELISA de alta sensibilidad (Amersham Pharmacia Biotech). Cada experimento se llevó a cabo por duplicado por operadores que desconocían la identidad de la muestra.

- 10 Los experimentos descritos en este Ejemplo demuestran de manera inequívoca que un análisis que emplea pares de haplotipos funcionales identificó genotipos de IL-1 que fueron significativamente asociados con un aumento de los biomarcadores inflamatorios *in vivo*. Ésta es la primera demostración de una relación entre niveles *in vivo* de un mediador inflamatorio y haplotipos de su promotor génico en ambos cromosomas. Estos hallazgos pueden aplicarse a otros genes inducibles y podrían proporcionar un marco lógico para explorar el riesgo de enfermedad relacionado con la variabilidad genética en la producción de mediadores patogénicos.

Ejemplo 4. El haplotipo B212 parecer ser protector contra enfermedad cardiovascular.

- 20 Los resultados de los experimentos descritos en este Ejemplo demuestran que los sujetos con el haplotipo B212 exhiben niveles inferiores de proteína C reactiva en comparación con sujetos sin B212. Se ha sugerido que B212 es un haplotipo protector contra enfermedad cardiovascular.

- 25 Como se indicó previamente (U.S.S.N. 11/586,995, presentado el 25 de octubre de 2006) los alelos de IL-1B, 1.2 o 2.2; y de IL-1B, 1.1 se asocian con niveles más altos de inflamación, en oposición a los alelos de IL-1A 1.1; IL-1B 1.1 e IL-1B 1.2 o 2.2. Este estudio demuestra que los sujetos con el haplotipo B212 exhiben niveles más bajos de proteína C reactiva en comparación con los sujetos sin B212, e indica que B212 es un haplotipo protector contra resistencia a la insulina, trastornos metabólicos y trastornos cardiovasculares.

- 30 En este estudio, la predisposición a trastornos metabólicos y cardiovasculares se ensayó en 281 sujetos control y en 291 sujetos coreanos con arteriopatía coronaria (CAD). Se compararon el IMC (índice de masa corporal), BPS (presión arterial sistólica), BPD (presión arterial diastólica), TG (triglicéridos), TCHOL (colesterol total), HDL (liproteína de alta densidad) y LDL (lipoproteína de baja densidad) entre los sujetos control y los sujetos con CAD con y sin el haplotipo protector B212.

- 35 El colesterol circulante es transportado por lipoproteínas-partículas de composición compleja de lípidos y proteínas que transportan lípidos en la sangre. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son los principales portadores de colesterol. Se cree que las LDL son responsables de la administración de colesterol desde el hígado (donde se sintetiza o se obtiene de fuentes alimentarias) hacia los tejidos extrahepáticos del organismo. La expresión "transporte de colesterol inverso" describe el transporte de colesterol desde los tejidos extrahepáticos hacia el hígado, donde se cataboliza y se elimina. Se cree que las partículas de HDL en el plasma cumplen una función importante en el proceso de transporte inverso, actuando como depuradores de colesterol en el tejido.

- 40 Los datos que vinculan el colesterol en suero elevado con la arteriopatía coronaria son abrumadores. Por ejemplo, la aterosclerosis es una enfermedad lentamente progresiva caracterizada por la acumulación de colesterol dentro de la pared arterial. Datos contundentes validan el concepto de que los lípidos depositados en las lesiones ateroscleróticas derivan principalmente de LDL de plasma; por ende, las LDL se han tornado popularmente conocidas como colesterol "malo". En contraste, los niveles de HDL en el suero se correlacionan inversamente con cardiopatía coronaria, de hecho, los altos niveles de HDL en el suero se consideran un factor de riesgo negativo. Se hipotetiza que los altos niveles de HDL en el plasma no solamente son protectores contra arteriopatía sino que realmente inducen la regresión de placas ateroscleróticas (véanse, p. ej., Badimon et al., 1992, *Circulation* 86 (Supl. III): 86-94). Por lo tanto, las HDL se han tornado popularmente conocidas como colesterol "bueno". La reducción de HDL y el aumento de TG también se asocian con síndrome metabólico.

Para estos experimentos, se aíslan niveles de HDL, LDL y TG de suero usando métodos conocidos en la técnica. La genotipificación se efectuó como se describe en el Ejemplo 1.

- 55 Como se resume en las Tablas 12 y 13, los sujetos control con el haplotipo B212 tienen una asociación superior con parámetros predictivos de menor riesgo de trastorno metabólico y enfermedad cardiovascular, tal como niveles inferiores de triglicéridos totales, niveles inferiores de LDL y niveles superiores de HDL en comparación con sujetos control sin el haplotipo B212 protector. Se hallaron resultados similares para sujetos que padecían CAD con el haplotipo B212 protector según lo comparado con sujetos que padecían CAD sin el haplotipo B212 protector. Por lo

tanto, los sujetos que padecen CAD y que portan el haplotipo B212 protector exhiben valores inferiores de TG y valores superiores de HDL comparados con sujetos sin el haplotipo B212 protector.

5 Asimismo, los sujetos que portaron el genotipo de B1B212 demostraron el inicio de CAD a una edad más tardía y menor presión arterial, niveles inferiores de triglicéridos, niveles superiores de HDL y niveles inferiores de CRP que los sujetos con otros genotipos. (Tabla 14). Los sujetos que portan solamente el alelo B212 exhibieron los mismos rasgos. (Tabla 15). Esto indica que los pacientes con CAD que tienen el haplotipo B212 tienen una asociación mayor con parámetros predictivos de menor riesgo de trastorno metabólico y enfermedad cardiovascular más severa.

Tabla 12

Tabla 12. Comparaciones de los parámetros de salud entre pacientes control con B212 y pacientes sin B212

Haplotipo		Edad		IMC		BPS		BPD		TG	
B212	N	promedio	SD	promedio	SD	promedio	SD	promedio	SD	promedio	SD
No	281	53,7	7,5	24,4	2,5	125,5	16,0	80,4	9,8	142,4	87,0
Sí	20	52,7	8,3	23,6	2,5	123,2	15,5	78,1	8,5	103,7	71,4
<i>p</i>											<i>p=0,04</i>

10

Haplotipo		TCHOL		HDL		LDL		CRP		Log CRP		Fibrinógeno	
B212	N	promedio	SD	promedio	SD								
No	281	195,7	33,7	49,9	11,9	117,9	30,4	1,20	3,50	-0,82	1,4	313,7	58,4
Sí	20	190,1	30,4	56,7	15,6	112,7	27,2	0,83	1,21	-1,12	1,48	298,7	53,6
<i>P</i> <i>p=0,01</i>													

Tabla 13. Comparaciones de los parámetros de salud entre pacientes control con B212 y pacientes sin B212

haplotipo		Age		BMI		BPS		BPD		TG	
B212	N	promedio	SD	promedio	SD	promedio	SD	promedio	SD	promedio	SD
No	292	53,8	7,5	24,8	2,2	122,8	16,5	79,7	8,7	147,1	84,0
Sí	7	56,3	9,7	26,1	1,2	120,1	14,1	78,1	11,7	123,0	37,6
<i>p**</i>						<i>p=0,025</i>					

Haplotipo		TCHOL		HDL		LDL		CRP		Log CRP		Fibrinógeno	
B212	N	promedio	SD	promedio	SD								
No	281	176,6	37,9	43,9	11,0	103,3	32,5	2,20	4,43	-0,03	1,17	335,9	69,5
Sí	20	193,7	71,9	52,4	23,4	116,7	66,8	0,68	0,50	-0,62	0,74	309,4	57,5
<i>P</i>											<i>p&lt;0,0001</i>		

15

Tabla 14. Medias y desviaciones estándar de parámetros de salud clave por el patrón del genotipo del promotor beta en pacientes con CAD.

Genotipo	N	Edad		Edad de ...		BMI		BPS		BPD		TG	
		Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD
B1B1	53	54,9	7,4	51,9	7,5	24,7	2,6	121,3	17,2	78,7	9,3	138,9	83,8
B1B2	120	53,0	7,5	49,2	7,3	24,6	2,2	123,6	15,7	80,3	9,0	155,8	92,8
B1B212	7	56,3	9,7	52,7	8,1	26,1	1,2	120,1	14,1	78,1	11,7	123,0	37,6
B1B3	9	55,4	10,0	52,6	8,9	25,1	1,6	125,4	16,8	80,1	9,0	140,0	66,1
B1B4	23	54,8	6,5	50,7	7,8	25,1	1,6	122,6	17,8	80,1	8,4	168,0	91,6
B2B2	48	53,0	7,5	48,5	7,5	24,2	2,3	120,3	17,0	78,2	7,2	142,5	77,6
B2B3	14	55,5	8,3	51,4	9,8	25,3	2,1	122,9	15,5	79,6	9,0	123,9	49,1
B2B4	19	52,5	6,2	47,5	6,5	26,1	1,9	125,3	20,4	81,6	10,0	128,5	65,0

Genotipo	N	TCHOL		HDL		LDL		CRP		Log CRP		Fibrinógeno	
		Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD
B1B1	53	172,9	40,0	44,4	11,8	99,6	26,9	2,20	3,35	0,09	1,17	350,5	65,9
B1B2	120	181,6	35,6	45,2	10,9	105,5	31,9	1,80	3,50	-0,17	1,1	323,8	54,7
B1B212	7	193,7	71,9	52,4	23,4	116,7	66,8	0,68	0,50	-0,62	0,74	309,4	57,5
B1B3	9	154,6	46,2	42,6	14,9	84,0	39,4	1,33	1,20	-0,16	1,05	324,7	52,1
B1B4	23	176,5	38,6	39,4	9,8	106,6	36,2	2,95	6,30	0,10	1,24	357,9	123,4
B2B2	48	174,0	39,6	42,7	10,2	102,8	35,5	2,76	6,14	0,03	1,31	331,3	62,1
B2B3	14	179,9	46,9	45,4	7,5	109,7	39,8	1,17	0,91	-0,11	0,77	331,5	42,4
B2B4	19	179,1	28,4	43,4	12,6	110,0	27,3	3,61	6,84	0,09	1,44	351,7	99,0

Tabla 15. Media y desviaciones estándar de parámetros clave por pacientes que portan por lo menos 1 haplotipo del promotor beta

Haplotipo	N	Edad		Edad de inicio		BMI		BPS		BPD		TG	
		Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD
B1	212	53,9	7,5	50,3	7,6	24,8	2,2	122,9	16,2	79,8	9,0	151,1	88,1
B2	201	53,1	7,4	49,0	7,5	24,7	2,2	122,9	16,4	79,9	8,7	147,8	84,8
B3	26	55,5	8,6	51,8	8,9	25,3	1,9	123,2	15,2	79,9	8,7	132,7	55,9
B4	46	54,1	6,5	49,5	7,2	25,6	1,8	123,6	18,2	80,9	8,9	148,7	80,4
B212	7	56,3	9,7	52,7	8,1	26,1	1,2	120,1	14,1	78,1	11,7	123,0	37,6

Haplotipo	N	TCHOL		HDL		LDL		CRP		Log CRP		Fibrinógeno	
		Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD	Prom.	SD
B1	212	178,1	39,2	44,5	11,9	103,6	33,3	1,95	3,75	-0,09	1,12	333,7	68,9
B2	201	179,4	36,7	44,4	10,7	105,4	32,9	2,13	4,57	-0,09	1,17	328,6	61,3
B3	26	169,7	44,5	44,1	10,8	99,1	38,6	1,20	0,98	-0,15	0,86	331,0	44,1
B4	46	176,6	32,7	41,7	11,4	106,7	31,2	3,06	6,20	0,07	1,28	353,3	107,3
B212	7	193,7	71,9	52,4	23,4	116,7	66,8	0,68	0,50	-0,62	0,74	309,4	57,5

- 5 Los resultados de estos experimentos indican que el haplotipo B212 es un factor protector en trastornos cardiovasculares y metabólicos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar si un sujeto es propenso a tener o está predispuesto a desarrollar resistencia a la insulina, que comprende detectar por lo menos una copia del alelo 1 (C) de IL-1B (- 511), por lo menos una copia del alelo 2 (T) de IL-1A (+4845) y por lo menos una copia del alelo 2 (T) de IL-1B (+3954) en el sujeto.
- 5 2. Un método para determinar si un sujeto es propenso a tener o está predispuesto a desarrollar resistencia a la insulina, que comprende detectar por lo menos una copia del alelo 2 (T) de IL-1A (+4845), por lo menos una copia del alelo 2 (T) de IL-1B (+3954) y dos copias del alelo 1 (G) de IL-1B (+3877) en el sujeto.
3. El método según la reivindicación 2, en donde la resistencia a la insulina se desarrolla a través de un aumento en el nivel de expresión de la proteína C reactiva en el sujeto.
- 10 4. El método según la reivindicación 1, que comprende detectar dos copias del alelo 1 (C) de IL-1B (-511) en el sujeto.
5. El método según la reivindicación 4, en donde la resistencia a la insulina se desarrolla a través de un aumento en el nivel de expresión de la proteína de IL-1 $\beta$  en el sujeto.

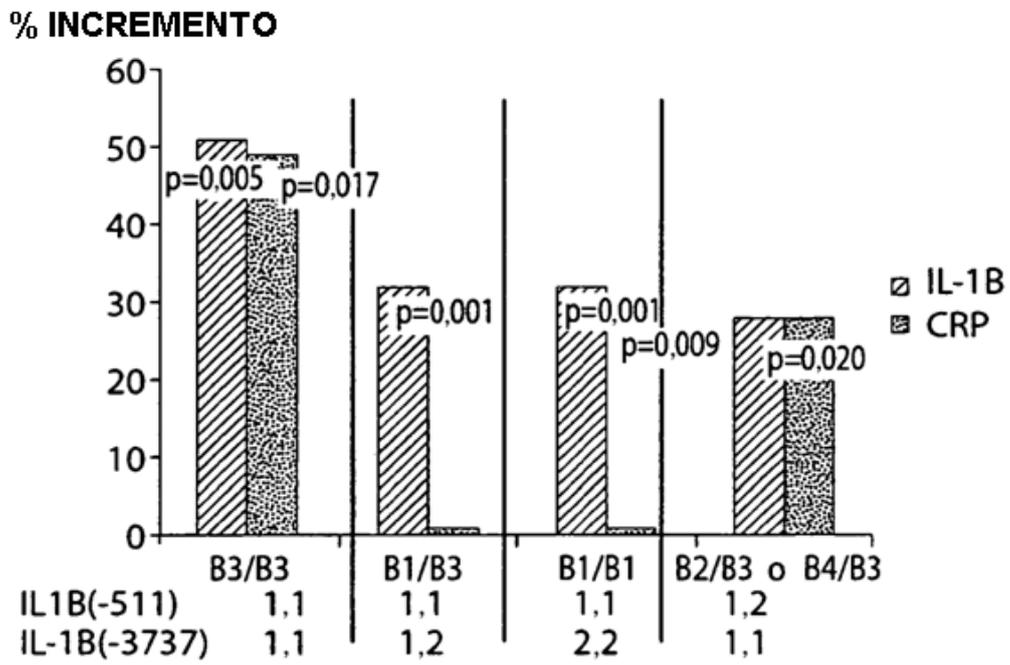


Fig. 1