



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 342 992**

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **98922938 .0**

(96) Fecha de presentación : **21.05.1998**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0983385**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2000**

(54) Título: **Predicción de un trastorno inflamatorio asociado con los polimorfismos de los loci de genes IL-1.**

(30) Prioridad: **29.05.1997 GB 9711040**

(73) Titular/es: **Interleukin Genetics, Inc.**  
**135 Beaver Street**  
**Waltham, Massachusetts 02452, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.07.2010**

(72) Inventor/es: **Duff, Gordon;**  
**Cox, Angela;**  
**Camp, Nicola, Jane y**  
**De Giovine, Francesco, Saverio**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.07.2010**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 342 992 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

Predicción de un trastorno inflamatorio asociado con los polimorfismos de los loci de genes IL-1.

### 5 Fundamento

#### 1. Campo del invento

Este invento se refiere a métodos y kits para la identificación de la susceptibilidad a trastornos inmunoinflamatorios o trastornos modulados por la actividad biológica de IL-1. Específicamente, el método implica la detección de al menos un alelo en un haplotipo de IL-1, tal como el haplotipo (44112332) de IL-1, que está asociado con trastornos inflamatorios tales como la enfermedad de las arterias coronarias, osteoporosis, nefropatía en diabetes mellitus, alopecia areata, enfermedad de Graves, lupus eritematoso sistémico, liquen escleroso, colitis ulcerosa, retinopatía diabética, enfermedad periodontal, artritis juvenil crónica, particularmente iridociclitis crónica, psoriasis, diabetes dependiente de insulina en pacientes DR3/4, asma, enfermedades hepáticas inflamatorias crónicas, enfermedad pulmonar inflamatoria crónica, fibrosis pulmonar y fibrosis hepática, así como enfermedades inflamatorias agudas y crónicas del sistema nervioso central, el sistema cardiovascular, el sistema gastrointestinal, el sistema musculosquelético, el sistema endocrino, la piel y su estructura asociada, el sistema inmune, el sistema hepatobiliar, o cualquier sitio del cuerpo en que pueda tener lugar una patología con un componente “inmune-inflamatorio” que implique productos génicos de IL independientemente de los factores de iniciación, tales como, por ejemplo, agentes infecciosos, traumas, neoplasias, autoinmunidad, enfermedades idiopáticas, toxinas biológicas y agentes nocivos, y otras enfermedades con un componente genético de los loci de IL-1.

#### 2. Descripción del fundamento

El ensayo genético (también llamado exploración genética, genotipado y diagnóstico molecular) puede ser definido en términos generales como el ensayo de ácido nucleico de un paciente en un sistema analítico para determinar si un paciente contiene mutaciones (o alelos o polimorfismos) que causan o aumentan la susceptibilidad a un estado morboso o están en “desequilibrio de ligamiento” con el gen que causa un estado morboso.

El desequilibrio de ligamiento se refiere a la tendencia de alelos específicos a aparecer juntos con más frecuencia de lo que cabría esperar a causa del azar. Los alelos de unos loci dados están en equilibrio si la frecuencia de cualquier conjunto particular de alelos (o haplotipo) es el producto de sus frecuencias individuales en la población. A menudo, la causa del desequilibrio no es evidente. 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 íntimamente ligados a un gen morboso, se espera una asociación de un alelo (o un grupo de alelos ligados) con el gen morboso si la mutación morbosa ha ocurrido en un pasado reciente, por lo que no ha transcurrido el tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio a través de procesos de recombinación en esa pequeña región cromosómica.

La detección precoz de una predisposición a enfermedades genéticas presenta la mejor oportunidad para una intervención médica. Un diagnóstico genético precoz puede mejorar el pronóstico de un paciente a través de una supervisión y una intervención precoz antes de que aparezca un trastorno clínicamente detectable. En los casos en que pacientes con síntomas similares son tratados con un éxito variable, un ensayo genético sofisticado puede permitir diferenciar a pacientes individuales con diferencias sutiles o indetectables y puede conducir a tratamientos individuales más adecuados. La intervención precoz puede implicar métodos tales como terapia génica y tratamiento con moduladores de IL-1. Con el desarrollo del ensayo genético, ahora es posible identificar las mutaciones génicas que indican una propensión a desarrollar una enfermedad incluso cuando la enfermedad es de origen poligénico. El número de enfermedades que pueden ser diagnosticadas mediante métodos biológicos moleculares continúa creciendo conforme aumenta el conocimiento de la base genética de los trastornos multifactoriales (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 4.582.788, 5.110.920, 4.801.531, 4.666.828 y 5.268.267).

#### *El grupo génico de IL-1*

El grupo génico de IL-1 está situado en el brazo largo del cromosoma 2 humano (2q13) y contiene al menos los genes para IL-1 $\alpha$  (IL1A), IL-1 $\beta$  (IL1B) y el antagonista del receptor de IL-1 (IL1RN) en una región de 430 kb [Nicklin *et al.*, *Genomics* 19: 382-4 (1994)]. Las moléculas agonistas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , presentan una potente actividad proinflamatoria y están a la cabeza de muchas cascadas inflamatorias. Sus acciones, a menudo a través de la inducción de otras citocinas, tales como IL-6 e IL-8, conducen a la activación y la reunión de leucocitos en el tejido dañado, la producción local de agentes vasoactivos, una respuesta febril en el cerebro y la respuesta hepática de fase aguda. Las tres moléculas de IL-1 se unen a los receptores de tipo I y tipo II de IL-1, pero sólo el receptor de tipo I transduce una señal al interior de la célula. Por contraste, el receptor de tipo II se desprende de la membrana celular y actúa como un receptor “señuelo”. Por lo tanto, tanto el antagonista del receptor como el receptor de tipo II son antiinflamatorios en lo que se refiere a sus acciones.

Parece que una producción inapropiada de IL-1 desempeña un papel central en la patología de muchas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, incluyendo la artritis reumatoide, el trastorno inflamatorio intestinal, la psoriasis y otras. Además, entre los individuos, hay diferencias estables en cuanto a las velocidades de producción de IL-1, y parte de esta variación puede ser debida a diferencias genéticas en loci génicos de IL-1 [Molvig *et al.*, *Scand. J. Immunol.*

27: 705-16 (1988); Pociot *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.* **22**: 396-402 (1992)]. De esta manera, los genes de IL-1 son unos candidatos razonables para determinar parte de la susceptibilidad genética a enfermedades inflamatorias, la mayoría de las cuales tienen una etiología multifactorial con un componente poligénico.

5 Se sabe que ciertos alelos del grupo génico de IL-1 están asociados con estados morbosos concretos. Por ejemplo, hemos mostrado que el alelo 2 de IL1RN está asociado con la enfermedad de las arterias coronarias, la osteoporosis (Solicitudes de EE.UU. números 08/813.416 y 08/628.282), la nefropatía en diabetes mellitus [Blakemore *et al.*, *Hum. Genet.* **97** (3): 369-74 (1996)], la alopecia areata [Cork *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* **104** (Supl. 5): 15S-16S (1995)], la enfermedad de Graves [Blakemore *et al.*, *J. Clin. Endocrinol.* **80** (1): 111-5 (1995)], el lupus eritematoso sistémico [Blakemore *et al.*, *Arthritis Rheum.* **37**: 1380-85 (1994)], el liquen escleroso [Clay *et al.*, *Hum. Genet.* **94**: 407-10 (1994)] y la colitis ulcerosa [ Mansfield *et al.*, *Gastroenterol.* **106** (3): 637-42 (1994)]. El alelo 1 del grupo de IL1RN está asociado con la retinopatía diabética (WO/98/15653). Asimismo, hemos mostrado que el alelo 2 del marcador -889 de IL1A y el alelo 2 del marcador +3953 de IL1B(TaqI) están asociados con la enfermedad periodontal (Patente de EE.UU. nº 5.686.246). El alelo 2 del marcador -889 está también asociado con la artritis juvenil crónica, particularmente la iridociclitis crónica [McDowell *et al.*, *Arthritis Rheum.* **38**: 221-28 (1995)]. El alelo 2 de IL1B (TaqI), del marcador +3953 de IL1B, también está asociado con la psoriasis y la diabetes dependiente de insulina en pacientes DR3/4 [di Giovine *et al.*, *Cytokine* **7**: 606 (1995); Pociot *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.* **22**: 396-402 (1992)].

### Sumario del invento

20 El presente invento proporciona un nuevo método para la predicción precoz de una propensión a desarrollar trastornos inflamatorios. También proporciona kits para la determinación precoz de dicha propensión.

El método para predecir un riesgo aumentado de padecer enfermedades moduladas por la actividad biológica de 25 IL-1 (aquí denominadas "trastornos inflamatorios") consiste en detectar la presencia de uno o más alelos del haplotipo (44112332) de IL-1, o, alternativamente, se puede detectar el haplotipo completo. Tener uno o más de los alelos de un haplotipo de IL-1 indica un riesgo aumentado de padecer una diversidad de trastornos inflamatorios. Estos incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de las arterias coronarias, osteoporosis, nefropatía en diabetes mellitus, alopecia areata, enfermedad de Graves, lupus eritematoso sistémico, liquen escleroso, colitis ulcerosa, enfermedad periodontal, 30 artritis juvenil crónica, particularmente iridociclitis crónica, psoriasis, diabetes dependiente de insulina en pacientes DR3/4, retinopatía diabética y otras enfermedades con un componente genético de los loci de IL-1.

El haplotipo de IL-1 está asociado con las enfermedades siguientes: enfermedad de las arterias coronarias, osteoporosis, nefropatía en diabetes mellitus, alopecia areata, enfermedad de Graves, lupus eritematoso sistémico, liquen escleroso y colitis ulcerosa. El haplotipo (33221461) de IL-1 está asociado con las enfermedades siguientes: enfermedad periodontal, artritis juvenil crónica, psoriasis, diabetes dependiente de insulina, y retinopatía diabética.

En otra realización, el invento puede ser descrito del modo siguiente: aislar ácido nucleico del paciente, identificar uno o más alelos presentes en el grupo génico de IL-1, y comparar el alelo o los alelos con una muestra testigo. La muestra testigo contiene al menos un alelo de un haplotipo de IL-1. De este modo, una muestra testigo contiene uno o más de los siguientes alelos del haplotipo (44112332) de IL-1:

45	alelo 4 del marcador 222/223	(producto de PCR de 132 mu*),
	alelo 4 del marcador gz5/gz6	(producto de PCR de 91 mu*),
	alelo 1 del marcador -889	(contiene un sitio Ncol),
50	alelo 1 del marcador +3953	(contiene dos sitios Taql),
	alelo 2 del marcador -511	(contiene un sitio Bsu36I),
	alelo 3 del marcador gaat.p33330	(producto de PCR de 197 mu*),
55	alelo 3 del marcador Y31	(producto de PCR de 160 mu*),
	alelo 2 del marcador VNTR	(producto de PCR de 240 bp).

60 \* Los tamaños de los productos de PCR de marcadores microsatélites se dan en unidades de movilidad (mu; del inglés, mobility units), que se aproximan al tamaño en pares de bases (bp; del inglés, base pairs) pero pueden variar de acuerdo con el método de determinación, como sería fácilmente comprobado por quien tiene experiencia en la técnica. Las posiciones de los marcadores son como indican las referencias de la Tabla 1.

65 Una similitud de los alelos identificados del paciente con la muestra testigo indica la predisposición del paciente a una enfermedad inflamatoria. La muestra testigo puede ser también una escalera alélica compuesta de una pluralidad de los alelos anteriormente enumerados y puede contener también alelos adicionales de los marcadores anteriores.

Puede haber una pluralidad de muestras testigo, conteniendo cada una de ellas diferentes alelos o diferentes conjuntos de alelos.

Otra realización del invento es un kit para la detección de alelos que predicen una enfermedad inflamatoria. El kit incluye generalmente al menos un oligonucleótido complementario de una secuencia de DNA de la familia génica de IL-1, y una muestra testigo. La muestra testigo contiene un alelo del que se sabe que está asociado con una enfermedad inflamatoria, como se describe anteriormente. La muestra testigo puede contener los productos reales de PCR producidos por multiplicación de dichos alelos o, alternativamente, puede contener DNA clonado o genómico de un individuo que porta un haplotipo de IL-1.

El kit puede incluir también un medio para muestreo de DNA, un medio para purificación de DNA, y reactivos para PCR. Además, el oligonucleótido puede contener una etiqueta detectable. El kit comprende al menos dos oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en:

15	<b>ATGTATAGAATTCCATTCTG</b>	(ID. SEC. nº 1),
	<b>TAAAATCAAGTGGATGTAG</b>	(ID. SEC. nº 2),
	<b>GGGATTACAGGCCTGAGCCACCGCG</b>	(ID. SEC. nº 3),
20	<b>TTAGTATTGCTGGTAGTATTCTAT</b>	(ID. SEC. nº 4),
	<b>TGTTCTACCACCTGAAGTAGG</b>	(ID. SEC. nº 5),
	<b>TTACATATGAGCCTTCATG</b>	(ID. SEC. nº 6),
	<b>CTCAGGGTGTCTCGAACGAAATCAA</b>	(ID. SEC. nº 7),
25	<b>GCTTTTTGCTGTGAGTCCCC</b>	(ID. SEC. nº 8),
	<b>TGGCATTGATCTGGTTCATC</b>	(ID. SEC. nº 9),
	<b>GTTTAGGAATCTTCCCCTT</b>	(ID. SEC. nº 10),
	<b>GAGGCGTGAGAACATCTCAAGA</b>	(ID. SEC. nº 11),
30	<b>GTGTCCTCAAGTGGATCTGG</b>	(ID. SEC. nº 12),
	<b>GGGCAACAGAGCAATGTTCT</b>	(ID. SEC. nº 13),
	<b>CAGTGTGTCAGTGTACTGTT</b>	(ID. SEC. nº 14),
	<b>CTCAGCAACACTCCTAT</b>	(ID. SEC. nº 15),
35	<b>TCCTGGTCTGCAGGTAA</b>	(ID. SEC. nº 16), y
	<b>TTACGCAGATAAGAACCAAGTTGG</b>	(ID. SEC. nº 17).

Otras realizaciones y ventajas del invento se exponen en parte en la descripción que viene a continuación y resultarán obvias a partir de esta descripción. Más generalmente, la descripción siguiente también describe aspectos y realizaciones de la revelación de la presente solicitud.

#### Descripción de los dibujos

En la Figura 1 se representan los 8 marcadores del grupo génico de IL-1 y su posición aproximada.

En la Figura 2 se representa la correlación entre desequilibrio de ligamiento y distancia física.

#### Descripción detallada del invento y de la revelación

Como se materializa y se describe aquí en términos generales, el presente invento y la presente revelación se dirigen a métodos para la detección de al menos un alelo de un haplotipo de IL-1, incluyendo el haplotipo (44112332) de IL-1 y el haplotipo (33221461) de IL-1, que está asociado con trastornos inflamatorios.

Como aquí se utiliza, el término “marcador” se refiere a un sitio específico del genoma que presenta variaciones secuenciales entre los individuos. Por ejemplo aquí se describen al menos 8 marcadores: los marcadores 222/223, gz5/gz6, -889, +3953, -511, gaat.p33330, Y31 y VNTR.

El término “alelo” se refiere a las diferentes variantes secuenciales halladas en unos marcadores dados. Por ejemplo, hay al menos 5 alelos, del 1 al 5, en el marcador VNTR y hay al menos 2 alelos en el marcador -889. Las variantes secuenciales pueden ser cambios de una sola base o de múltiples bases, incluyendo inserciones, delecciones y sustituciones, o pueden ser un número variable de repeticiones secuenciales y similares.

La expresión “desequilibrio de ligamiento” se refiere a la herencia conjunta de dos alelos con frecuencias mayores de las que se esperarían a partir de las frecuencias de aparición separadas de cada alelo en una población testigo dada. La frecuencia esperada de aparición de dos alelos que se heredan independientemente es la frecuencia del primer

## ES 2 342 992 T3

alelo multiplicada por la frecuencia del segundo alelo. Se dice que los alelos que se presentan conjuntamente con las frecuencias esperadas están en “equilibrio de ligamiento”.

El término “haplotipo” es un conjunto de alelos que se heredan juntos como un grupo (están en desequilibrio de ligamiento). Como aquí se usa, se define el haplotipo para que incluya aquellos haplotipos que aparecen en niveles estadísticamente significativos ( $p_{corr} \leq 0,05$ ).

Como aquí se utiliza, la frase “un haplotipo de IL-1” se refiere a cualquier haplotipo de los loci de IL-1. Incluye al menos el haplotipo (44112332) de IL-1 y el haplotipo (33221461) aquí descritos.

10 Como aquí se usa, la frase “haplotipo (44112332) de IL-1” se refiere al haplotipo que consiste en al menos:

15 alelo 4 del marcador 222/223 de IL1A;

20 alelo 4 del marcador gz5/gz6 de IL1A;

25 alelo 1 del marcador -889 de IL1A;

alelo 1 del marcador +3953 de IL1B;

alelo 2 del marcador -511 de IL1B;

alelo 3 del marcador gaat.p33330;

alelo 3 del marcador Y31; y

alelo 2 del marcador VNTR de IL1RN.

30 La frase “haplotipo (44112332) de IL-1” también incluye cualesquier alelos adicionales que estén en desequilibrio de ligamiento con este conjunto de alelos. Por ejemplo, el haplotipo (44112332) de IL-1 puede contener también los alelos siguientes:

35 alelo 2 del marcador 1731 del gen IL1RN (A en la posición 1731),

alelo 2 del marcador 1812 del gen IL1RN (A en la posición 1812),

alelo 2 del marcador 1868 del gen IL1RN (G en la posición 1868),

40 alelo 2 del marcador 1887 del gen IL1RN (C en la posición 1887),

alelo 2 del marcador 8006 del gen IL1RN (contiene un sitio Hpall o Mspl),

alelo 2 del marcador 8061 del gen IL1RN (carece de un sitio Mwol), y

45 alelo 2 del marcador 9589 del gen IL1RN (contiene un sitio Sspl).

Como aquí se usa, la frase “haplotipo (33221461) de IL-1” se refiere al haplotipo que consiste en al menos:

50 alelo 3 del marcador 222/223 de IL1A;

alelo 3 del marcador gz5/gz6 de IL1A;

55 alelo 2 del marcador -889 de IL1A;

alelo 2 del marcador +3953 de IL1B;

alelo 1 del marcador -511 de IL1B;

60 alelo 4 del marcador gaat.p33330;

alelo 6 del marcador Y31; y

alelo 1 del marcador VNTR de IL1RN.

65 La frase “haplotipo (33221461) de IL-1” también incluye cualesquier alelos adicionales que estén en desequilibrio de ligamiento con este conjunto de alelos.

# ES 2 342 992 T3

La frase “enfermedad inflamatoria” o “trastorno inflamatorio”, como aquí se usa, se refiere a aquellas enfermedades asociadas con la herencia de un haplotipo de IL-1. Además de las enfermedades convencionales relativas a la inflamación, la expresión abarca aquellas enfermedades que no son tradicionalmente consideradas como estados inflamatorios pero que tienen un componente inflamatorio o están moduladas por el grupo génico de IL-1, incluyendo ciertas enfermedades infecciosas, ciertos trastornos metabólicos y ciertos aspectos del crecimiento, propagación y control de tumores. Los trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de las arterias coronarias, osteoporosis, nefropatía en diabetes mellitus, alopecia areata, enfermedad de Graves, lupus eritematoso sistémico, liquen escleroso, colitis ulcerosa, retinopatía diabética, enfermedad periodontal, artritis juvenil crónica, particularmente iridociclitis crónica, psoriasis, diabetes dependiente de insulina en pacientes DR3/4 y otras enfermedades con un componente genético de los loci de IL-1.

Como aquí se utiliza, el proceso de “detectar alelos” se describe variadamente como “genotipar, determinar o identificar un alelo o un polimorfismo”, o cualquier frase similar. El alelo realmente detectado podría ser una mutación causativa de enfermedad o una mutación que está en desequilibrio de ligamiento con una mutación causativa de enfermedad. Se manifestará en el DNA genómico de un paciente, pero puede ser también detectable por medio de secuencias de RNA o proteína transcritas o traducidas a partir de esta región.

La frase “grupo génico de IL-1” o “loci de IL-1” o “familia génica de IL-1”, como aquí se usa, incluye todo el ácido nucleico en, o cerca de, 2q13 del cromosoma 2, incluyendo los genes IL1A, IL1B e IL1RN y cualesquier otras secuencias ligadas.

Por “propensión”, “predisposición” o “susceptibilidad” a enfermedad lo que se quiere significar es que se ha descubierto aquí que ciertos alelos están “asociados” con un estado morboso dado. Por lo tanto, están sobrerepresentados en los individuos con la enfermedad en comparación con los individuos sanos e indican que estos individuos presentan un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad o pueden desarrollar una forma más grave o un subconjunto particular del tipo de enfermedad.

Por “marcador microsatélite” lo que se quiere significar es un marcador cuyos alelos comprenden números diferentes de secuencias repetidas cortas (< 5 bp).

Por “marcador VNTR” lo que se quiere significar es un marcador cuyos alelos comprenden números diferentes de secuencias repetidas de longitud media. Se describe aquí un marcador VNTR específico del intrón 2 del gen IL1RN.

Por “marcador bialélico” lo que se quiere significar es un marcador con sólo dos alelos conocidos.

Las citocinas del grupo génico de IL-1 desempeñan un papel central en las respuestas inmunes e inflamatorias así como en un número de enfermedades inflamatorias. Se investigó el grado de desequilibrio de ligamiento del grupo génico de IL-1 y se halló que era estadísticamente significativo, con un nivel de confianza de 95%, a través de un tramo de aproximadamente 400 kb de la región. En la población sana se hallaron un haplotipo (44112332) de IL-1 previamente no reconocido y un haplotipo (33221461) de IL-1. Se halló que el haplotipo (44112332) completo de IL-1 aparecía con una frecuencia aumentada en los pacientes con nefropatía en diabetes mellitus.

La revelación se dirige a un método para predecir la propensión o predisposición de un paciente a una enfermedad inflamatoria mediante el genotipado del DNA del paciente en el grupo génico de IL-1. El genotipo del paciente es comparado con una muestra testigo que contiene uno o más alelos de un haplotipo de IL-1, tal como el haplotipo (44112332) de IL-1 o el haplotipo (33221461) de IL-1. Los alelos incluyen:

50	alelo 4 del marcador 222/223	(producto de PCR de 132 mu*),
	alelo 4 del marcador gz5/gz6	(producto de PCR de 91 mu*),
	alelo 1 del marcador -889	(contiene un sitio Ncol),
55	alelo 1 del marcador +3953	(contiene dos sitios Taql),
	alelo 2 del marcador -511	(contiene un sitio Bsu36I),
	alelo 3 del marcador gaat.p33330	(producto de PCR de 197 mu*),
60	alelo 3 del marcador Y31	(producto de PCR de 160 mu*),
	alelo 2 del marcador VNTR	(producto de PCR de 240 bp).

65 \* Los tamaños de los productos de PCR de marcadores microsatélites se dan en unidades de movilidad, que se aproximan al tamaño en pares de bases pero pueden variar de acuerdo con el método de determinación, como sería fácilmente comprobado por quien tiene experiencia en la técnica.

## ES 2 342 992 T3

La muestra testigo puede contener también los alelos siguientes, que pueden ser parte del haplotipo (44112332) de IL-1:

5	alelo 2 del marcador 1731 del gen IL1RN	(A en la posición 1731),
	alelo 2 del marcador 1812 del gen IL1RN	(A en la posición 1812),
	alelo 2 del marcador 1868 del gen IL1RN	(G en la posición 1868),
10	alelo 2 del marcador 1887 del gen IL1RN	(C en la posición 1887),
	alelo 2 del marcador 8006 del gen IL1RN	(contiene un sitio Hpall o Mspl),
	alelo 2 del marcador 8061 del gen IL1RN	(carece de un sitio Mwol),
15	alelo 2 del marcador 9589 del gen IL1RN	(contiene un sitio Sspl).

La muestra testigo puede también contener los siguientes alelos del haplotipo (33221461) de IL-1:

20	alelo 3 del marcador 222/223	(producto de PCR de 130 mu*),
	alelo 3 del marcador gz5/gz6	(producto de PCR de 88 mu*),
25	alelo 2 del marcador -889	(carece de un sitio Ncol),
	alelo 2 del marcador +3953	(contiene un sitio Taql),
	alelo 1 del marcador -511	(carece de un sitio Bsu36I),
30	alelo 4 del marcador gaat.p33330	(producto de PCR de 201 mu*),
	alelo 6 del marcador Y31	(producto de PCR de 166 mu*),
35	alelo 1 del marcador VNTR	(producto de PCR de 412 bp).

Se sabe que estos alelos están asociados con una diversidad de trastornos inflamatorios, tales como la enfermedad de las arterias coronarias, osteoporosis, nefropatía en diabetes mellitus, alopecia areata, enfermedad de Graves, lupus eritematoso sistémico, liquen escleroso, colitis ulcerosa, retinopatía diabética, enfermedad periodontal, artritis juvenil crónica, particularmente iridociclitis crónica, psoriasis, diabetes dependiente de insulina en pacientes DR3/4 y otras enfermedades con un componente genético de los loci de IL-1.

La identificación de un haplotipo asociado con una enfermedad (el conjunto de alelos en desequilibrio de ligamiento) permitirá al investigador comenzar a determinar cuáles de los alelos son causativos en vez de estar meramente ligados a un alelo causativo de enfermedad. Esta información puede ser utilizada para diseñar planteamientos de tratamiento racionales, incluyendo la terapia génica y el tratamiento con una diversidad de agentes que modulen la actividad de las proteínas producidas por el grupo génico de IL-1. Es también posible que múltiples mutaciones pudieran contribuir, cada una parcialmente, a estados morbosos relativos a enfermedades de origen complejo. De este modo, si las mutaciones son aditivas o sinérgicas, la detección de estas mutaciones indicaría un riesgo aún mayor de padecer la enfermedad. Además, la presencia de alelos asociados con enfermedad en desequilibrio de ligamiento permitirá el ensayo diagnóstico de más de un alelo, lo que ayudará a eliminar la posibilidad de falsos resultados positivos.

Las técnicas para determinar la presencia de alelos particulares pueden ser técnicas de ácido nucleico basadas en el tamaño o la secuencia, tales como el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP; del inglés, restriction fragment length polymorphism), la secuenciación de ácido nucleico y la hibridación.

Estas técnicas pueden comprender también la operación de multiplicar el ácido nucleico antes del análisis. Las técnicas de multiplicación son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen la clonación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction), la reacción en cadena de la polimerasa para alelos específicos (PASA; del inglés, PCR amplification of specific alleles), la ligación en cadena de la polimerasa, la reacción en cadena de la polimerasa de tipo anidado, y similares. Los productos de multiplicación pueden ser examinados de diversas maneras, incluyendo el análisis de los tamaños, la digestión de restricción seguida del análisis de los tamaños, la detección de cebadores oligonucleotídicos etiquetados específicos en los productos de reacción, la hibridación de oligonucleótidos específicos de alelos (ASO; del inglés, allele-specific oligonucleotide), la secuenciación, la hibridación y similares.

Los medios de detección basados en PCR incluyen la multiplicación múltiple simultánea de una pluralidad de marcadores. Por ejemplo, es bien sabido en la técnica cómo seleccionar cebadores de PCR para generar productos de PCR que no solapen en cuanto al tamaño y puedan ser analizados simultáneamente. Alternativamente, es posible multiplicar diferentes marcadores con cebadores que están diferencialmente marcados, pudiéndose detectar de este modo cada uno de ellos. Un medio para analizar múltiples marcadores implica etiquetar cada marcador con una sonda fluorescente diferente. Los productos de PCR son luego analizados en un secuenciador automatizado basado en fluorescencia. Por supuesto, la detección basada en hibridación permite la detección diferencial de múltiples productos de PCR en una muestra. En este campo técnico se conocen otras técnicas que permiten análisis múltiples de una pluralidad de marcadores.

Las técnicas para detección de alelos pueden ser de base proteica si un alelo particular produce una proteína con una variante de aminoácidos. Por ejemplo, los epítopos específicos para la variante de aminoácidos pueden ser detectados con anticuerpos monoclonales. Asimismo, mediante técnicas que se conocen en este campo técnico, es posible detectar alelos si están presentes en RNA procesado.

Otra realización del invento se dirige a kits diagnósticos para detectar una propensión a una enfermedad inflamatoria en un paciente. Los kits pueden ser utilizados presintomáticamente o postsintomáticamente, o prenatalmente.

Diversos formatos de ensayo son útiles para genotipar utilizando los oligonucleótidos proporcionados. Los formatos más comunes implican la unión de ácido nucleico, tal como la unión a filtros, glóbulos o placas de microtitulación, y similares. Las técnicas pueden incluir transferencias en forma de punto, transferencias de RNA, transferencias de DNA, PCR, RFLP y similares.

Los oligonucleótidos pueden ser una variedad de composiciones naturales y sintéticas tales como oligonucleótidos sintéticos, fragmentos de restricción, cDNAs, PNAs sintéticos y similares. En el ensayo se pueden emplear también oligonucleótidos etiquetados para facilitar la identificación en los ensayos. Los ejemplos de etiquetas que se pueden emplear incluyen radioetiquetas, enzimas, compuestos fluorescentes, estreptavidina, avidina, biotina, componentes magnéticos, componentes ligantes de metales, componentes de antígeno o anticuerpo, y similares. Los kits del invento comprenden al menos dos oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en:

	<b>ATGTATAGAATTCCATTCTG</b>	<b>(ID. SEC. nº 1),</b>
35	<b>TAAAATCAAGTGTGATGTAG</b>	<b>(ID. SEC. nº 2),</b>
	<b>GGGATTACAGGCCTGAGCCACCGCG</b>	<b>(ID. SEC. nº 3),</b>
	<b>TTAGTATTGCTGGTAGTATTCATAT</b>	<b>(ID. SEC. nº 4),</b>
40	<b>TGTTCTACCACCTGAACTAGG</b>	<b>(ID. SEC. nº 5),</b>
	<b>TTACATATGAGCCTTCATG</b>	<b>(ID. SEC. nº 6),</b>
	<b>CTCAGGTGTCCTCGAACGAAATCAAA</b>	<b>(ID. SEC. nº 7),</b>
	<b>GCTTTTTGCTGTGAGTCCCG</b>	<b>(ID. SEC. nº 8),</b>
45	<b>TGGCATTGATCTGGTTCATC</b>	<b>(ID. SEC. nº 9),</b>
	<b>GTTTAGGAATCTTCCCCTT</b>	<b>(ID. SEC. nº 10),</b>
	<b>GAGGCGTGAGAACCTCAAGA</b>	<b>(ID. SEC. nº 11),</b>
	<b>GTGTCCTCAAGTGGATCTGG</b>	<b>(ID. SEC. nº 12),</b>
50	<b>GGGCAACAGAGCAATGTTCT</b>	<b>(ID. SEC. nº 13),</b>
	<b>CAGTGTGTCAGTGTACTGTT</b>	<b>(ID. SEC. nº 14),</b>
	<b>CTCAGCAACACTCCTAT</b>	<b>(ID. SEC. nº 15),</b>
	<b>TCCTGGTCTGCAGGTAA</b>	<b>(ID. SEC. nº 16), y</b>
55	<b>TTACGCAGATAAGAACCAAGTTGG</b>	<b>(ID. SEC. nº 17).</b>

El kit puede incluir también medios para muestreo de DNA tales como AmpliCard™ [University of Sheffield, Sheffield, England S10 2JF; J. W. Tarlow *et al.*, *J. of Invest. Dermatol.* **103**: 387-389 (1994)] y similares; medios para la purificación de DNA tales como la lisis celular con SDS seguida de digestión con proteinasa K, kits Nucleon™, y similares; y reactivos para PCR tales como tampones de reacción 10X, polimerasa termoestable, dNTPs, y similares.

Otra realización de la revelación proporciona un método para identificar alelos adicionales en ligamiento con un haplotipo de IL-1, por ejemplo, el haplotipo (44112332) de IL-1. Se pueden identificar alelos adicionales del grupo génico de IL-1 mediante el análisis de la secuencia de esta región del DNA. Alternativamente se pueden identificar alelos adicionales mediante un análisis con enzimas de restricción [para los métodos para identificar nuevos marca-

## ES 2 342 992 T3

dores, véanse McDowell *et al.*, *Br. J. Rheumatol.* **32** (Supl. 1): 182 (1983); Wilson *et al.*, *Hum. Molec. Genet.* **1** (5): 353 (1992); di Giovine *et al.*, *Hum. Molec. Genet.* **1** (6): 450 (1992); y nuestra comunicación, Clay *et al.*, *Human Genetics* **97** (6): 723-26 (1996)]. La secuenciación, o el análisis con enzimas de restricción, del DNA del grupo génico de IL-1 procedente de un portador del haplotipo (44112332) de IL-1 y la comparación con secuencias procedentes de individuos no portadores permitirán identificar alelos adicionales que puedan estar presentes en el haplotipo. Alternativamente, se puede establecer el desequilibrio de ligamiento del modo descrito en el Ejemplo 3 o mediante estudios de familias.

La revelación también se dirige a métodos para identificar trastornos inflamatorios adicionales que están asociados con alelos de un haplotipo de IL-1. Se genotipan y comparan grupos de pacientes con y sin la enfermedad. De este modo, es posible mostrar que el haplotipo está asociado con nuevos trastornos inflamatorios.

El ejemplo siguiente ilustra realizaciones del invento y de la revelación, pero no debe ser considerado restrictivo del alcance del invento.

15

### Ejemplo 1

#### Genotipado

20

Todos los sujetos humanos estaban no relacionados y eran caucásicos sanos de Sheffield, donantes de sangre (n = 112). Se tiparon los sujetos en los loci indicados en la Tabla 1.

25

TABLA 1

*Marcadores utilizados en el estudio de haplotipos*

30

Marcador	Gen	Referencia
<b>222/223</b>	IL1A	Todd y Naylor, <i>Nucleic Acids Res.</i> <b>19</b> : 3756 (1991)
<b>gz5/gz6</b>	IL1A	Zuliani <i>et al.</i> , <i>Am. J. Hum. Genet.</i> <b>46</b> : 963-69 (1990)
<b>-889</b>	IL1A	McDowell <i>et al.</i> , <i>Arth. &amp; Rheum.</i> <b>38</b> : 221-8 (1995)
<b>+3953</b>	IL1B	di Giovine <i>et al.</i> , <i>Cytokine</i> <b>7</b> (6): 606 (1995)
<b>-511</b>	IL1B	di Giovine, <i>Hum. Molec. Genet.</i> <b>1</b> (6): 450 (1992)
<b>gaat.p33330</b>	entre IL1B e IL1RN	Murray <i>et al.</i> , <i>Coop. Hum. Link. Center</i> , no publicado
<b>Y31</b>	entre IL1B e IL1RN	Spurr <i>et al.</i> , <i>Cytogenet. &amp; Cell Genet.</i> <b>73</b> : 255-73 (1996)
<b>VNTR</b>	IL1RN	Tarlow <i>et al.</i> , <i>Hum. Genet.</i> <b>91</b> : 403-4 (1993)

55

60

65

## ES 2 342 992 T3

Las secuencias cebadoras y las etiquetas fluorescentes utilizadas en la multiplicación de marcadores por PCR fueron como se indican en la Tabla 2.

TABLA 2

*Secuencia cebadora y etiqueta fluorescente para el genotipado*

<b>Marcador</b>	<b>Etiqueta</b>	<b>Secuencia cebadora</b>	
<b>222/223</b>	HEX	ATGTATAGAATTCCATTCCCTG	(ID. SEC. nº 1)
		TAAAATCAAGTGTGATGTAG	(ID. SEC. nº 2)
<b>gz5/gz6</b>	FAM	GGGATTACAGGCCTGAGCCACCGCG	(ID. SEC. nº 3)
		TTAGTATTGCTGGTAGTATTCATAT	(ID. SEC. nº 4)
<b>-889</b>	NINGUNA	TGTTCTACCACCTGAACCTAGG	(ID. SEC. nº 5)
		TTACATATGAGCCTTCATG	(ID. SEC. nº 6)
<b>+3953</b>	NINGUNA	CTCAGGTGTCTCGAAGAAATCAA	(ID. SEC. nº 7)
		GCTTTTGCTGTGAGTCCCG	(ID. SEC. nº 8)
<b>-511</b>	NINGUNA	TGGCATTGATCTGGTTCATC	(ID. SEC. nº 9)
		GTTTAGGAATCTTCCCACCTT	(ID. SEC. nº 10)
<b>gaat.p33330</b>	FAM	GAGGCCTGAGAACATCTCAAGA	(ID. SEC. nº 11)
		GTGTCCTCAAGTGGATCTGG	(ID. SEC. nº 12)
<b>Y31</b>	HEX	GGGCAACAGAGCAATGTTCT	(ID. SEC. nº 13)
		CAGTGTGTCAGTGTACTGTT	(ID. SEC. nº 14)
<b>VNTR</b>	NINGUNA	CTCAGCAACACTCCTAT	(ID. SEC. nº 15)
		TCCTGGTCTGCAGGTAA	(ID. SEC. nº 16)

Las condiciones de reacción fueron como se describen en la Tabla 3.

TABLA 3

*Condiciones de reacción*

<b>Marcador</b>	<b>Condiciones</b>
<b>222/223</b>	KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH de 9,0, MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 200 µM, 25 ng de cebadores, 50 ng de molde, W-1 (Gibco-BRL) al 0,004%, 0,2 U de Taq; La PCR se realizó en 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min
<b>gz5/gz6</b>	Como para el marcador 222/223 salvo porque se añadió 1 U de Perfect Match (StrataGene)
<b>-889</b>	Como para el marcador 222/223 salvo porque se realizó la PCR en 1 ciclo a 96 °C durante 1 min, 40 ciclos de 94 °C durante 1 min, 46 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min, y 1 ciclo de 72 °C durante 4 min. Los productos fueron escindidos con Ncol para su análisis

# ES 2 342 992 T3

5	+3953	Como para el marcador 222/223 salvo porque se realizó la PCR en 35 ciclos con hibridación a 67,5 °C. Los productos fueron escindidos con Taq I para su análisis
10	-511	Como para el marcador 222/223 salvo porque se realizó la PCR en 1 ciclo a 95 °C durante 2 min, 35 ciclos de 95 °C durante 1 min, 53 °C durante 1 min, 74 °C durante 1 min, y 1 ciclo de 74 °C durante 4 min. Los productos fueron escindidos con Aval y Bsu36I para su análisis
15	gaat.p33330	Como para el marcador 222/223
20	Y31	Como para el marcador 222/223
	VNTR	Como para el marcador 222/223 salvo por MgCl <sub>2</sub> 1,7 mM y 1 ciclo a 96 °C durante 1 min, 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min, 70 °C durante 1 min, y 1 ciclo a 70 °C durante 2 min

25 Se examinaron los productos de PCR de 222/223, gz5/gz6, gaat.p33330 e Y31 mediante electroforesis en gel de agarosa, y se reunió el resto de los productos de PCR de acuerdo con la intensidad de la tinción con bromuro de etidio. Se analizaron 2 µl de la colección en un secuenciador automatizado ABI 373A y se determinaron los tamaños de los alelos usando el software “Genescan and Genotyper”. Los alelos fueron globalmente categorizados usando un programa informático sencillo y fueron numerados por orden de tamaño.

30 Se dirigieron los productos de la PCR de -889 con NcoI y se determinó el tamaño de los fragmentos resultantes mediante PAGE al 8%. El alelo 1 produce fragmentos de 83 y 16 bp. El alelo 2 produce un fragmento de 99 bp.

35 Se dirigieron los productos de la PCR de +3953 con la enzima de restricción Taq I. El alelo 1 produce fragmentos de 97, 85 y 12 bp, y el alelo 2 produce fragmentos de 182 y 12 bp.

40 Se dirigieron los productos de la PCR de -511 con Aval y Bsu36I y se determinó el tamaño de los fragmentos mediante PAGE al 8%. El alelo 1 produce fragmentos de 190 y 114 bp cuando es digerido con Aval, y un fragmento de 304 bp cuando es digerido con Bsu36I. El alelo 2 produce un fragmento de 304 bp cuando es digerido con Aval, y fragmentos de 190 y 114 bp cuando es digerido con Bsu36I.

45 Se determinó el tamaño de los productos de la PCR de VNTR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, a 90 V, durante 45 minutos. El alelo 1 tiene 4 repeticiones y el producto de PCR es de 412 bp, el alelo 2 tienen 2 repeticiones y el producto de PCR es de 240 bp, el alelo 3 tienen 3 repeticiones y el producto de PCR es de 326 bp, el alelo 4 tienen 4 repeticiones y el producto de PCR es de 498 bp, y el alelo 5 tienen 6 repeticiones y el producto de PCR es de 584 bp.

50 Se determinaron las distancias intergénicas mediante una estimación basada en los tamaños de los insertos de clones de PAC relevantes procedentes de un cónigo que abarca el grupo génico de IL-1 [Nicklin *et al.*, *Genomics* **19**: 382-4 (1994); Nothwang *et al.*, *Genomics* (en prensa)]. Las distancias intragénicas se determinaron a partir de la secuencia de nucleótidos relevante obtenida de la base de datos GENBANK.

## Ejemplo 2

### 55 Método para estimar el desequilibrio de ligamiento

Puesto que cuatro de los marcadores aquí estudiados son multialélicos, se llevó a cabo un análisis preliminar para determinar qué combinaciones alélicas entre pares de loci contribuían al mayor desequilibrio, con objeto de que el desequilibrio no resultara enmascarado cuando los alelos se agrupaban en sistemas bialélicos. Se usó el programa E. H. de Xie y Ott (Handbook of Human Genetic Linkage, 1994, John Hopkins University Press, 188-98), incorporado aquí por referencia, para estimar las frecuencias de los haplotipos bajo H<sub>0</sub> (sin ligamiento) y H<sub>1</sub> (ligamiento alélico permitido). Se halló que la complicada estrategia de agrupamiento de alelos presentaba ciertas ventajas con respecto a los métodos comúnmente utilizados ya que se detectaba desequilibrio entre casi todas las combinaciones de marcadores por pares examinadas y había una buena correlación entre desequilibrio y distancia física.

Más específicamente, se usó el programa E. H. de Xie y Ott para determinar estimaciones de desequilibrio de máxima probabilidad (D<sub>ij</sub>) entre cada combinación de alelos por pares, siendo D<sub>ij</sub> = h<sub>ij</sub> - p<sub>i</sub>q<sub>j</sub>, en que p<sub>i</sub> y q<sub>j</sub> son

## ES 2 342 992 T3

las frecuencias para el alelo  $i$  en el locus 1 y el alelo  $j$  en el locus 2, respectivamente, y  $h_{ij}$  es la frecuencia del haplotipo  $ij$ . El programa calculaba valores de máxima probabilidad para las frecuencias haplotípicas ( $y$ , por consiguiente, las frecuencias alélicas) bajo  $H_0$  (sin asociación) y las frecuencias haplotípicas bajo  $H_1$  (asociación alélica permitida).

5 Para marcadores con más de dos alelos, las estimaciones de E. H. para frecuencias alélicas se correlacionaban mal con las frecuencias alélicas que se estimaban directamente a partir de la población de muestra y, por lo tanto, no daban confianza a las estimaciones de  $D_{ij}$  dadas. Por lo tanto, fue necesario agrupar los alelos de los marcadores multialélicos en un sistema bialélico. El análisis de los marcadores en un formato bialélico tiene las ventajas añadidas 10 de que la notación  $\hat{D}_{ij}$ ,  $p_i$ , y  $q_j$  puede ser simplificada hasta  $\hat{D}$ ,  $p$ , y  $q$ , respectivamente, definiéndose  $p$  y  $q$  como las frecuencias de los alelos más raros en ambos loci (tal como, sin pérdida de generalidad,  $p \leq q \leq 0,5$ ) y siendo  $\hat{D}$  el desequilibrio estimado entre esos alelos.

15 Bajo un sistema bialélico, también es muy sencillo determinar la potencia usando ecuaciones como las detalladas por Hill [Hill, *Heredity* **33**: 229-39 (1974)]. Además, el signo de  $\hat{D}$  se vuelve informativo, de modo que  $\hat{D} > 0$  cuando los alelos más raros de cada uno de los dos loci están asociados, y  $\hat{D} < 0$  cuando el alelo raro de un locus está asociado con el alelo común del otro locus.

20 Puesto que el método de agrupamiento de alelos afectaba claramente a la potencia para detectar el desequilibrio [Zouros *et al.*, *Genet.* **85**: 543-50 (1977); Weir *et al.*, *Genet.* **88**: 633-42 (1976)], se llevó a cabo un análisis preliminar para asegurar que el agrupamiento no enmascaraba un desequilibrio entre subconjuntos de alelos. En este análisis, se calculó  $\delta_{ij} = (O'_{ij} - E_{ij})/\sqrt{E_{ij}}$  para cada haplotipo, en que  $E_{ij}$  es el número esperado de haplotipos  $ij$  que manifiestan equilibrio ( $E_{ij} = 2n p_i q_j$ , en que  $n$  = número de individuos en el estudio), y  $O'_{ij}$  es una estimación básica para la cuenta observada de haplotipos determinada del modo siguiente. Se contaron los haplotipos de todos los genotipos que 25 podían ser inequívocamente resueltos. Cada heterocigoto doble ( $i_1 i_2 / j_1 j_2$ ) podía ser resuelto en dos posibles conjuntos de haplotipos,  $[i_1 j_1, i_2 j_2]$  e  $[i_1 j_2, i_2 j_1]$ . Utilizando las frecuencias haplotípicas como se estimaron a partir de la cuenta inequívoca de haplotipos, se calculó la probabilidad de cada conjunto y se usó como una cuenta "parcial". De este modo, también se contaron los haplotipos de los genotipos ambiguos, y las cuentas totales (ambiguas más inequívocas) 30 constituyeron los  $O'_{ij}$  usados en  $\delta_{ij}$ . Una vez establecidos, se usaron la magnitud y el signo de los  $\delta_{ij}$  para determinar qué combinaciones alélicas mostraban la mayor desviación de la hipótesis nula de no asociación. Esta información se usó para agrupar los alelos de los loci multialélicos en sistemas bialélicos para permitir el uso eficaz del programa E.H.

35 Con objeto de comparar el grado de desequilibrio entre diferentes combinaciones de loci por parejas, se calculó una medida del desequilibrio, independiente de la frecuencia ( $\hat{D}$ , la proporción del máximo desequilibrio posible en la dirección dada), en que  $\tilde{D} = \hat{D}/|D_{\max}|$  [Thompson *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* **42**: 113-24 (1988)]. La relación entre  $p$  y  $q$  es tal que  $p \leq q \leq 0,5$  y, por lo tanto, se puede escribir que  $-pq \leq D \leq p(1-q)$ , de modo que, cuando  $\hat{D} < 0$ ,  $D_{\max} = -pq$ , y, cuando  $\hat{D} > 0$ ,  $D_{\max} = p(1-q)$ . La salida del programa E.H. incluía probabilidades logarítmicas para los 40 máximos valores paramétricos de probabilidad bajo  $H_0$  y  $H_1$ , y, puesto que  $-21n(L_0/L_1) \sim X_1^2$ , en que  $L_0$  y  $L_1$  son las probabilidades bajo  $H_0$  y  $H_1$ , se pudieron determinar entonces valores de  $p$  para cada ensayo.

45 Se calcularon las varianzas asintóticas para  $\hat{D}$ , bajo  $H_0$ :  $D = 0$ , y  $H_1$ , usando la fórmula definida por Hill [*Heredity* **33**: 229-39 (1974)] para datos genotípicos. Utilizando éstas, se pudo calcular la potencia para cada comparación por parejas.

50 Los haplotipos comunes que contenían los 8 loci fueron identificados a partir del análisis preliminar de  $\delta_{ij}$  anteriormente descrito y fueron respaldados por la magnitud y el signo de los desequilibrios una vez que se hubieron agrupado los alelos de los loci multialélicos. Para estos loci, se ha identificado en el haplotipo el alelo del grupo que más contribuía al desequilibrio. Para estimar las frecuencias haplotípicas de la población, se determinaron los índices de inclusión de al menos una copia de los alelos relevantes en la población. Estos no representan haplotipos verdaderos ya que se desconoce la fase. Se utilizaron técnicas de simulación Monte Carlo para ensayar la desviación significativa de una distribución simulada nula para estas inclusiones combinadas, bajo la suposición de no asociación.

### 55 Ejemplo 3

#### *Estimación del desequilibrio de ligamiento en el grupo génico de IL-1*

60 Se han identificado diversos marcadores bialélicos y multialélicos en, y alrededor de, los genes de IL-1. Sin embargo, hasta ahora no se han identificado el grado de desequilibrio de ligamiento entre los marcadores ni la incidencia de haplotipos multimarcadores en la población general.

## ES 2 342 992 T3

En la Figura 1 se muestran las posiciones relativas de los 8 loci de marcadores utilizados en este estudio. Se genotipo cada uno de estos marcadores en muestras de DNA de 212 voluntarios sanos no relacionados, y, en la Tabla 4, se muestran las estimaciones resultantes de las frecuencias alélicas.

5

TABLA 4  
*Frecuencias estimadas de alelos de marcadores*

	<b>222/223</b>	<b>Frec.</b>	<b>gz5/gz6</b>	<b>Frec.</b>	<b>-889</b>	<b>Frec.</b>	<b>+3953</b>	<b>Frec.</b>
10	<b>1 (126 bp)</b>	0,005	<b>1 (79 bp)</b>	0,003	<b>1 (Ncol)</b>	0,714	<b>1 (2 Taql)</b>	0,812
15	<b>2 (128 bp)</b>	0,018	<b>2 (82 bp)</b>	0,005	<b>2</b>	0,286	<b>2</b>	0,188
20	<b>3 (130 bp)</b>	0,378	<b>3 (88 bp)</b>	0,676				
25	<b>4 (132 bp)</b>	0,299	<b>4 (91 bp)</b>	0,316				
30	<b>5 (134 bp)</b>	0,016						
35	<b>6 (136 bp)</b>	0,208						
40	<b>7 (138 bp)</b>	0,055						
45	<b>8 (140 bp)</b>	0,003						
50	<b>9 (142 bp)</b>	0,010						
55	<b>10 (144 bp)</b>	0,008						
60	*Total	384		392		398		398
	<b>-511</b>	<b>Frec.</b>	<b>gaat.p33330</b>	<b>Frec.</b>	<b>Y31</b>	<b>Frec.</b>	<b>VNTR</b>	<b>Frec.</b>
	<b>1</b>	0,618	<b>1 (189 bp)</b>	0,658	<b>1 (148 bp)</b>	0,092	<b>1</b>	0,744
	<b>2 (Bsu36I)</b>	0,382	<b>2 (193 bp)</b>	0,002	<b>2 (158 bp)</b>	0,008	<b>2</b>	0,256
			<b>3 (197 bp)</b>	0,255	<b>3 (160 bp)</b>	0,454		
			<b>4 (201 bp)</b>	0,084	<b>4 (162 bp)</b>	0,062		
					<b>5 (164 bp)</b>	0,003		
					<b>6 (166 bp)</b>	0,122		
					<b>7 (168 bp)</b>	0,035		
					<b>8 (170 bp)</b>	0,030		
					<b>9 (172 bp)</b>	0,095		
					<b>10 (174 bp)</b>	0,087		
					<b>11 (176 bp)</b>	0,003		
					<b>12 (178 bp)</b>	0,011		
		398		404		370		398

65 \* Número de cromosomas analizados

Nota - Los nombres (y tamaños) de los alelos se escriben en negrita

## ES 2 342 992 T3

Para determinar los desequilibrios de ligamiento entre combinaciones de loci por pares, se utilizó el programa informático de Xie y Ott. Se halló que este programa era más eficaz cuando se utilizaba con sistemas bialélicos; por lo tanto, se agruparon los alelos de los loci multialélicos del modo más apropiado para cada comparación por pares de modo que el desequilibrio entre subconjuntos de alelos no resultara enmascarado.

5

En la Tabla 5, se expresan los desequilibrios entre pares de loci como  $\tilde{D}$  la relación entre  $\hat{D}$ , y su valor máximo  $D_{max}$ , y se muestran junto con las distancias físicas aproximadas entre los loci en kilopares de bases.

10

TABLA 5

*Desequilibrio ( $\tilde{D} = \hat{D}/|D_{max}|$ ) y distancias físicas entre marcadores*

	<b>222/223</b>	<b>gz5/gz6</b>	<b>-889</b>	<b>+3953</b>
	<b>222/223</b>	—	+0,872	+0,829
15	<b>gz5/gz6</b>	2,5	—	-0,889
20	<b>-889</b>	7	4,5	—
25	<b>+3953</b>	55	55	50
30	<b>-511</b>	60	60	55
35	<b>gaat.p33330</b>	260	260	255
40	<b>Y31</b>	310	310	305
45	<b>VNTR</b>	380	380	375
50		<b>-511</b>	<b>gaat.p33330</b>	<b>Y31</b>
	<b>222/223</b>	+0,535	+0,433	+0,364
	<b>gz5/gz6</b>	+0,540	+0,517	-0,503
	<b>-889</b>	-0,264	+0,337	+0,318
	<b>+3953</b>	-0,617	+0,409	-0,475
	<b>-511</b>	—	+0,691	-0,456
	<b>gaat.p33330</b>	200	—	+0,639
	<b>Y31</b>	250	50	—
	<b>VNTR</b>	320	120	70

55 Nota - Los valores de desequilibrio se muestran en la parte superior derecha, las distancias físicas aproximadas en kb se muestran en la parte inferior izquierda. Las distancias intergénicas se ajustan a los 5 kb más próximos.

60

65

## ES 2 342 992 T3

En la Tabla 6 se muestra la potencia para detectar el 50% de  $D_{\max}$  para cada combinación de loci, y los valores de  $p$  para cada  $D$  correspondiente.

5

TABLA 6

*Potencia para detectar el 50% de  $D_{\max}$  y los valores de  $p$  de  $-2\ln(L_0L_1)$*

10

	<b>222/223</b>	<b>gz5/gz6</b>	<b>-889</b>	<b>+3953</b>
<b>222/223</b>	—	~ 100 (+)	~ 100 (+)	98 (+)
<b>gz5/gz6</b>	< 1x10 <sup>-10</sup>	—	87 (-)	60 (-)
<b>-889</b>	< 1x10 <sup>-10</sup>	~ 3x10 <sup>-8</sup>	—	~ 100 (+)
<b>+3953</b>	~ 1x10 <sup>-7</sup>	*~ 9x10 <sup>-3</sup>	< 1x10 <sup>-10</sup>	—
<b>-511</b>	~ 9x10 <sup>-10</sup>	~ 4x10 <sup>-10</sup>	*~ 9,4x10 <sup>-2</sup>	*~ 2,6x10 <sup>-2</sup>
<b>gaat.p33330</b>	~ 9x10 <sup>-8</sup>	~ 2x10 <sup>-9</sup>	*~ 1,7x10 <sup>-2</sup>	~ 5x10 <sup>-4</sup>
<b>Y31</b>	~ 1x10 <sup>-4</sup>	~ 4x10 <sup>-4</sup>	~ 6x10 <sup>-4</sup>	~ 1x10 <sup>-7</sup>
<b>VNTR</b>	~ 1x10 <sup>-3</sup>	~ 1x10 <sup>-3</sup>	*~ 3x10 <sup>-1</sup>	*~ 1,2x10 <sup>-1</sup>
	<b>-511</b>	<b>gaat.p33330</b>	<b>Y31</b>	<b>VNTR</b>
<b>222/223</b>	~ 100 (+)	~ 100 (+)	~ 100 (+)	93 (-)
<b>gz5/gz6</b>	~ 100 (+)	~ 100 (+)	98 (-)	~ 100 (+)
<b>-889</b>	96 (-)	89 (+)	~ 100 (+)	78 (-)
<b>+3953</b>	79 (-)	97 (+)	~ 100 (+)	52 (-)
<b>-511</b>	—	~ 100 (+)	~ 100 (-)	~ 100 (+)
<b>gaat.p33330</b>	< 1x10 <sup>-10</sup>	—	49 (+)	~ 100 (+)
<b>Y31</b>	~ 2x10 <sup>-4</sup>	*~ 7x10 <sup>-3</sup>	—	89 (-)
<b>VNTR</b>	~ 8x10 <sup>-6</sup>	~ 1x10 <sup>-9</sup>	2x10 <sup>-7</sup>	—

50

Nota - La potencia se muestra en la parte superior derecha con el signo de desequilibrio entre paréntesis: los valores de  $p$  puntuales se muestran (sin corregir) en la parte inferior izquierda. Para un nivel de significación global de  $p = 0,05$ , el nivel de significación puntual es 0,0018 para 28 comparaciones.

55

\* No significativo para un umbral de  $p = 0,0018$

60

Se detectó un desequilibrio de ligamiento significativo ( $p_{corr} < 0,05$ ) entre la mayoría de las combinaciones de loci con sólo unas pocas excepciones. Éstas incluyen las comparaciones entre el VNTR y los marcadores bialélicos más distantes, +3953 y -889, en que el desequilibrio está en la dirección negativa y, en consecuencia, la potencia está reducida (Tabla 6). La correlación entre el desequilibrio  $\tilde{D}$  y la distancia física fue  $r = -0,752$  ( $p < 0,0001$ , de una cola) (Figura 2).

65

Con objeto de comparar los diferentes métodos de agrupamiento para los marcadores multialélicos, se calculó  $\tilde{D}$  para todas las comparaciones que afectaban a 222/223 utilizando dos estrategias de agrupamiento adicionales. La primera de éstas fue un planteamiento de “alelo común frente al resto”, y la segunda fue un agrupamiento basado en el tamaño alélico usando la distribución bimodal de la frecuencia alélica frente al tamaño alélico que se observaba para

# ES 2 342 992 T3

todos los marcadores multialélicos examinados. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 7, en que se comparan los valores de  $\tilde{D}$  para los tres métodos de agrupamiento.

5

TABLA 7

*Valores de  $\tilde{D}$  para tres métodos para agrupar alelos en los loci de marcadores multialélicos*

10

15

20

25

	$\delta_{ij}$	común frente al resto	tamaño alélico
<b>gz5/gz6</b>	0,87	0,79	0,77
<b>-899</b>	0,83	0,81	0,98
<b>+3953</b>	0,71	0,74	0,77
<b>-511</b>	0,54	*0,15	0,61
<b>gaat.p33330</b>	0,43	*0,03	0,53
<b>Y31</b>	0,36	*0,12	0,16
<b>VNTR</b>	0,5	0,48	*0,04

Nota - Se dan los valores para el desequilibrio entre 222/223 y los otros marcadores enumerados.

30 \* Indica no significativo para un nivel de  $p = 0,05$ , incluso antes de la corrección para el ensayo múltiple.

35 Se puede ver que el desequilibrio no se detecta en varios casos al utilizar estas otras estrategias de agrupamiento, notablemente 222/223 con -511 y gaat.p33330 en el planteamiento de común frente al resto, 222/223 con Y31 en ambos planteamientos, el de común frente al resto y el del tamaño alélico, y 222/223 con VNTR en el planteamiento del tamaño alélico.

40 El examen de qué alelos de los loci multialélicos estaban contribuyendo más al desequilibrio, a partir de la determinación de  $\delta_{ij}$ , reveló la existencia de 2 haplotipos que contenían alelos de los 8 loci. Estos fueron confirmados mediante el examen de las frecuencias haplotípicas y los valores de desequilibrio obtenidos después del agrupamiento. El primer haplotipo: alelos 44112332 (expresados en el orden en el cromosoma; véase la Figura 1), es el más común (inclusión de 34/198) y está presente 7 veces más frecuentemente de lo esperado (esperado = 4,5/198) ( $p < 0,000001$ ). El segundo haplotipo: alelos 33221461 (inclusión de 2/206), estaba presente 4 veces más frecuentemente de lo esperado (esperado = 0,5/206), pero esto no era estadísticamente significativo ( $p \sim 0,106$ ). Sin embargo, el examen de una muestra de mayor tamaño podría ayudar a aumentar la significación estadística de este hallazgo.

50 Los datos presentados indican un grado significativo de desequilibrio de ligamiento a través de un tramo de aproximadamente 400 kb del cromosoma 2q13. El desequilibrio era intenso para los tres marcadores del gen de IL-1 $\alpha$ , como se podría esperar, pero era también intenso entre algunos de los marcadores más distamente separados (-899/+3953;  $\tilde{D} = +0,804$ ; distancia física = 50 kb) (Tabla 6). Sin embargo,  $\tilde{D}$  estaba considerablemente disminuido entre los puntos extremos del grupo génico. En el gen de IL-1 $\beta$  se obtuvo un valor moderado de  $\tilde{D}$  (+3953/-511;  $\tilde{D} = -0,617$ ), aunque esto no era significativo cuando se corregía para las comparaciones múltiples, lo que refleja probablemente la reducción de potencia cuando el desequilibrio está en la dirección negativa [Thompson *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 42: 113-24 (1988)].

55

En conjunto, hay una buena correlación entre distancia física y desequilibrio de ligamiento (Figura 2);  $r = -0,752$ . La fiabilidad del propio  $r$  depende en parte de la fiabilidad de las estimaciones tanto de la distancia física como de  $\tilde{D}$ . En las distancias cortas, las distancias físicas son exactas ya que se determinan a partir de una secuencia de DNA conocida, mientras que las estimaciones de mayor rango son menos precisas. Se puede tomar provisionalmente la potencia como un indicador de la fiabilidad de  $\tilde{D}$  ya que, si la potencia es baja, esto indica que el tamaño de la muestra era demasiado pequeño, y, con tamaños de muestra bajos, las estimaciones de  $\tilde{D}$  pueden ser poco fiables.

60 El éxito de la complicada estrategia de agrupamiento se indica en la Tabla 7, que muestra varios casos en que el desequilibrio entre loci particulares es aparentemente bajo o no detectado cuando se emplean otros métodos de agrupamiento comúnmente utilizados. La desventaja de la estrategia de agrupamiento aquí utilizada es que es bastante laboriosa ya que la información utilizada para el agrupamiento se basaba en una estimación aproximada de las frecuencias haplotípicas "observadas" (véase el Ejemplo 2). Para los marcadores más polimórficos, la mayor heterocigosidad

## ES 2 342 992 T3

significaba que la estimación de  $\delta_{ij}$  era menos precisa ya que había una mayor proporción de haplotipos ambiguos. A pesar de este inconveniente, se puso cuidado en tener en cuenta tanto el signo y la magnitud de  $\delta_{ij}$  como las frecuencias de los alelos afectados.

5 El método podría ser simplificado, en un estudio suficientemente grande, considerando sólo los haplotipos inequívocos cuando se determina el agrupamiento. En la determinación de  $\delta_{ij}$  se utiliza la máxima cantidad de conocimiento previo para el agrupamiento de los marcadores multialélicos, y ésta puede ser la razón por la que se detectó desequilibrio entre casi todas las combinaciones de marcadores por parejas.

10 Los dos haplotipos que contienen los 8 marcadores, así como otros haplotipos más cortos, son de particular interés ya que es probable que combinaciones particulares de alelos de los genes de IL-1 puedan actuar de concierto para determinar un fenotipo inflamatorio global. El conocimiento de qué marcadores están en un acusado desequilibrio de ligamiento no sólo permite un diseño más racional de los estudios genéticos sino que también proporciona pistas para el mecanismo de la enfermedad.

15 Alelos adicionales pueden ser también parte del haplotipo (44112332) de IL-1. Hemos mostrado previamente que 5 nuevos marcadores estaban asociados con el alelo 2 del marcador VNTR del gen IL1RN [Clay *et al.*, *Hum. Genetics* **97**: 723-6 (1996)]. Es probable que estos cinco alelos estén en desequilibrio de ligamiento, aunque no se ha llevado a cabo aún la confirmación mediante análisis estadísticos. Por lo tanto, el haplotipo (44112332) de IL-1 puede incluir 20 también estos cinco marcadores.

25 Similarmente, Guasch halló 3 alelos adicionales en IL1RN [Guasch *et al.*, *Cytokine* **8**: 598-602 (1997)] que aparecían con las mismas frecuencias en una muestra pequeña (12 individuos). Uno de los alelos de Guasch (el alelo MspI) es el alelo 8006 del estudio de Clay. Por lo tanto, los dos alelos adicionales de Guasch (alelos MwoI y SspI) pueden ser parte del haplotipo (4112332) de IL-1 aquí revelado. Sin embargo, esto debería ser confirmado como aquí se describe porque el tamaño muy pequeño de la muestra puede haber producido resultados engañosos.

30 Guasch también trabajó con tres alelos del gen IL1B. Los alelos eran el alelo 5887, que corresponde probablemente al alelo Taq de la posición +3953 de IL1B aquí descrito, así como un alelo 5810 (BsoFI) y un alelo 1903 (AluI). Se dice que estos tres alelos están en “escaso desequilibrio de ligamiento”, pero un tipado preciso con una muestra de mayor tamaño puede indicar que el alelo AluI es también parte del haplotipo (4412332) de IL-1 ya que las frecuencias alélicas de los alelos TaqI y AluI son similares (0,78/0,22 frente a 0,74/0,26). Sin embargo, el desequilibrio de ligamiento aparece más débil que en los alelos de IL1RN descritos por Guasch.

35 Por lo tanto, además de los alelos aquí identificados, el haplotipo (44112332) de IL-1 puede contener los

40 alelo 2 del marcador 1731 del gen IL1RN (A en la posición 1731),  
alelo 2 del marcador 1812 del gen IL1RN (A en la posición 1812),  
alelo 2 del marcador 1868 del gen IL1RN (G en la posición 1868),  
45 alelo 2 del marcador 1887 del gen IL1RN (C en la posición 1887),  
alelo 2 del marcador 8006 del gen IL1RN (contiene un sitio Hpall o Mspl),  
alelo 2 del marcador 8061 del gen IL1RN (carece de un sitio Mwol), y  
50 alelo 2 del marcador 9589 del gen IL1RN (contiene un sitio Sspl).

55

60

65

## ES 2 342 992 T3

Además, para multiplicar estos alelos, se pueden utilizar los siguientes cebadores de PCR:

5	TTACGCAGATAAGAACCACTAGTTGG TTTCCTGGACGCTTGCTCACAG (usado para 1731, 1812, 1868 y 1887)	(ID. SEC. nº 17) (ID. SEC. nº 18)
10	TTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTAGC	(ID. SEC. nº 19)
15	CACCAGACTTGACACAGGACAGGCACATC (usado para 8006)	(ID. SEC. nº 20)
20	CGACCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAG (usado con la ID. SEC. nº 20 para 8006)	(ID. SEC. nº 21)
25	ACACAGGAAGGTGCCAAGCA TGCAGACAGACGGGCAAAGT (usado para 8006 y 9589)	(ID. SEC. nº 22) (ID. SEC. nº 23)

### 30 Ejemplo 4

*El haplotipo (44112332) de IL-1 está asociado con la nefropatía diabética*

35 Se investigó la presencia de los dos haplotipos aquí descritos, en poblaciones sanas y enfermas, para determinar si los haplotipos estaban asociados con una enfermedad inflamatoria. 81 pacientes aquejados de diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM; del inglés, non-insulin dependant diabetes mellitus) con nefropatía fueron comparados con 198 sujetos sanos étnicamente equivalentes del Ejemplo 3 y 147 pacientes aquejados de NIDDM sin nefropatía. El genotipado se llevó a cabo como en el Ejemplo 1.

40 El haplotipo (44112332) de IL-1 era portado por 24 de 79 de los pacientes aquejados de NIDDM con nefropatía y 25 de 141 de los pacientes aquejados de NIDDM sin nefropatía. Sin embargo, no se halló el segundo haplotipo (33221461) en los pacientes con nefropatía (0/81). El haplotipo (44112332) de IL-1 estaba significativamente sobrerepresentado en el grupo de los pacientes con respecto al grupo testigo de individuos sanos (24/79 frente a 34/198; p = 0,015) y el grupo de pacientes con NIDDM sin nefropatía (24/79 frente a 25/141; p = 0,03). Por lo tanto, el haplotipo está asociado con una enfermedad inflamatoria.

### 50 Ejemplo 5

*Un haplotipo de IL-1 está asociado con una enfermedad inflamatoria*

55 Éste es un ejemplo profético. Se examinan otras enfermedades como en el Ejemplo 4. Se halla que el haplotipo (44112332) de IL-1 está asociado con la enfermedad de las arterias coronarias, la osteoporosis, la nefropatía en diabetes mellitus, la alopecia areata, la enfermedad de Graves, el lupus eritematoso sistémico, el liquen escleroso y la colitis ulcerosa.

60 Asimismo, el haplotipo (33221461) de IL-1 está asociado con la enfermedad periodontal, la artritis juvenil crónica, la psoriasis, la diabetes dependiente de insulina, y la retinopatía diabética.

### Ejemplo 6

*Nuevos marcadores están ligados a un haplotipo de IL-1*

65 Éste es un ejemplo profético. Se identifican marcadores adicionales mediante el análisis de la secuencia y el análisis con enzimas de restricción, de la región 2q13-14. Estos nuevos marcadores son identificados como pertenecientes a un haplotipo de IL-1 de la manera descrita en los Ejemplos 2 y 3.

## ES 2 342 992 T3

### Ejemplo 7

*El haplotipo (44112332) de IL-1 se utiliza para predecir la susceptibilidad a una enfermedad*

- 5      Éste es un ejemplo profético. Se genotipa un paciente con una historia familiar de colitis ulcerosa en cuanto a la presencia del haplotipo (44112332) de IL-1. Se lleva a cabo el genotipado como en el Ejemplo 1 y se determina que el paciente porta uno o más alelos del haplotipo. De esta manera, el paciente es tratado con antagonistas de IL-1 para prevenir la enfermedad.
- 10     Se genotipa un segundo paciente con una historia familiar de enfermedad de las arterias coronarias en cuanto al grupo génico de IL-1. Se halla que el paciente porta uno o más alelos del haplotipo (44112332) de IL-1 y que es homocigoto para el alelo 2 de VNTR. De esta manera, es 5,4 veces más probable que el paciente desarrolle la enfermedad de las arterias coronarias que la población general y es enérgicamente tratado para evitar la enfermedad.

15     Ejemplo 8

*Haplótipos adicionales son estadísticamente significativos*

- 20     Éste es un ejemplo profético. Se tipan 400 cromosomas adicionales como en el Ejemplo 1 y se evalúa el desequilibrio de ligamiento como en el Ejemplo 2. Se halla que el haplotipo (33221461) de IL-1 está presente aproximadamente 4 veces más frecuentemente de lo esperado ( $p \sim 0,05$ ).
- 25     De un modo similar, se determina que los marcadores siguientes están presentes en el haplotipo (44112332) de IL-1 ( $p << 0,05$ ).

alelo 2 del marcador 1731 del gen IL1RN  
30     alelo 2 del marcador 1812 del gen IL1RN  
      alelo 2 del marcador 1868 del gen IL1RN  
      alelo 2 del marcador 1887 del gen IL1RN  
35     alelo 2 del marcador 8006 del gen IL1RN  
      alelo 2 del marcador 8061 del gen IL1RN  
      alelo 2 del marcador 9589 del gen IL1RN.  
40

Todos los documentos aquí citados se incorporan por referencia y se enumeran separadamente aquí por conveniencia.

- 45     Patente de EE.UU. nº 4.582.788  
      Patente de EE.UU. nº 4.666.828  
50     Patente de EE.UU. nº 4.801.531  
      Patente de EE.UU. nº 5.110.920  
      Patente de EE.UU. nº 5.268.267  
55     Solicitud de EE.UU. nº 08/813.416  
      Solicitud de EE.UU. nº 08/628.282  
      Solicitud de Gran Bretaña nº 9618960.0  
60     **Blakemore, et al., Hum. Genet. 97(3); 369-74 (1996)**  
         **Blakemore, et al., J. Clin. Endocrinol. 80(1): 111-5 (1995)**  
65     **Blakemore, et al., Arthritis Rheum. 37: 1380-85 (1994)**  
         **Clay, et al., Hum. Genet. 97: 723-6 (1996)**

ES 2 342 992 T3

- Clay, et al., *Hum. Genet.* **94**: 407-10 (1994)
- di Giovine, et al., *Hum. Molec. Genet.* **1(6)**: 450 (1992)
- 5 di Giovine, et al., *Cytokine* **7(6)**: 606 (1995)
- Guasch, et al., *Cytokine* **8**: 598-602 (1997)
- Handbook of Human Genetic Linkage, 1994, John Hopkins University Press
- 10 Hill, *Heredity*, **33**: 229-39 (1974)
- Pociot, et al., *Eur. J. Clin. Invest.* **22**: 396-402 (1992)
- 15 Mansfield, et al., *Gastroenterol.* **106(3)**: 637-42 (1994)
- McDowell, et al., *Br. J. Rheumatol.* **32(Supp 1)**: 182 (1983)
- 20 McDowell, et al., *Arthritis Rheum.* **38**: 221-28 (1995)
- Moling et al., *Scand. J. Immunol.* **27**: 705-16 (1988)
- Nicklin, et al., *Genomics* **19**: 382-4 (1994)
- 25 Nothwang et al. *Genomics (in press)*
- Pociot, et al., *Eur J. Clin. Invest.* **22**: 396-402 (1992)
- Spurr, et al., *Cytogenet. & Cell Genet. (in press, 1996)*
- 30 Tarlow, et al., *Hum. Genet.* **91**: 403-4 (1993)
- Tarlow, et al., *J. Invest. Dermatol.* **103**: 387-90 (1994)
- Thompson, et al., *Am. J. Hum. Genet.* **42**: 113-24 (1988)
- 35 Todd & Naylor, *Nucleic Acids Res.* **19**: 3756 (1991)
- Weir, et al., *Genet.* **88**: 633-42 (1976)
- 40 Wilson, et al., *Hum. Molec. Genet.* **1(5)**: 353 (1992)
- Xie and Ott, HANDBOOK OF HUMAN GENETIC LINKAGE, John Hopkins Un. Press, pp. 188-98 (1994)
- Zouros, et al., *Genet.* **85**: 543-50 (1977)
- 45 Zuliani, et al., *Am. J. Hum. Genet.* **46**: 963-69 (1990)

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar la susceptibilidad de un paciente a un trastorno inflamatorio, método que comprende:

5 detectar la presencia de un haplotipo (44112332) de IL-1 en una muestra biológica obtenida del paciente,

en que el haplotipo (44112332) de IL-1 está definido por una pluralidad de alelos seleccionados del grupo que consiste en:

10

alelo 4 de un marcador 222/223 de IL1A;

15

alelo 4 de un marcador gz5/gz6 de IL1A;

20

alelo 1 de un marcador -889 de IL1A;

25

alelo 1 de un marcador +3953 de IL1B;

30

alelo 2 de un marcador -511 de IL1B;

35

alelo 3 de un marcador gaat.p33330;

40

alelo 3 de un marcador Y31; y

45

alelo 2 de un marcador VNTR de IL1RN;

y en que la presencia de dicho haplotipo (44112332) de IL-1 indica la susceptibilidad de dicho paciente a un trastorno inflamatorio, en que dicho trastorno inflamatorio es seleccionado del grupo que consiste en la enfermedad de las arterias coronarias, osteoporosis, nefropatía en diabetes mellitus, alopecia areata, enfermedad de Graves, lupus eritematoso sistémico, liquen escleroso y colitis ulcerosa.

50 2. El método de la Reivindicación 1, en que dicha detección se realiza multiplicando dicha muestra biológica con una PCR en que se usa al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

40

ATGTATAGAATTCCATTCTG	(ID. SEC. n° 1),
TAAAATCAAGTGTGATGTAG	(ID. SEC. n° 2),
GGGATTACAGGCCTGAGCCACCGCG	(ID. SEC. n° 3),
TTAGTATTGCTGGTAGTATTCAAT	(ID. SEC. n° 4),
TGTTCTACCACCTGAACCTAGG	(ID. SEC. n° 5),
TTACATATGAGCCTTCATG	(ID. SEC. n° 6),
CTCAGGTGTCTCGAAGAAATCAA	(ID. SEC. n° 7),
GCTTTTGCTGTGAGTCCCCG	(ID. SEC. n° 8),
TGGCATTGATCTGGTTCATC	(ID. SEC. n° 9),
GTTTAGGAATCTTCCCACTT	(ID. SEC. n° 10),
GAGGCCTGAGAATCTCAAGA	(ID. SEC. n° 11),
GTGTCCTCAAGTGGATCTGG	(ID. SEC. n° 12),
GGGCAACAGAGCAATGTTCT	(ID. SEC. n° 13),
CAGTGTGTCAGTGTACTGTT	(ID. SEC. n° 14),
CTCAGCAACACTCCTAT	(ID. SEC. n° 15), y
TCCTGGTCTGCAGGTAA	(ID. SEC. n° 16).

65

3. Un kit diagnóstico para la predicción de un trastorno inflamatorio, kit que comprende al menos dos oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en:

5	ATGTATAGAATTCCATTCTG TAAAATCAAGTGTGATGTAG GGGATTACAGGCAGGCCACCGCG	(ID. SEC. nº 1), (ID. SEC. nº 2), (ID. SEC. nº 3),
10	TTAGTATTGCTGGTAGTATTCATAT TGTTCTACCACCTGAAGTAGG TTACATATGAGCCTCCATG	(ID. SEC. nº 4), (ID. SEC. nº 5), (ID. SEC. nº 6),
15	CTCAGGTGTCTCGAAGAAATCAA GCTTTTGCTGTGAGTCCCG TGGCATTGATCTGGTTCATC	(ID. SEC. nº 7), (ID. SEC. nº 8), (ID. SEC. nº 9),
20	GTTTAGGAATCTTCCCAC GAGGCAGTGAGAACATCTCAAGA GTGTCTCAAGTGGATCTGG	(ID. SEC. nº 10), (ID. SEC. nº 11), (ID. SEC. nº 12),
25	GGGCAACAGAGCAATGTTCT CAGTGTGTCAGTGTACTGTT CTCAGCAACACTCCTAT TCCTGGTCTGCAGGTAA TTACGCAGATAAGAACCAAGTTGG	(ID. SEC. nº 13), (ID. SEC. nº 14), (ID. SEC. nº 15), (ID. SEC. nº 16), y (ID. SEC. nº 17).

4. El kit diagnóstico de la Reivindicación 3, que comprende además una muestra testigo.

5. El kit diagnóstico de la Reivindicación 4, en que dicha muestra testigo comprende uno o más alelos seleccionados del grupo que consiste en:

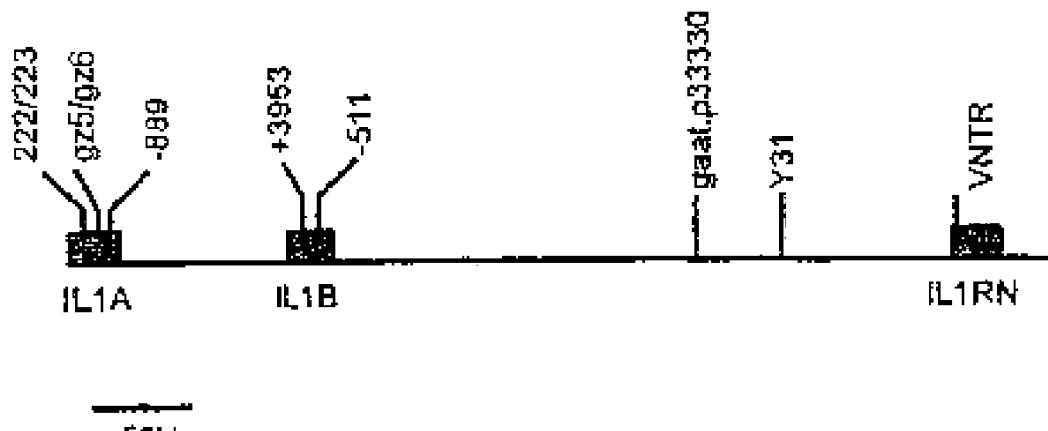
35	alelos de un marcador 222/223 de IL1A; alelos de un marcador gz5/gz6 de IL1A;
40	alelos de un marcador -889 de IL1A; alelos de un marcador +3953 de IL1B;
45	alelos de un marcador -511 de IL1B; alelos de un marcador gaat.p33330; alelos de un marcador Y31; y alelos de un marcador VNTR de IL1RN.

6. El kit diagnóstico de la Reivindicación 3, en que dicho oligonucleótido comprende una etiqueta detectable.

7. El kit diagnóstico de la Reivindicación 6, que comprende además reactivos para el muestreo de DNA y reactivos para la multiplicación por PCR.

8. El kit diagnóstico de la Reivindicación 7, que comprende además medios para el muestreo de DNA.

FIGURA 1



Loci polimórficos en el grupo génico de IL-1

ES 2 342 992 T3

FIGURA 2

