



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 517**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/53** (2006.01)

**C12N 9/04** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/25** (2006.01)

**A61K 38/44** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 31/07** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99933376 .8**

86 Fecha de presentación : **23.06.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1090127**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2001**

54

Título: **Nucleótidos ADH7.**

30

Prioridad: **26.06.1998 SE 9802294**  
**26.06.1998 US 90925 P**

73

Titular/es: **AstraZeneca AB.**  
**151 85 Södertälje, SE**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

72

Inventor/es: **Olson, Lars;**  
**Bürvenich, Silvia;**  
**Sydow, Olof;**  
**Anvret, Maria y**  
**Zhang, Zhiping**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 306 517 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

Nucleótidos ADH7.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos humanos aislados implicados en la enfermedad de Parkinson y a los usos de los mismos, tal como en métodos de diagnóstico y pronóstico y en preparaciones farmacéuticas.

10 **Antecedentes**

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa que ataca por igual a los hombres y a las mujeres. Se estima que afecta aproximadamente a 15 de cada 10.000 individuos, y usualmente aparece por primera vez a una edad de aproximadamente 55-60 años. A pesar de considerables esfuerzos, la razón para la degeneración de las neuronas de dopamina del cerebro medio, causante de los síntomas en los pacientes afectados por este trastorno incapacitante, incurable, no se conoce. Además, aunque muchos de los síntomas de la enfermedad de Parkinson pueden ser imitados mediante lesiones o administración de neurotoxinas a animales experimentales, la enfermedad por sí misma no se conoce en ninguna otra especie aparte del hombre, dificultando así la investigación dirigida al entendimiento de la etiología y el desarrollo de nuevas terapias.

La exposición a compuestos tóxicos en el medio ambiente sigue siendo una causa hipotética de la enfermedad, aunque los estudios epidemiológicos han generado pocas pistas en cuanto a su etiología. Más recientemente, un interés en las formas familiares de la enfermedad ha indicado la presencia de componentes genéticos, y se ha informado de su conexión con un área en el cromosoma 4, y se discute con más detalle más adelante.

Así, en recientes estudios de ligamiento, se han mapeado tipos autosómicos dominantes o autosómicos recesivos de la enfermedad de Parkinson para varios loci diferentes en el genoma humano. Aunque estos tipos de enfermedad de Parkinson difieren a menudo de la enfermedad de Parkinson esporádica y constituyen solamente una pequeña fracción de la población total de pacientes, los loci reportados podrían conferir susceptibilidad también a formas idiopáticas de la enfermedad de Parkinson.

Polymeropoulos *et al* (Science 274, p. 1197 (1996)) mapearon Parkinson dominante autosómico al cromosoma 4q21-q23. Llamaron a este área "PARK1". Más tarde, encontraron una mutación en el gen para la alfa-sinucleína que se segregaba con la enfermedad en unas grandes gemelas italianas y tres griegas, y que no pudieron encontrar en individuos de control sanos. Se encontró que la sinucleína estaba contenida abundantemente en los cuerpos de Lewy, proporcionando así una prueba de un vínculo causal entre mutación y enfermedad. Sin embargo, a pesar de los grandes esfuerzos de otros grupos para encontrar mutaciones de la sinucleína en sus propios pacientes, no pudieron identificar ninguna mutación en el gen de la alfa-sinucleína en su material.

De manera interesante, Vaughan *et al.* (Hum. Mol. Genet. 7, 751 (1998)) han informado sobre una familia alemana con dominante autosómico Parkinsoniano para mostrar la conexión con la región PARK1 4q21-q23. En esta familia, no se pudieron identificar mutaciones en la alfa-sinucleína. Dichos autores sugieren que podría haber otro gen en el mismo locus que podría ser el responsable de la enfermedad. En este caso, la mutación de la sinucleína en las gemelas italianas y griegas puede ser un marcador que se segrega con el verdadero gen de la enfermedad.

Por consiguiente, la técnica anterior no ha identificado ningún gen responsable de la enfermedad de Parkinson idiopática en los seres humanos. Así, en el estado actual de la técnica, todavía no hay herramientas de diagnóstico y pronóstico fiables a este respecto y, por tanto, los individuos en riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson no tienen un modo seguro de saber esto de antemano. Además, y quizá lo que es más importante, los pacientes que padecen la enfermedad de Parkinson no pueden confiar aún en que la ciencia les proporcione un remedio seguro para esta sumamente molesta e incapacitante enfermedad.

**Resumen de la invención**

El objeto de la presente invención es satisfacer la necesidad definida anteriormente con respecto a la enfermedad de Parkinson. Por consiguiente, la presente invención se refiere, de manera concluyente, al establecimiento de la identidad de un gen humano en el que se desarrolla la enfermedad de Parkinson, así como a las mutaciones específicas de dicho gen asociadas con la enfermedad. Más específicamente, se ha demostrado por primera vez, según la presente invención, que el gen humano que codifica la alcohol deshidrogenasa 7 (ADH7) está asociado significativamente al desarrollo de la enfermedad de Parkinson, exhibiendo una o más mutaciones, definidas en la presente memoria, que desencadenan la enfermedad. Por consiguiente, los nuevos hallazgos acordes con la presente invención también implican un nuevo uso de la ADH7 en la diagnosis, tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Parkinson. La invención será descrita con más detalle a continuación, junto con diversos usos nuevos ventajosos.

65 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra la secuencia previamente publicada de la ADH7 (Zgombic *et al.*, *supra*).

La Figura 2 muestra los registros de GenBank U16286 a 16293 que albergan las secuencias del gen ADH7 humano para el promotor, todos los exones y secuencias intrónicas en una extensión más grande que la mostrada en la figura 1.

La Figura 3 muestra la Tabla 1, en la que se definen los cebadores usados para amplificar ocho fragmentos del gen ADH7 humano según la sección Parte "Experimental" de más adelante.

La Figura 4 muestra la Tabla 2, en la que las secuencias de los ocho fragmentos mutados amplificados M1-M7 acordes con la invención se comparan con correspondientes secciones de tipo salvaje de la secuencia descrita en la Figura 1 o las entradas de GeneBank acordes con la Figura 2.

La Figura 5 muestra las localizaciones de las mutaciones M1-M7 del gen ADH7 acordes con la invención.

La Figura 6A muestra la Tabla 3, en la que se describe la frecuencia del alelo A1 y se compara para diferentes grupos, mientras que la Figura 6B muestra la Tabla 4 que presenta la ocurrencia de homocigotos para A1 y A3 entre pacientes de Parkinson.

### Descripción detallada de la invención

Así, más específicamente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un ácido nucleico asociado a la alcohol deshidrogenasa 7 (ADH7), que comprende partes o toda la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la ADH7 de tipo salvaje humana, o una variante de la misma, que incluye al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en M2, M3 y M6 que se definen en la Figura 4. Cuando se interpreta la tabla de la Figura 4 de la presente solicitud, se hace referencia a las secuencias de GeneBank descritas en la Figura 2. Esto es debido al hecho de que la secuencia de la ADH7 publicada por Zgombic-Knight *et al.* (*supra*) en 1995 no es la secuencia completa, pero ha sido complementada más tarde por las referencias de GeneBank descritas en la Figura 2 y referidas en dicha tabla. Así, como no existe una numeración establecida de la totalidad de las secciones secuenciadas hasta ahora, la presente solicitud usa ambas de estas figuras para identificar las mutaciones acordes con la invención. Es de entender que la presente invención se refiere a las mutaciones M1-M7 definidas en la presente memoria, así como a las mismas mutaciones definidas por cualquier sistema alternativo de numeración, esto es, a cualquier mutación funcionalmente equivalente independientemente de la notación elegida. En conclusión, el presente sistema de identificación de las mutaciones M1-M7 acordes con la invención permite a los expertos en este campo localizar las mutaciones hoy, así como en cualquier secuencia de ADH7 completa en el futuro. Además, la presente invención también permitirá el establecimiento de ubicaciones para mutaciones en genes relacionados, tales como ADH5.

La presente invención se refiere a una mutación seleccionada del grupo que consiste en M2, M3 y M6 como tales, así como a los usos específicos de cualquier mutación seleccionada del grupo que consiste en M2, M3 y M6. Esto es debido al hecho de que M1 se publicó en realidad antes de la fecha de prioridad de la presente solicitud (Zgombic-Knight *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, vol. 270, Ejemplar del 3 de marzo, págs. 4305-4311). Sin embargo, dicha publicación describía M1 dentro de la secuencia de tipo salvaje presentada en la misma, lo cual los presentes inventores han demostrado ahora que es erróneo, ya que M1 es de hecho una mutación asociada con la enfermedad de Parkinson. Así, en la publicación anterior de la secuencia base de M1, los diversos usos ventajosos de la misma descritos en la presente memoria no pudieron ser previstos, y son por consiguiente aspectos patentables de la presente invención. Además, la presente invención se refiere también a la subsecuencia de la secuencia de ADH7 de tipo salvaje correspondiente a M1 *per se*, ya que dicha secuencia nunca ha sido descrita antes de la presente invención. En realizaciones específicas, la presente invención se refiere a nucleótidos aislados comprendidos de secuencias de DNA que incluyen al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en M2, M3 y M6, o la secuencia de tipo salvaje correspondiente a M1, y al menos aproximadamente 10 bases de las secuencias adyacentes y/o circundantes mostradas en la Figura 4 y definidas también por las SEQ. ID. NOS. 2, 3 y 6 y la SEQ. ID. N° 1, respectivamente. Dichas secuencias pueden, en realizaciones particulares, estar rodeadas de, o adyacentes a, cualquier número de bases consecutivas de la secuencia humana de tipo salvaje definida en la Figura 1, hasta esencialmente todo de dicha secuencia. Para el uso como sonda, puede ser adecuada una longitud de aproximadamente 10 bases en algunos métodos, pero los expertos en este campo pueden elegir fácilmente una longitud adecuada dependiendo del uso pretendido. En una realización particular, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica ADH7, ácido nucleico que difiere de la secuencia publicada anteriormente incluyendo el tipo salvaje correcto en lugar de la mutación M1. La presente secuencia que codifica ADH7 puede ser genómica o estar comprendida de cDNA.

En una realización particular de este aspecto de la invención, dicha mutación es la mutación denotada como M2, que está en una caja TATA putativa. Alternativamente, el nucleótido acorde con la invención comprende una cualquiera de las mutaciones M3 ó M6 o cualquier combinación de las mismas.

Como se mencionó anteriormente, los presentes inventores han identificado por primera vez el gen humano que codifica la alcohol deshidrogenasa 7 (ADH7) como un gen significativo asociado con la enfermedad de Parkinson en los seres humanos. Según la invención, un subconjunto de pacientes que padecen la enfermedad de Parkinson exhiben una o más de las mutaciones definidas en la presente memoria, que desencadenan así la enfermedad. Por consiguiente, en una realización particular de la presente invención, el nucleótido acorde con la invención es un gen codificante de la ADH7 mutante aislado, capaz de desencadenar la enfermedad de Parkinson en un ser humano. Adicional o alternativamente, el gen mutante aislado acorde con la invención es capaz de pasar la enfermedad a una generación posterior. En el presente contexto, es de entender que la expresión enfermedad de Parkinson debe ser interpretada para

## ES 2 306 517 T3

incluir todas las clases de parkinsonismo. Es de entender también que las formas familiares así como no familiares de la enfermedad de Parkinson están incluidas en dicha expresión.

En la presente solicitud, el término “ácido nucleico” se refiere a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido bien en forma de hebra única o bien de doble hebra, y engloba los análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a los nucleótidos de aparición natural. Cuando se hace referencia al gen, es de entender que están englobados tanto DNA como cDNA.

Preferiblemente, los presentes nucleótidos comprenden una o dos de las mutaciones definidas anteriormente rodeadas de, o adyacentes a, la secuencia del ADH7 humano descrita en la Figura 1 y 2 o partes esenciales de la misma. En realizaciones alternativas, la presente invención no está restringida a nucleótidos correspondientes al gen ADH7 humano completo o partes esenciales del mismo, tales como fragmentos funcionales del mismo, o a análogos del mismo, sino que está limitada solamente por la presencia de una o más de las mutaciones definidas en la presente memoria, así como a cualquier fragmento(s) que rodea(n) la(s) mutación(es). Cómo son de largos los fragmentos circundantes estará determinado por el uso futuro pretendido de los mismos, como se discute más adelante, pero pueden estar en cualquier punto de un intervalo de aproximadamente 0-50, o aproximadamente 50-100, preferiblemente hasta aproximadamente 300, tal como 200-300, y lo más preferiblemente hasta 1000 pares de bases del ADH7. Así, la presente invención engloba las mutaciones definidas anteriormente en un entorno ADH7. En una realización de la presente invención, la secuencia del ADH7 es esencialmente como se define en la Figura 1 y 2, esto es, al menos una mutación está flanqueada por una secuencia que codifica la enzima humana ADH7. Es de entender que todas las variantes de la secuencia de nucleótidos del ADH7 descrita en la presente memoria están también dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención se refiere también a un nucleótido que, bajo condiciones rigurosas, es capaz de realizar una hibridación específica con uno cualquiera de los nucleótidos acordes con la invención y definidos anteriormente. En el presente contexto, el término “hibridarse específicamente con” se refiere a la unión, duplicación o hibridación de una molécula solamente con una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja de DNA ó RNA. En el presente contexto, el término “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará con su secuencia diana, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de las secuencias, y serán diferentes en circunstancias diferentes. El experto en este campo elegirá fácilmente las condiciones adecuadas en el presente contexto. De manera general, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmico (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración salina sea menor que aproximadamente 1,0 M de ión Na, tal como aproximadamente 0,01-1,0 M, a un pH de aproximadamente 7,0-8,3, y la temperatura está entre aproximadamente 30°C y 60°C, dependiendo de la longitud del nucleótido. También se pueden obtener condiciones rigurosas mediante la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Tal nucleótido acorde con la invención puede ser de cualquier longitud, de acuerdo con lo definido anteriormente.

Así, la presente invención se refiere también al uso de cualquiera de los presentes nucleótidos como sondas. Como se usa en la presente memoria, el término “sonda de ácido nucleico” se define como un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria mediante uno o más tipos de enlaces químicos, usualmente por emparejamiento de bases complementarias, usualmente mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Las sondas acordes con la invención pueden incluir bases naturales (es decir, A, G, C ó T) o modificadas (tales como 7-deazaguanosina, inosina, etc.). Las sondas acordes con la invención pueden unirse mediante otros enlaces distintos a enlaces fosfodiéster, tales como enlaces peptídicos si la sonda es un ácido nucleico peptídico (PNA), lo cual es también un aspecto de la invención, siempre y cuando no se interfiera con la hibridación. Las sondas acordes con la invención se marcan preferiblemente de manera directa, p.ej. con isótopos, cromóforos, lumíforos, cromógenos etc, o de manera indirecta, tal como con biotina, a la cual se puede unir más tarde un complejo de estreptavidina. Evaluando la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada, preferiblemente una o más de las mutaciones acordes con la invención. Tales sondas se usan preferiblemente en la diagnosis de la enfermedad de Parkinson, tal como en los kits acordes con la invención, discutidos con más detalle más adelante.

Los presentes nucleótidos se pueden usar también como cebadores, p.ej. para PCR, los cuales pueden estar presentes, por ejemplo, en un kit. Además, como se discute más adelante, se pueden usar para generar polipéptidos inmunogénicos o proteínas de fusión para el uso en la generación de anticuerpos específicos que reconozcan el epítipo mutante.

Los nucleótidos acordes con la invención se clonan, o amplifican, mediante cualesquiera métodos *in vitro* o *in vivo*, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencias autosostenido (SSR) o la clonación y amplificación basada en células, en donde la célula puede ser cualquier célula adecuada, tal como una bacteria, una línea celular cultivada, etc. Los expertos en este campo conocen bien una amplia variedad de métodos de clonación y amplificación, véase, p.ej. Sambrook *et al.*, (1989); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed, Vol. 1-3).

## ES 2 306 517 T3

La invención se refiere también a péptidos, polipéptidos o proteínas sintetizados específicamente para unirse a uno cualquiera de los presentes nucleótidos, tales como las mutaciones y/o sus secuencias circundantes/adyacentes. En el presente contexto, los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable para referirse a un polímero de residuos aminoácidos. Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se aplican a polímeros de aminoácidos, en los que uno o más residuos aminoácidos son análogos químicos artificiales de un aminoácido de aparición natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de aparición natural. En una realización específica, la invención se refiere al péptido presente para el uso como medicamento.

Los péptidos, polipéptidos y proteínas acordes con la invención se pueden sintetizar usando técnicas químicas estándar de síntesis de péptidos, bien conocidas por el experto en la materia. Para la síntesis en fase sólida, véase p.ej. Barany y Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, vol 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*. Los presentes péptidos y polipéptidos también se pueden producir usando tecnología de DNA recombinante. De manera general, esto implica crear una secuencia de DNA que codifica el péptido deseado, p.ej. como una secuencia recombinante que codifica el presente péptido como parte de una proteína de fusión, poniendo el DNA en una caja de expresión bajo el control de un promotor particular, expresando el péptido en un huésped y aislando el péptido expresado. En el caso de una proteína, se puede requerir su renaturalización. Los ácidos nucleicos que codifican los péptidos o proteínas se pueden expresar en diversas células huésped, que incluyen *E. coli.*, otros huéspedes bacterianos, levadura, y diversas células eucarióticas superiores, tales como las líneas celulares COS, CHO y HeLa, y líneas celulares de mieloma. El gen se conectará de manera operable a secuencias de control de la expresión apropiadas para cada huésped. Para *E. coli.*, esto incluye un promotor tal como los promotores T7, trp o lambda, un sitio de unión con ribosomas y preferiblemente una señal de terminación de la transcripción.

La expresión de un gen ADH7 mutado puede ser detectada y/o cuantificada detectando o cuantificando el péptido expresado codificado por el nucleótido acorde con la invención. Están disponibles varios medios bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos pueden incluir métodos analíticos bioquímicos, tales como electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión y similares, o diversos métodos inmunológicos, tales como reacciones de precipitación en fluido o gel, inmunodifusión (simple o doble), inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISAs), ensayos inmunofluorescentes, análisis Western blot, etc.

En la presente solicitud, el término “análogo de ADH7” es para ser interpretado como que comprende cualesquiera otras alcohol deshidrogenasas distintas a la ADH7. “Anticuerpo” se refiere a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo, que se une de manera específica a y reconoce un analito (antígeno). Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de regiones variables de inmunoglobulinas. Los anticuerpos acordes con la invención son elevados a cualquier péptido o polipéptido codificado por una de las presentes mutaciones, opcionalmente junto con regiones de ADH7 flanqueantes. Los anticuerpos son preferiblemente monoclonales, pero también pueden ser policlonales. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de células que secretan el anticuerpo deseado. Después, los anticuerpos se criban en cuanto a la unión a polipéptidos normales o modificados, o se criban en cuanto a su actividad agonística o antagonística, p.ej. la actividad mediada a través de un péptido acorde con la invención. Los anticuerpos monoclonales específicos, monoclonales y policlonales, se unirán usualmente con un KD de al menos aproximadamente 0,1 mM, más usualmente al menos aproximadamente 50  $\mu$ M y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 1  $\mu$ M o mejor. Los métodos de producción de anticuerpos son conocidos por los expertos en este área, véase p.ej. Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology*, Wiley Greene, NY; Harlow and Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, NY y Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales a partir de diversos huéspedes mamíferos, tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc. Se encuentra una descripción de técnicas para preparar tales anticuerpos monoclonales en, p.ej., Stites *et al.* (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4ª ed), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y las referencias allí citadas. Resumido brevemente, este método procede inyectando a un animal un inmunogen. Después, el animal es sacrificado y se toman células de su bazo, las cuales se fusionan con células de mieloma. El resultado es una célula híbrida o un “hibridoma”, que es capaz de reproducirse *in vitro*. Después, la población de hibridomas se criba para aislar clones individuales, cada uno de los cuales secreta una única especie de anticuerpo para el inmunogen. De esta manera, las especies de anticuerpos individuales obtenidas son los productos de células B simples inmortalizadas y clonadas del animal inmune generados en respuesta a un sitio específico reconocido en la sustancia inmunogénica. Los métodos alternativos de inmortalización incluyen la transformación con virus de Epstein-Barr, oncogenes, retrovirus etc. La presente invención se refiere a anticuerpos quiméricos, así como a anticuerpos humanizados.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un nucleótido, anticuerpo o polipéptido acorde con la invención en la detección por pronóstico y/o diagnóstico de mutaciones asociadas a la enfermedad de Parkinson en pacientes o individuos con una predisposición al Parkinson, así como a kits para realizar tal diagnosis. Por tanto, según la invención, se puede detectar un gen ADH7 defectivo, que implica un riesgo incrementado de desarrollar la enfermedad de Parkinson, o alternativamente, establecer la diagnosis de la enfermedad. Tal kit puede comprender uno o más de los nucleótidos acordes con la invención como reactivos. Alternativamente, el kit acorde con la invención comprenderá medios para detectar al menos una de las mutaciones denotadas en la presente memoria como M1-M7, siendo dichos medios p.ej. cebadores, enzimas de restricción, etc. El kit también incluirá preferiblemente instrucciones

## ES 2 306 517 T3

para su uso. Así, el gen o producto genético ADH7 puede ser detectado usando un ensayo basado en amplificación. En un ensayo basado en amplificación, todo o parte del gen o transcripto (p.ej. mRNA ó cDNA) es amplificado, y después el producto de la amplificación es detectado. Los ensayos basados en amplificación son bien conocidos por los expertos en la técnica, y se encuentran fácilmente descripciones en la bibliografía. Las secuencias mutadas proporcionadas por la presente invención son suficientes para permitir a un experto seleccionar de manera rutinaria cebadores para amplificar cualquier porción del gen ADH7.

La presente invención se refiere también a métodos de cribado. Todas las mutaciones en la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la ADH7 humana pueden ser detectadas por cualquiera de los siguientes métodos (a-j), que se describen en detalle en: (1) Mutation Detection, A Practical Approach, R.G.H. Cotton, E. Edkins y S. Forrest (editores), The Practical Approach Series, Oxford University press (1998) y (2) Finding Mutations, The Basics, J.R. Hawkins, Oxford University Press (1997).

- (a) Análisis del polimorfismo de conformación de hebra única (SSCA, también llamado SSCP), solo o en combinación con análisis heteroduplex (HA), es uno de los métodos más ampliamente usados para la detección de mutaciones.
- (b) Electroforesis desnaturizante en gel con gradiente (DGGE) es el nombre de una familia entera de métodos similares que se basan en la reducción en la movilidad electroforética de una molécula de DNA en un medio denso durante la desnaturalización.
- (c) El ensayo de protección de la ribonucleasa o ensayo de escisión de la RNasa (RPA), el ensayo de escisión química de desapareamientos (CMM) y la detección de mutaciones usando endonucleasa T4 tipo VII (EMC) son métodos eficaces para detectar desapareamientos DNA-DNA ó DNA-RNA causados por mutaciones.
- (d) Hibridación con sondas oligonucleótidas específicas de secuencias (SSOP) toma ventaja del hecho de que bajo condiciones rigurosas, un único desapareamiento de un par de bases puede impedir la hibridación de sondas oligonucleótidas complementarias cortas.
- (e) Ensayos de ligación tales como el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA), comprenden vías adicionales de detección de cambios en secuencias de DNA.
- (f) La secuenciación directa fue el método usado según la presente invención, a la hora de detectar las siete diferentes mutaciones (M1-M7) en el gen ADH7 humano, y constituye uno de los métodos más sensibles de detección de mutaciones.
- (g) Un método bastante nuevo que se origina a partir de la secuenciación directa se llama minisequenciación o minisequenciación en fase sólida.
- (h) Amplificación selectiva de alelos específicos (PASA, también llamada ASA ó ASP) hace posible detectar mutaciones ya durante la amplificación del fragmento de interés por PCR.
- (i) Con la prueba de truncamiento de proteínas (PTT), se pueden identificar mutaciones que inducen codones de parada en la secuencia de DNA después de la traducción de la secuencia a proteína.
- (j) Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) hace uso de endonucleasas que reconocen y escinden secuencias de nucleótidos específicas. Las mutaciones en el DNA pueden cambiar la secuencia de tal modo que una endonucleasa que corta la secuencia de tipo salvaje no puede reconocer y cortar la secuencia mutada, o puede inducir un nuevo sitio de escisión para una endonucleasa que no corta la secuencia de tipo salvaje. En la figura 4, se dan ejemplos para endonucleasas de aparición natural que se pueden usar para detectar las mutaciones M1-M7. En secuencias que no pueden ser distinguidas por enzimas de aparición natural, las mutaciones pueden ser analizadas por análisis de restricción con cebador introducido, un método que altera la secuencia que rodea a la mutación.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método de cribado, en el que se detecta al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en M2, M3 y M6, definidas en la Figura 4 de la presente solicitud, con el fin de diagnosticar la enfermedad de Parkinson. En una realización, un método de cribado acorde con la invención usa enzimas de restricción que reconocen específicamente una secuencia de nucleótidos específica que rodea a una cualquiera de las mutaciones M2, M3 y M6, definidas en la Figura 4, en presencia o ausencia de la mutación respectiva, en la diagnosis de la enfermedad de Parkinson. En una realización alternativa, se usan agentes biológicos o químicos que detectan desapareamientos de ácidos nucleicos para detectar cualquiera de las mutaciones M2, M3 y M6 definidas en la Figura 4 en la diagnosis de la enfermedad de Parkinson.

Más específicamente, se pueden usar ensayos de amplificación y sondas de hibridación acordes con la invención para acceder específicamente a anomalías en el gen ADH7, el cual, según la presente invención, ha sido identificado como un gen que desencadena la enfermedad de Parkinson. Se pueden usar diversas técnicas de detección en fase sólida, véase p.ej. Fodor *et al.* (1991) Science, 251:767-777; Sheldon *et al.* (1993) Clinical Chemistry 39(4): 718-

719, y Koza *et al.* (1996) *Nature Medicine* 2(7): 753-759. Véase también Tjissen (1993): *Laboratory Techniques In biochemistry And Molecular Biology - Hybridisation with nucleic acid probes*, partes I y II, Elsevier, Nueva York.

Además, la invención se refiere también al uso de ADH7 de tipo salvaje humana aislada, o cualquier molécula que sea capaz de asumir una función faltante de ADH7, o de compensar una falta de función de la ADH7 o abolir una disfunción de la ADH7, en la elaboración de una terapia o un medicamento para tratar la enfermedad de Parkinson, preferiblemente la enfermedad de Parkinson causada por una o más de las mutaciones definidas anteriormente en el gen ADH7. En una realización alternativa, la invención se refiere al uso de un alcohol o retinoide metabolizado normalmente por la ADH7, o cualquier sustituto de la ADH7 alternativo, tal como una enzima, en la elaboración de una terapia o un medicamento para tratar la enfermedad de Parkinson, preferiblemente la enfermedad de Parkinson causada por una o más de las mutaciones definidas anteriormente en el gen ADH7. Por tanto, la invención se refiere también a una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir la enfermedad de Parkinson causada por una o más de las mutaciones descritas en la presente memoria en el gen ADH7. La composición comprende ADH7 de tipo salvaje en una dosis terapéuticamente eficaz y un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso, p.ej. suero salino tamponado y similares, que sea estéril y esté exento de materias indeseables. En una realización alternativa de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende un sustrato o un producto de ADH7, tal como un alcohol o retinoide metabolizado normalmente por la ADH7, o cualquier sustituto de la ADH7 alternativo, tal como una enzima, en una dosis terapéuticamente eficaz y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Si bien el uso de compuestos retinoides ha sido sugerido antes para la prevención y el tratamiento de dolencias y enfermedades asociadas con el virus del papiloma humano (véase la patente de EE.UU. 5 514 825), la presente invención sugiere por primera vez tales usos para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Parkinson. La cantidad eficaz de ADH7 de tipo salvaje como ingrediente activo dependerá de la gravedad de la dolencia y el estado general de la salud del paciente. Una composición acorde con la invención también puede comprender excipientes adecuados y sustancias auxiliares según se requieran, agentes ajustadores y amortiguadores del pH, agentes ajustadores de la toxicidad, estabilizantes, etc., tales como los usados convencionalmente en la industria farmacéutica. La presente composición se puede administrar en diversas formas de dosificación unitaria, dependiendo del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración oral incluyen polvo, comprimidos, píldoras, cápsulas y pastillas para chupar, siendo la preparación oral la más preferida por razones de simplicidad. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables por vía parenteral son conocidos o evidentes para los expertos en la técnica, y se describen con más detalle en publicaciones tales como Remington's *Pharmaceutical Science*, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980).

La presente invención se refiere también a todos los aspectos farmacéuticos discutidos anteriormente, en donde se usan los previamente descritos péptidos, polipéptidos o proteínas capaces de unirse a un nucleótido que comprende la secuencia de al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en M2, M3 y M6.

El uso farmacéutico de la ADH7 según la invención se basa en las siguientes rutas propuestas.

#### 1. *Implicación directa de la ADH7 en el metabolismo de retinoides*

Recientemente se demostró que una aldehído deshidrogenasa que actúa sobre retinoides es expresada específicamente en las neuronas de dopamina de cerebro medio del cerebro de la rata. Para convertir retinal en ácido retinoico, se necesita una alcohol deshidrogenasa y una aldehído deshidrogenasa. Las neuronas de dopamina también expresan el factor de transcripción Nurr1, y recientes experimentos de eliminación ("knock-out") demuestran que se requiere este factor para el desarrollo de las neuronas de dopamina, así como para la función apropiada de las neuronas de dopamina en la vida adulta postnatal. Puede que el Nurr1 sea activado en sí mismo por el retinoide, lo cual, sin embargo, permanece sin ser probado. De manera importante, el Nurr1 forma heterodímeros con RXR, que es activado por el ácido 9-cis-retinoico. Por tanto, se propone un mecanismo, en el que las neuronas de dopamina son críticamente dependientes de una combinación específica de una aldehído y una alcohol deshidrogenasa (ADH7) necesitadas para generar retinoides necesarios para activar el control transcripcional mediado por RXR-Nurr1 de genes vitales en estas neuronas.

#### 2. *Implicación de la ADH7 en el metabolismo de la dopamina*

Para metabolizar el transmisor dopamina, se necesitan aldehído y alcohol deshidrogenasas. Se propone que la ADH7 sirve a este papel, conduciendo su malfunción a una acumulación tóxica de metabolitos y dañando de este modo las neuronas de dopamina.

#### 3. *ADH7 como enzima detoxificante en el tracto gastrointestinal*

La ADH7 también puede convertir aldehídos en alcoholes menos agresivos, protegiendo así de la absorción de aldehídos presentes en los alimentos, o generados durante la digestión. Se propone que si la ADH7 es defectuosa, entonces los aldehídos tóxicos alcanzan la circulación y pasan la barrera sangre-cerebro para dañar las neuronas de dopamina. Alternativamente, tales aldehídos conducen a efectos secundarios, dañando al final las neuronas de dopamina.

Por consiguiente, hay varias implicaciones importantes de las mutaciones detectadas según la presente invención, así como el papel reconocido por primera vez en la presente memoria de la ADH7 y/o enzimas relacionadas.

En primer lugar, como se mencionó anteriormente, la presente invención se puede utilizar en nuevas herramientas de diagnóstico. Antes de la presente invención, no había ningún modo de predecir o diagnosticar la enfermedad de Parkinson antes del comienzo de los síntomas. Cuando aparecen los síntomas, típicamente los pacientes ya han perdido un número muy grande, en realidad, la mayoría, de sus células nerviosas de dopamina. La diagnosis temprana que permite la presente invención, junto con medidas preventivas, será muy valiosa y satisfecerá una necesidad que han tenido durante mucho tiempo tanto los médicos como los pacientes. Las herramientas de diagnóstico, tales como ensayos, p.ej. para el cribado de muestras, o métodos similares, en los que se usan los nucleótidos acordes con la presente invención, también permiten una subclasificación de la enfermedad con un valor pronóstico, y ayudarán en la diagnosis diferencial hacia una serie de enfermedades similares a la de Parkinson y los llamados casos Parkinson+.

Unos simples análisis de sangre serán suficientes para este fin.

En segundo lugar, la presente invención proporcionará una base para el desarrollo futuro de nuevas terapias. Dado que se propone que la ADH7 está implicada de manera directa en el proceso de la enfermedad, el ahora reconocido mecanismo de la ADH7 acorde con la invención formará una base importante para el desarrollo de nuevos productos terapéuticos y fármacos. Un nuevo fármaco tal es una preparación farmacéutica que comprende uno o más agonistas de retinoides junto con un vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable. Otro fármaco tal es uno que pueda tratar aldehídos tóxicos, así como uno que pueda compensar la falta de ADH7 como enzima metabolizante de dopamina. Este puede estar p.ej. en la forma de una píldora, que actúa en el tracto intestinal, o cualquier otra forma adecuada como las discutidas anteriormente. Por tanto, la presente invención se refiere también a un método de tratamiento de un paciente mediante la administración de un fármaco que compensa la falta de ADH7, p.ej. administrando una dosis terapéuticamente eficaz de ADH7.

En tercer lugar, la presente invención se refiere también a modelos animales de la enfermedad de Parkinson. Como se mencionó anteriormente, la enfermedad de Parkinson no existe en los animales, lo cual ha impuesto hasta ahora un problema sustancial en la investigación dentro de este campo. Por tanto la investigación se ha basado en modelos en los que aquellas neuronas que mueren en la enfermedad humana son dañadas mecánica o químicamente en animales para generar síntomas similares. Como las mutaciones de ADH7 acordes con la invención pueden causar la enfermedad de Parkinson en los seres humanos, las enseñanzas acordes con la invención permiten ahora, por primera vez, la generación de "ratones Parkinson" usando técnicas de acceso a genes. Por ejemplo, en base a la presente invención, una vez que los genes correspondientes a la ADH7 se han identificado en el ratón, se puede producir un modelo de ratón "knock-out" clásico. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a animales manipulados genéticamente, tales como ratones, que contienen una o más de las mutaciones acordes con la invención. Para producir un animal tal, se introduce un nucleótido acorde con la invención en un vector adecuado mediante protocolos estándar. (Para la producción de animales transgénicos, tales como ratones, véase la patente de EE.UU. 5 455 169 a nombre de Mullen, y las referencias citadas en ella). Así, en los animales acordes con la invención, el (los) defecto(s) genómico(s) humano(s) puede(n) ser replicado(s) de manera precisa, conduciendo a animales que desarrollan una enfermedad con las características humanas. Los animales modelo acordes con la invención, preferiblemente ratones modelo, serán de gran valor para los investigadores y la industria farmacéutica por igual como herramientas para el desarrollo de nuevos tratamientos y terapias, tales como medicamentos.

La presente invención se refiere también a métodos para la diagnosis, prevención o tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Un método de detección de la presencia de una mutación acorde con la invención puede incluir, por ejemplo, las etapas de obtener una muestra biológica de un sujeto humano, muestra que se analiza aislando DNA de dicha muestra, digerir dicho DNA con una enzima de restricción que escinde en sitios adecuados, y analizar un patrón de restricción de dicha digestión para identificar dicha mutación. Los métodos para detectar mutaciones en DNA son discutidos p.ej. por Landegren, U, GATA 9, 1992, págs. 3-8.

### Descripción detallada de los dibujos

La Figura 1 muestra las secuencias de nucleótidos de exones, pequeñas partes de los intrones en los límites exón-intrón y el promotor para el gen ADH7 humano de clase IV publicado previamente (Zgombic-Knight, *et al.* (1995), *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, p. 4305). Se muestran las secuencias de nucleótidos para todos los nueve exones, así como alguna secuencia corriente arriba y corriente abajo de cada uno. Se indica la ubicación de los ocho intrones, con sus tamaños aproximados en paréntesis. Los extremos 5' y 3' de cada intrón contienen las secuencias de sitio de empalme GT/AG conservadas, indicadas con asteriscos. El sitio de inicio de la transcripción se muestra en la posición +1 en una adenina marcada con un círculo cerrado. Corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, se indican dos sitios potenciales de unión con el factor de transcripción en el promotor (AP-1 y C/EBP) en base a emparejamientos de secuencias de consenso. Corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción, se muestra una caja TATA en orientación inversa (rev TATA box). La secuencia de aminoácidos predicha de la región codificante del ADH7 de clase IV (corriente abajo del iniciador metionina en la posición +101) se numera según la homología con ADH de clase I, que se usa para numerar todas las secuencias de ADH vertebradas (Jörnvall *et al.*, 1987). La región corriente abajo del iniciador metionina es realmente de 373 aminoácidos de longitud, más corta que la ADH de clase I debido a la delección aparente del codón 118, que es advertida cuando se alinean las secuencias de todas las clases de ADH humana (Satre *et al.*, 1994). El codón de parada se indica mediante un triángulo y se muestran 64 pb de la región 3' no traducida.

La Figura 2 muestra los registros de GenBank U16286 a 16293 que albergan las secuencias del gen ADH7 humano para el promotor, todos los exones y secuencias intrónicas en una extensión más grande que la mostra-

da en la figura 1. Los nucleótidos se agrupan en bloques de 10 nucleótidos con el fin de facilitar la determinación de las posiciones de los nucleótidos mutados descritos en lo que sigue y referidos en la Figura 4. Se puede acceder a la secuencia que se muestra en la figura 2 por internet en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?uid=642480&form=6&db=n&Dopt=f>.

5

La Figura 3 muestra la Tabla 1, en la que se muestran los cebadores usados para amplificar ocho fragmentos del gen ADH7 humano, que se describirán con más detalle en la parte experimental más adelante.

10

La Figura 4 muestra la Tabla 2, en la que fragmentos de secuencias presentes dentro de dichos ocho fragmentos amplificados acordes con la invención se comparan con la secuencia de la ADH7 publicada de la Figura 1. Los números de los nucleótidos se refieren a la Figura 1 y los nucleótidos que no aparecen, o no están numerados, son referidos allí por sus posiciones en las entradas de la base de datos GenBank acordes con la Figura 2. Los nucleótidos mutados están en negrita y subrayados. Se dan ejemplos de enzimas de restricción útiles para detectar la presencia o ausencia de las mutaciones para aquellas mutaciones en las que se conocen tales enzimas. Los inventores han encontrado que la TspRI no es adecuada para la detección de la mutación M5 a pesar de su capacidad teórica para ello. No se decidió si esto dependía de las condiciones experimentales o es un error en la bibliografía que informa de las capacidades de corte de estas enzimas.

15

La Figura 5 muestra la distribución de las siete mutaciones (M1 a M7) en los cinco diferentes alelos (A0-A4) identificados por los presentes inventores. El alelo de tipo salvaje (A0) es el alelo más frecuente en la población de control sueca. Por definición, no contiene ninguna mutación.

20

La Figura 6A muestra las frecuencias de alelos del alelo A1 en pacientes de Parkinson y controles. Las frecuencias del alelo A1 se determinaron por secuenciación directa del fragmento 1 en pacientes y controles y comprobación de la presencia de M1 que es única para A1. Se realizó un test exacto de Fisher sobre todas las diferencias entre pacientes y controles, y se encontró que las diferencias entre la población total de pacientes y controles y el subgrupo de pacientes de casos familiares y controles era altamente significativa. Las razones de probabilidades y los intervalos de confianza de 95% para las razones de probabilidades se muestran también para todas las diferencias entre frecuencias en controles y poblaciones de pacientes. Todos los valores p son valores p de dos colas. Esta altamente significativa asociación del alelo A1 con la enfermedad de Parkinson sugiere un papel para el alelo A1 en la patogénesis de la enfermedad.

25

La Figura 6B documenta el hallazgo de dos homocigotos para el alelo A1 y tres homocigotos para el alelo A3 entre los 58 pacientes de Parkinson, mientras que ninguno de los 130 controles sanos se encontró que fuera homocigótico para alguno de estos alelos.

30

Los presentes inventores supusieron una distribución binomial de todos los alelos en la población, y tomaron la probabilidad de una persona de tener dos copias de uno de los alelos mutados como la probabilidad de suceso para determinar si se esperaba encontrar 2 ó 3 homocigotos para A1 ó A3, respectivamente, entre los pacientes. Dadas las frecuencias de alelo mostradas en la segunda columna en la población de control, la posibilidad de encontrar dos (o más) homocigotos para A1 entre 58 individuos es muy baja ( $P < 0,01$ ). La posibilidad de encontrar tres (o más) homocigotos para A3 también es baja ( $P < 0,05$ ). Eso significa que la posibilidad de encontrar tanto dos homocigotos para A1 y tres homocigotos para A3 en la misma muestra de 58 individuos es extremadamente baja ( $P < 0,0005$ ). Esta acumulación de homocigotos para los alelos mutados A1 y A3 sugiere fuertemente además una implicación del ADH7 en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson.

35

## Parte experimental

La presente descripción experimental se presenta sólo como ilustrativa de la invención definida por las reivindicaciones apoyadas por la descripción, y de ningún modo pretende limitar el alcance de la invención.

40

## Procedimiento general

45

Básicamente, la presente invención resulta de un interés en el papel del ácido retinoico en el sistema de dopamina nigrostriatal. Las neuronas de dopamina contienen todos los componentes necesarios para el control transcripcional mediado por ácido retinoico mediante los receptores nucleares RAR (que se unen a todo el ácido trans-retinoico) y RXR (que se unen al ácido 9-cis-retinoico) así como para la transcripción por Nurr1, presumiblemente activada por otro retinoide. La enzima aldehído deshidrogenasa 1 (Aldh1, que previamente fue denotada como Ahd2), de la que se mostró previamente que metaboliza retinaldehído a ácido retinoico, está fuerte y específicamente expresada en las neuronas de dopamina. El retinaldehído es generado a partir de retinol por una alcohol deshidrogenasa, y la isozima alcohol deshidrogenasa que ha mostrado ser la más potente para esta conversión *in vitro* se denota como ADH7 en seres humanos, perteneciendo a la clase IV de las alcohol deshidrogenasas.

50

Además, los presentes inventores observaron que el gen para esta enzima se encuentra dentro del cluster de la alcohol deshidrogenasa en el cromosoma 4q21-25, que está solapado con el área de mapeado PARK1 (4q21-23). La ADH7 ha sido mapeada al cromosoma 4q23-34, un área que solapa parcialmente el área PARK1. Además, este área solapa la región cromosómica con los valores lod más altos en la familia alemana que muestra ligamiento con esta región sin tener mutaciones en el gen para la alfa-sinucleína. Por tanto, según la presente invención, se presumió que el gen para la ADH7 sería un gen candidato muy fuerte para las mutaciones en los casos de enfermedad de Parkinson.

55

60

Con el fin de verificar esto, se eligió el muy sensible método de secuenciación directa para buscar mutaciones en la región codificante y promotora del gen ADH7. Las secuencias del promotor, todos los exones y partes de los intrones en los límites exón-intrón han sido publicadas por Zgombic-Knight *et al* (The Journal of Biological Chemistry, 1995, vol. 270: "Genomic Structure and Expression of the ADH7 Gene Encoding Human Class IV Alcohol Dehydrogenase, the Form Most Efficient for Retinol Metabolism *in Vitro*").

En primer lugar, se secuenció ADH7 en diez pacientes de Parkinson con historia familiar confirmada de enfermedad de Parkinson. Los cebadores usados para amplificar ocho fragmentos se muestran en la Tabla 1 (Figura 3). Se identificaron cuatro alelos que contenían un total de siete alteraciones de la secuencia del ADH7 publicada (Figuras 1 y 2). El alelo A1 (A1) contiene cuatro cambios respecto a la secuencia de tipo salvaje en cuatro ubicaciones diferentes, A2 y A3 dos cambios en dos loci diferentes y A3 un cambio.

La distribución de las siete mutaciones (M1-M7) en cuatro alelos diferentes (A1-A4) se muestra en la Figura 5.

El alelo A1 contiene dos únicos intercambios de nucleótidos, uno de los cuales está ubicado en el promotor y el otro en el cuarto intrón (M1 y M6). Adicionalmente, hay una alteración de la secuencia en el exón 3 (M5) y una en el exón 6 (M7, véase la Figura 4). Mientras que el intercambio base en el exón 6 es una mutación silenciosa (Arg218Arg), el intercambio en el exón 3 conduce a una sustitución Gly79A1a. A2 contiene ambas de las mutaciones exónicas presentes en A1 (M5 y M7) pero carece tanto de la mutación en el promotor (M1) como la mutación en el cuarto intrón (M6). En el alelo A3, se observó una doble inserción de pares de bases en el segundo intrón (M3) y un único intercambio de nucleótidos en la región 5' no traducida (M2). El cambio en la región 5' no traducida está ubicado en un elemento similar a TATA localizado 22 bases corriente abajo del sitio de transcripción y en dirección inversa. Debido a que el gen ADH7 carece de una caja TATA normal 20 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, y no están presentes en su promotor otros elementos de secuencia encontrados normalmente en promotores sin TATA, se propone que este elemento similar a TATA está implicado en el inicio de la transcripción. La funcionalidad de un elemento similar a TATA ubicado alrededor de 20 bases corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción en dirección inversa se ha mostrado previamente.

El alelo 3 contiene una única sustitución de bases (M4) ubicada en el segundo intrón, 6 bases corriente arriba del límite intrón/exón.

Después, las frecuencias de alelo de A1 a A4 se determinaron en 58 pacientes de Parkinson y 130 controles sanos de la misma área geográfica. Catorce de los pacientes tenían un pariente de primer o segundo grado con enfermedad de Parkinson confirmada o muy probable. Fueron clasificados como pacientes de Parkinson familiares. Todos los alelos estaban presentes tanto en los controles como en los pacientes. Se encontró que el alelo 1 que contenía el intercambio Gly79A1a era significativamente más frecuente en los pacientes que en los controles (figura 6A). La diferencia fue más prominente en los pacientes con historias familiares de la enfermedad.

Además, se encontró que dos pacientes con antecedentes familiares eran homocigóticos para la mutación (figura 6B). Esto era un suceso improbable ( $P < 0.01$ ) ya que la frecuencia para homocigosidad calculada a partir de las frecuencias de alelo era sólo 1 en 468 individuos. No hubo diferencia significativa de frecuencias de A2 entre pacientes (3,45%;  $n=116$ ) y controles (6,25%;  $N=256$ ) y los autores de la invención no encontraron ningún homocigoto para A2 entre todos los grupos. También se encontró que el alelo A3 era igualmente frecuente en los controles y la población total de pacientes de Parkinson (11,14% y 10,34% respectivamente). La distribución de A3 entre los pacientes de Parkinson fue sin embargo irregular, con frecuencias de 5,68% ( $n=88$ ) de los alelos en enfermedad de Parkinson no familiar y 25% ( $n=28$ ) en enfermedad de Parkinson familiar. No se encontró que la diferencia entre controles y en enfermedad de Parkinson familiar fuera significativa ( $p=0,063$ ). Sin embargo, esta significancia puede haber sido enmascarada por la alta frecuencia de A1 en los casos familiares. Cuando se retiran los alelos A1 tanto de los controles como de los pacientes, la diferencia en las frecuencias de A3 entre controles y pacientes también llegó a ser significativa (razón de probabilidades=4,07; IC 95%=1,5 a 11,03;  $p < 0,01$ ). Tres individuos entre los 58 pacientes eran homocigóticos para A3, teniendo dos de ellos historia familiar de la enfermedad y siendo uno no informativo en relación a parientes afectados. La ocurrencia esperada de homocigosidad para el alelo A3 es 1 en 76 individuos, lo que significa que la ocurrencia de tres o más homocigotos en 58 individuos es significativamente diferente de los números esperados ( $P < 0,05$ ). No se encontraron heterocigotos compuestos para A1 y A3 entre los pacientes. Las frecuencias de A4 no fueron significativamente diferentes entre los controles (5,21%;  $n=96$ ) y los pacientes (2,59%;  $n=116$ ). No se encontraron homocigotos para A4 en ninguno de los grupos.

Por tanto, los resultados sugieren que hay una asociación de dos alelos (A1 y A3) en el locus ADH7 con la enfermedad de Parkinson. Se reportan cinco individuos homocigóticos entre los 58 pacientes investigados bien para A1 ( $n=2$ ) o bien para A3 ( $n=3$ ). Suponiendo una distribución binomial de los alelos en la población y tomando la frecuencia de homocigosidad como la probabilidad de suceso, la probabilidad de que se den los casos homocigóticos por casualidad es muy baja. La probabilidad de encontrar dos homocigotos para A1 ( $P < 0,01$ ) junto con tres homocigotos para A3 ( $P < 0,05$ ) es incluso más improbable ( $P < 0,0005$ ). El hecho de que ambos eventos ocurrieran en el mismo material sugiere por tanto además una correlación con la enfermedad. En nuestros casos con historia familiar, A1 juntos A3 ascendieron a más que la mitad (53,5%) de todos los alelos presentes.

## ES 2 306 517 T3

### *Cribado de mutaciones*

Se extrajo DNA de muestras de sangre de 58 pacientes ambulatorios de Parkinson consecutivos según protocolos estándar. Todos los pacientes cumplían los criterios de diagnóstico reconocidos para la enfermedad de Parkinson. Catorce de los pacientes tenían uno o más parientes de primer o segundo grado con enfermedad de Parkinson confirmada o muy probable. Entre los restantes 44 pacientes esporádicos, diez presentaban otros casos de temblor en sus familias.

Todos los pacientes fueron informados sobre el objetivo del estudio, y el estudio estaba aprobado por el comité ético sueco (presentado bajo Dnr. 96-377).

Los cebadores mostrados en la Tabla 1 (Figura 3) se usaron para amplificar ocho fragmentos del gen ADH7 humano que contiene las regiones codificantes y 5' regulatorias.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo según protocolos estándar usando DNA polimerasa Taq (SIGMA). Se ejecutaron 35 ciclos con 94°C durante 40 segundos, 56°C durante 45 segundos y 72°C durante un minuto.

Después de la PCR, las muestras se hicieron correr en geles de agarosa al 1% de bajo punto de fusión y se visualizaron usando transluminación UV después de una tinción con bromuro de etidio. Después, se fundieron los trozos de gel que contenían los fragmentos amplificados y se extrajo el DNA (kit de purificación de DNA PCR preps, SDS) según las instrucciones del fabricante.

Después de la purificación a partir de los trozos de gel de agarosa, se secuenciaron los fragmentos de DNA (kit de secuenciación de ciclos con terminadores radiomarcados Thermo Sequenase, Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de reacción se hicieron correr en geles de secuenciación de acrilamida al 6% (National Diagnostics). Se puso una película (Sterling Diagnostic Imaging) sobre los geles para autorradiografía.

Cuando se compara la secuencia de los ocho fragmentos amplificados con la secuencia publicada (Zgombic-Knight M, *supra*, número de acceso genbank U16286-U16293), que se describe en las Figuras 1 y 2 de la presente solicitud, se encontraron las alteraciones descritas en la Tabla 2 (Figura 4) (los números de nucleótido se refieren a la Figura 1, los nucleótidos que no aparecen, o no están numerados, son referidos allí por sus posiciones en las entradas de la base de datos GenBank mostradas en la Figura 2).

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 306 517 T3

## REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una secuencia de ácidos nucleicos que incluye al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones de ADH7 M2, M3 y M6, como se definen en SEQ. ID. NOS. 2, 3 y 6, respectivamente, y al menos 10 bases de las secuencias adyacentes y/o circundantes mostradas en la Fig. 4, en la diagnosis de la enfermedad de Parkinson.

10 2. El uso según la reivindicación 1, en donde dicha mutación de ADH7 es M2 (SEQ. ID. N° 2).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1 SEQ ID NO 1

-496 ACCATAGTCA TCCATATGCA TATTCTATAT CATCTACACT TCTCTCCACC AACTTGGACC TACTTGTGCA ATATATTTAC ATTCTCTTGG CTCTGTTTTC  
-396 ATTTATATTT AATTCGAGAA ACCGACACAA GTCTTTCCAG AARGAGACAG ACCATTAAGA ACTGACAGATG TACACAGCCA TCTCTAAATY CAGCCATGCT  
-296 TAGCCAAAGC AGCTTGCACY TAAACAGCCA ATACATTTTT CAGATCTGTG TGAAGTGGAA GTACCTGAC CCCTTTTTAT AECTTCAAA ATAAGGTGGA  
-196 TAGGAAGCTT TTAGCCCTT TTAGAGACT TTAGTACTY TGTTTTTTGT AGRACCTGTC TCTGTGTTG ATCAGAGAG TTAGCTATT TCTTTTAA

\*\*\*\*\*  
-96 AGCTGCTGTC CAAGAGTAS GCTTCCAGA CCATTCGAAA GTCTGACCG CTGTCAGTCA TATTCTGAAA GGTGCACTC TGAAGCCAA CTATCTATGT  
AG-1 C/2BP +1

\*\*\*\*\*  
+5 GAAGACAAA OCTCTGTTA TACACACAG AGTGACTA CCATCAGTCA GAAGAAGTCT ATGTTTCCAG AAATACAGAT CCAGACAAA GACAGG ATG  
new TGA base M

+104 GGC ACT GCT GGA AAA GTAGTGAACATTT intrón 1 (5,6 kb) TPOCCATCTCTGAS GTT ATT AAA TGC AAA GCA GCT GTC  
G T A G K \*\* \*\* V I K C K A A V  
1 19

CCT TGG GAG CAG AAG CAA GCG TTC TCC ATT GAG GAA ATA GAA GTT GCG CCA CCA AAG ACT AAA GAA GTT GCG ATT AAG GTA  
L W E Q K Q P P S I E E I E V A P P K T K E V R I K \*\*  
29 30

AGCTGAGCCCT intrón 2 (1,0 kb) TGTCTTGAACACAG ATT TTC GCG ACA GCA ATC TGT GCG ACA GAT GAC CAT GTC ATA  
\*\* I L A T D I C R T D H V I  
49 50

AAA GCA ACA ATG GTC TCC AAG TTT CCA GTC ATT GTC GCA CAT GAG CCA ACT GCG ATT GTA GAG ACC ATT GCA GAA GCA GTC  
K G Y H V S K P P V I V G B E A T G I V E S I G E G V  
60 70 80

ACT ACA GTC AAA CCA G GTAGTGAACATTT intrón 3 (0,3 kb) ATTTTTTCTCTGAS CT GAC AAA GTC ATC GCT CTC TTT  
T T V K P \*\* \*\* G D K V I P L F  
90

CTG CCA CAA TGT AGR GAA TGC AAT GCT TGT GCG AAC CCA GAT GCG AAC CTT TCC ATT AGG ACC GA GAAGTTTCACTAT  
L P Q C R E C H A C H M P D G H L C I R S D \*\*  
100 110

intrón 4 (0,1 kb) TGTGTGATCAACAG T ATT ACT GGT GGT GGA GEA CTG GCT GAT GCG ACC ACC AGA TTT ACA TCC AAG GCG  
\*\* I T G R G V L A D G T T R F T C K G  
117 119 120 130

AAA CCA GTC CAC CAC TTC ATG AAC ACC AGT ACA TTT ACC GAG TAC ACA GTC GTC GAT GAA TCT TCT GTT GCT AAG ATT CAT  
K P V H N H P H N T S T F T E Y T V V D E S S V A K I D  
140 150 160

GAT CCA GCT GCT GCT GAG AAA GTC TGT TTA ATT GCG TGT GCG TTT TCC ACT GCA TAT GCG GCT GCT GTT AAA ACT GCG AAG  
D A A P P E K V C L I G C G P S T G Y G A A V K T G K  
170 180

GAAGAAGACGGTA intrón 5 (7,1 kb) CATCTCTCCACAG GTC AAA GCT GGT TCC ACT TGC GTC GTC TTT GCG CTG GCA  
\*\* V H P G S T C V V P C L G  
190 200

GCA GTT GCG CTG TCA GTC ATC ATG GCG TGT AAG TCA GCT GGT GCA TCT AGS ATC ATT GCG ATT GAC CTC AAC AAA GAC AAA  
G V G L E V I H G C K S A G A S R I I G I D L N K D K  
210 220

TTT GAG AAG GCG ATG GCT GGA GGT GCG ACT GAG TGT ATC ACT GCG AAG GAC TCT ACC AAA GCG ATC ACT GAG GTC CTG TCA  
F E K A H A V G A T E C I S P K D S T K P I S E V L S  
230 240 250

GAA ATG ACA GCG AAC AAC GTC GCA TAC ACC TTT GAA GTT ATT GCG CAT CTT GAA ACC ATG GAAGAAGACAAAAT intrón 6  
E H T G H H V G Y T F E V I G H L E T H \*\*  
260 270

(1,4 kb) CCGTTTGAACATTT intrón 7 (3,2 kb) TGTGCTATTGCG GT TTT AAA AGC ACA GAT GAT GTC CCA AAA CTA GTC ACT GAG TTC  
\*\* I D A L A S C N H N Y G T S V V V G V P  
280 290

CCA TCA GCG AAG ATG CTC ACC TAT GAC CCG ATG TTS CTC TTC ACT GGA GCG ACA TGG AAG GCA TGT GTC TTT GCA G GTGAC  
P S A K H L T Y D P H L L F T G R T M K G C V F G \*\*  
300 310 320

GAAGCAAG intrón 8 (2,3 kb) TGTGCTATTGCG GT TTT AAA AGC ACA GAT GAT GTC CCA AAA CTA GTC ACT GAG TTC  
\*\* G L K S R D D V P K L V T E F  
330

CTG CCA AAG AAA TTT GAC CTG GAC CAG TTT ATA ACT CAT GTT TTA CCA TTT AAA AAA ATC ACT GAA GCA TTT GAG CTG CTC  
L A K K P D L D Q L I T H V L P F K K I S E G F E L L  
340 350 360

AAT TCA CCA CAA AG GTACTGTTCTTAT intrón 8 (2,3 kb) CATTTTACATTTG C ATT CCA ACC GTC CTG ACC TTT TCA  
H S Q Q S \*\* \*\* I R T V L T F A  
370 374

GATCCAAAGT GCGAGAGGT CTGTGTTTC ATGTGAACT GAGTTTTC TGTGAGAT TCCC

Fig. 2

>g11642473|gb|U16286|HSADNVII1 Gen de la alcohol deshidrogenasa de clase IV (ADH7) humana, exón 1

```

ACCATAGTCA TCCATATGTA TATTTATAT CATCTCACT TCTCTGCC AACTTGGACC TACTGTTGCA ATTAATTTAC ATTTCTGTGG
CTCTGTTTTC ATTTATATTT AATCCAGAA ACCACATCAA GCTTTGCGAG AATGAAGTAG AGCATTAAAG AGTAGAGATG TACACACOCA
TCTCTAAAT CAGCCAGGCC TAGCCAAAGC AGCTTGCCT TAAACACCCA ATACATTTT CATGATTGTC TTGAAGTGAA GTAACCTAAC
CGTTTATTAT ATGCTTCAAA ATRAGGTGGA TAGGATGCT TTCAGCCCTT TTCAAZAGCT TTGATTATCT TGTTTTTGTT AGATCCCTCC
TCTTGGTTTG ATCATAGTAG TTACTGTATT TCTTTTATA AGCTGGTCTG CAAAGGGTAG GGCTTGCAGA CCAATGCCAA GTTGTGAGGG
CTGTGAGTCA TATTOCTGAA GGTGGAACTC TGAAGCCAGA CTATCTATGT GAAGCCACAA GCTGTCTGTA TAAACACAG AGTGAACAGA
GCATCAGTCA GAUAAAGTCT ATGTTTGCAG AAATACAGAT CCAAGACAAA GACAGGATGG GCACTGCTGG AAAAGTAGT GGAACATTT
TGTCCCTCC TCATCATGAC CTAASGATGT GAGGCTGATA CTIAGAACTT TGAATCCATT AAAGTAATA AACACTGGA GAPATTCCTT
GAGGAATGAA ATGCTTGGTG AGCAGGCATA CAGTGGGGA AACACTGGAT ATGCTGTTTC AGAGATGTC AATGGAAGA GGGGTAGTT
GAAATAGTA TATCCAAATGT CAGCAGACA TTGGTGAUAA ATAGAGAAAT TGATTATAT TGCCATTATT CATATTTGA TTTCCGATA
GCTGGCCAA TGTCCAGGA AGCCAAATGT TTCCAAAGG ACACCTCAAT GGTCTCAGTA GCATGTGCTG CACTCCCTGC
AG
    
```

>g11642474|gb|U16287|HSADNVII2 Gen de la alcohol deshidrogenasa de clase IV (ADH7) humana, exón 2

```

TAGGTGACCA TGGATCCATC AITTAGTCAE TCTGGGCTGC ATGCTCATG CCTTAGCAA AGGCACACAC AAGATGATT ATZAGCTTA
TATAGTATGT GTTGTAGAA AATCATCTGT GAUAACTTAA AATATATAT ATGCTCTCTT GTTCTATTT ATACTAGTCA GGGATCTGT
AAGTTAAAG CAUAACTCG ACCCATATA ADCTTGCCT ATTTCTTGG TTATTAATG CAAAGCAGCT GTGCTTTGG AGCAGAGCA
ACCTCTTCC ATTAGGAAA TAGAGTTGC CCCACCAAG ACTAAAGAG TCCGCAATA GGTAGCCGTU AGCCCTAGAG AACTTAGCC
AAAGCGTAA TCAAACCTAT ATTGAAATA GCACTGTTGT GAGGCTGGAT TCTTAATAA GGAGATGCTT CCAATGTTG GAGTATTAAT
TCTTTACTG GCTTATAT ATGTTAAGG ATCTGTTGT ACTGATGTC AAATTAATGA GTTCATTATC C
    
```

>g11642475|gb|U16288|HSADNVII3 Gen de la alcohol deshidrogenasa de clase IV (ADH7) humana, exón 3

```

AAGAAATAA ATTTCTCAA GAAGTAAAT ATTTCCCAA CAGTGAATG ATCAGTTGT TGATTGGTC AATGTTTTG TCTTGAACA
CAGATTTGG CACAGGAAT CTGTCCACA GATGCAATG TGATAAAGG AACATGTTG TCCAGTTTC CAGTATGTT GGCACATG
GCAGCTGGA TTGTAGAGS CATGAGAA GGAGTACTA CAGTAAAGC AGGTATATG AAGTGTCAA CCAAGTTT GAATAATA
GCTTTGAT ACCATCAA AGGAATAGC ACACNTAGG AATTAATGA GGGATCC
    
```

>g11642476|gb|U16289|HSADNVII4 Gen de la alcohol deshidrogenasa de clase IV (ADH7) humana, exones 4-5

```

CTCAACCT TAGAAGCAA ACTACGGTG TTTAAACC TTAGATATA TTTTAAAG TTTACCTAT AGTATGGCT CAATTCACAT
TTGTTAATTT CATATTTAA CATATAGAA CAGCATCTA TATCATGAT TTTTCTGT AGGTGACAAA GTCATCCCTC TCTTTCTGC
ACATGTAGA GAATGCAATG CTGTCCCA CCCAGTGGC AACCTTTGCA TTAGGAGGA GTAGGTTTCA GTCATTTTTA CTTTAAJGTA
TTACATTTT TCTATGCTA ATTTTGAAT TGAATTAAT AATACGTTA TTTGATGAT CAAACAGTAT TACTGGTGT GGAATAGTG
CTATGGCAC CACCAGATT ACATGCAGG GCAACCAAT CCAACACTC ATGAACACCA GTACATTTAC CGAGTACACA GTGGTGGATG
AATCTTCTGT TCTAAGATT GATGATCAG CTCTCTGTA GAAAGTCTGT TTAATGGCT GTGGGTTTT CACTGGATAT GGCCTGCTG
TTAAACTGS CAAGGTAGA AACAGGGTAG CTAGTT
    
```

>g11642477|gb|U16290|HSADNVII5 Gen de la alcohol deshidrogenasa de clase IV (ADH7) humana, exón 6

```

GAGTCACTC ATGATTTGT TTTTAACTG GAGGCCCTT TCAGGTTTCA CTTTTGACC CTAACACCTA ACATGTTCAA GAACATTCCT
CTCCACAGT CAACCTGGT TCCACTTGG TGTCTTTGG CTGGGAGGA GTTGGCTGT CAGTCACTAT GGGCTTAGG TCACTGCTG
CATCAGGAT CATGGGAT GACTCAACA ANGCNAAT TGCAAGGCC ATGCTGTAG GTGCCACTGA GTGTATCAGT CCCAAGGACT
CTACCAACC CATGATGAG GTCTGTGAG AAATGACAG CAACAAGCTG GCATACCTT TTGAAGTTAT TGGCATCTT GAACCATGG
TAGACCCCA AAATTTG
    
```

>g11642478|gb|U16291|HSADNVII6 Gen de la alcohol deshidrogenasa de clase IV (ADH7) humana, exón 7

```

AAGATCTCC TCGTTTFAA ACTCAGATT ATGCTTGGC ATCTTCCAC ATGAACTATG GGACCAGCTT GGTGTAGGA GTTCTCCAT
CAOCCAGAT GCTCACTAT GACCCGATG TGTCTTTCAC TGAAGCACA TGGAAAGGAT GTGTCTTGG AGGTGAGAA AGCAAGCTT
CTGGATGGG AGTATGCTT TTAACCTGG TCTTGGCAA GTGGAGAG CCTGTTCTT CAGGCTTTC TTCCAAGAT GAGTATGAG
TGATCT
    
```

>g11642479|gb|U16292|HSADNVII7 Gen de la alcohol deshidrogenasa de clase IV (ADH7) humana, exón 8

```

AACACAGGA AAGTCATAGT GCAGGAAGA GAAGGAATA ATATAACATA ATAAAGATA AGGATTTT AGTAATGCT AAAGAAAAA
TGTGTCTTA TTCCAGGT TGAAGAGAG AGATGATGC CCAAACTAG TCACTGATTT CTTGGCAAAG AAATTTGACC TGAACAGTT
GATAACTCAT GTTTACCAT TTAATAAAT CAGTGAAGA TTTGAGCTC TCAATTCAGG ACAAGGTAA CTGTTCTTA TGATGA
    
```

>g11642480|gb|U16293|HSADNVII8 Gen de la alcohol deshidrogenasa de clase IV (ADH7) humana, exón 9, y cds completo

```

TTAACTATC CTTCTTGAA AGATATGAAA ACAAGTATT AAAAACTTC ATTTTACATT TCAGCATTCG AACGGTCTG ACGTTTSGAG
ATCCAAAGTG GCAGGAGGTC TGTGTTGTA TGGTGAAGT CAGTTCTCT TGTGAGATT CCC
    
```

Fig. 3

Número de fragmento	Tamaño	Contenido	Cebadores directos e inversos
1	450pb	Región promotora, UTR 5' y primer exón.	1-F AATCAGCCATGCCTAGGC AAA 1-R GGAGGGGACAGAAATGTTCCA
2	405pb	Segundo exón y partes de intrones flanqueantes	2-F GGCTGCATGTCTCATGCCTT 2-R CCAAACATGGGAAGCATCTCC
3	260pb	Tercer exón y partes de intrones flanqueantes	3-F CAGTTTGTGATTGGTGCAATGTT 3-R TGTGTGCTATTTCCCTTTGATAGGCT
4	510pb	Cuarto y quinto exón y cuarto intrón y partes de intrones flanqueantes	4-F ATGGGCTCAATTCACATTTGTT 4-R AACTAGCCTACCCTGTTTCTT
5	340pb	Sexto exón y partes de intrones flanqueantes	5-F TTCAGGTTTCACTTTTTGACCC 5-R CAAATTTTGGOGTCTTACC
6	260pb	Séptimo exón y partes de intrones flanqueantes	6-F ATCTCCTCCGTTTTAAACTC 6-R CTCATTCTTGGAAGAAAGGCC
7	265pb	Octavo exón y partes de intrones flanqueantes	7-F ACAGGGAAAGTCATAGTGCAGG 7-R TCATCATAAGAAACAGTTAC
8	135pb	Noveno exón y partes de intrones flanqueantes	8-F TCCTTTCTTGAAAGATATGAA 8-R CTCCAGTTCACCATGACAACAC

Fig. 4

Nombre	Frag- mento N°	Ubica- ción	Secuencia de tipo salvaje	Secuencia mutada (las mutaciones en negrita están subrayadas)	Enzima de restricción (ejemplos)	Tipo de mutación
M1	1	pro- motor	-102 a -88 TTTATAAGTTGGTCT	-102 a -88 TTTATAAG <u>CT</u> GGTCT	Aba I CviJ I	intercambio de nucleótido único
M2	1	UTR 5'	+20 a +32 TGTATATACAAC	+20 a +32 TGTAC <u>A</u> TACAAC	Mae III	interrupción de caja TATA putativa
M3	2	segundo intrón	En GDB U16287 n° 415 a 426 AAATAAGGAGAT	En GDB U16287 n° 415 a 426 AAATAAG <u>G</u> GAGAT	-	inserción de 2pb
M4	3	segundo intrón	En GDB U16288 n° 81 a 95 TCTTTGAACACAGAT	En GDB U16288 n° 81 a 95 TCTTTGAG <u>C</u> ACAGAT	BsiHKAI BspI286I	intercambio de nucleótido único
M5	3	tercer exón	En GDB U16288 n° 205 a 218 GGAGAAGGAGTGAC	En GDB U16288 n° 205 a 218 GGAGAAG <u>C</u> AGTGAC	(TspRI)	intercambio de aminoácidos Gly79Ala
M6	4	cuarto intrón	En GDB U16289 n° 274 a 287 ACATTTTTCCTATG	En GDB U16289 n° 274 a 287 ACATTT <u>G</u> TCCTATG	-	intercambio de nucleótido único
M7	5	sexto exón	En GDB U16290 n° 180 a 194 GCATCTAGGATCATT	En GDB U16290 n° 180 a 194 GCATCTAGAATCATT	Hinf I	mutación silenciosa Arg218Arg

Fig. 5

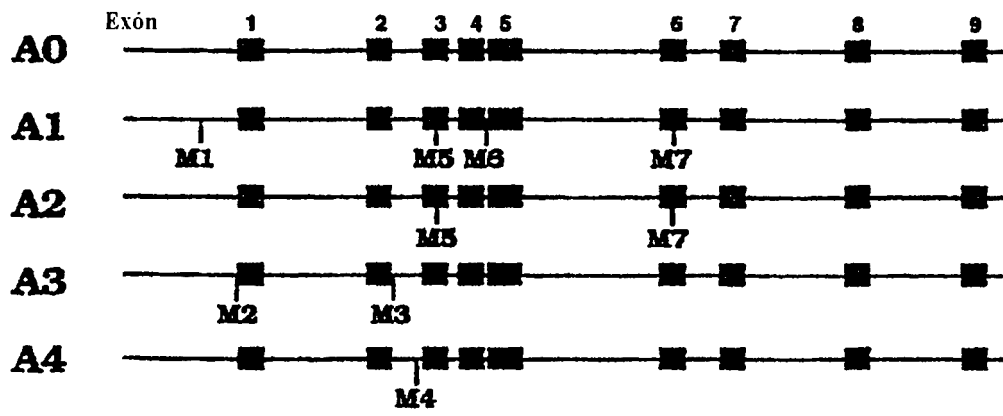


Fig. 6A

	Frecuencia de alelo	Número de alelos investigados	Razón de probabilidades	IC de 95% para la razón de probab.	valor p
Controles	4,62%	260	-	-	-
Casos no familiares	10,23%	88	2,354	0,9565 a 5,796	0,07
Casos familiares	28,57%	28	8,267	3,028 a 22,565	0,0002
Total de pacientes	14,66%	116	3,549	1,635 a 7,703	0,0014

Fig. 6B

Número de alelo	Frecuencia de alelo en controles (n=260)	Número de homocigotos en controles (n=130)	Número de homocigotos en pacientes de EP (n=58)	P
A1	4,62%	0	2	<0,01
A3	11,15%	0	3	<0,05

# ES 2 306 517 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> KAROLINSKA INNOVATIONS AB

5 <120> NUCLEÓTIDOS DEL ADH7

<130> 55828

10 <140>

<141>

15 <160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 15

<212> DNA

<213> HUMANO

25 <400> 1

tttataagtt ggtct

15

30 <210> 2

<211> 13

<212> DNA

35 <213> HUMANO

<220>

<221> mutación

40 <222> (6)

<400> 2

45 tgttacatac aac

13

<210> 3

<211> 14

50 <212> DNA

<213> HUMANO

<220>

55 <221> mutación

<222> (7)..(8)

<400> 3

60 aaataagggg agat

14

<210> 4

65 <211> 15

<212> DNA

<213> HUMANO

## ES 2 306 517 T3

	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (8)	
5	<400> 4	
	tctttgagca cagat	15
10	<210> 5	
	<211> 14	
	<212> DNA	
15	<213> HUMANO	
	<220>	
	<221> mutación	
20	<222> (8)	
	<400> 5	
25	ggagaagcag tgac	14
	<210> 6	
	<211> 14	
30	<212> DNA	
	<213> HUMANO	
	<220>	
35	<221> mutación	
	<222> (7)	
	<400> 6	
40	acattgtcc tatg	14
	<210> 7	
45	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> HUMANO	
50	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (9)	
55	<400> 7	
	gcacctagaa tcatt	15
60		
65		