



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 525**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04734298 .5**

96 Fecha de presentación : **21.05.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1627077**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.02.2006**

54 Título: **Gen de predisposición a la enfermedad de alzheimer.**

30 Prioridad: **22.05.2003 GB 0311835**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2011

73 Titular/es: **ISIS INNOVATION LIMITED**
Ewert House, Ewert Place
Summertown, Oxford, Oxfordshire OX2 7SG, GB

72 Inventor/es: **Nagy, Zsuzsanna**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 354 525 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

GEN DE PREDISPOSICIÓN A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a cribas genéticas para la propensión a la enfermedad de Alzheimer. En particular, la invención se refiere a cribas genéticas basadas en el genotipado del polimorfismo p21E2c31 y/o el polimorfismo p21E3+20 C/T en el gen p21cip 1.

Antecedentes de la invención

10 A medida que la esperanza de vida aumenta, la enfermedad de Alzheimer (AD) se está convirtiendo en un problema de salud de gran importancia en el mundo occidental. Se han realizado investigaciones exhaustivas con el objetivo de identificar una cura fiable o medidas preventivas para la enfermedad, hasta el momento sin éxito.

15 Cada vez está más aceptado que la reentrada en el ciclo celular y el posterior fallo regulador en neuronas se encuentra en la base patógena de la enfermedad de Alzheimer (Nagy, Z., M. M. Esiri, y A. D. Smith, The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. Neuroscience, 1998. 84 (4): págs. 731-739; también la solicitud de patente internacional publicada del solicitante WO 02/073212). También existen indicaciones de que esta disfunción reguladora del ciclo de división celular no está restringida a las neuronas de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Nagy, Z., et al., Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. Neurosci Lett, 2002.317 (2): págs. 81-4). Existen evidencias de que otros tipos celulares, tales como linfocitos y fibroblastos, originarios de enfermos de enfermedad de Alzheimer tienen una maquinaria reguladora del ciclo celular deficiente. Esta deficiencia reguladora conduce a una respuesta aberrante de estas células a diversos estímulos *in vitro* (véase el documento WO 02/073212). Además, los pacientes con enfermedad Alzheimer son más propensos a ciertos tipos de cánceres que los sujetos de control de la misma edad. En base a estas evidencias, es plausible que el fallo regulador en el punto de transición G1/S responsable del desarrollo de una patología relacionada con AD en neuronas se deba a mutaciones o variaciones alélicas de los genes reguladores del ciclo celular, particularmente los inhibidores de quinasa dependientes de ciclina o
35 CDKI.

Dado que las alteraciones del ciclo celular parecen ser un suceso muy temprano en la enfermedad de Alzheimer, que precede al desarrollo de cualquier síntoma clínico, la identificación de mutaciones y polimorfismos en los genes reguladores del ciclo celular permitirá la identificación de pacientes que no han desarrollado completamente la enfermedad de Alzheimer pero pueden presentar un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. Esto puede permitir, a su vez, la intervención temprana con estrategias cuyo objetivo sea prevenir el desarrollo y/o retardar el inicio de la patología de la enfermedad de Alzheimer.

El gen inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A humano (número de entrada de la OMIM 116899, denominado en este documento como p21cip 1, nomenclatura de la OMIM CDKN1A, también conocido en la técnica como proteína de interacción con CDK 1, CIP1, p21, fragmento 1 activado por p53 de tipo silvestre, o WAF1) es uno de los genes de CDKI responsables de la regulación del punto de transición G1/S. El gen codifica una proteína de 21 kd que se encuentra en inmunoprecipitados de ciclina A, ciclina D1, ciclina E y CDK2. El gen p21cip 1 se ha mapeado a 6p21.2 mediante hibridación in situ por fluorescencia (Véase *Online Mendelian Inheritance in Man* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>).

Se ha identificado un polimorfismo en el codón 31 de p21cip 1 (Chedid, M. et al., *Oncogene*, Vol 9 (10), 3021-4, 1994), donde una mutación puntual cambia el alelo normal o "de tipo silvestre" AGC (ser) a un alelo variante AGA (arg). El número de entrada de la OMIM para este polimorfismo (denominado en este documento como p21E2c31) es 116899.0001. La sustitución de un único nucleótido da como resultado la pérdida de un sitio de restricción y la ganancia de otro, permitiendo el cribado rápido del polimorfismo (Chedid, M. et al., 1994, *ibídem*). El análisis del polimorfismo ha revelado que éste está relacionado con un mayor riesgo de algunos tipos de cáncer (Harima, Y., et al., Polymorphism of the WAF1 gene is related to susceptibility to cervical cancer in Japanese women. *Int J Mol Med*, 2001. 7(3): págs. 261-4). También se sabe que un polimorfismo de único nucleótido adicional en el gen p21, una transición de C a T que se produce 20 nucleótidos cadena abajo del extremo 3' del exón 3 (denominado en este documento como p21E3+20 C/T) está asociado al cáncer (Facher, E. A., et al., Association between human cancer and two polymorphisms occurring together in the p21Waf1/Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Cancer*, 1997. 79(12): págs. 2424-9).

El presente inventor ha demostrado ahora que el polimorfismo p21E2c31 muestra una asociación significativa con la enfermedad de Alzheimer. Además, la simultaneidad del polimorfismo p21E2c31 con el polimorfismo p21E3+20 C/T mejora la significación de la asociación con la enfermedad de Alzheimer. Estas observaciones han conducido al desarrollo de nuevas cribas genéticas que pueden usarse para identificar individuos genéticamente predispuestos a desarrollar enfermedad de Alzheimer.

Descripción de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de cribado de un sujeto humano masculino para la predisposición a la enfermedad de Alzheimer, que comprende genotipar al sujeto para el polimorfismo p21E2c31 C/A en el gen p21cip 1 y/o el polimorfismo p21E3+20 C/T en el gen p21cip 1, en el que la presencia de al menos un alelo variante p21E2c31 A y/o p21E3+20 T se toma como una indicación de que el sujeto tiene predisposición a la enfermedad de Alzheimer.

La invención proporciona además un método de determinación de cualquier base genética para la enfermedad de Alzheimer en un sujeto humano masculino, que comprende genotipar al sujeto para el polimorfismo p21E2c31 C/A en el gen p21cip 1 y/o el polimorfismo p21E3+20 C/T en el gen p21cip 1, en el que la presencia de al menos un alelo variante p21E2c31 A y/o p21E3+20 T indica que esta variación genética contribuye a la base genética para la enfermedad de Alzheimer en el sujeto.

La invención proporciona además un método *in vitro* de evaluación de la edad probable del inicio de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto humano femenino que comprende genotipar al sujeto para el polimorfismo p21E2c31 C/A y el polimorfismo p21E3+20 C/T, en el que la presencia de al menos un alelo variante p21E2c31 A y al menos un alelo p21E3+20 T indica una probable reducción de la edad de inicio de la enfermedad de Alzheimer, en comparación con individuos homocigóticos para los alelos normales p21E2c31 C y p21E3+20 C.

Los métodos de la invención son cribas genéticas que comprenden genotipar sujetos humanos para el polimorfismo p21E2c31 C/A y/o el polimorfismo p21E3+20 C/T en el gen p21cip 1. Los sujetos que tienen uno o dos alelos variantes (es decir heterocigóticos u homocigóticos para el alelo variante) en ambos de estos loci (siendo los alelos variantes p21E2c31 "A" y

p21 E3+20 "T") pueden valorarse, dependiendo de si la criba se usa como diagnóstico o como pronóstico, como que tienen una predisposición a la enfermedad de Alzheimer (AD) o que tienen la propia AD.

La expresión "polimorfismo p21E2c31" se refiere a un polimorfismo de
5 único nucleótido en el exón 2 del gen p21cip 1 humano. En el contexto de esta solicitud, la expresión "polimorfismo p21E2c31" puede usarse para referirse al locus polimórfico. La variación genética es una sustitución de único nucleótido C→A que se produce en el codón 31 del gen (AGC→AGA), dando como resultado una sustitución de único aminoácido serina (S)→arginina (R) en la
10 posición 31 en la proteína p21. Como se ha mencionado anteriormente, en la técnica se sabe que este polimorfismo está asociado al cáncer (Chedid et al., Facher et al., *ibídem*). El alelo variante de este polimorfismo es p21E2c31 A.

La expresión "polimorfismo p21E3+20 C/T" se refiere a un polimorfismo de único nucleótido, una sustitución de único nucleótido C→T, que se produce
15 20 nucleótidos cadena abajo del extremo 3' del exón 3 del gen p21cip 1 humano.

En el contexto de esta solicitud, la expresión "polimorfismo p21E3+20 C/T" puede usarse para referirse al locus polimórfico. En la técnica también se sabe que este polimorfismo está asociado al cáncer (Chedid et al., Facher et al., *ibídem*). El alelo variante de este polimorfismo es p21E3+20 T.
20

Como se ilustra en los ejemplos adjuntos, el inventor ha mostrado que la presencia del alelo variante p21E2c31 "A" está asociada significativamente con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer en sujetos masculinos y con una reducción de la edad de inicio de la enfermedad de Alzheimer en
25 sujetos femeninos, en comparación con individuos homocigóticos para el alelo normal p21E2c31 "C". La significación de estas asociaciones aumenta cuando el alelo p21E2c31 "A" aparece junto con el alelo p21 E3+20 "T".

La enfermedad de Alzheimer es una afección compleja y multi-factorial. En cualquier individuo dado, es probable que el desarrollo de AD esté asociado
30 con la acumulación de variación genética dentro de un único gen, o en múltiples genes, y las variantes acumuladas pueden tener un efecto aditivo. Como se describe en la solicitud de patente internacional publicada del solicitante WO 02/073212, esencialmente cualquier variación genética que tiene un efecto adverso sobre la función de un gen regulador del ciclo celular
35 puede dar como resultado, potencialmente, que se evite el punto de control de

la transición G1/S, y la consiguiente patología de AD.

En vista de lo anterior, el genotipado de los polimorfismos p21E2c31 y p21 E3+20 C/T puede realizarse junto con el genotipado de “otros” polimorfismos que son marcadores de susceptibilidad/predisposición a enfermedad de Alzheimer en el mismo sujeto humano, por ejemplo como una “criba de panel” de múltiples variantes genéticas. Las “otras” variantes para su inclusión en dicha criba de panel pueden incluir polimorfismos adicionales en p21, polimorfismos, polimorfismos en otros genes reguladores del ciclo celular, cualquier otro polimorfismo que se sabe que está asociado a la enfermedad de Alzheimer, se produzca(n) o no dicho(s) polimorfismo(s) en p21 o cualquier otro gen regulador del ciclo celular, y polimorfismos en desequilibrio de ligamiento con cualquiera de los anteriores. El genotipado de múltiples polimorfismos en una única muestra del paciente puede realizarse simultáneamente, por ejemplo con el uso de una micromatriz o geno chip (“*Gene Chip*”).

El “genotipado” de cualquier variante polimórfica dada puede comprender ventajosamente el cribado para la presencia o ausencia en el genoma del sujeto del alelo normal o de tipo silvestre y el alelo variante o mutante o puede comprender el cribado para la presencia o ausencia de cualquier alelo individual, siendo posible generalmente sacar conclusiones sobre el genotipo de un individuo en un locus polimórfico que tiene dos formas alélicas alternativas solamente cribando para uno u otro de los alelos específicos.

El genotipado de variantes polimórficas puede realizarse usando cualquier metodología adecuada conocida en la técnica y debe entenderse que la invención no está limitada en absoluto por la técnica precisa usada para realizar el genotipado.

Las técnicas conocidas que pueden usarse para genotipar polimorfismos de único nucleótido incluyen reacción de detección de ligamiento (LDR; Day, D. J., Speiser, P. W., White, P. C. & Barany, F. *Genomics* 29, 152-62 (1995)), espectrometría de masas, particularmente espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS), extensión por cebador de único nucleótido y chips o micromatrices de ADN (véase la revisión de Schafer, A. J. y Hawkins, J. R. en *Nature Biotechnology*, Vol 16, págs. 33-39 (1998)). El uso de chips o micromatrices de ADN puede permitir el genotipado simultáneo en muchos loci polimórficos

diferentes en un único individuo o el genotipado simultáneo de un único locus polimórfico en múltiples individuos. Los SNP (polimorfismos de único nucleótido) también pueden valorarse mediante secuenciación de ADN.

Además de lo anterior, los SNP se valoran habitualmente usando técnicas basadas en PCR, tales como PCR-SSP usando cebadores específicos de alelo (descrita por Bunce M, et al., *Tissue Antigens*, 1995; 50: 23-31). Este método generalmente implica realizar reacciones de amplificación de ADN usando ADN genómico como plantilla y dos pares de cebadores diferentes, comprendiendo el primer par un cebador específico de alelo que, en condiciones apropiadas, es capaz de hibridar selectivamente con el alelo de tipo silvestre y un cebador no específico de alelo que se une a una secuencia complementaria en cualquier otra parte en el gen en cuestión, comprendiendo el segundo par un cebador específico de alelo que, en las condiciones apropiadas, es capaz de hibridar selectivamente con el alelo variante y el mismo cebador no específico de alelo. Técnicas adicionales adecuadas para valorar SNP incluyen PCR-ELISA y cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (DHPLC).

Si el SNP da como resultado la supresión o creación de un sitio de restricción, el genotipado puede realizarse, realizando PCR usando cebadores no específicos de alelo que abarcan en sitio polimórfico y digiriendo el producto de PCR resultante usando las enzimas de restricción apropiadas (también conocido como PCR-RFLP). Los polimorfismos de longitud de un fragmento de restricción, incluyendo aquellos que resultan de la presencia de un polimorfismo de único nucleótido, pueden valorarse digiriendo ADN genómico con una enzima apropiada y realizando a continuación una transferencia de Southern usando una sonda marcada correspondiente a la región polimórfica (véase el documento *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Las técnicas conocidas para genotipar polimorfismos son de aplicabilidad general y será fácilmente evidente para especialistas en la técnica que muchas de las técnicas conocidas pueden adaptarse para la valoración de polimorfismos de único nucleótido en el gen p21. En el caso de p21E2c31 y p21E3+20 C/T, la técnica preferida para genotipar sujetos para estos SNP es PCR-RFLP, como se describe en el ejemplo adjunto y en el documento Facher et al., *ibídem*. Sin embargo, la invención no pretende estar limitada al uso de

esta técnica.

El genotipado se realiza preferiblemente *in vitro*, y de la forma más preferible se realiza en una muestra aislada que contiene ADN genómico preparado a partir de una muestra tisular adecuada obtenida del sujeto en
5 ensayo. De la forma más habitual, el ADN genómico se prepara a partir de una muestra de sangre completa o tejido cerebral, de acuerdo con procedimientos convencionales que se conocen bien en la técnica. Si los datos de la secuencia genómica para un individuo en ensayo en la región que contiene el SNP están disponibles, por ejemplo en una base de datos de secuencia genómica como
10 resultado de un ejercicio anterior de secuenciación genómica, entonces el genotipado del SNP puede realizarse buscando los datos de secuencia disponibles.

En el caso de variantes genéticas que tienen un efecto detectable sobre los transcritos de ARNm transcritos desde un gen dado, por ejemplo variantes
15 que causan corte y empalme alterado o que afectan a la terminación del transcrito o que afectan al nivel de expresión de ARNm, entonces como alternativa a la detección de la presencia de la variante a nivel del ADN genómico, la presencia de la variante puede inferirse evaluando el patrón de expresión de ARNm usando cualquier técnica adecuada. Análogamente, en el
20 caso de variantes genéticas que tienen un efecto detectable sobre los productos proteicos codificados por un gen, por ejemplo variantes que causan un cambio de la secuencia primaria de aminoácidos (tales como p21E2c31), estructura o propiedades de la proteína codificada, la presencia de la variante puede inferirse evaluando la secuencia, estructura o propiedades de la proteína
25 usando cualquier técnica conveniente.

Los métodos de cribado descritos anteriormente pueden usarse como pronóstico para identificar individuos con predisposición a la enfermedad de Alzheimer (AD) en virtud a su composición genética. La "predisposición a la enfermedad de Alzheimer" puede manifestarse como un mayor riesgo de
30 desarrollar la enfermedad en comparación con individuos que no poseen un alelo variante (es decir, sujetos que son homocigóticos para el(los) alelo(s) normal(es) correspondiente(s) p21E2c31 "C", p21E3+20 "C"), o como una edad más temprana de inicio de la enfermedad en comparación con individuos que no poseen un alelo variante. El método puede usarse para cribar individuos
35 asintomáticos (es decir individuos que no muestran síntomas significativos de

AD de acuerdo con criterios de diagnóstico convencionales) para identificar aquellos “en riesgo” de desarrollar AD, y/o aquellos que es probable que muestren una edad más temprana de inicio de AD. En realizaciones particulares, las cribas pueden usarse para evaluar el riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer en sujetos humanos masculinos o para evaluar la edad probable de inicio de la enfermedad de Alzheimer en sujetos humanos femeninos. Los resultados de dichas cribas pueden facilitar la intervención temprana con tratamientos terapéuticos, particularmente tratamientos profilácticos cuyo objetivo es prevenir, reducir o retrasar los síntomas clínicos de la enfermedad de Alzheimer.

La invención se entenderá mejor en referencia a los siguientes ejemplos experimentales, junto con las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 ilustra el genotipado de los polimorfismos p21E2c31 y p21E3+20 C/T del gen p21cip 1 humano mediante PCR-RFLP. El panel (a) muestra el genotipado de p21E2c31, el exón 2 de p21 se amplifica a partir de ADN genómico mediante PCR como se describe en los ejemplos adjuntos, los alelos normales y variantes se distinguen a continuación mediante digestión del producto de PCR resultante con BsmA I. El panel (b) muestra el genotipado del polimorfismo p21E3+20 C/T, el exón 3 de p21 se amplifica a partir de ADN genómico mediante PCR como se describe en los ejemplos adjuntos, los alelos normales y variantes se distinguen a continuación mediante digestión del producto de PCR resultante con Pst I.

La figura 2 ilustra la relación entre la mutación del codón 31 del exón 2 de p21 (p21E2c31) y la incidencia de la enfermedad de Alzheimer. p21c31-N se refiere al alelo “C” normal; p21c31-X se refiere al alelo “A” variante.

La figura 3 ilustra la relación entre la enfermedad de Alzheimer y la simultaneidad de mutaciones exónicas (p21E2c31) e intrónicas (p21E3+20 C/T) de p21. p21c31-N se refiere a los individuos normales; p21c31-X se refiere a individuos que tienen el alelo variante “A” y el alelo variante p21E3+20 “T”.

La figura 4 ilustra la relación entre la mutación del codón 31 del exón 2 de p21 (p21E2c31) y la edad de inicio de la enfermedad de Alzheimer (años).

Ejemplo 1-genotipado de polimorfismos de p21cip 1

Población de pacientes

Los sujetos ensayados eran participantes a tiempo completo en el *Oxford Project to Investigate Memory and Ageing* (OPTIMA). La rutina anual de examen de OPTIMA incluye un examen físico, ensayos cognitivos y neuropsicológicos. La ingesta de fármacos y cualquier infección interrecurrente se registran.

Materiales y métodos

El exón 2 de p21cip se amplificó a partir de ADN genómico (extraído de cerebro o sangre) usando los cebadores 5'-CGGGATCCGGCGCCATGTCAGAACCGGC-3' (SEC ID N° 1) y 5'-CCAGACAGGTCAGCCCTTGG-3' (SEC ID N° 2) (Facher, E. A., et al., Association between human cancer and two polymorphisms occurring together in the p21Waf1/Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Cancer*, 1997. 79 (12): págs. 2424-9). La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 50 µl usando 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa, MgCl₂ 1,5 mM, Gelatina al 0,1%, 200 µM de cada dNTP en tampón de PCR (Tris-HCl 75 mM, pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 20 mM y Tween al 0,01%). Al inicio en caliente (95°C durante 5 minutos) le siguieron 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 65°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto. El polimorfismo del exón 2 se detectó usando digestión mediante enzima de restricción con BsmA I.

El exón 3 de p21cip se amplificó a partir de ADN genómico (extraído de cerebro o sangre) usando los cebadores 5'-CCCAGGGAAGGGTGTCTG-3' (SEC ID N° 3) y 5'-GGGCGGCCAGGGTATGTAC-3' (SEC ID N° 4). La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 50 µl usando 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa, MgCl₂ 1,5 mM, Gelatina al 0,1%, 200 µM de cada dNTP en tampón de PCR (Tris-HCl 75 mM, pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 20 mM y Tween al 0,01%). Al inicio en caliente (95°C durante 5 minutos) le siguieron 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos. La mutación intrónica cerca del exón 3 se detectó mediante digestión por enzima de restricción usando Pst I.

Resultados

Los resultados se ilustran en las figuras adjuntas 1 a 4 y se resumen en la Tabla 1, a continuación. La aparición de la mutación ser a arg en el codón 31 de p21cip 1 (es decir la sustitución p21E2c31 C→A) conduce a un mayor riesgo de enfermedad de Alzheimer en hombres (Fig. 2). La figura 3 ilustra que la significación de la asociación con la enfermedad de Alzheimer aumenta

cuando el alelo p21E2c31 A y el alelo p21E3+20 T aparecen juntos. En mujeres, el riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer no aumentaba significativamente en la población de este estudio. Sin embargo, la edad de inicio de la enfermedad de Alzheimer se redujo significativamente en mujeres portadoras del alelo variante.

Tabla 1

		Gen variante N° de sujetos		Gen normal N° de sujetos		Frecuencia relativa		Oportunidad relativa (<i>Odds Ratio</i>)	
AD		12		76		14%		1,61	
	Hombres		7		41		15%		4,44
	Mujeres		5		35		13%		0,98
Controles		10		82		11%			
	Hombres		2		35		5%		
	Mujeres		8		47		15%		
Otras Demencias		1		30		3%			
	Hombres		0		15		0%		
	Mujeres		1		15		6%		

Referencias mencionadas

- 10 1. Nagy, Z., M. M. Esiri, y A. D. Smith, The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 1998. 84(4): págs. 731-739.
2. Nagy, Z., et al., Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 2002. 317(2): págs. 81-4.
- 15 3. Harima, Y., et al., Polymorphism of the WAF1 gene is related to susceptibility to cervical cancer in Japanese women. *Int J Mol Med*, 2001. 7(3): págs. 261-4.
4. Facher, E.A., et al., Association between human cancer and two polymorphisms occurring together in the p21Waf1/Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Cancer*, 1997. 79(12): págs. 2424-9.
- 20

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Isis Innovation limited

5 <120> Gen de predisposición a la enfermedad de Alzheimer

<130> P63288WO00

<160> 4

10

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 28

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos

20

<400> 1

cgggatccgg cgccatgtca gaaccggc 28

<210> 2

25

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 2

ccagacaggt cagcccttgg 20

35

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 3

cccaggggaag ggtgtcctg 19

10

<210> 4

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador de oligonucleótidos

<400> 4

20 gggcggccag ggtatgtac 19

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro de cribado de un sujeto humano masculino para la predisposición a la enfermedad de Alzheimer, que comprende genotipar al sujeto para el polimorfismo p21E2c31 C/A en el gen p21cip 1 y el polimorfismo p21E3+20 C/T en el gen p21cip 1, en el que la presencia de al menos un alelo variante p21E2c31 A y al menos un alelo variante p21E3+20 T se toma como una indicación de que el sujeto tiene predisposición a la enfermedad de Alzheimer.
2. Un método in vitro de determinación de cualquier base genética para la enfermedad de Alzheimer en un sujeto humano masculino, que comprende genotipar al sujeto para el polimorfismo p21E2c31 C/A y el polimorfismo p21E3+20 C/T, en el que la presencia de al menos un alelo variante p21E2c31 A y al menos una alelo variante p21E3+20 T indica que estas variaciones genéticas contribuyen a la base genética para la enfermedad de Alzheimer en el sujeto.
3. Un método in vitro de evaluación de la edad probable del inicio de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto humano femenino, que comprende genotipar al sujeto para el polimorfismo p21E2c31 C/A y el polimorfismo p21E3+20 C/T, en el que la presencia de al menos un alelo variante p21E2c31 A y al menos un alelo p21E3+20 T indica una probable reducción de la edad de inicio de la enfermedad de Alzheimer, en comparación con individuos homocigóticos para los alelos normales p21E2c31 C y p21E3+20 C.

Figura 1

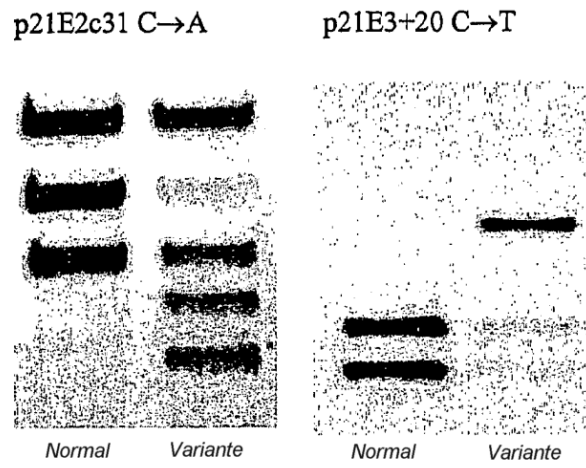
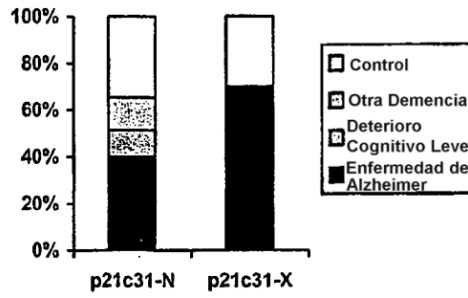


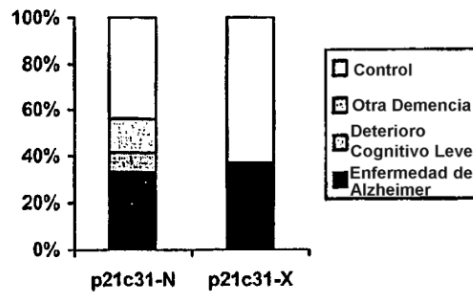
Figura 2

Hombres



R de Pearson $p = 0,02$

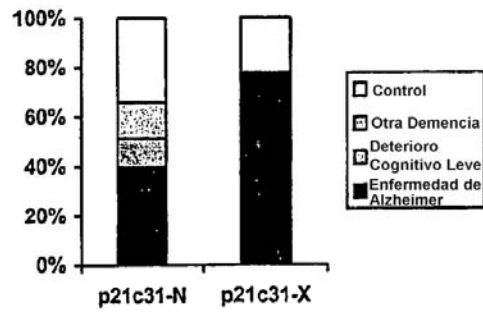
Mujeres



No significativo

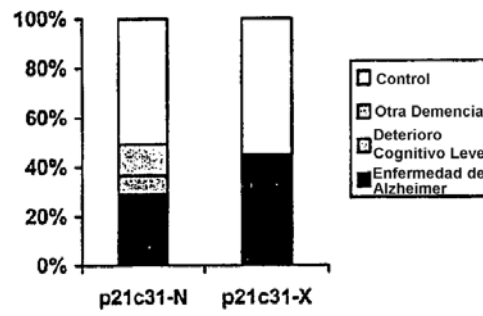
Figura 3

Hombres



R de Pearson $p = 0,14$

Mujeres

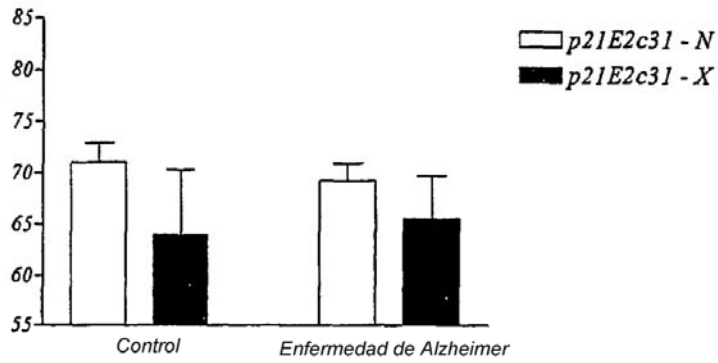


No significativo

Figura 4

Hombres

No significativo



Mujeres

* indica diferencia significativa P < 0,05

