



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 344 881**

② Número de solicitud: 200930533

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **29.07.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
08.09.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Extremadura**
Avda. de Elvas, s/n
06071 Badajoz, ES
FUNDESALUD

⑧ Inventor/es: **Morán García, José María y**
Fuentes Rodríguez, José Manuel

⑦ Agente: **Alesci Naranjo, Magdalena**

⑤ Título: **Procedimiento de obtención de un dispositivo para diagnóstico de mutaciones frecuentes de la proteína LRRK2 basado en PCR en tiempo real.**

⑥ Resumen:

Procedimiento de obtención de un dispositivo para diagnóstico de mutaciones frecuentes de la proteína LRRK2 basado en PCR en tiempo real.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un dispositivo para diagnóstico de mutaciones frecuentes de la proteína LRRK2 basado en PCR en tiempo real, consistente en un sistema de diagnóstico *in vitro* basado en PCR en tiempo real utilizando SYBR green I como fluorocromo que permite el diagnóstico de las mutaciones G2019S y R1441C/H/G del gen LRRK2 humano.

Dispone de una placa de 96 pocillos que genotipa hasta 12 muestras procedentes de DNA humano, obtenido a partir de sangre o frotis bucal, empleándose secuencias de oligonucleótidos específicas que permiten la detección mediante la técnica de PCR del genotipo concreto de la muestra analizada basado en una reacción de tipo multiplex, que en una única reacción indica el genotipo (homocigótico mutante, homocigótico silvestre o heterocigótico) de la muestra analizada.

ES 2 344 881 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de un dispositivo para diagnóstico de mutaciones frecuentes de la proteína LRRK2 basado en PCR en tiempo real.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un dispositivo para diagnóstico de mutaciones frecuentes de la proteína LRRK2 basado en PCR en tiempo real.

La indicación PCR identifica la reacción de la polimerasa en cadena.

Sector de la técnica

Esta invención se destina al sector de la técnica de diagnóstico clínico e investigación básica.

Estado de la técnica

Actualmente no existe en el mercado ningún dispositivo comercial que permita el diagnóstico directo de las mutaciones indicadas del gen LRRK2. Cualquier procedimiento de diagnóstico incluye necesariamente a día de hoy una de las siguientes tres opciones:

- Diagnóstico basado en RFLP: Permite el diagnóstico de la mutación G2019S
- Diagnóstico basado en RFLP+secuenciación: Permite el diagnóstico de las mutaciones R1441G/C/H.
- Diagnóstico basado en secuenciación: Permite el diagnóstico de las mutaciones G2019S y R1441G/C/H.

El diagnóstico basado en RFLP requiere de al menos 2 pasos diferenciados, y en condiciones habituales tienen una duración de 24 horas. Los pasos necesarios son PCR (reacción de la polimerasa en cadena) seguido de restricción enzimática. El procedimiento es eficaz y con un coste económico asumible sin embargo tiene tres grandes *debilidades*:

- 1.- Es un procedimiento que requiere mucho tiempo para llevarse a cabo.
- 2.- La sucesión de pasos aumenta exponencialmente la posibilidad de cometer errores.
- 3.- El riesgo de contaminación de la muestra es moderadamente alto.

En el caso de las mutaciones R1441G/C/H es necesario añadir un paso adicional de secuenciación del DNA para poder discernir que tipo de mutación es la presente. El método es absolutamente fiable y no dejará ningún lugar a dudas respecto del resultado sin embargo la secuenciación también tiene algunas debilidades:

- 1.- Requiere de equipamiento muy sofisticado y caro no disponible en la mayoría de los laboratorios de biología molecular ni en hospitales.
- 2.- Requiere de personal altamente especializado.

La realización de la técnica se basa en la utilización de dos aproximaciones experimentales previamente descritas pero nunca aplicadas al diagnóstico de mutaciones del gen LRRK2.

La primera técnica previamente descrita es la introducción de mutaciones adicionales en la secuencia del primer directo en el extremo 3' en la posición tercera contando desde ese mismo extremo. Teniendo en cuenta que el primer debe diseñarse de forma que la mutación que se quiere analizar quede en ese extremo 3', la adición de una mutación más en la posición tercera hace que la especificidad del primer aumente de manera notable de forma que con esa modificación adicional el primer es altamente específico y permite la diferenciación entre el genotipo silvestre y el genotipo mutante.

La segunda técnica es la inclusión en uno de los primeros correspondiente al alelo en cuestión de una cola rica en "GC" de forma que el producto generado de PCR tenga una temperatura de desnaturalización mayor y pueda ser analizado en la misma carrera mediante la correspondiente curva de desnaturalización. La unión de las dos técnicas previamente indicadas permite la realización de todo el proceso en una sola carrera mediante un PCR de tipo multiplex.

Ambas aproximaciones han sido previamente descritas por el grupo de Papp AC y colaboradores y publicadas en la revista *Biotechniques*. 2003 May;34(5):1068-72.

Descripción de la invención

La presente invención incluye la posibilidad de desarrollar dos tipos distintos, aunque complementarios de productos:

5

Prototipo tipo A: Desarrollo de una placa de diagnóstico comprensiva de las mutaciones G2019S; R1441C/G/H y sus respectivos controles. Permitiría el diagnóstico de hasta 12 pacientes de una sola vez, en un único análisis y con una duración aproximada del mismo de unas 2 horas y en un solo paso (Fig. 1). El dispositivo sería optimizado para partir de DNA obtenido tanto mediante procedimientos invasivos (muestras sanguíneas) como no invasivos (frotis bucales). Este sistema está más orientado hacia actividades de tipo asistencial y diagnóstico en hospitales.

10

Prototipo tipo B: Desarrollo de un sistema de diagnóstico individual para cada una de las mutaciones. Cada kit incluiría todo lo necesario para poder diagnosticar la presencia de una mutación concreta (G2019S o R1441C/H/G) así como los controles necesarios a partir de una muestra individual de DNA procedente de sangre o frotis bucales. El ensayo podría llevarse igualmente a cabo en un tiempo no superior a 2 horas y en un único paso mediante la utilización de placas o tubos de reacción procedentes de cualquier fabricantes y adaptados a las características del equipo de PCR en tiempo real.

15

Características comunes a ambas propuestas son: la economía, la velocidad y la eficiencia.

20

Es el primer sistema de diagnóstico de mutaciones frecuentes relacionadas con la Enfermedad de Parkinson comercializado.

El sistema utiliza las siguientes *tecnologías/materiales/productos* que tendrían que ser proveídos por terceros participantes:

25

Para el Prototipo tipo A:

- Soporte plástico (placa de 96 well)
- Fijado de los primeros en la placa
- Polimerasas/dNTPs/Otros para la reacción en tiempo Real.
- Fluorocromo SYBR-green I

30

35

Para el Prototipo tipo B:

- Polimerasas/dNTPs/Otros para la reacción en tiempo Real.
- Fluorocromo SYBR-green I.

40

Por parte de nuestro equipo se han diseñado un total de 12 secuencias de oligonucleótidos específicos, basados en la secuencia pública (traducción de leucine-rich repeat kinase 2 gene ID 120892) del gen LRKK2 humano accesible desde el GeneBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Dichas secuencias son únicas y han sido diseñadas específicamente por nuestro equipo no existiendo copias de las mismas en ningún otro dispositivo o sistema de diagnóstico parecido.

45

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 344 881 A1

MUTACION	PRIMER	SECUENCIA	MODIFICACION
G2019S	G2019SMut	5'-CATTCTACAGCAGTACTGAGCAAT <u>I</u> CT-3'	Mutación adicional en la 3ª base por el extremo 3'
	G2019SWt	5'-GCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCC GCC CGTCTACAGCAGTACTGAGCAATGCC-3'	Cola adicional de G+C
	LRRK2Wt	5'-GATACCTCCA CT CAGCCATGATTA-3'	Sin modificar.
R1441H	R1441Hfw	5'-TGTCTTTCCCTCCAGGC <u>A</u> CA-3'	Mutación adicional en la 3ª base por el extremo 3'
R1441C	R1441Cfw	5'-TTGTGTCTTTCCCTCCAGG <u>A</u> TT-3'	Mutación adicional en la 3ª base por el extremo 3'
R1441G	R1441Gfw	5'-TGTGTCTTTCCCTCCAGG <u>A</u> TG-3'	Mutación adicional en la 3ª base por el extremo 3'
Común R1441	R1441wtfw	5'-GCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCG CGGCGGGCGGG GCGGGGGTGTGTCTTTCCCTCCAGGCTC- 3'	Cola adicional de G+C
WtR1441	wtR1441rv	5'-GGCTTTGCGTTGCTTCTCAT-3'	Sin modificar

50 La idea de sistema diagnóstico tal y como nos referimos en el prototipo A debe entenderse como “un sistema de diagnóstico *in vitro* basado en PCR en tiempo real utilizando SYBR green I como fluorocromo que permite el diagnóstico de las mutaciones G2019S y R1441C/H/G del gen LRRK2 humano”. El sistema consta de una placa de 96 pocillos que genotipa hasta 12 muestras procedentes de DNA humano ya sea obtenido a partir de sangre o de frotis bucales facilitando el genotipo completo (homocigótico silvestre, homocigótico mutante o heterocigótico) de cada una de las mutaciones indicadas para el paciente en cuestión.

60 La idea de sistema de diagnóstico tal y como nos referimos en el prototipo B debe entenderse como “un sistema de diagnóstico *in vitro* que permite la detección de una mutación aislada del gen LRRK2: G2019S, R1441C, R1441H o R1441G; basado en PCR en tiempo real utilizando el fluorocromo SYBR green I y que a partir de muestras procedentes de DNA humano ya sea obtenido a partir de sangre o de frotis bucales facilita el genotipo completo (homocigótico silvestre, homocigótico mutante o heterocigótico) de la muestra en cuestión”.

65 Respecto de las secuencias de oligonucleótidos utilizados indicar que son secuencias específicas que permiten la detección mediante la técnica de PCR del genotipo concreto de la muestra analizada basado en una reacción de tipo multiplex, que en una única reacción indica el genotipo (homocigótico mutante, homocigótico silvestre o heterocigótico) de la muestra analizada. Los oligonucleótidos utilizados han sido modificados sintéticamente y su diseño es único,

no derivan directamente de la secuencia del gen si no que se han introducido modificaciones en los mismos que son indispensables para alcanzar la sensibilidad deseada del método.

Ventajas

Las ventajas de esta invención se desprenden de la presente memoria si bien a continuación se citan las ventajas más destacadas con carácter meramente enunciativo y no limitativo;

- Se pueden analizar doce muestras de una de las mutaciones en dos horas aproximadamente.
- Se puede emplear sangre o resultados de frotis bucal.
- Las secuencias de oligonucleótidos utilizados son secuencias específicas que permiten la detección mediante la técnica de PCR del genotipo concreto de la muestra analizada basado en una reacción de tipo multiplex, que en una única reacción indica el genotipo (homocigótico mutante, homocigótico silvestre o heterocigótico) de la muestra analizada.

Descripción de los dibujos

Para mejor comprensión de esta memoria se acompañan los dibujos adjuntos que muestran un ejemplo de realización, no limitativo, del objeto de la invención y en los que:

La figura nº 1, es un ejemplo del prototipo A, consistente en una placa cuyo fondo se divide en pocillos dispuestos en columnas desde la A a la H en donde se disponen los oligonucleótidos específicos de cada uno de los productos de PCR adsorbidos al fondo de la placa. Cada circulo representa un pocillo y la indicación de que tipo de primer debe estar adsorbido. El pocillo "G" contiene oligonucleotidos indicadores de "positivo" en cuanto a la reacción de PCR (β -actina humana). El pocillo "H" no tiene ningún primer adsorbido, actúa como "control negativo" o "control de contaminación" de la reacción.

Las filas de la 1 a la 12 corresponden a cada uno de los pacientes/muestras que pueden analizarse en cada carrera.

El resultado del análisis mediante curva de desnaturalización del producto de PCR de cada una de las columnas es comprensivo del genotipo correspondiente a cada paciente, referido a las mutaciones G2019S y a las del codón 1441 R1441G/C/H.

La figura nº 2, es un ejemplo del resultado obtenido a partir de tres muestras independientes por triplicado que permite la detección del genotipo de la muestra en un solo paso con una fiabilidad y reproducibilidad muy elevadas.

Ejemplo de una realización preferente de la invención

Conforme a los diseños descritos, un ejemplo básico de realización aplicado a la detección de la mutación R1441G, implica la utilización de los siguientes oligonucleótidos.

```

R1441Gfw  5'-TGTGTCTTTCCCTCCAGGATG-3'
R1441wtfw 5'-
GCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCGCGGCGGGGCGGGGCGGGGG
TGTGTCTTTCCCTCCAGGCTC-3'
wtR1441rv 5'-GGCTTTGCGTTGCTTCTCAT-3'
    
```

Los tres oligonucleótidos se utilizan simultáneamente en una reacción de PCR en tiempo real con *SYBR-green*, que permite discriminar en cada reacción si el genotipo es homocigótico mutante, homocigótico recesivo o heterocigoto respecto de la mutación estudiada. Las condiciones del PCR en tiempo real básicas son:

4 mM MgC₂

DMSO 5%

SYBR@ GREEN 1X

Annealing: 60°C

Ciclos: 40

ES 2 344 881 A1

Una vez transcurrida la carrera se procede a realizar una curva de desnaturalización (*melting curve*) del producto de PCR entre 65°C y 95°C con intervalos de toma de temperatura del 1%.

5 Como muestras control se han utilizado preparaciones de plasmidos conteniendo fragmentos de entre 300 y 400 pares de bases del gen de LRRK2 humano. Dichos plasmidos han sido sintetizados artificialmente en un laboratorio externo y posteriormente secuenciados para garantizar la presencia de la mutación. A partir de las diluciones de plasmidos originales se han construido moldes homocigotos mutantes, homocigotos silvestres y heterocigotos siempre de forma equimolar.

10 **Aplicaciones de la invención**

Desarrollo de una placa de diagnóstico comprensiva de las mutaciones G2019S; R1441C/G/H y sus respectivos controles. Permitiría el diagnóstico de hasta 12 pacientes de una sola vez, en un único análisis y con una duración aproximada del mismo de unas 2 horas y en un solo paso (Fig. 1). El kit sería optimizado para partir de DNA obtenido tanto mediante procedimientos invasivos (muestras sanguíneas) como no invasivos (frotis bucales). Este sistema está más orientado hacia actividades de tipo asistencial y diagnóstico en hospitales.

Desarrollo de un sistema de diagnóstico individual para cada una de las mutaciones. Cada dispositivo incluiría todo lo necesario para poder diagnosticar la presencia de una mutación concreta (G2019S o R1441C/H/G) así como los controles necesarios a partir de una muestra individual de DNA procedente de sangre o frotis bucales. El ensayo podría llevarse igualmente a cabo en un tiempo no superior a 2 horas y en un único paso mediante la utilización de placas o tubos de reacción procedentes de cualquier fabricante y adaptados a las características del equipo de PCR en tiempo real. Inicialmente indicado para labores de investigación básica.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el diagnostico de las mutaciones G2019S y R1441C/H/G de la proteína LRRK2 basado en una sola PCR múltiple en tiempo real, **caracterizado** por los oligonucleótidos cebadores:

SEQ ID N° 1

SEQ ID N° 2

SEQ ID N° 3

SEQ ID N° 4

SEQ ID N° 5

SEQ ID N° 6

SEQ ID N° 7

SEQ ID N° 8

2. Procedimiento para el diagnostico de las mutaciones G2019S y R1441C/H/G de la proteína LRRK2 basado en una sola PCR múltiple en tiempo real, según la primera reivindicación, **caracterizada** porque la detección de la mutación R1441G, implica la utilización de los siguientes oligonucleótidos:

- SEQ ID N° 5

- SEQ ID N° 7

- SEQ ID N° 8

Los tres oligonucleótidos se utilizan simultáneamente en una reacción de PCR en tiempo real con *SYBR-green*, que permite discriminar en cada reacción si el genotipo es homocigótico mutante, homocigótico recesivo o heterocigoto respecto de la mutación estudiada. Las condiciones del PCR en tiempo real básicas son:

4 mM MgCl₂

DMSO 5%

SYBR@ GREEN 1X

Annealing: 60°C

Ciclos: 40.

Una vez transcurrida la carrera se procede a realizar una curva de desnaturalización del producto de PCR entre 65°C y 95°C con intervalos de toma de temperatura del 1%.

3. Procedimiento para el diagnostico de las mutaciones G2019S y R1441C/H/G de la proteína LRRK2 basado en una sola PCR múltiple en tiempo real, según reivindicación primera, **caracterizada** porque como muestras de control, se han utilizado preparaciones de plasmidos conteniendo fragmentos de entre 300 y 400 pares de bases del gen de LRRK2 humano. Dichos plasmidos han sido sintetizados artificialmente en un laboratorio externo y posteriormente secuenciados para garantizar la presencia de la mutación. A partir de las diluciones de plasmidos originales, se han construido moldes homocigotos mutantes, homocigotos silvestres y heterocigotos siempre de forma equimolar.

4. Procedimiento para el diagnostico de las mutaciones G2019S y R1441C/H/G de la proteína LRRK2 basado en una sola PCR múltiple en tiempo real, según reivindicación primera, **caracterizada** porque se desarrolla un sistema de diagnostico individual para cada una de las mutaciones. Cada dispositivo incluiría todo lo necesario para poder diagnosticar la presencia de una mutación concreta (G2019S o R1441C/H/G) así como los controles necesarios a partir de una muestra individual de DNA procedente de sangre o frotis bucales, utilizando polimerasas/dNTPs/Otros para la reacción en tiempo Real y Fluorocromo SYBR-green I.

5. Procedimiento para el diagnostico de las mutaciones G2019S y R1441C/H/G de la proteína LRRK2 basado en una sola PCR múltiple en tiempo real, según reivindicación primera, **caracterizado** por disponer de una placa de 96 pocillos que genotipa hasta 12 muestras procedentes de DNA humano, obtenido a partir de sangre o frotis bucal.

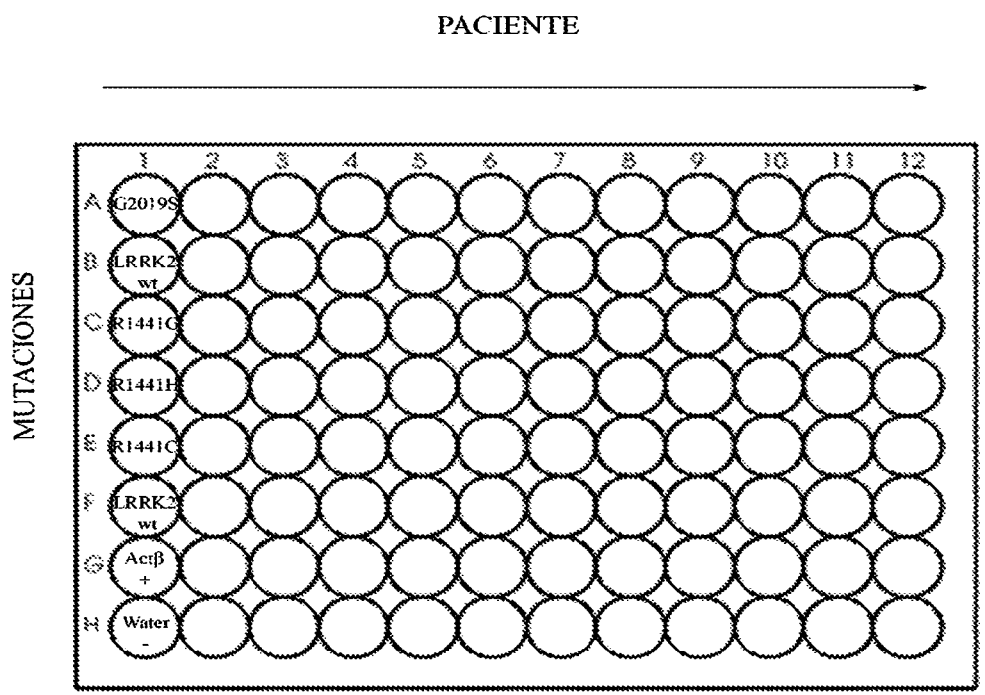


Figura nº 1

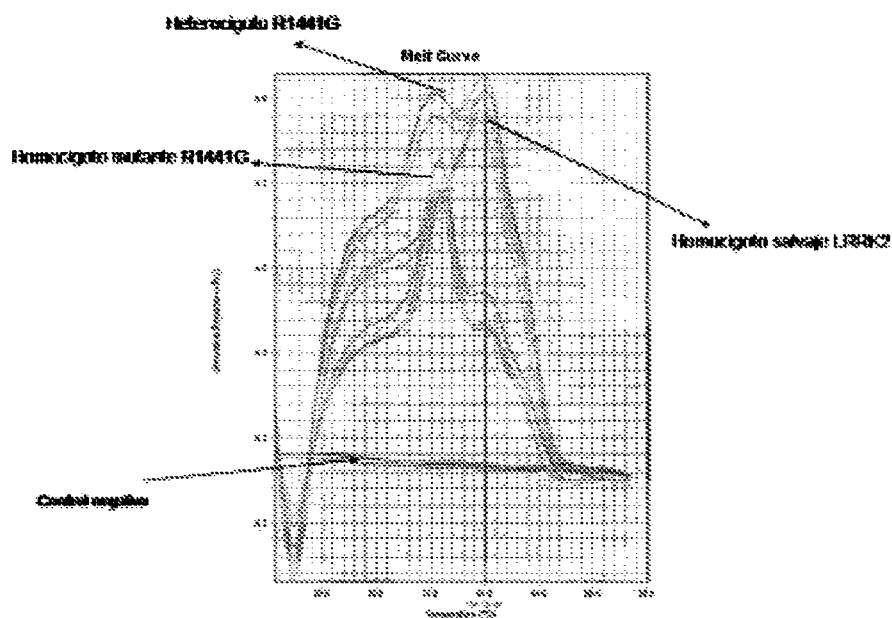


Figura nº 2

ES 2 344 881 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> FUNDESALUD
- 5 <120> Procedimiento de obtención de un dispositivo para diagnóstico de mutaciones frecuentes de la proteína LRRK2 basado en PCR en tiempo real.
- <130> P200930533
- 10 <140> P200930533
<141> 2010-01-18
- <150> P200930533
- 15 <151> 2009-07-29
- <160> 8
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 27
- 25 <212> DNA
<213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 30 cattctacag cagtactgag caattct 27
- <210> 2
- <211> 63
- 35 <212> DNA
<213> *Homo sapiens*
- <400> 2
- 40 gcccgccgcg ccccgegcc gtcccgccgc ccccgccgt ctacagcagt actgagcaat 60
- gcc 63
- 45 <210> 3
- <211> 24
- <212> DNA
- 50 <213> *Homo sapiens*
- <400> 3
- 55 gataacctcca ctacagccatg atta 24
- <210> 4
- <211> 20
- <212> DNA
- 60 <213> *Homo sapiens*
- <400> 4
- 65 tgtctttccc tccaggcaca 20
- <210> 5
- <211> 22

ES 2 344 881 A1

<212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 5
 ttgtgtcttt cctccagga tt 22
 <210> 6

10 <211> 21
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 6
 tgtgtctttc cctccaggat g 21
 <210> 7

20 <211> 66
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 7
 gcggggcgggg cgggggcacg gggggcgccg cgggsggggc gggggtgtgt cttccctcc 60
 aggctc 66

30 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 8
 40 ggctttgcgt tgcttctcat 20

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 344 881

② Nº de solicitud: 200930533

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.07.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	MATA, I.F. et al., "Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease", NEUROGENETICS, 2005, Vol. 6, No. 4, páginas 171-177, ISSN: 1364-6745, Resultados; Materiales y Métodos; Tabla 3.	1-5
Y	PAPP, A. C. et al., "Single nucleotide polymorphism genotyping using allele-specific PCR and fluorescence melting curves", BIOTECHNIQUES, 2003, Vol. 34, No. 5, páginas 1068-1072, ISSN: 0736-6205, todo el documento, en particular, Materiales y Métodos.	1-5
A	DI FONZO, A. et al., "Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease", EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, 2006, Vol. 14, No. 3, páginas 322-331, ISSN: 1018-4813, todo el documento.	1-5
A	MOORE, D.J., "The biology and pathobiology of LRRK2: implications for Parkinson's disease.", PARKINSONISM AND RELATED DISORDERS, 2008, Vol. 14, Suppl. 2; páginas S92-S98, ISSN: 1353-8020, todo el documento.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.08.2010

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.08.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-5	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Mata, I.F. et al., Neurogenetics, (2005), 6(4): 171-7.	2005
D02	Papp, A. C. et al., BioTechniques, (2003), 34(5): 1068 - 1072.	2003
D03	Di Fonzo, A. et al., Eur. J. Hum. Genet. , (2006), 14(3): 322-31.	2006
D04	Moore, D.J., Parkinsonism. Relat. Disord., (2008), 14(Suppl 2): S92-8.	2008

Observaciones sobre documentos:

En D1 se resumen y analizan diferentes variantes alélicas identificadas en el gen LRRK2.

En D2 se describe un método de identificación de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) basado en la aplicación de una reacción PCR múltiple caracterizada por el uso de un cebador específico para cada alelo y en la detección de los productos de la reacción de amplificación mediante las correspondientes curvas de fusión.

En D3 se analiza el gen LRRK2 en familias afectadas de la enfermedad de Parkinson.

En D4 se revisa la implicación del gen LRRK2 en la enfermedad de Parkinson.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención está relacionada con la divulgación de nuevos procedimientos de identificación de las mutaciones G2019S y R1441C/H/G de la proteína LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2) asociadas a la enfermedad de Parkinson.

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicación independiente 1.

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 es un procedimiento para el diagnóstico de las mutaciones G2019S y R1441C/H/G de la proteína LRRK2 basado en una reacción PCR múltiple en tiempo real caracterizada por el uso de los cebadores SEQ ID Nos 1 a 3 específicos para la detección de la mutación G2019S y del alelo silvestre, y de los cebadores SEQ ID Nos 4 a 8 específicos para la detección de las mutaciones R1441C/H/G y del correspondiente alelo silvestre. Debido a que en el estado de la técnica no se han descrito de cebadores similares a los de la invención, ni su aplicación en procedimientos de identificación de mutaciones del gen LRRK2, se considera nuevo el objeto de la reivindicación independiente 1 y el de las dependientes 2-5.

1.2. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-5, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

Hoja adicional

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicación independiente 1.

2.1.1. Los documentos D1 y D2 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D1 se analizan 26 variantes exónicas del gen LRRK2 entre las que se incluyen las siguientes: 6055G>A (G2019S), 4321C>T/G (R1441C/G) y 4322G>A (R1441H) relacionadas con la enfermedad de Parkinson (cf.D1: Resultados, Tabla 1, Tabla 2). En D2 se describe un método de identificación de polimorfismos de un único nucleótido (SPN: 'single nucleotide polymorphism') basado en una reacción PCR específica de alelo ('Allele-specific PCR') y en la detección de los productos de la reacción de amplificación mediante el análisis de las curvas de fusión ('Melting Curves'). La secuencia de cada cebador directo, diseñada para amplificar selectivamente un único alelo, incorpora el nucleótido específico del alelo pertinente en su extremo 3' y, además, una mutación adicional en la tercera base del extremo 3' con el fin de prevenir la posible amplificación del alelo incorrecto (cf. D2: Materiales y Métodos, 'Allele-Specific PCR Amplification'; Tabla 1.). Las curvas de fusión de los fragmentos de DNA amplificados se obtienen a partir de los datos de fluorescencia emitida por el fluorocromo SYBR Green que se une inespecíficamente a la doble hebra de ADN. Mediante la incorporación de secuencias ricas en GC en el extremo 5' en uno de los cebadores directos, específicos de alelo, se logra aumentar su temperatura de fusión lo que permite el análisis simultáneo de ambos alelos (cf. D2: Materiales y Métodos, 'SYBR Green Fluorescence Melting Curve Analysis'; Figura 1.).

El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo procedimiento de detección de las mutaciones G2019S y R1441C/H/G de la proteína LRRK2.

La solución propuesta en la reivindicación 1 se basa en una reacción PCR múltiple en tiempo real caracterizada por el uso de los cebadores SEQ ID Nos 1 a 3 específicos para la detección de los alelos G2019S y silvestre, y de los cebadores SEQ ID Nos 4 a 8 específicos para la detección de R1441C/H/G y del correspondiente alelo silvestre. Por lo tanto, el alcance inventivo del procedimiento de la reivindicación 1 radica en los cebadores (SEQ ID Nos 1 a 8) utilizados en dicho procedimiento. El análisis de las secuencias de dichos cebadores revela que son homólogas a las secuencias de los alelos concernidos del gen LRRK2 (cf. D1) y que además incorporan las modificaciones en sus extremos 3' y/o 5' descritas previamente (cf.D2). Por consiguiente, el objeto de la reivindicación independiente 1 se considera que no es inventivo sobre la base de los documentos D1 y D2.

Según lo anteriormente expuesto, el objeto de las reivindicaciones 2 y 5 también se considera que no es inventivo.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-5 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.