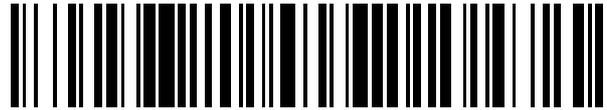


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 379**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2012 E 12750628 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2723894**

54 Título: **Biomarcadores de microARN indicativos de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

**27.06.2011 US 201161501720 P**

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

**23.08.2016**

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)  
6-10 Koishikawa 4-chome  
112-8088 Tokyo, JP**

72 Inventor/es:

**DEZSO, ZOLTAN y  
KUMAR, PAVAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 580 379 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

Biomarcadores de microARN indicativos de la enfermedad de Alzheimer

## 5 Antecedentes

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad progresiva del sistema nervioso central. Se manifiesta por demencia, típicamente en la tercera edad, y los síntomas incluyen desorientación, pérdida de memoria, dificultad con el lenguaje, el cálculo, o las habilidades de visión espacial y por manifestaciones psiquiátricas. La enfermedad de Alzheimer está asociada con neuronas en degeneración en varias regiones del cerebro. La neuropatología de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de placas amiloides, ovillos neurofibrilares, pérdida sináptica y muerte selectiva de neuronas. Las placas amiloides resultan de niveles anómalos de péptido beta amiloide extracelular, mientras que los ovillos neurofibrilares están asociados con la presencia de proteína tau hiperfosforilada intracelular. Típicamente, los síntomas se manifiestan primero clínicamente con una disminución de la memoria seguida de un deterioro de otras funciones cognitivas y mediante un comportamiento anómalo. Aproximadamente 24 millones de personas en todo el mundo tienen demencia, en su mayoría (~60 %) debida a la enfermedad de Alzheimer (Ferri C.P. et al. (2005) Lancet 366(9503):2112-2117). Se estima que más de 5 millones de americanos tienen la enfermedad de Alzheimer, y se prevé que este número aumentará hasta 14,3 millones hacia la mitad del siglo, lo que representa un aumento del 350 por ciento desde 2000. El número creciente de pacientes con demencia en el mundo desarrollado colocará una enorme carga sobre la sociedad y el sistema de atención sanitaria.

El diagnóstico precoz es una etapa esencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, ya que el diagnóstico precoz permite que los sujetos reciban fármacos que podrían retrasar el avance de la enfermedad. La enfermedad de Alzheimer se diagnostica actualmente usando una combinación de criterios clínicos, que puede incluir un examen neurológico, pruebas del estado mental, y generación de imágenes cerebrales. Suele hacerse un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer eliminando otras demencias. Basándose en estos criterios, puede ser difícil un diagnóstico preciso, especialmente para los pacientes que tienen un estadio leve o precoz de la enfermedad de Alzheimer. Puede hacerse un diagnóstico inequívoco examinando la patología del tejido cerebral, pero esto sólo es factible de forma póstuma. Por consiguiente, existe una necesidad de marcadores que sean indicativos de la enfermedad de Alzheimer, que puedan usarse en aplicaciones diagnósticas.

## Sumario

La presente invención proporciona marcadores de miARN novedosos que son indicativos de la enfermedad de Alzheimer y que podrían usarse para diagnosticar de forma precisa la enfermedad de Alzheimer en un sujeto. Estos biomarcadores incluyen miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, miR-301a y miR-545. En algunas realizaciones, los métodos conllevan la detección de miARN circulantes extracelulares en una muestra adecuada, preferentemente sangre, plasma, suero, orina, o saliva,

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención proporciona un método de diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto determinando el nivel de al menos un miARN en una muestra que contiene miARN circulante procedente del sujeto, en el que el al menos un miARN es miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, o combinaciones de los mismos, y en el que una diferencia en el nivel del al menos un miARN frente al de un sujeto normal determinada en relación con un control adecuado es indicativa de enfermedad de Alzheimer en el sujeto. Por ejemplo, en una realización, el método incluye determinar el nivel de al menos un miARN en una muestra que contiene miARN circulante procedente del sujeto, en el que el al menos un miARN es miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, o combinaciones de los mismos, y en el que un descenso en el nivel del al menos un miARN en relación con un control es indicativo de enfermedad de Alzheimer en el sujeto. Opcionalmente, el método puede incluir además proporcionar un diagnóstico de que el sujeto tiene o no tiene la enfermedad de Alzheimer basado en el nivel de al menos un miARN en la muestra. En otra realización, el método puede incluir además correlacionar una diferencia en el nivel o niveles de al menos un miARN en relación con un control adecuado con un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en el sujeto.

En una realización, el método comprende determinar el nivel de un miARN, p. ej., miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g o Let-7d en la muestra, en la que la diferencia en el nivel del miARN frente al de un sujeto normal es un descenso.

En otra realización, el método comprende determinar el nivel de dos o más miARN en la muestra. En esta realización, el método puede comprender además determinar el nivel de miR-301a, miR-545, o miR-301a y miR-545 en la muestra. Por ejemplo, puede seleccionarse al menos un miARN de entre miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, o combinaciones de los mismos y, opcionalmente, puede seleccionarse al menos un miARN de entre miR-191, miR-545, o miR-301a y miR-545. En otra realización, el método implica determinar el nivel de una de las siguientes combinaciones de miARN: miR-545, let7g, y miR-15b; miR-15b y miR-545; miR-301a, miR-545, let-7g y miR-15b; miR-191 y miR-15b; Let-7g y miR-15b; miR-191, miR-301a, y miR-545; miR-301a, let-7g, y miR-15b; y miR-191, miR-301a, miR-545, y miR-15b.

- 5 En una realización particular, el método puede comprender determinar los niveles de dos o más miARN en una muestra que contiene miARN circulante del sujeto, comparar los niveles de los dos o más miARN en la muestra con un conjunto de datos que representan los niveles de los mismos miARN presentes en sujetos normales y en sujetos que tienen la enfermedad de Alzheimer, y diagnosticar al sujeto como que tiene o no tiene la enfermedad de Alzheimer basándose en la comparación. En algunas realizaciones, los dos o más miARN pueden incluir las siguientes combinaciones: miR-545, let7g, y miR-15b; miR-15b y miR-545; miR-301a, miR-545, let-7g y miR-15b; miR-191 y miR-15b; Let-7g y miR-15b; miR-191, miR-301a, y miR-545; miR-301a, let-7g, y miR-15b; y miR-191, miR-301a, miR-545, y miR-15b.
- 10 El método puede incluir opcionalmente realizar al menos una prueba adicional para facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, la prueba adicional puede ser uno o más del mini examen del estado mental (MEEM), la prueba mini-cog, la prueba EEEA-cog y la prueba del dibujo del reloj. Opcionalmente o además, las pruebas adicionales pueden incluir detectar o evaluar al menos un biomarcador adicional para la enfermedad de Alzheimer.
- 15 El método puede incluir opcionalmente administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico para el Alzheimer al sujeto. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico para el Alzheimer puede ser Razadyne® (galantamina), Exelon® (rivastigmina), o Aricept® (donepezilo) En una realización particular, el agente terapéutico para el Alzheimer es donepezilo o una sal o éster del mismo farmacéuticamente aceptable (p. ej., clorhidrato de donepezilo).
- 20 El nivel de un miARN puede detectarse mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede detectarse un miARN usando un agente que hibrida de forma específica con el miARN. En ciertas realizaciones, el nivel de un miARN puede detectarse usando métodos de amplificación, métodos de hibridación, y/o métodos de secuenciación. En una realización, el nivel de miARN se detecta usando PCR cuantitativa.
- 25 En otro aspecto, la invención proporciona un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, que comprende medir el nivel de al menos un miARN en una muestra de sangre procedente del sujeto, en el que el al menos un miARN es miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, o combinaciones de los mismos, y correlacionar una diferencia en el nivel o niveles en el sujeto en relación con un control adecuado con un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en el sujeto. En una realización, el método puede comprender además determinar el nivel de miR-301a, miR-545, o miR-301a y miR-545 en la muestra.
- 30 En otro aspecto, la invención proporciona un método para vigilar la evolución de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, determinando el nivel de al menos un miARN en una primera muestra que contiene miARN circulante de un sujeto, determinando el nivel de dicho al menos un miARN en una segunda muestra que contiene miARN circulante de dicho sujeto, en el que dicha segunda muestra se obtiene después de dicha primera muestra, y comparando los niveles determinados en la primera muestra con los niveles determinados en la segunda muestra, en la que dichos niveles son indicativos del avance de la enfermedad de Alzheimer en la que el al menos un miARN es miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, o combinaciones de los mismos. En una realización, el método puede comprender además determinar el nivel de miR-301a, miR-545, o miR-301a y miR-545 en las muestras.
- 35 En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, determinando el nivel de al menos un miARN en una muestra que contiene miARN circulante de un sujeto, en el que una diferencia en el nivel del al menos un miARN frente al de un sujeto normal determinada en relación con un control adecuado es indicativa de enfermedad de Alzheimer en el sujeto; y, si se detecta una diferencia en el nivel de al menos un miARN, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un agente terapéutico para el Alzheimer al sujeto. En una realización, el al menos un miARN es miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, o combinaciones de los mismos. El método puede incluir opcionalmente además determinar el nivel de miR-301a, miR-545, o miR-301a y miR-545 en la muestra.
- 40 En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer, identificando un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer en el cual el nivel de al menos un miARN en una muestra que contiene miARN circulante del sujeto es diferente (p. ej., menor) en relación con un control adecuado, y administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico para el Alzheimer al sujeto. En una realización, el al menos un miARN es miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, o combinaciones de los mismos. El método puede incluir opcionalmente además identificar a un sujeto en el cual, el nivel de miR-301a, miR-545, o miR-301a y miR-545, también es diferente (p. ej., menor) en la muestra en relación con un control adecuado. En estos aspectos, el agente terapéutico para el Alzheimer puede ser Razadyne® (galantamina), Exelon® (rivastigmina), o Aricept® (donepezilo) En una realización de ejemplo, el agente terapéutico para el Alzheimer es donepezilo o una sal o éster del mismo farmacéuticamente aceptable (p. ej., clorhidrato de donepezilo).
- 45 En otro aspecto, la invención proporciona un *kit* para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, que contienen un agente que detecta selectivamente la presencia de al menos un miARN en una muestra que contiene miARN circulante de un sujeto, en el que el al menos un miARN es miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, o combinaciones de los mismos, e instrucciones para determinar el nivel de dicho al menos un miARN, en el que una
- 50
- 55
- 60
- 65

- 5 diferencia en el nivel del al menos un miARN frente al de un sujeto normal determinada en relación con un control adecuado es indicativa de enfermedad de Alzheimer en el sujeto. Dicho *kit* puede contener opcionalmente un agente que detecta selectivamente la presencia de al menos un miARN adicional en la muestra, en la que el miARN adicional es miR-301a, miR-545, o miR-301a y miR-545. En algunas realizaciones, el agente hibrida específicamente con un miARN.
- En algunas realizaciones de los métodos o *kits* descritos en el presente documento, el sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un ser humano.
- 10 En métodos o *kits* descritos en el presente documento, la diferencia en el nivel del al menos un miARN en relación con un control adecuado puede determinarse ejecutando un algoritmo de clasificación informático.
- En ciertas realizaciones de los métodos y *kits*, la muestra puede ser un fluido corporal, por ejemplo, sangre, linfa, orina, o saliva. La muestra puede ser una muestra acelular y/o una muestra sin microvesículas. En una realización, la muestra es plasma. En otra realización, la muestra es suero.
- 15 En ciertas realizaciones de los métodos y *kits*, en los que se selecciona o se usa un miARN, dicho miARN es (a) un miARN distinto de miR-191, (b) un miARN distinto de miR-15b, (c) un miARN distinto de miR-142-3p, (d) un miARN distinto de Let-7g, y/o (e) un miARN distinto de Let-7d.
- 20 En ciertas realizaciones de los métodos y *kits*, en los que la muestra es LCR, el miARN es (a) un miARN distinto de miR-15b, y/o (b) un miARN distinto de miR-191.
- Breve descripción de las figuras y tablas
- 25 Figuras 1A y 1B: Gráficos de dispersión de expresión de miARN normalizada de la cohorte 1 (20 pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) o deterioro cognitivo leve (DCL) (11 EA; 9 DCL) y 20 pacientes de control normales (CN) usando un ensayo nCounter de miARN.
- 30 Figura 2: Gráficos de dispersión de los valores de factores de cambio lineal, normalizados con respecto a los valores promedio de los CN de los biomarcadores de miARN candidatos individuales de la cohorte 1 (20 pacientes con EA o DCL y 20 pacientes CN) usando RT-qPCR TaqMan.
- 35 Figura 3: Gráficos de dispersión de los valores de factores de cambio lineal, normalizados con respecto a los valores promedio de los CN de los biomarcadores de miARN candidatos individuales de la cohorte 2 (20 pacientes con EA o DCL y 17 pacientes CN) usando RT-qPCR TaqMan.
- Tabla 1: Detalles disponibles de los pacientes de la cohorte 1, incluyendo diagnóstico, edad, sexo, puntuaciones de MEEM y números de visita, obtenidos de PrecisionMed, Inc.
- 40 Tabla 2: Secuencia y números de acceso de los biomarcadores de miARN y miARN usados para normalización.
- Tabla 3: Correlación de los valores promedio de factores de cambio para los biomarcadores de miARN candidatos entre las plataformas Nanostring y TaqMan para las muestras de la cohorte 1 (20 EA o DCL (11 EA; 9 DCL) y 20 CN).
- 45 Tabla 4: Valores de Ct relativos procedentes de qPCR TaqMan usando un subgrupo de muestras de la cohorte 1 (11 EA y 20 CN); los datos se usaron para generar patrones distintivos de biomarcadores de miARN candidatos para diferenciar entre pacientes con EA y pacientes CN.
- 50 Tabla 5: Detalles disponibles de los pacientes de la cohorte 2, incluyendo diagnóstico, edad, sexo, puntuaciones de MEEM y números de visita, obtenidos de PrecisionMed, Inc.
- Tabla 6: Correlación de los valores promedio de factores de cambio (normalizados con respecto a los valores promedio de control) para los biomarcadores de miARN candidatos entre la cohorte 1 y la cohorte 2 usando el ensayo RT-qPCR TaqMan de miARN.
- 55 Tabla 7: Valores de Ct relativos procedentes de qPCR TaqMan usando las muestras de la cohorte 2 (20 EA y 17 CN), que se usaron como entrada para el algoritmo para predecir el estado del paciente con EA y CN usando distintivos procedentes de los datos de la cohorte 1 (tabla 4).
- 60 Tablas 8A-8C: Distintivos de biomarcadores de miARN candidatos indicativos de enfermedad de Alzheimer
- 65 Tablas 9A-9B: Precisión, especificidad, sensibilidad y ABC (área bajo la curva) para los distintivos de biomarcadores de miARN que tienen una precisión >75 %.

Tabla 10: Precisión, especificidad, sensibilidad y ABC (área bajo la curva) para 8 combinaciones de distintivos de miARN usando las muestras de la cohorte 2 para la predicción.

5 Tabla 11: Precisión, especificidad, sensibilidad y ABC (área bajo la curva) miARN individuales usando las muestras de la cohorte 2 para la predicción.

Descripción detallada

10 1. Introducción

15 La presente invención proporciona marcadores de miARN novedosos que son indicativos de la enfermedad de Alzheimer, y que podrían usarse para diagnosticar de forma precisa la enfermedad de Alzheimer en un sujeto. Además, se proporcionan métodos para vigilar la evolución de la enfermedad de Alzheimer, métodos para tratar a un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer, y kits para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, los métodos conllevan la detección de miARN circulantes extracelulares en una muestra adecuada, preferentemente sangre, plasma, suero, orina, o saliva.

20 2. Definiciones

Antes de exponer la invención con detalle, se proporcionan definiciones de ciertos términos para usar en el presente documento. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la técnica.

25 El uso de los términos "un" y "uno" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) han de interpretarse como para abarcar tanto el singular como el plural, a menos que se indique otra cosa en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. Las expresiones "comprendiendo"/ "que comprende", "teniendo"/ "que tiene", "incluyendo"/ "que incluye" y "conteniendo"/ "que contiene" han de interpretarse como expresiones abiertas (es decir, que significan "incluyendo/que incluye, pero sin limitarse a") a menos que se indique otra cosa. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento pretende simplemente servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado enumerado o que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpore dentro de la memoria como si se enumerase individualmente.

35 El término "sujeto" pretende incluir animales que son capaces de padecer o estar afectados por demencia asociada con un trastorno del SNC, incluyendo enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, o cualquier trastorno que implique, directa o indirectamente, enfermedad de Alzheimer. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, p. ej., seres humanos, primates no humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas, y animales transgénicos no humanos. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano, p. ej., un ser humano que padece, está en riesgo de padecer, o es potencialmente capaz de padecer enfermedad de Alzheimer o demencia asociada con la enfermedad de Alzheimer.

45 El término "tratar" se utiliza en el presente documento para significar mitigar, reducir o aliviar al menos un síntoma de una enfermedad en un sujeto. Por ejemplo, en relación con la enfermedad de Alzheimer, el término "tratar" incluye mitigar, reducir, o aliviar el deterioro cognitivo (tal como deterioro de la memoria y/u orientación) o el deterioro del funcionamiento global (funcionamiento general, incluyendo actividades de la vida diaria) y/o retrasar o invertir el deterioro progresivo en el deterioro general o cognitivo. Por consiguiente, el término "tratar" también abarca retrasar o prevenir el comienzo antes de la manifestación clínica de una enfermedad o síntoma de una enfermedad y/o reducir el riesgo de desarrollar o empeorar un síntoma de una enfermedad.

50 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico, o combinaciones de los mismos, es una cantidad suficiente para tratar la enfermedad en un sujeto. Por ejemplo, para un agente terapéutico para el Alzheimer, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad que se ha demostrado que proporciona un beneficio terapéutico observable en comparación con los signos y síntomas clínicamente observables iniciales de la enfermedad de Alzheimer.

55 La expresión "alrededor de" o "aproximadamente" significa normalmente dentro del 5 %, o más preferentemente dentro del 1 %, de un valor o intervalo dado.

60 3. Biomarcadores de miARN de la enfermedad de Alzheimer

65 La invención se relaciona con biomarcadores de microARN ("miARN") que se ha encontrado que están presentes de forma diferencial en muestras biológicas procedentes de sujetos que tienen la enfermedad de Alzheimer (EA), en comparación con sujetos que son "normales", es decir, sujetos que no tienen la enfermedad de Alzheimer. Un biomarcador de miARN o conjunto de biomarcadores de miARN está presente de forma diferencial entre muestras si se ha determinado que la diferencia entre los niveles de expresión del biomarcador de miARN o conjunto de

biomarcadores de miARN en las muestras es estadísticamente significativa. Las pruebas habituales para la significación estadística incluyen, pero no se limitan a, las pruebas de la t, ANOVA, Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Mann-Whitney, y de la oportunidad relativa. Los biomarcadores de miARN, solos o en combinación, pueden usarse para proporcionar una medida del riesgo relativo que tiene o no tiene un sujeto de tener la enfermedad de Alzheimer.

Los miARN son ARN pequeños no codificantes que están implicados en la regulación de la expresión génica a través de diferentes mecanismos, incluyendo la represión traduccional. Los miARN se transcriben inicialmente a partir de ADN como transcritos largos de miARN primarios ("pri-miARN"), cuyo tamaño oscila desde cientos a miles de nucleótidos. El pri-miARN en se procesa el núcleo mediante el complejo enzimático Drosha-DGCR8 para formar precursores de miARN de tallo-bucle ("pre-miARN"). El pre-miARN se transporta mediante la proteína exportina 5 al citoplasma, donde se escinde mediante la enzima Dicer para generar miARN maduro (funcional). El genoma humano codifica más de 1300 miARN, que se han catalogado en la "miRBase: La base de datos de microARN" (<http://www.mirbase.org/>). La expresión de miARN se ha comunicado en una amplia gama de tipos celulares y tisulares, y extracelularmente, p. ej., en fluidos biológicos.

Los biomarcadores de miARN de la enfermedad de Alzheimer se descubrieron comparando el nivel de expresión de miARN en muestras biológicas procedentes de sujetos que tenían enfermedad de Alzheimer con muestras procedentes de sujetos que son "normales", es decir, sujetos que no tienen EA, e identificando los miARN que están presentes de forma diferencial. Se identificaron siete biomarcadores de miARN presentes de forma diferencial de esta manera, que, sorprendentemente, se encontró que eran indicativos de la enfermedad de Alzheimer cuando se medían en plasma: miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, miR-301a, y miR-545 (véase la Tabla 2). Estos biomarcadores de miARN pueden usarse actualmente para determinar el estado de la enfermedad de Alzheimer de un sujeto, por ejemplo, un sujeto cuyo estado de enfermedad de Alzheimer era desconocido previamente o que se sospecha que padece la enfermedad de Alzheimer. Esto puede conseguirse determinando el nivel de uno o más de miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, miR-301a, y miR-545, o combinaciones de los mismos, en una muestra biológica procedente del sujeto. Una diferencia en el nivel de uno o más de estos biomarcadores de miARN en comparación con los de una muestra biológica procedente de un sujeto normal es una indicación de que el sujeto tiene la enfermedad de Alzheimer.

Un sujeto que tiene una diferencia en el nivel de uno o más biomarcadores de miARN en comparación con un sujeto normal puede tener la enfermedad de Alzheimer, incluyendo enfermedad de Alzheimer en estadio precoz, enfermedad de Alzheimer moderada o en estadio medio, o enfermedad de Alzheimer grave o en estadio avanzado. En una realización, el nivel de uno o más biomarcadores de miARN puede usarse para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que tiene síntomas característicos de enfermedad de Alzheimer en estadio precoz, también conocido como enfermedad de Alzheimer prodrómica. Los sujetos que tienen enfermedad de Alzheimer en estadio precoz tienen típicamente puntuaciones de MEEM de 24-30. El propio paciente suele comunicar quejas en relación con pérdida leve de memoria o una capacidad decreciente para realizar tareas complejas, o las comunican sus parejas o cuidadores.

En otra realización, el nivel de uno o más biomarcadores de miARN puede usarse para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que tiene síntomas característicos de "disminución cognitiva moderadamente grave", también denominada enfermedad de Alzheimer "moderada" o "en estadio medio". La disminución cognitiva moderadamente grave se caracteriza por lagunas de memoria importantes y la aparición de deficiencias en la función cognitiva. En este estadio, está indicada alguna asistencia con las actividades cotidianas.

En otra realización, el nivel de uno o más biomarcadores de miARN puede usarse para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que tiene síntomas característicos de "disminución cognitiva grave", también denominada como enfermedad de Alzheimer en "moderada" o "en estadio medio". En la disminución cognitiva grave, las dificultades de la memoria continúan empeorando, pueden aparecer cambios de personalidad significativos, y los individuos afectados necesitan típicamente ayuda extensa con las actividades diarias habituales.

En otra realización, el nivel de uno o más biomarcadores de miARN puede usarse para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que tiene síntomas característicos de "disminución cognitiva muy grave", también denominada como enfermedad de Alzheimer en "grave" o "en estadio avanzado". La enfermedad de Alzheimer en estadio avanzado o la disminución cognitiva muy grave es el estadio final de la enfermedad. Los individuos pierden típicamente la capacidad para responder a su entorno, la capacidad para hablar y, finalmente, la capacidad para controlar el movimiento (véase, por ejemplo, <http://www.alz.org>).

En otra realización, el nivel de uno o más biomarcadores de miARN puede usarse para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que tiene una puntuación de MEEM entre 0 y 26, p. ej., una puntuación de MEEM de 0-10, una puntuación de MEEM de 0-20, una puntuación de MEEM de 0-26, etc. "MEEM" se refiere al mini examen del estado mental usado en la comunidad de la evaluación cognitiva. Durante el MEEM, un médico u otro profesional médico pregunta al paciente una serie de preguntas que están diseñadas para probar una serie de habilidades mentales del día a día. Las preguntas que se preguntan habitualmente incluyen, por ejemplo, recordar y repetir los nombres de tres objetos habituales, decir el año, fecha, estación y día de la semana, contar hacia atrás desde 100 en incrementos de 7, deletrear la palabra "world" hacia atrás, nombrar objetos familiares cuando el examinador los

señala, identificar la localización de la consulta del examinador, repetir una frase común después de que la haya dicho el examinador, copiar un dibujo de dos formas entrelazadas y seguir una serie de instrucciones en tres partes (p. ej., recoger un trozo de papel, doblarlo por la mitad y colocarlo en el suelo). La puntuación máxima del examen MEEM es de 30 puntos. En general, se considera que un paciente con una puntuación de MEEM de 27-30 no tiene deterioro cognitivo, se considera que un paciente con una puntuación de MEEM de 21-26 tiene deterioro cognitivo leve, se considera que un paciente con una puntuación de MEEM de 11-20 tiene deterioro cognitivo moderado, y se considera que un paciente con una puntuación de MEEM de 0-10 tiene deterioro cognitivo grave. En ciertas realizaciones, se considera que un paciente con una puntuación de MEEM de 0-16 tiene enfermedad de Alzheimer avanzada (de moderadamente grave a grave).

En una realización, el nivel de uno o más biomarcadores de miARN puede usarse para vigilar la evolución de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto. El estado de la enfermedad de Alzheimer de un sujeto puede cambiar a lo largo del tiempo. Por ejemplo, la enfermedad puede empeorar o mejorar a lo largo del tiempo. El nivel de uno o más biomarcadores de miARN detectado en muestras procedentes del sujeto puede cambiar con dicho empeoramiento o mejora. Por ejemplo, el nivel de uno o más de miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, miR-301a, y/o miR-545 desciende con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, la evolución de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto puede vigilarse determinando el nivel de uno o más biomarcadores de miARN en una primera muestra procedente de un sujeto, y determinando el nivel de uno o más biomarcadores de miARN en una segunda muestra procedente de un sujeto, en el que la segunda muestra se obtiene después de la primera muestra. Los niveles en la segunda muestra en relación con los niveles en la primera muestra son indicativos del avance de la enfermedad. Por ejemplo, un descenso en el nivel de uno o más de miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, miR-301a, y/o miR-545 de la primera muestra a la segunda muestra es indicativo de que el sujeto ha desarrollado la enfermedad de Alzheimer, o de que la enfermedad ha empeorado. Por el contrario, un aumento en el nivel de uno o más de miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, miR-301a, y/o miR-545 de la primera muestra a la segunda muestra es indicativo de que la enfermedad ha mejorado. En una realización, los uno o más biomarcadores de miARN son miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, y combinaciones de los mismos.

Puede verificarse si el nivel de un biomarcador de miARN procedente de un sujeto de prueba es o no diferente del nivel de un biomarcador de miARN presente en un sujeto normal comparando el nivel del biomarcador de miARN en la muestra del sujeto de prueba con un control adecuado. El experto puede seleccionar un control apropiado para el ensayo en cuestión. Por ejemplo, un control adecuado puede ser una muestra biológica procedente de un sujeto conocido, p. ej., un sujeto que se sabe que es un sujeto normal, o un sujeto que se sabe que tiene la enfermedad de Alzheimer. Si se obtiene un control adecuado de un sujeto normal, una diferencia estadísticamente significativa en el nivel de un biomarcador de miARN en un sujeto de prueba en relación con el control adecuado es indicativa de que el sujeto tiene la enfermedad de Alzheimer. Si se obtiene un control adecuado de un sujeto que se sabe que tiene la enfermedad de Alzheimer, los niveles comparables o inferiores a dicho control son indicativos de enfermedad de Alzheimer, reflejo de una diferencia en los niveles presentes en una muestra de un sujeto normal. En una realización, la diferencia en el nivel de un biomarcador de miARN es un descenso. Un control adecuado también puede ser un patrón de referencia. Un patrón de referencia sirve como un nivel de referencia para la comparación, de modo que las muestras de prueba pueden compararse con el patrón de referencia con el fin de inferir el estado de la enfermedad de Alzheimer de un sujeto. Un patrón de referencia puede ser representativo del nivel de uno o más biomarcadores de miARN en un sujeto conocido, p. ej., un sujeto que se sabe que es un sujeto normal, o un sujeto que se sabe que tiene la enfermedad de Alzheimer. Del mismo modo, un patrón de referencia puede ser representativo del nivel de uno o más biomarcadores de miARN en una población de sujetos conocidos, p. ej., un sujeto que se sabe que es un sujeto normal, una población de sujetos que se sabe que tienen la enfermedad de Alzheimer. El patrón de referencia puede obtenerse, por ejemplo, agrupando muestras de una pluralidad de individuos y determinando el nivel de un biomarcador de miARN en las muestras agrupadas, para producir de esa forma un patrón a lo largo de una población promedio. Dicho patrón de referencia representa un nivel promedio de un biomarcador de miARN en una población de individuos. Un patrón de referencia también puede obtenerse, por ejemplo, promediando el nivel de un biomarcador de miARN que se ha determinado que está presente en muestras individuales obtenidas de una pluralidad de individuos. Dicho patrón también es representativo de un nivel promedio de un biomarcador de miARN en una población de individuos. Un patrón de referencia también puede ser una colección de valores que representan cada uno el nivel de un biomarcador de miARN en un sujeto conocido en una población de individuos. En ciertas realizaciones, las muestras de prueba pueden compararse frente a dicha colección de valores a fin de inferir el estado de la enfermedad de Alzheimer de un sujeto. En ciertas realizaciones, el patrón de referencia es un valor absoluto. En dichas realizaciones, las muestras de prueba pueden compararse frente al valor absoluto a fin de inferir el estado de la enfermedad de Alzheimer de un sujeto. En una realización, se hace una comparación entre el nivel de uno o más miARN en una muestra en relación con un control adecuado ejecutando un algoritmo de clasificación informático. El experto puede idear fácilmente controles adecuados adicionales que pueden ser apropiados dependiendo del ensayo en cuestión. Los controles adecuados mencionados anteriormente son de ejemplo, y no se pretende que sean limitantes.

En general, un descenso en el nivel de uno o más de miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, miR-301a, y/o miR-545 en una muestra biológica procedente de un sujeto de prueba en relación con un control adecuado representativos del nivel de uno o más de miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, miR-301a, y/o miR-545, respectivamente, en un sujeto normal indicará que el sujeto de prueba tiene la enfermedad de Alzheimer. En los

casos en los que el control adecuado es representativo del nivel de los biomarcadores de miARN en un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer, en general, los niveles de uno o más de miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, miR-301a, y/o miR-545 comparables o inferiores a los de dicho control son indicativos de enfermedad de Alzheimer.

5 En algunos casos en los que los niveles de uno o más biomarcadores de miARN se determinan en un sujeto de prueba, puede haber un descenso en el nivel de uno o más de biomarcadores de miARN, y ningún cambio o un aumento en el nivel de uno o más biomarcadores de miARN adicionales, en relación con un control adecuado. En dichos casos, una diferencia en el nivel de uno o más de los biomarcadores de miARN en relación con un control adecuado representativos del nivel de los biomarcadores de miARN en un sujeto normal indica que el sujeto de  
10 prueba tiene la enfermedad de Alzheimer. La determinación de dicha diferencia puede asistirse mediante la ejecución de un algoritmo de clasificación informático, tal como se describe en el presente documento.

#### 4. Muestras biológicas

15 El nivel de uno o más biomarcadores de miARN puede determinarse en una muestra biológica procedente de un sujeto. Una muestra procedente de un sujeto es una que se origina a partir de un sujeto. Dicha muestra puede procesarse adicionalmente después de obtenerse del sujeto. Por ejemplo, puede aislarse ARN de una muestra. En este ejemplo, el ARN aislado de la muestra también es una muestra procedente de un sujeto. Una muestra biológica útil para determinar el nivel de uno o más biomarcadores de miARN puede obtenerse esencialmente a partir de  
20 cualquier fuente, ya que se ha comunicado expresión de miARN en células, tejidos y fluidos por todo el organismo. Sin embargo, en un aspecto de la invención, los niveles de uno o más biomarcadores indicativos de la enfermedad de Alzheimer pueden detectarse en una muestra obtenida de un sujeto de forma no invasiva. Los biomarcadores existentes para la enfermedad de Alzheimer (p. ej.,  $A\beta_{1-42}$ , p-tau, etc.) suelen medirse en una muestra procedente de líquido cefalorraquídeo (LCR) o de tejido cerebral. El LCR se obtiene más frecuentemente mediante punción lumbar, lo cual es un método doloroso asociado con factores de riesgo que incluyen hemorragia dentro del conducto  
25 raquídeo, cefalea por punción lumbar e infección. La detección de biomarcadores en muestras de tejido cerebral es actualmente inútil para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto vivo, y se usa principalmente para confirmar de forma póstuma un diagnóstico hecho por otros medios. Por consiguiente, se prefiere que la muestra se obtenga a partir de una fuente distinta del tejido cerebral. Los biomarcadores de miARN descritos en el presente documento son indicativos de la enfermedad de Alzheimer y pueden detectarse en muestras biológicas obtenidas de forma no invasiva.

En una realización preferida, la muestra biológica obtenida para determinar el nivel de uno o más biomarcadores de miARN es una muestra que contiene miARN circulantes, p. ej., miARN extracelulares. Los miARN extracelulares circulan libremente en una amplia gama de material biológico, incluyendo fluidos corporales, tales como fluidos del sistema circulatorio. p. ej., una muestra de sangre o una muestra de linfa, o de otro fluido corporal tal como LCR, orina o saliva. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la muestra biológica usada para determinar el nivel de uno o más biomarcadores de miARN es un fluido corporal, por ejemplo, sangre, fracciones de la misma, suero, plasma, orina, saliva, lágrimas, sudor, semen, secreciones vaginales, linfa, secreciones bronquiales, LCR, etc. En algunas  
40 realizaciones, la muestra es una muestra que se obtiene de forma no invasiva. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene a partir de un fluido corporal distinto del LCR.

Los miARN circulantes incluyen miARN en células (miARN celular), miARN extracelulares en microvesículas (miARN asociado a microvesículas) y miARN extracelulares que no están asociados con células o microvesículas (miARN extracelular no vesicular). En algunas realizaciones, la muestra biológica usada para determinar el nivel de uno o más biomarcadores de miARN (p. ej., una muestra que contiene miARN circulante) puede contener células. En otras realizaciones, la muestra biológica puede estar libre o sustancialmente libre de células (p. ej., una muestra de suero). La muestra puede estar, del mismo modo, libre o sustancialmente libre de microvesículas. Por ejemplo, una muestra que está libre o sustancialmente libre de microvesículas es una en la cual el contenido de microvesículas de la muestra es suficientemente bajo para evitar la interferencia con la capacidad para determinar de forma precisa el nivel de miARN no vesicular en la muestra. En algunas realizaciones, una muestra que contiene miARN circulantes, p. ej., miARN extracelulares, es una muestra procedente de sangre. Los ejemplos de muestra procedente de sangre incluyen, p. ej., una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, etc. En otras realizaciones, una muestra que contiene miARN circulantes es una muestra de linfa. También se encuentran miARN circulantes en  
50 orina y saliva y las muestras biológicas procedentes de estas fuentes son adecuadas del mismo modo para determinar el nivel de uno o más biomarcadores de miARN.

#### 5. Determinación del nivel de biomarcadores de miARN en una muestra

60 El nivel de uno o más biomarcadores de miARN en una muestra biológica puede determinarse mediante cualquier método adecuado. Puede usarse cualquier método fiable para medir el nivel o cantidad de miARN en una muestra. En general, puede detectarse y cuantificarse miARN de cualquier muestra (incluyendo fracciones de la misma), tal como muestras de ARN aislado mediante diversos métodos conocidos para el ARNm, que incluyen, por ejemplo, métodos basados en amplificación (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), amplificación en círculo rodante, etc.), métodos basados en hibridación (p. ej., matrices de hibridación (p. ej., micromatrices), análisis  
65

de NanoString, análisis de transferencia de Northern, amplificación de señal de ADN ramificado (ADNr) hibridación *in situ*, etc.), y métodos basados en secuenciación (p. ej. secuenciación de última generación, por ejemplo, usando las plataformas Illumina o IonTorrent). Otras técnicas de ejemplo incluyen ensayo de protección de ribonucleasa (EPR) y espectroscopía de masas.

5 En algunas realizaciones, el ARN se convierte en ADN (ADNc) antes del análisis. El ADNc puede generarse mediante transcripción inversa de miARN aislado usando técnicas convencionales. Los *kits* de transcripción inversa de miARN se conocen y están disponibles comercialmente. Los ejemplos de *kits* adecuados incluyen, pero no se limitan al *kit* de transcripción mirVana™ TaqMan® miRNA Transcription kit (Ambion, Austin, TX), y el *kit* de transcripción TaqMan® miRNA Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se conocen cebadores universales o cebadores específicos, incluyendo cebadores de tallo-bucle y están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Applied Biosystems. En algunas realizaciones, el miARN se amplifica antes de su medición. En otras realizaciones, el nivel de miARN se mide durante el método de amplificación. En otras realizaciones más, el nivel de miARN no se amplifica antes de su medición. Algunos métodos de ejemplo adecuados para determinar el nivel de miARN en una muestra se describen con detalle más adelante. Estos métodos se proporcionan únicamente a modo de ilustración, y será evidentes para un experto que pueden usarse del mismo modo otros métodos adecuados.

#### A. métodos basados en amplificación

20 Existen numerosos métodos basados en amplificación para detectar el nivel de secuencias de ácido nucleico de miARN, que incluyen, pero no se limitan a, PCR, RT-PCR, qPCR y amplificación en círculo rodante. Otras técnicas basadas en amplificación incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la ligasa, amplificación de sondas de ligamiento múltiple, transcripción *in vitro* (TIV), amplificación por desplazamiento de cadena (ADC), amplificación mediada por transcripción, amplificación de ARN (de Eberwine) y otros métodos conocidos para los expertos en la técnica.

30 Una reacción de PCR típica incluye múltiples etapas, o ciclos, que amplifican selectivamente especies de ácido nucleico diana: una etapa de desnaturalización, en la cual se desnaturaliza un ácido nucleico diana; una etapa de hibridación, en la cual un conjunto de cebadores (es decir, cebadores directo e inverso) hibridan con cadenas complementarias de ADN, y una etapa de elongación, en la cual una ADN polimerasa termoestable elonga los cebadores. Repitiendo estas etapas múltiples veces, un fragmento de ADN se amplifica para producir un amplicón, que corresponde a la secuencia diana. Las reacciones de PCR típicas incluyen 20 o más ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación. En muchos casos, las etapas de hibridación y elongación pueden realizarse de forma simultánea, en cuyo caso, el ciclo contiene solo dos etapas. Puede realizarse una reacción de transcripción inversa (que produce una secuencia de ADNc que tiene complementariedad con un miARN) antes de la amplificación por PCR. Las reacciones de transcripción inversa incluyen el uso de, p. ej., una ADN polimerasa basada en ARN (transcriptasa inversa) y un cebador.

40 Los *kits* para la PCR cuantitativa en tiempo real de miARN son conocidos y están disponibles comercialmente. Los ejemplos de *kits* adecuados incluyen, pero no se limitan a, TaqMan® miRNA Assay (Applied Biosystems) y mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection kit (Ambion). El miARN puede ligarse a un oligonucleótido monocatenario que contiene secuencias de cebador universal, una secuencia poliadenilada, o una secuencia adaptadora antes de la transcriptasa inversa y amplificarse usando un cebador complementario a la secuencia de cebador universal, cebador poli(T), o cebador que comprende una secuencia que es complementaria a la secuencia adaptadora.

45 En algunos casos, pueden desarrollarse ensayos de qRT-PCR a medida para la determinación de niveles de miARN. Los ensayos de qRT-PCR a medida para la determinación de niveles de miARN en una muestra biológica, p. ej., un fluido corporal, pueden desarrollarse usando, por ejemplo, métodos que implican un cebador de transcripción inversa extensa y PCR modificada de ácido nucleico bloqueado. Los ensayos a medida de miARN pueden comprobarse efectuando el ensayo en una serie de dilución de miARN sintetizados químicamente correspondientes a la secuencia diana. Esto permite la determinación del límite de detección y el intervalo de cuantificación lineal de cada ensayo. Además, cuando se usa una curva patrón, estos datos permiten una estimación de la abundancia absoluta de miARN medidos en muestras biológicas.

55 Las curvas de amplificación pueden comprobarse para verificar que los valores de Ct se evalúan en el intervalo lineal de cada gráfico de amplificación. Típicamente, el intervalo lineal abarca varios órdenes de magnitud. Para cada miARN candidato analizado, puede obtenerse una versión del miARN sintetizada químicamente y analizarse en una serie de dilución para determinar el límite de sensibilidad del ensayo, y el intervalo de cuantificación lineal. Pueden determinarse niveles de expresión relativos, por ejemplo, de acuerdo con el método del  $2(-\Delta\Delta C(T))$ , tal como describen Livak et al., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta C(T))$  Method. Methods (2001) dic; 25(4):402-8.

65 En algunas realizaciones, se amplifican dos o más miARN en un único volumen de reacción. Por ejemplo, la q-PCR múltiple, tal como la qRT-PCR, permite la amplificación y cuantificación simultánea de al menos dos miARN de interés en un volumen de reacción usando más de un par de cebadores y/o más de una sonda. Los pares de cebadores comprenden al menos un cebador de amplificación que se une específicamente a cada miARN, y las

sondas se marcan de forma que son distinguibles entre sí, permitiendo así la cuantificación simultánea de múltiples miARN.

La amplificación en círculo rodante es una reacción dirigida por ADN polimerasa que puede replicar sondas de oligonucleótido circularizadas con cinética bien lineal o bien geométrica en condiciones isotérmicas (véase, por ejemplo, Lizardi et al., *Nat. Gen.* (1998) 19(3):225-232; Gusev et al., *Am. J. Pathol.* (2001) 159(1):63-69; Nallur et al., *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(23):E118). En presencia de los dos cebadores, uno que hibrida con la cadena (+) de ADN, y otro que hibrida con la cadena (-), un patrón complejo de desplazamiento de cadena resulta en la generación de más de  $10^9$  copias de cada molécula de ADN en 90 minutos o menos. Pueden formarse copias de una molécula circular cerrada de ADN ligadas en tándem usando un cebador individual. El procedimiento también puede realizarse usando un ADN asociado a una matriz. El molde usado para la amplificación en círculo rodante puede someterse a transcripción inversa. Este método puede usarse como un indicador de alta sensibilidad de la secuencia y nivel de expresión del miARN a concentraciones de miARN muy bajas (véase, por ejemplo, Cheng et al., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* (2009) 48(18):3268-72; Neubacher et al., *Chembiochem.* (2009) 10(8):1289-91).

#### B. Métodos basados en hibridación

El miARN puede detectarse usando métodos basados en hibridación, que incluyen pero no se limitan a matrices de hibridación (p. ej., micromatrices), análisis de NanoString, análisis de transferencia de Northern, amplificación de señal de ADN ramificado (ADNr) e hibridación *in situ*.

Las micromatrices pueden usarse para medir los niveles de expresión de números grandes de miARN de forma simultánea. Las micromatrices pueden fabricarse usando una variedad de tecnologías, que incluyen impresión con punzones de punta fina sobre portaobjetos de vidrio, fotolitografía usando máscaras prefabricadas, fotolitografía usando dispositivos de espejos dinámicos, impresión con inyección de tinta, o electroquímica sobre matrices de microelectrodos. También son útiles las matrices de microfluidos de baja densidad TaqMan Low-Density Arrays, que están basadas en una matriz de reacciones de microfluidos de qRT-PCR, así como en métodos relacionados con qRT-PCR basada en microfluidos.

En un ejemplo de detección por micromatriz, se aplican diversos oligonucleótidos (p. ej., oligos 200+ C6 5' amino modificado) correspondientes a secuencias de miARN codificantes humanas a portaobjetos tridimensionales CodeLink (GE Health/Amersham Biosciences) a una concentración final de alrededor de 20  $\mu$ M y se procesan de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La primera cadena de ADNc sintetizada a partir de 20  $\mu$ g de ARN total purificado con TRIzol se marca con ddUTP biotinilado usando el *kit* de marcaje terminal Enzo BioArray End Labeling kit (Enzo Life Sciences Inc.). La hibridación, tinción y lavado pueden realizarse de acuerdo con un protocolo modificado Antisense Genome Array de Affymetrix.

El escáner Axon B-4000 y el programa informático Gene-Pix Pro 4.0 u otro programa informático adecuado pueden usarse para escanear imágenes. Las manchas no positivas tras la sustracción del fondo y los valores atípicos detectados con el procedimiento de ESD se eliminan. Los valores de intensidad de señal resultantes se normalizan con respecto a la mediana de los valores por chip y después se usan para obtener las medias geométricas y los errores típicos para cada miARN. Cada señal de miARN puede transformarse a log en base 2, y puede llevarse a cabo una prueba t de una muestra. Pueden realizarse hibridaciones independientes para cada muestra sobre chips con cada miARN aplicado múltiples veces para aumentar la consistencia de los datos.

Las micromatrices pueden usarse para la identificación del perfil de expresión de miARN en enfermedades. Por ejemplo, puede extraerse ARN de una muestra y, opcionalmente, los miARN se seleccionan por tamaño de entre el ARN total. Pueden unirse engarzadores de oligonucleótidos a los extremos 5' y 3' de los miARN y los productos de ligamiento resultantes se usan como moldes para una reacción de RT-PCR. El cebador de PCR de la cadena codificante puede tener un fluoróforo unido a su extremo 5', marcando así la cadena codificante del producto de PCR. Este producto de PCR se desnaturaliza y después se hibrida a la micromatriz. Un producto de PCR, denominado como el ácido nucleico diana que es complementario a la secuencia correspondiente de la sonda de captura del miARN de la micromatriz hibridará, por medio del apareamiento de bases, con la mancha a la cual se fijan las sondas de captura. Después las manchas generarán fluorescencia cuando se exciten usando un escáner de micromatrices con láser.

La intensidad de fluorescencia de cada mancha se evalúa después en cuanto al número de copias de un miARN particular, usando un número de controles positivos y negativos y métodos de normalización de los datos de la matriz, lo cual resultará en la evaluación del nivel de expresión de un miARN particular.

El ARN total que contiene el miARN extraído de una muestra de fluido corporal también puede usarse directamente sin selección por tamaño de los miARN. Por ejemplo, el ARN puede marcarse en 3' usando ARN ligasa de T4 y un engarzador corto de ARN marcado con fluoróforo. Los miARN marcados con fluoróforo complementarios a las secuencias correspondientes de las sondas de captura del miARN de la matriz hibridan, por medio del apareamiento de bases, con la mancha a la cual se fijan las sondas de captura. La intensidad de fluorescencia de cada mancha se evalúa después en cuanto al número de copias de un miARN particular, usando un número de controles positivos y

negativos y métodos de normalización de los datos de la matriz, lo cual resultará en la evaluación del nivel de expresión de un miARN particular.

5 Pueden emplearse varios tipos de micromatrices que incluyen pero no se limitan a, micromatrices de oligonucleótidos aplicados, micromatrices de oligonucleótidos prefabricadas o matrices de oligonucleótidos aplicados largos.

10 También pueden detectarse miARN sin amplificación usando el sistema nCounter Analysis System (NanoString Technologies, Seattle, WA). Esta tecnología emplea dos sondas a base de ácido nucleico que hibridan en solución (p. ej., una sonda indicadora y una sonda de captura). Tras la hibridación, se elimina el exceso de sondas, y los complejos sonda/diana se analizan de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los *kits* de ensayo nCounter de miARN están disponibles de NanoString Technologies, los cuales son capaces de distinguir entre miARN muy similares con gran especificidad.

15 Los miARN también pueden detectarse usando amplificación de señal de ADN ramificado (ADNr) (véase, por ejemplo, Urdea, Nature Biotechnology (1994), 12:926-928). Los ensayos para miARN basados en amplificación de señal de ADNr están disponibles comercialmente. Uno de dichos ensayos es el QuantiGene® 2.0 miRNA Assay (Affymetrix, Santa Clara, CA).

20 También pueden usarse transferencia de Northern e hibridación *in situ* para detectar miARN. En la técnica se conocen métodos adecuados para realizar la transferencia de Northern y la hibridación *in situ*.

#### C, Métodos basados en secuenciación

25 Pueden usarse del mismo modo métodos avanzados de secuenciación disponibles. Por ejemplo, pueden detectarse miARN usando Illumina® Next Generation Sequencing (p. ej., los métodos de secuenciación por síntesis o TruSeq, usando, por ejemplo, los sistemas HiSeq, HiScan, GenomeAnalyzer, o MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA)). También pueden detectarse miARN usando los sistemas Ion Torrent Sequencing (Ion Torrent Systems, Inc., Gulliford, CT), u otros métodos adecuados de secuenciación por semiconductores.

30

#### D. Herramientas adicionales de detección de miARN

35 Puede usarse espectroscopia de masas para cuantificar miARN usando cartografía con ARNasa. Los ARN aislados pueden digerirse enzimáticamente con endonucleasas de ARN (ARNasas) que tienen alta especificidad (p. ej., ARNasa de T1, que escinde en el lado 3' de todos los restos de guanosina no modificados) antes de su análisis mediante EM o estrategias de EM en tándem (EM/EM). La primera estrategia desarrollada utilizó la separación cromatográfica conectada de productos de digestión de endonucleasa mediante HPLC de fase inversa acoplada directamente a IEN-EM. La presencia de modificaciones postranscripcionales puede desvelarse mediante cambios de masa con respecto a los esperados basados en la secuencia de ARN. Los iones con valores anómalos de masa/carga pueden aislarse después para la secuenciación en tándem por EM para localizar la situación en la secuencia del nucleósido modificado postranscripcionalmente.

40

45 También se ha usado espectrometría de masas por desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés) (EM-MALDI), como una estrategia analítica para obtener información sobre los nucleósidos modificados postranscripcionalmente. Las estrategias basadas en MALDI pueden diferenciarse de las estrategias basadas en IEN por la etapa de separación. En EM-MALDI, se usa el espectrómetro de masas para separar el miARN.

50

50 Para analizar una cantidad limitada de miARN intactos, puede emplearse un sistema del CL capilar acoplado con nano EM-IEN, usando un espectrómetro de masas híbrido Orbitrap-de trampa iónica (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific) o un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar en tándem (QSTAR® XL, Applied Biosystems) equipado con una fuente de iones por nanopulverización hecha a medida, una válvula de nanovolumen (Valco Instruments), y un sistema de nano HPLC sin división ("splitless") (DiNa, KYA Technologies). El analito/TEAA se carga en una columna de captura de nano-CL, se desala, y después se concentra. Los miARN intactos se eluyen de la columna de captura y se inyectan directamente en una columna capilar Cl 8, y se someten a cromatografía mediante HPLC-RP (HPLC de fase inversa) usando un gradiente de disolventes de polaridad creciente. El eluyente cromatográfico se pulveriza desde una punta pulverizadora unida a la columna capilar, usando un voltaje de ionización que permite escanear los iones en el modo de polaridad negativa.

55

60 Los métodos adicionales para la detección y medición de miARN incluyen, por ejemplo, ensayo de invasión de cadena (Third Wave Technologies, Inc.), ensayo de resonancia de plasmón superficial (RPS), ADNc, ADNMT (ADN metálico; Advance Technologies, Saskatoon, SK), y métodos de moléculas individuales tales como el desarrollado por US Genomics. Pueden detectarse múltiples miARN en un formato de micromatriz usando una estrategia novedosa que combina una reacción enzimática superficial con la generación de imágenes por RPS (RPSI) amplificada por nanopartículas. La reacción superficial de las polimerasas de poli(A) crea colas de poli(A) en miARN hibridados sobre micromatrices de ácidos nucleicos bloqueados (ANB). Las nanopartículas modificadas por ADN se

65

adsorben después sobre las colas de poli(A) y se detectan mediante RPSI. Esta metodología ultrasensible de RPSI amplificada por nanopartículas puede usarse para la identificación del perfil de miARN a niveles atomolares.

#### E. Detección de miARN amplificados o no amplificados

En ciertas realizaciones, se usan marcadores, colorantes o sondas y/o cebadores marcados para detectar miARN amplificados o no amplificados. El experto en la materia reconocerá qué métodos de detección se basan apropiadamente en la sensibilidad del método de detección y la abundancia de la diana. Dependiendo de la sensibilidad del método de detección y de la abundancia de la diana, puede requerirse o no requerirse amplificación antes de la detección. Un experto en la técnica reconocerá los métodos de detección en los que se prefiere la amplificación del miARN.

La sonda o cebador puede incluir bases convencionales (A, T o U, G y C), o bases modificadas. Las bases modificadas incluyen, pero no se limitan a, las bases AEGIS (de Eragen Biosciences), que se han descrito, p. ej., en las patentes de EE.UU. n.º 5.432.272, 5.965.364, y 6.001.983. En ciertos aspectos, las bases se unen mediante un enlace fosfodiéster natural o una unión química diferente. Las uniones químicas incluyen, pero no se limitan a, un enlace peptídico o una unión a ácido nucleico bloqueado (ANB), que se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. n.º 7.060.809.

En un aspecto adicional, las sondas o cebadores de oligonucleótidos presentes en una reacción de amplificación son adecuadas para vigilar la cantidad de producto de amplificación producida como una función del tiempo. En ciertos aspectos, las sondas que tienen carácter monocatenario frente a bicatenario diferente se usan para detectar el ácido nucleico. Las sondas incluyen, pero no se limitan a, el ensayo de la 5'-exonucleasa (p. ej., TaqMan™ sondas (véase la patente de EE.UU. n.º 5.538.848), balizas moleculares de tallo-bucle (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. n.º 6.103.476 y 5.925.517), balizas moleculares sin tallo o lineales (véanse, p. ej., el documento WO 9921881, las patentes de EE.UU. n.º 6.485.901 y 6.649.349), balizas moleculares de ácido peptidonucleico (APN) (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. n.º 6.355.421 y 6.593.091), balizas moleculares de APN lineal (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 6.329.144), sondas no de FRET (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 6.150.097), sondas Sunrise™/AmplifluorB™ (véase p. ej., la patente de EE.UU. n.º 6.548.250), sondas de tallo-bucle y Scorpion™ bicatenarias (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 6.589.743), sondas de bucle abultado (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 6.590.091), sondas de pseudonudo (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 6.548.250), ciclicones (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 6.383.752), sonda MGB Eclipse™ (Epoch Biosciences), sondas de horquilla (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 6.596.490), sondas iluminadoras (light-up) de APM, sondas de inactivación anticebador (Li et al., Clin. Chem. 53:624-633 (2006)), sondas de nanopartículas autoensambladas, y sondas modificadas con ferroceno descritas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 6.485.901.

En ciertas realizaciones, uno o más de los cebadores en una amplificación puede incluir un marcador. En otras realizaciones adicionales, diferentes sondas o cebadores comprenden marcadores detectables que son distinguibles entre sí. En algunas realizaciones un ácido nucleico, tal como la sonda o el cebador, puede marcarse con dos o más marcadores distinguibles.

En algunos aspectos, un marcador se une a una o más sondas y tiene una o más de las siguientes propiedades: (i) proporciona una señal detectable; (ii) interacciona con un segundo marcador para modificar la señal detectable mediante el segundo marcador, p. ej., FRET (siglas en inglés de transferencia de energía de resonancia fluorescente, ); (iii) estabiliza la hibridación, p. ej., formación de cadenas dobles; y (iv) proporciona un miembro de un complejo de unión o conjunto de afinidad, p. ej., afinidad, antígeno-anticuerpo, complejos iónicos, hapteno-ligando (p. ej., biotina-avidina). En otros aspectos más, el uso de marcadores puede conseguirse usando cualquiera de un gran número de técnicas conocidas empleando marcadores, uniones, grupos de unión, reactivos, condiciones de reacción, y métodos de análisis y purificación conocidos.

Los miARN pueden detectarse mediante métodos directos o indirectos. En un método de detección directo, se detectan uno o más miARN mediante un marcador detectable que se une a una molécula de ácido nucleico. En dichos métodos, los miARN pueden marcarse antes de unirse a la sonda. Por lo tanto, la unión se detecta explorando el miARN marcado que está unido a la sonda. La sonda se une opcionalmente a una perla en el volumen de reacción.

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos se detectan mediante unión directa con una sonda marcada, y la sonda se detecta posteriormente. En una realización de la invención, los ácidos nucleicos, tales como miARN amplificados, se detectan usando microesferas FlexMAP Microspheres (Luminex) conjugadas con sondas para capturar los ácidos nucleicos deseados. Algunos métodos pueden implicar la detección con sondas de polinucleótidos modificados con marcadores fluorescentes o detección con ADN<sub>r</sub>, por ejemplo.

En otras realizaciones, los ácidos nucleicos se detectan mediante métodos de detección indirectos. Por ejemplo, puede combinarse una sonda biotinilada con un colorante conjugado con estreptavidina para detectar el ácido nucleico unido. La molécula de estreptavidina se une a un marcador de biotina sobre miARN amplificado, y el miARN unido se detecta detectando la molécula de colorante unida a la molécula de estreptavidina. En una realización, la

molécula de colorante conjugado con estreptavidina comprende Phycolink® Streptavidin R-Phycoerythrin (PROzyme). Los expertos en la técnica conocen otras moléculas de colorante conjugadas.

Los marcadores incluyen, pero no se limitan a: emisores de luz, dispersantes de luz, compuestos que absorben luz, los cuales generan o inactivan una señal fluorescente, quimioluminiscente o bioluminiscente detectable (véase, p. ej., Kricka, L., *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press, San Diego (1992) y Garman A., *Non-Radioactive Labeling*, Academic Press (1997)). En algunas realizaciones se usa una sonda fluorescente con marcaje doble que incluye un fluoróforo indicador y un fluoróforo inactivador. Se apreciará que se eligen pares de fluoróforos que tienen espectros de emisión distintos de modo que puedan distinguirse fácilmente.

En ciertas realizaciones, los marcadores son restos estabilizadores de la hibridación que sirven para potenciar, estabilizar, o influir sobre las cadenas dobles de hibridación, p. ej., intercalantes y colorantes de intercalación (incluyendo, pero sin limitarse a, bromuro de etidio y SYBR Green), agentes que se unen al surco menor, y grupos funcionales de reticulación (véase, p. ej., Blackburn et al., eds. "DNA and RNA Structure", en *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* (1996)).

En otras realizaciones, pueden usarse métodos que se basan en la hibridación y/o ligamiento para cuantificar miARN, que incluyen métodos de ligamiento de oligonucleótidos (OLA, por sus siglas en inglés) y métodos que permiten que una sonda distinguible que hibrida con la secuencia diana de ácido nucleico se separe de una sonda no unida. Como ejemplo, pueden usarse sondas de tipo HARP, tal como se desvela en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0078894, para medir la cantidad de miARN. En dichos métodos, tras la hibridación entre una sonda y el ácido nucleico diana, la sonda se modifica para distinguir la sonda hibridada de la sonda no hibridada. A partir de ahí, la sonda puede amplificarse o detectarse. En general, una región de inactivación de la sonda comprende un subgrupo de nucleótidos dentro de la región de hibridación diana de la sonda. Para reducir o evitar la amplificación o detección de una sonda HARP que no está hibridada con su ácido nucleico diana, y permitir, por tanto, la detección del ácido nucleico diana, se lleva a cabo una etapa de inactivación de la sonda tras la hibridación usando un agente que es capaz de distinguir entre una sonda HARP que está hibridada con su secuencia de ácido nucleico diana y la correspondiente sonda HARP no hibridada. El agente es capaz de inactivar o modificar la sonda HARP no hibridada de forma que no puede amplificarse.

También puede usarse una reacción de ligamiento de sonda para cuantificar miARN. En una técnica de amplificación de sonda dependiente de ligamiento múltiple (MLPA, por sus siglas en inglés) (Schouten et al., *Nucleic Acids Research* 30:e57 (2002)), pares de sondas que hibridan en posiciones inmediatamente adyacentes sobre el ácido nucleico diana, se ligan entre sí dirigidas por la presencia del ácido nucleico diana. En algunos aspectos, las sondas MLPA tienen sitios de unión de cebadores de PCR flanqueantes. Las sondas MLPA se amplifican de forma específica cuando se ligan, permitiendo así la detección y cuantificación de biomarcadores de miARN.

#### 6. Determinación del estado de la enfermedad de Alzheimer usando biomarcadores de miARN

Los biomarcadores de miARN descritos en el presente documento pueden usarse de forma individual o en combinación en pruebas diagnósticas para evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer de un sujeto. El estado de la enfermedad incluye la presencia de la enfermedad de Alzheimer. El estado de la enfermedad también puede incluir vigilar la evolución de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, vigilando el avance de la enfermedad. Basándose en el estado de la enfermedad de Alzheimer de un sujeto, pueden estar indicados procedimientos adicionales, que incluyen, por ejemplo, pruebas diagnósticas o procedimientos terapéuticos adicionales.

El poder de una prueba diagnóstica para predecir correctamente el estado de la enfermedad se usa habitualmente en cuanto a la precisión del ensayo, la sensibilidad del ensayo, la especificidad del ensayo, o el "área bajo la curva" (ABC), por ejemplo, el área bajo la curva de la característica operativa del receptor (COR). Tal como se usa en el presente documento, la precisión es la medida de la fracción de muestras mal clasificadas. La precisión puede calcularse como el número total de muestras clasificadas correctamente dividido por el número total de muestras, p. ej., en una población de prueba. La sensibilidad es una medida de los "verdaderos positivos" que se ha predicho que son positivos mediante una prueba, y puede calcularse como el número de muestras de enfermedad de Alzheimer identificadas correctamente dividido por el número total de muestras de enfermedad de Alzheimer. La especificidad es una medida de los "verdaderos negativos" que se ha predicho que son negativos mediante una prueba, y puede calcularse como el número de muestras normales identificadas correctamente dividido por el número total de muestras normales. El ABC es una medida del área bajo una curva de la característica operativa del receptor, que es un gráfico de la sensibilidad frente al índice de falsos positivos (1-especificidad). Cuanto mayor es el ABC, más poderoso es el valor predictivo de la prueba. Otras medidas útiles de la utilidad de una prueba incluyen el "valor predictivo positivo", que es el porcentaje de positivos reales que se analizan como positivos, y el "valor predictivo negativo", que es el porcentaje de negativos reales que se analizan como positivos. En una realización preferida, el nivel de uno o más biomarcadores de miARN en las muestras procedentes de sujetos que tienen diferentes estados de la enfermedad de Alzheimer muestran una diferencia estadísticamente significativa de al menos  $p \leq 0,05$ , p. ej.,  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,005$ ,  $p \leq 0,001$ , etc., en relación con los sujetos normales, determinada en relación con un control adecuado. En otra realización preferida, las pruebas diagnósticas que usan biomarcadores de miARN descritas en el presente documento de forma individual o en combinación muestran una precisión de al menos alrededor de un 75

%, p. ej., una precisión de al menos alrededor del 75 %, alrededor del 80 %, alrededor del 85 %, alrededor del 90 %, alrededor del 95 %, alrededor del 97 %, alrededor del 99 % o alrededor del 100 %. En otras realizaciones, las pruebas diagnósticas que usan biomarcadores de miARN descritas en el presente documento de forma individual o en combinación muestran una especificidad de al menos alrededor de un 75 %, p. ej., una especificidad de al menos alrededor del 75 %, alrededor del 80 %, alrededor del 85 %, alrededor del 90 %, alrededor del 95 %, alrededor del 97 %, alrededor del 99 % o alrededor del 100 %. En otras realizaciones, las pruebas diagnósticas que usan biomarcadores de miARN descritas en el presente documento de forma individual o en combinación muestran una sensibilidad de al menos alrededor de un 75 %, p. ej., una sensibilidad de al menos alrededor del 75 %, alrededor del 80 %, alrededor del 85 %, alrededor del 90 %, alrededor del 95 %, alrededor del 97 %, alrededor del 99 % o alrededor del 100 %. En otras realizaciones, las pruebas diagnósticas que usan biomarcadores de miARN descritas en el presente documento de forma individual o en combinación muestran una especificidad y sensibilidad de al menos alrededor de un 75 % cada una, p. ej., una especificidad y sensibilidad de al menos alrededor del 75 %, alrededor del 80 %, alrededor del 85 %, alrededor del 90 %, alrededor del 95 %, alrededor del 97 %, alrededor del 99 % o alrededor del 100 % (por ejemplo, una especificidad de al menos alrededor del 80 % y sensibilidad de al menos alrededor del 80 %, o, por ejemplo, una especificidad de al menos alrededor del 80 % y sensibilidad de al menos alrededor del 95 %.

Cada biomarcador enumerado en la tabla 2 está presente de forma diferencial en muestras biológicas procedentes de sujetos que tienen la enfermedad de Alzheimer en comparación con sujetos normales, y, por tanto, cada uno es útil de forma individual para facilitar la determinación de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto de prueba. Dicho método implica determinar el nivel de biomarcador en una muestra procedente del sujeto. Determinar el nivel de biomarcador en una muestra puede incluir medir, detectar o ensayar el nivel de biomarcador en la muestra usando cualquier método adecuado, por ejemplo, los métodos expuestos en el presente documento. Determinar el nivel de biomarcador en una muestra también puede incluir examinar los resultados de un ensayo que ha medido, detectado o ensayado el nivel de biomarcador en la muestra. El método también puede implicar comparar el nivel del biomarcador en una muestra con un control adecuado. Un cambio en el nivel del biomarcador con respecto al de un sujeto normal evaluado usando un control adecuado es indicativo del estado de la enfermedad de Alzheimer en el sujeto. Puede usarse una cantidad diagnóstica de un biomarcador que representa una cantidad de los biomarcadores por encima o por debajo de la cual se clasifica a un sujeto como que tiene un estado particular de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, si el biomarcador está regulado negativamente en muestras procedentes de un individuo que tiene la enfermedad de Alzheimer en comparación con un individuo normal, una cantidad medida por debajo del límite diagnóstico proporciona un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer. En general, los biomarcadores de miARN individuales de la tabla 2 están regulados negativamente en las muestras de enfermedad de Alzheimer en relación con las muestras obtenidas de individuos normales. Tal como está bien entendido en la técnica, el ajuste del límite diagnóstico particular usado en un ensayo permite ajustar la sensibilidad y/o especificidad del ensayo diagnóstico como se desee. El límite diagnóstico particular puede determinarse, por ejemplo, midiendo la cantidad del biomarcador en un número estadísticamente significativo de muestras de sujetos con diferentes estados de la enfermedad de Alzheimer, y estableciendo el límite en el nivel deseado de precisión, sensibilidad, y/o especificidad. En ciertas realizaciones, el límite diagnóstico puede determinarse con la ayuda de un algoritmo de clasificación, tal como se describe en el presente documento.

Por consiguiente, se proporcionan métodos para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, determinando el nivel de al menos un miARN en una muestra que contiene miARN circulante del sujeto, en el que una diferencia en el nivel del al menos un miARN frente al de un sujeto normal (determinada en relación con un control adecuado) es indicativa de enfermedad de Alzheimer en el sujeto. El al menos un miARN incluye preferentemente uno o más de miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, y Let-7d, y puede incluir opcionalmente miR-301a, miR-545, o miR-301a y miR-545. Por ejemplo, la presente invención proporciona un método de determinar el nivel de al menos un miARN en una muestra que contiene miARN circulante procedente del sujeto, en el que un descenso en el nivel del al menos un miARN en relación con un control es indicativo de enfermedad de Alzheimer en el sujeto.

Opcionalmente, el método puede incluir además proporcionar un diagnóstico de que el sujeto tiene o no tiene la enfermedad de Alzheimer basado en el nivel de al menos un miARN en la muestra. Además o de forma alternativa, el método puede comprender además correlacionar una diferencia en el nivel o niveles de al menos un miARN en relación con un control adecuado con un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en el sujeto. En algunas realizaciones, dicho diagnóstico puede proporcionarse directamente al sujeto, o puede proporcionarse a otra parte implicada en la atención al sujeto.

Aunque los biomarcador de miARN individuales son útiles en aplicaciones diagnósticas para la enfermedad de Alzheimer, tal como se muestra en el presente documento, una combinación de biomarcadores de miARN puede proporcionar mayor valor predictivo del estado de la enfermedad de Alzheimer que los biomarcadores de miARN cuando se usan solos. Específicamente, la detección de una pluralidad de biomarcadores de miARN puede incrementar la precisión, sensibilidad, y/o especificidad de una prueba diagnóstica. En las tablas 8A-8C se muestran biomarcadores y combinaciones de biomarcadores de miARN. Los biomarcadores y combinaciones de biomarcadores de miARN que muestran una precisión global del 75 % se muestran en las tablas 9A-9B. La invención incluye los biomarcadores y combinaciones de biomarcadores de miARN tal como se exponen en estas

tablas, y sus usos en los métodos y *kits* descritos en el presente documento.

Por consiguiente, se proporcionan métodos para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, determinando el nivel de dos o más miARN en una muestra que contiene miARN circulante del sujeto, en el que una diferencia en el nivel de los miARN frente al de un sujeto normal (determinada en relación con un control adecuado) es indicativa de enfermedad de Alzheimer en el sujeto. Los miARN incluyen preferentemente uno o más de miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, y Let-7d, y pueden incluir opcionalmente miR-301a, miR-545, o miR-301a y miR-545. Las combinaciones de ejemplo de dos o más biomarcadores de miARN incluyen, por ejemplo, miR-545, let7g, y miR-15b; miR-15b y miR-545; miR-301a, miR-545, let-7g y miR-15b; miR-191 y miR-15b; Let-7g y miR-15b; miR-191, miR-301a, y miR-545; miR-301a, let-7g, y miR-15b; y miR-191, miR-301a, miR-545, y miR-15b.

También se proporciona un método de diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto determinando los niveles de dos o más miARN en una muestra que contiene miARN circulante del sujeto, comparando los niveles de los dos o más miARN de la muestra con un conjunto de datos que representan los niveles de los mismos miARN presentes en sujetos normales y en sujetos que tienen la enfermedad de Alzheimer, y diagnosticar al sujeto como que tiene o no tiene la enfermedad de Alzheimer basándose en la comparación. En dicho método, el conjunto de datos sirve como un control adecuado o patrón de referencia para la comparación con la muestra del sujeto. La comparación de la muestra del sujeto con el conjunto de datos puede estar asistida mediante un algoritmo de clasificación, que computa si existe o no una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles colectivos de los dos o más miARN de la muestra y los niveles de los mismos miARN presentes en sujetos normales y en sujetos que tienen la enfermedad de Alzheimer.

#### 7. Generación de algoritmos de clasificación para cualificar el estado de la enfermedad de Alzheimer

En algunas realizaciones, los datos que se generen usando muestras tales como "muestras conocidas" pueden usarse después para "entrenar" un modelo de clasificación. Una "muestra conocida" es una muestra que se ha preclasificado, p. ej., se ha clasificado como procedente de un sujeto normal, o de un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer. Los datos que preceden de los espectros y se usan para formar el modelo de clasificación pueden denominarse como "un conjunto de datos de entrenamiento". Una vez entrenado, el modelo de clasificación puede reconocer patrones en datos procedentes de espectros generados usando muestras conocidas. El modelo de clasificación puede usarse después para clasificar las muestras desconocidas en clases. Esto puede ser útil, por ejemplo, para predecir si una muestra biológica particular se asocia con una cierta afección biológica (p. ej., enfermo frente a no enfermo).

En algunas realizaciones, los datos para el conjunto de datos de entrenamiento que se usa para formar el modelo de clasificación pueden obtenerse directamente a partir de PCR cuantitativa (por ejemplo, valores de Ct obtenidos usando el método  $\Delta\Delta Ct$ ), o a partir de identificación del patrón de expresión de alto rendimiento, tal como análisis de micromatriz (por ejemplo, recuentos totales o recuentos normalizados a partir de un ensayo de expresión de miARN, p. ej., el ensayo de expresión de miARN nCounter).

Los modelos de clasificación pueden formarse usando cualquier método de clasificación estadística (o de "aprendizaje") adecuado que intenta segregar cuerpos de datos en clases basadas en parámetros objetivos presentes en los datos. Los métodos de clasificación pueden ser bien supervisados o bien no supervisados. Se describen ejemplos de procesos de clasificación supervisados y no supervisados en Jain, "Statistical Pattern Recognition: A Review", IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. 22, n.º 1, enero de 2000.

En una clasificación supervisada, los datos de entrenamiento que contienen ejemplos de categorías conocidas se presentan a un mecanismo de aprendizaje, que aprende uno o más conjuntos de relaciones que definen cada una de las clases conocidas. Después pueden aplicarse nuevos datos al mecanismo de aprendizaje, que clasifica después los nuevos datos usando las relaciones aprendidas. Los ejemplos de procesos de clasificación supervisados incluyen procesos de regresión lineal (p. ej., regresión lineal múltiple (RLM), regresión de mínimos cuadrados parciales (RMCP) y regresión de componentes principales (RCP)), árboles de decisión binarios (p. ej., procesos de particionamiento recursivo tales como ACR -árboles de clasificación y regresión-), redes neurales artificiales como redes de retropropagación, análisis discriminantes (p. ej., clasificador bayesiano o análisis de Fischer), clasificadores logísticos, y clasificadores de vectores de soporte (máquinas de vectores de soporte).

En otras realizaciones, los modelos de clasificación que se crean pueden formarse usando métodos de aprendizaje no supervisados. La clasificación no supervisada intenta aprender clasificaciones basadas en similitudes en el conjunto de datos de entrenamiento, sin preclasificar los espectros a de los cuales procede el conjunto de datos de entrenamiento. Los métodos de aprendizaje no supervisados incluyen análisis de conglomerados. Un análisis de conglomerados intenta dividir los datos en "conglomerados" o grupos que idealmente deberían tener miembros que son muy similares entre sí, y muy diferentes a los miembros de otros grupos. La similitud se mide después usando cierta distancia métrica, que mide la distancia entre las unidades ("items") de datos, y agrupa las unidades de datos que están más cercanas entre sí. Las técnicas de agrupación incluyen el algoritmo de K-medias de MacQueen y el algoritmo del mapa autoorganizado de Kohonen.

Los algoritmos de aprendizaje indicados para su uso en la clasificación de la información biológica se describen, por ejemplo, en la publicación internacional de PCT n.º WO 01/31580 (Barn-Hill et al., "Methods and devices for identifying patterns in biological systems and methods of use thereof"), la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2002 0193950 A1 (Gavin et al., "Method or analyzing mass spectra"), la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003 0004402 A1 (Hitt et al., "Process for discriminating between biological states based on hidden patterns from biological data"), y la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003 0055615 A1 (Zhang y Zhang, "Systems and methods for processing biological expression data").

Los modelos de clasificación pueden formarse en y usarse en cualquier ordenador digital adecuado. Los ordenadores digitales adecuados incluyen micro, mini, o grandes ordenadores que usan cualquier sistema operativo convencional o especializado, tal como un sistema operativo basado en Unix, Windows™ o Linux™.

El(los) conjunto(s) de datos y los modelos de clasificación pueden materializarse mediante un código informático que se ejecuta o se usa por un ordenador digital. El código informático puede almacenarse en cualquier medio informático legible incluyendo discos, barras, cintas, etc., ópticos o magnéticos, y pueden escribirse en cualquier lenguaje de programación informático adecuado, incluyendo C, C++, Visual basic, etc.

Los algoritmos de aprendizaje que se describen anteriormente pueden usarse para desarrollar algoritmos de clasificación para biomarcadores de miARN para la enfermedad de Alzheimer. El algoritmo de clasificación puede, a su vez, usarse en pruebas diagnósticas proporcionando valores diagnósticos (p. ej., valores límite) para biomarcadores usados individualmente o en combinación.

#### 8. Pruebas diagnósticas adicionales

El nivel de biomarcadores de miARN indicativo de la enfermedad de Alzheimer puede usarse como un indicador diagnóstico independiente de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto. Opcionalmente, los métodos pueden incluir la realización de al menos una prueba adicional para facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, pueden realizarse otras pruebas además de determinar el nivel de uno o más biomarcadores de miARN con el fin de facilitar un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Puede usarse cualquier otra prueba o combinación de pruebas usadas en la práctica clínica para facilitar un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer junto con los biomarcadores de miARN descritos en el presente documento.

Por ejemplo, un clínico puede realizar pruebas del estado mental en un sujeto, además de determinar el nivel de uno o más biomarcadores de miARN en una muestra procedente de un sujeto. Dichas pruebas pueden incluir, pero no se limitan a, el mini examen del estado mental (MEEM), la prueba mini-cog, la prueba EEEA-cog y/o una prueba del dibujo del reloj. Estas pruebas se usan de forma rutinaria en la práctica clínica para facilitar un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Del mismo modo, pueden realizarse pruebas de generación de imágenes cerebrales en un sujeto, por ejemplo, una IRM o una exploración por TC). Estas pruebas se realizan principalmente para descartar otras afecciones que pueden causar síntomas similares a la enfermedad de Alzheimer, tales como tumores, ictus, o líquido en el cerebro.

Puede realizarse un examen neurológico en el sujeto, en el que se analizan condiciones del sujeto tales como los reflejos, la coordinación, la fuerza muscular, el movimiento ocular, el habla y/o la sensación.

También pueden explorarse factores genéticos del sujeto que indican que un sujeto puede tener un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Del mismo modo, puede explorarse en el sujeto la presencia, ausencia, o nivel de al menos uno u otro biomarcador indicativo de la enfermedad de Alzheimer.

#### 9. Métodos de tratamiento

En algunas realizaciones, cuando se diagnostica a un sujeto la enfermedad de Alzheimer mediante los métodos descritos en el presente documento, la presente invención proporciona además métodos para tratar a dichos sujetos en los que se ha identificado que tienen la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un método para tratar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, que comprende determinar el nivel de al menos un biomarcador de miARN en una muestra procedente de un sujeto, en el que una diferencia en el nivel del al menos un biomarcador de miARN frente al de un sujeto normal determinada en relación con un control adecuado es indicativa de enfermedad de Alzheimer en el sujeto y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico para el Alzheimer al sujeto. En otra realización, la invención se relaciona con un método para tratar a un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer, que comprende identificar a un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer en el cual el nivel de al menos un biomarcador de miARN en una muestra que contiene miARN circulante del sujeto es diferente (p. ej., menor) frente al del sujeto normal determinado en relación con un control adecuado, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico para el Alzheimer al sujeto.

La expresión "agente terapéutico para el Alzheimer" incluye, por ejemplo, sustancias aprobadas por la Administración de Medicamentos (FDA) de EE.UU. y Alimentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Dichas sustancias incluyen, por ejemplo, Razadyne® (galantamina), Exelon® (rivastigmina), y Aricept® (donepezilo). En una realización de ejemplo, el agente terapéutico para el Alzheimer es donepezilo o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo (p. ej., clorhidrato de donepezilo).

El agente terapéutico para el Alzheimer puede administrarse a un sujeto usando una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas adecuadas comprenden un agente terapéutico para el Alzheimer (o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo), y, opcionalmente, comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una composición farmacéutica que comprende galantamina, rivastigmina, donepezilo o una sal o éster farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores (p. ej., bromhidrato de galantamina, tartrato de rivastigmina, clorhidrato de donepezilo). En ciertas realizaciones, estas composiciones comprenden además opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica o similares excesiva, y son acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables de aminas, ácidos carboxílicos y otros tipos de compuestos son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S.M. Berge, *et al.* describen en detalle sales farmacéuticamente aceptables en *J. Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19 (1977). Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos de la invención, o por separado haciendo reaccionar una función básica libre o ácida libre con un reactivo adecuado. Por ejemplo, una función básica libre puede hacerse reaccionar con un ácido adecuado. Además, cuando los compuestos portan un resto ácido, y sales farmacéuticamente aceptable de los mismos pueden incluir sales metálicas tales como sales de metales alcalinos, p. ej., sales de sodio o de potasio; y sales de metales alcalinotérreos, p. ej., sales de calcio o de magnesio.

La expresión "éster farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a ésteres que se hidrolizan *in vivo* e incluyen aquellos que se rompen fácilmente en el organismo humano para dejar el compuesto precursor o una sal del mismo. Los grupos éster adecuados incluyen, por ejemplo, los procedentes de ácidos carboxílicos alifáticos farmacéuticamente aceptables, en particular ácidos alcanóicos, alquenóicos, cicloalcanóicos y alcanodióicos, en los que cada resto alquilo o alquenilo ventajosamente no tiene más de 6 átomos de carbono.

Tal como se describe anteriormente, las composiciones farmacéuticas pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término vehículo incluye a cualquiera y a todos los disolventes, diluyentes, u otros vehículos líquidos, ayudantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, adecuados para preparar la forma de dosificación particular deseada. Remington's *Pharmaceutical Sciences*, sexta edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) desvela diversos vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina, talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites tales como aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponadores tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógeno; suero salino isotónico; solución de Ringer; alcohol etílico, y soluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes atóxicos compatibles tales como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes pueden también estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador.

Las composiciones para su uso en la presente invención pueden formularse para tener cualquier concentración del agente terapéutico para el Alzheimer deseado. En realizaciones preferidas, la composición se formula de modo que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico para el Alzheimer.

#### 10. Kits para detectar biomarcadores de miARN

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits para diagnosticar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, kits que son útiles para determinar el nivel de uno o más de miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, miR-301a, y miR-545, y combinaciones de los mismos. En una realización, el uno o más miARN se seleccionan de entre el grupo que consiste en miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p. Los kits pueden incluir materiales y reactivos adaptados para detectar selectivamente la presencia de un miARN o grupo de miARN diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer en una muestra procedente de un sujeto. Por ejemplo, en una realización, el kit puede incluir un reactivo que hibrida de forma específica con un miARN. Dicho reactivo puede ser una molécula de ácido nucleico en una forma adecuada para detectar el miARN, por ejemplo, una sonda o un cebador. El kit puede incluir

reactivos útiles para realizar un ensayo para detectar uno o más miARN, por ejemplo, reactivos que pueden usarse para detectar uno o más miARN en una reacción de qPCR. El *kit* puede incluir del mismo modo una micromatriz útil para detectar uno o más miARN.

5 En una realización adicional, el *kit* puede contener instrucciones para parámetros de funcionamiento adecuados en forma de una etiqueta o de un prospecto. Por ejemplo, las instrucciones pueden incluir información o indicaciones en relación con cómo recoger una muestra, cómo determinar el nivel de uno o más biomarcadores de miARN en una muestra, o cómo correlacionar el nivel de uno o más biomarcadores de miARN en una muestra con el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto.

10 En otra realización, el *kit* puede contener uno o más envases con muestras de biomarcadores de miARN, para usar como patrones de referencia, controles adecuados, o para la calibración de un ensayo para detectar los biomarcadores de miARN en una muestra de prueba.

15 La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación y validación de biomarcadores de miARN candidatos

20 El objetivo de este estudio fue generar perfiles de miARN a partir de la fracción de plasma de sangre humana, y determinar si existen diferencias significativas en el contenido y el patrón de expresión de miARN entre pacientes diagnosticados de la enfermedad de Alzheimer (EA) y controles normales (CN).

25 Las muestras de plasma humano se adquirieron de PrecisionMed, Inc. (Solano Beach, CA-EE.UU.). La cohorte 1 contenía muestras de 11 pacientes con EA, 9 pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL), y 20 pacientes CN. La edad, sexo, diagnóstico, y puntuaciones del mini examen del estado mental (MEEM) de los pacientes de la cohorte 1 se proporcionan en la tabla 1. Se extrajeron ARN total de muestras de plasma (1 ml), y se añadieron miARN sintéticos de adición ("spike-in") (Ath-159a y Neg-A) para el control de la eficacia de la extracción y la normalización, tal como se describe más adelante.

30 Cada muestra se usó después para identificación del patrón de expresión de alto rendimiento usando el ensayo de expresión de miARN nCounter (Nanostring Technology, Seattle, WA-EE.UU.) por triplicado, tal como se describe más adelante. Tras la normalización posterior y corrección del fondo se determinó el promedio de los recuentos lineales finales para las muestras tanto de EA/DCL como de CN, y se determinaron los valores del factor de cambio. Se eligieron miARN candidatos que tuvieran al menos una diferencia de 1,5 veces entre los valores de expresión promedio de las muestras de EA/DCL y CN, y que tuvieran recuentos promedio normalizados >200. El miARN 106a (Hsa-miR-106a) se identificó como un control endógeno potencial que mostró una variación mínima a lo largo de todas las muestras de EA/DCL y CN.

35 Se identificaron 227 miARN que tuvieron al menos un recuento de expresión promedio >100 (considerado de expresión significativa sobre el fondo). De los 227 miARN, se identificaron 13 miARN que tuvieron al menos una diferencia de 1,5 veces, y tuvieron un promedio >200 de recuentos lineales normalizados (figuras 1A y 1B). Éstos incluyeron hsa-let-7d, hsa-let-7g, hsa-miR-15b, hsa-miR-126, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-191, hsa-miR-301a, hsa-miR-453, hsa-miR-545, hsa-miR-563, hsa-miR-600, hsa-miR-1274a y hsa-miR-1975.

40 Los biomarcadores de miARN candidatos identificados usando la plataforma de alto rendimiento Nanostring se validaron después usando el ensayo RT-qPCR TaqMan de miARN de tallo-bucle (Life Technologies). Se hizo una dilución 1:10 del ARN total para todas las muestras de la cohorte 1, y se realizó el ensayo TaqMan en cada muestra tal como se describe más adelante. Los valores de Ath-159a (de adición) y miR-106a (miARN endógeno) se usaron para normalizar los valores a lo largo de todas las muestras usando el método de análisis  $\Delta\Delta Ct$  (Life Technologies). De los 13 miARN analizados, no pudo confirmarse la presencia de 6. Estos incluyeron hsa-miR-126, hsa-miR-453, hsa-miR-563, hsa-miR-600, hsa-miR-1274a y hsa-miR-1975.

45 Los 7 miARN restantes (miR-191, miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, miR-301a y miR-545) mostraron una correlación muy fuerte entre los promedios de los factores de cambio registrados mediante Nanostring y mediante TaqMan (figura 2, tabla 3). Las secuencias y los números de acceso de miRBase de los miARN se proporcionan en la tabla 2. Por ejemplo, miR-191 estaba regulado negativamente en ~3,1 veces en las muestras de EA de acuerdo con el análisis Nanostring, mientras que se encontró que estaba regulado negativamente en ~3,7 veces mediante el análisis de TaqMan (véase la tabla 3). Esta estrecha tendencia se observó a lo largo de todos los miARN restantes (miR-15b, Let-7d, let-7g, miR-142-3p, miR-301a y miR-545). Todos los valores de factor de cambio tuvieron un valor de  $p < 0,005$ .

50 Es digno de atención que los miARN candidatos (excepto miR-126) que no pudieron confirmarse mediante el análisis de TaqMan tuvieron recuentos lineales normalizados (determinados mediante Nanostring) de menos de 500. Por otra parte, los recuentos promedio de cada uno de los miARN validados fueron superiores a 3.000. Esto sugiere que

ajustar un umbral mayor para los experimentos de Nanostring podría ser útil para reducir el número de candidatos falsos positivos.

#### 5 *Materiales y métodos*

##### 5 *Extracción de ARN total*

10 El ARN total se extrajo usando un protocolo mirVana PARIS modificado (Life Technologies; AM 1556) como se ha descrito (Mitchell, P.S. et al. PNAS. 2008 jul 29; 105(30):10513-8). Se añadió 1 ml de plasma humano a una cantidad equivalente de tampón desnaturante 2 x y después se adicionaron 10 µl de Ath-159a 0,05 µM y 40 pM de Neg-A (UUGUGCGAGCGGAAUGGAAU) (miARN sintéticos usados para la normalización y el control de la eficacia de la extracción). Se realizó extracción con fenol dos veces, y el ARN total se eluyó finalmente en 70 µl de agua siguiendo la recomendación del protocolo (AM1556).

##### 15 *Identificación del patrón de expresión de alto rendimiento de los miARN*

20 Se concentraron 45 µl de ARN total purificado hasta 9 µl y se usaron como molde para el ensayo de expresión de miARN nCounter (Nanostring Technology, Seattle, WA-EE.UU.). La preparación de la muestra se efectuó de la forma recomendada (Nanostring; C-0009-02) usando 3 µl de ARN total concentrado como cantidad de partida para todas las muestras por triplicado. Dado que la cantidad de ARN total recuperado no fue suficiente para detectarlo de forma fiable usando equipos basados en espectros convencionales tales como Nanodrop, se adoptó una estrategia de volumen equivalente en la que se usaron 3 µl de ARN total concentrado como material de partida para todos los ensayos basados en Nanostring (utilizada también en Mitchell, P.S. et al. PNAS. 2008 jul 29;105(30):10513-8). Las reacciones se prepararon para una hibridación de toda la noche durante 16 horas a 65 °C. Al día siguiente, las muestras se procesaron a través del puesto nCounter Prep Station (Nanostring Technology, Seattle, WA-EE.UU.). v.20081003) tal como recomienda el protocolo del fabricante, seguido de procesamiento a través del equipo nCounter Digital Analyzer (Nanostring Technology, Seattle, WA-EE.UU.). v.20081009). La resolución del analizador se ajustó a 600 CDV. Los datos se descargaron y se analizaron en Excel tal como se recomienda (guía para el análisis de datos de nCounter). Brevemente, los datos se normalizaron primero con respecto a la variación entre carriles usando los controles de ensayo positivos proporcionados. Esto se siguió de una normalización de la media global usando los recuentos de los miARN con expresión superior a 100. Después se comprobó cada valor normalizado para garantizar que fuera al menos 2 DT superior al promedio de la señal de fondo registrada para ese carril. Cualquier valor por debajo de ese se convirtió en cero. Los valores de factor de cambio se calcularon tomando el promedio de todos los valores de expresión en las muestras de EA/DCL y CN para los miARN individuales.

##### 35 *Validación de biomarcadores de miARN candidatos usando qPCR TaqMan*

40 Los biomarcadores de miARN candidatos identificados usando la plataforma de alto rendimiento Nanostring se validaron después usando el ensayo RT-qPCR TaqMan de miARN de tallo-bucle (Life Technologies). Brevemente, Se creó un grupo de cebadores de RT con cebadores de RT específicos de miARN (miR-301a, miR-1975, miR-191, miR-15b, miR-126, let-7g, Let-7d, miR-545, miR-1274, miR-142-3p, miR-600, miR-453, miR-563, miR-106a y ath-159a) a una concentración final de 0,05x en TE 1x. Los cebadores y sondas específicos de miARN se adquirieron de Life Technologies. Se preparó una reacción de RT de 15 µl que contenía 6 µl del grupo de cebadores de RT, 0,3 ml de dNTPS (100 mM), 3 µl de Multiscribe RT (50U/µl), 1,5 µl del tampón de transcripción inversa 10x y 0,2 ml de RNaseIn (20U/µl) y agua. Todos los componentes de la transcripción inversa estaban contenidos en el *kit* miRNA RT kit (Life Technologies; n.º 4366596). Se añadieron tres µl de ARN total (dilución 1:10) como molde para cada muestra y la reacción se incubó en hielo durante 5 min seguido de 30 min a 16 °C, 30 min a 42 °C, y 5 min at 85 °C para la inactivación de la enzima. La reacción se almacenó después a 4 °C. Después se creó un segundo grupo de cebadores de preamplificación con cada cebador y sonda de PCR (20x) para los mismos ensayos mezclados a una concentración final de 0,2x en TE 1x. Se preparó una reacción de preamplificación que contenía mezcla maestra de preamplificación 2x (Life Technologies; n.º 4391128), 3,75 µl del grupo de cebadores de preamplificación a medida y agua (ajustando el volumen de reacción a 22,5 µl). Después se añadieron 2,5 µl del producto de la RT y se sometió a ciclos a través del programa de preamplificación [95 °C durante 10 min, 55 °C durante 2 min, y 72 °C durante 2 min seguido de 12 ciclos de 95 °C durante 15 seg y 60 °C durante 4 min]. Esto se siguió de una incubación a 99,9 °C durante 10 min, y después la reacción se diluyó añadiendo 175 µl de TE 0,1x (pH 8,0) y se mezcló mediante inversión. Después se usaron dos µl del producto de preamplificación para las reacciones convencionales individuales de qPCR TaqMan (por duplicado) siguiendo el protocolo convencional ((Life Technologies; P/N 4364031-Rev D) en un equipo ABI7500. Los valores de Ct se calcularon ajustando un umbral manual de 0,2 y una línea basal automática para todas las reacciones en un único estudio (SDS 2,4, Life Technologies) para un análisis uniforme.

65 Se usó el método  $\Delta\Delta C_t$  (Life Technologies, véase también Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta C(T))$  Method. Methods. (2001) dic;25(4):402-8) para el análisis, usándose la media geométrica tanto de hsa-miR-106a como de ath-159a como control endógeno, y usándose los valores promedio de Ct relativos de los pacientes CN para calibrar todos los valores individuales. Después se calcularon los valores de factores de cambio lineal y se representaron en gráficos de dispersión usando

el programa Prism (GraphPad Prism Software, San Diego, CA-EE.UU.). (Nota: La validación de distintivo para la cohorte 2 (véase el ejemplo 2) se hizo exactamente como se describe anteriormente, pero los grupos de RT y preamplificación se prepararon usando únicamente cebadores específicos de distintivo y control de normalización (miR-301a, miR-191, miR-15b, let-7g, Let-7d, miR-545, miR-142-3p, miR-106a y ath-159a). Los cebadores y sondas específicos de miARN se adquirieron de Life Technologies, con los n.º de cat. 000464 (miR-142-3p), 001289 (miR-545), 000380 (let-7d), 000490 (miR-191), 000528 (miR-301a), 000383 (let-7g), 000390 (miR-15b), 000578 (miR-106a), y 000338 (ath-159a)).

#### Ejemplo 2: Generación de distintivos y construcción del modelo predictivo

Los miARN identificados y validados como que tenían una expresión significativamente diferente entre muestras de EA y CN en la cohorte 1 (factor de cambio  $>1,5$ , valor de  $p < 0,005$ ) se seleccionaron para la construcción del modelo predictivo. Los valores de expresión de 7 miARN (let-7d, miR-191, miR-301a, miR-545, let-7g, miR-15b, miR-142-3p) de cada una de las muestras de EA ( $n=11$ ) y CN ( $n=20$ ) de la cohorte 1 se usaron como entrada para un modelo de construcción de distintivos. En particular, se usaron los valores relativos de Ct (valores de Ct observados de miARN individuales menos la media geométrica de los valores de Ct de Ath-159a y miR-106a) para cada uno de los 7 miARN obtenidos a partir de la qPCR TaqMan de las muestras de la cohorte 1 para construir un clasificador lineal para separar las muestras de EA de las de CN (los valores de Ct relativos se muestran en la tabla 4). Se usaron todos los subgrupos no cero de los 7 miARN (127 distintivos) para el análisis discriminador lineal (ADL). Para el ADL, se usó el paquete informático MASS en la implementación de Windows de la versión R 2.12.2 (Venables, W. N. y Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Cuarta edición. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0). El código fuente del análisis está disponible en: <http://cran.r-project.org/web/packages/MASS/index.html>. Pueden usarse o desarrollarse otros paquetes informáticos adecuados. Los cifras del área bajo la curva (ABC) también se calcularon en R (versión 2.12.2) usando el paquete informático "verificación" (código fuente disponible en <http://cran.r-project.org/web/packages/verification/index.html>; véase también Mason, S.J. y N.E. Graham. "Areas beneath the relative operating characteristics (ROC) and relative operating levels (ROL) curves: Statistical significance and interpretation," *Q. J. R. Meteorol. Soc.* 30 (1982) 291-303). Pueden usarse o desarrollarse otros paquetes informáticos adecuados.

Más adelante se expone un código y una descripción de muestra de los archivos de entrada usados para calcular las cifras de precisión, sensibilidad, especificidad y ABC de la predicción. Este código muestra cómo clasificar muestras desconocidas como EA o normales usando un distintivo significativo de tres miARN ("miR-545", "let-7g", "miR-15b"). El código para realizar una clasificación basada en cualquier combinación de los 7 miARN validados sería similar, y debería entenderse que pueden usarse distintivos basados en cualquier combinación de estos 7 miARN. Podemos construir un modelo discriminante lineal para cualquier combinación o para un miARN individual seleccionado de entre los 7 miARN validados determinando los coeficientes del modelo de ADL. Una vez hemos determinado el modelo basado en la cohorte 1, podemos predecir para cualquier muestra nueva si el individuo a partir del cual se obtuvo la muestra es un individuo con EA, o un individuo normal. Para hacer una predicción para una muestra nueva necesitamos determinar los niveles de expresión de miARN para cualquier miARN individual del distintivo. Basándose en estos valores, el modelo devolverá la probabilidad ("a posteriori") de que la nueva muestra es de un individuo que tiene EA. El valor límite de esta probabilidad determina la sensibilidad y especificidad del modelo. Para nuestras predicciones, determinamos la precisión, sensibilidad y especificidad a un umbral de 0,5 (es decir, si la probabilidad de una muestra de ser de EA es mayor de 0,5, nuestro modelo la clasifica como EA).

Los archivos de entrada de ejemplo pueden estar en forma de train.txt, validation.txt, train\_an.txt y validation\_an.txt. "Train.txt" es el archivo que contiene el perfil de expresión para la cohorte 1 en forma de matriz, en la que las filas son las muestras y las columnas son los miARN. La primera fila contiene los nombres de los miARN y la primera columna los nombres de las muestras. El archivo "train\_an.txt" contiene la anotación de las muestras. Hay dos columnas, en las que la primera columna contiene el nombre de la muestra y la segunda columna la anotación de las muestras ("normal" y "AD" -EA en inglés- en este caso). Los archivos "validation.txt" y "validation\_an.txt" contienen los datos y anotaciones para la cohorte 2 exactamente en el mismo formato. Las variables prediction\$class y prediction\$posteriori contienen la anotación predicha y la probabilidad correspondiente de las muestras de la cohorte 2.

El código de ejemplo que puede usarse para calcular las cifras de precisión, sensibilidad, especificidad y ABC de la predicción es como sigue:

```

read.file <- function(file,inv)
{
  data.tmp=read.csv(file,sep="\t",header=T)
  mat <- matrix(0, nrow=nrow(data.tmp),
ncol=ncol((data.tmp))-1)
  rownames(mat)=data.tmp[,1]

colnames(mat)=colnames(data.tmp)[2:ncol(data.
tmp)]
  for(i in 1:nrow(data.tmp))
  {
    mat[i,]=as.numeric(data.tmp [i,2:
ncol(data.tmp)])
  }
  if(inv==T) {mat=t(mat) }
  mat
}
library(MASS)
library(verification)
train=read.file("train.txt",F)
validation=read.file("validation.txt",F)
train_an=read.table("train_an.txt")

validation_an=read.table("validation_an.txt")

validation_an=as.factor(validation_an[,1])
train_an=as.factor(train_an[,1])
obs=NULL
obs[validation_an=="normal"]=0
obs[validation_an=="AD"]=1
set=c("miR.545", "let.7g", "miR.15b")
train_sp=train[,set]
ldatrain=lda((train_sp),train_an)

validation_sp=validation[,set]
prediction=predict(ldatrain,validation_sp)
tb=table(validation_an,prediction$class)
nr=tb[1,1]+tb[2,2]
accuracy=nr/sum(tb)
sensitivity=tb[1,1]/(tb[1,1]+tb[1,2])
specificity=tb[2,2]/(tb[2,1]+tb[2,2])
auc=roc.area(obs,prediction$posteri[,1])$A

```

5 Para realizar una clasificación basada en cualquier combinación de los 7 miARN validados, puede usarse un código de muestra similar al que se muestra anteriormente. De forma alternativa, puede usarse otro código informático útil para la predicción, o para calcular la precisión, sensibilidad, especificidad y ABC de la predicción en lugar del código de muestra que se describe anteriormente.

10 Ejemplo 3: Los biomarcadores de miARN predicen el estado de los sujetos como normal o como que tiene la enfermedad de Alzheimer

15 El funcionamiento de un modelo predictivo usando todos los subgrupos no cero de los 7 miARN validados (let-7d, let-7g, miR-15b, miR-142-3p, miR-191, miR-301a y miR-545) tal como se describe en el ejemplo 2 se evaluó sobre la base de los resultados de la clasificación de las muestras de plasma humano de una segunda cohorte que contenía 20 pacientes con EA y 17 CN ("cohorte 2") obtenidos de PrecisionMed, Inc. La edad, sexo, diagnóstico, y puntuaciones del MEEM para los pacientes de la cohorte 2 se proporcionan en la tabla 5. El funcionamiento del modelo predictivo se evaluó sobre la base de las cifras de precisión, especificidad, sensibilidad y área bajo la curva (ABC).

20 La extracción de ARN total se llevó a cabo usando sólo 500 µl de plasma de cada muestra de la cohorte 2 tal como se describe en el ejemplo 1, seguida de análisis mediante RT-qPCR TaqMan. Conseguimos una correlación

significativa con los promedios de factor de cambio entre las dos cohortes para los distintivos de miARN que se replican muy cerca, y con valores de p excelentes (figura 3, tabla 6).

5 Los valores relativos de Ct (valores de Ct observados de miARN individuales menos la media geométrica de los valores de Ct de Ath-159a y miR-106a) para cada uno de los miARN candidatos (let-7d, let-7g, miR-15b, miR-142-3p, miR-191, miR-301a y miR-545) de cada una de las muestras de la cohorte 2 se usaron después como entrada (tabla 7) para el algoritmo de predicción de los distintivos de miARN, que se desarrolló sobre la base de los datos de la cohorte 1 tal como se describe anteriormente. Todos los distintivos potenciales se enumeran en la tabla 8. Los  
10 distintivos con una precisión >75 % se muestran en la tabla 9, mientras que los distintivos con una precisión >89 % se muestran en la tabla 10. La precisión global del distintivo se calculó como la fracción de muestras mal clasificadas (EA o CN). La sensibilidad caracteriza la capacidad de los modelos predictivos para identificar verdaderos positivos, la cual se calculó en este estudio como el número de muestras de EA identificadas correctamente dividido por el número total de muestras de EA. Por otra parte, la especificidad fue el número de muestras de CN clasificadas correctamente (verdaderos negativos) dividido por el número total de muestras de CN. El ABC se calculó como el área bajo la curva de la característica operativa del receptor (COR), que es un gráfico de la sensibilidad frente al índice de falsos positivos (1-especificidad). La curva COR se generó variando el umbral para la probabilidad de predicción.  
15

20 La combinación de miR-545, let-7g y miR-15b resultó en la mayor especificidad (94,1 %), sensibilidad (95 %) y ABC (0,953). Las combinaciones de distintivos oscilaron desde sólo dos miARN (p. ej., miR-15b y miR-545) hasta 7 miARN (p. ej. miR-191, miR-301a, miR-545, let-7g, Let-7d, miR-15b y miR-142-3p) (véanse las tablas 8A-8C). Cada distintivo tuvo diferentes combinaciones de los biomarcadores de miARN candidatos y resultó en una especificidad y sensibilidad variable (véanse las tablas 9A-9B). Además, también examinamos la precisión de distintivo para miARN individuales (tabla 11). La precisión de distintivo fue inferior para los miARN individuales en comparación con  
25 distintivos de combinación. Los mejores miARN independientes en cuanto a especificidad fueron miR-142-3p y miR-301a, teniendo ambos un 100 % de especificidad. Pero miR-142-3p tuvo mejor sensibilidad (65 %) en comparación con la sensibilidad del 25 % para miR-301a. Let-7g y miR-191 tuvieron la mejor sensibilidad al 95 %, pero sólo miR-191 tuvo una especificidad enriquecida del 76 %. miR-191, miR-15b y let-7d tuvieron la mejor precisión global de los  
30 miARN independientes.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para facilitar el diagnóstico del deterioro cognitivo debido a la enfermedad de Alzheimer o a deterioro cognitivo leve (DCL) en un sujeto, que comprende:
- 5 determinar el nivel de al menos un miARN en una muestra que contiene miARN circulante extracelular del sujeto, en el que la muestra no es líquido cefalorraquídeo (LCR), y en el que el al menos un miARN se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, y combinaciones de los mismos, en el que una diferencia en el nivel del al menos un miARN frente al de un sujeto normal determinada en relación con un control adecuado es indicativa de enfermedad de Alzheimer o DCL en el sujeto.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además proporcionar un diagnóstico de que el sujeto tiene o no tiene la enfermedad de Alzheimer o DCL basado en el nivel de al menos un miARN en la muestra, o que comprende además correlacionar una diferencia en el nivel o niveles de al menos un miARN en relación con un control adecuado con un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer o DCL en el sujeto.
- 15 3. Un método para facilitar el diagnóstico del deterioro cognitivo debido a la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que tiene una puntuación de MEEM de 0-26 o 21-26, que comprende:
- 20 determinar el nivel de al menos un miARN en una muestra que contiene miARN circulante extracelular del sujeto, en el que la muestra no es líquido cefalorraquídeo (LCR), y en el que el al menos un miARN se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, y combinaciones de los mismos, en el que una diferencia en el nivel del al menos un miARN frente al de un sujeto normal determinada en relación con un control adecuado es indicativa de deterioro cognitivo en el sujeto.
- 25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende determinar el nivel de;
- (i) uno o más miARN seleccionados de entre el grupo que consiste en miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d en la muestra, en el que la diferencia en el nivel del miARN frente al de un sujeto normal es un descenso, o
- 30 (ii) al menos dos miARN en la muestra, en la que dichos miARN se seleccionan de entre el grupo que consiste en miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g, Let-7d, y combinaciones de los mismos.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además determinar el nivel de al menos un miARN adicional en la muestra seleccionado del grupo que consiste en miR-301a; miR-545; y miR-301a y miR-545.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, que comprende determinar el nivel de al menos dos miARN en la muestra, o en el que los miARN son
- 40 a) miR-545, let7g, y miR-15b, o  
 b) miR-15b y miR-545, o  
 c) miR-301a, miR-545, let-7g y miR-15b, o  
 d) miR-191, miR-301a, y miR-545, o  
 e) miR-301a, let-7g, y miR-15b, o
- 45 f) miR-191, miR-301a, miR-545, y miR-15b.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el miARN es miR-191 y miR-15b, o el miARN es Let-7g y miR-15b.
- 50 8. El método de la reivindicación 4 o 5, que comprende:
- (i) determinar los niveles de dos o más miARN en una muestra que contiene miARN circulante del sujeto, en el que los miARN se seleccionan del grupo que consiste en
- 55 (a) miR-545, let7g, y miR-15b,  
 (b) miR-15b y miR-545,  
 (c) miR-301a, miR-545, let-7g y miR-15b,  
 (d) miR-191 y miR-15b,  
 (e) Let-7g y miR-15b,
- 60 (f) miR-191, miR-301a, y miR-545,  
 (g) miR-301a, let-7g, y miR-15b, y  
 (h) miR-191, miR-301a, miR-545, y miR-15b;
- 65 (ii) comparar los niveles de los dos o más miARN de la muestra con un conjunto de datos que representan los niveles de los mismos miARN presentes en sujetos normales y sujetos que tienen la enfermedad de Alzheimer; y

(iii) diagnosticar al sujeto como que tiene o no tiene la enfermedad de Alzheimer basándose en la comparación que se hace en la etapa (ii).

5 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra se selecciona de entre grupo que consiste en sangre, linfa, orina, y saliva, o en el que la muestra es una muestra acelular, o en el que la muestra es plasma, o suero, o una muestra sin microvesículas.

10 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la muestra es una muestra de plasma.

15 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además realizar al menos una prueba adicional para facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, opcionalmente en el que la prueba adicional se selecciona de entre el grupo que consiste en el mini examen del estado mental (MEEM), la prueba mini-cog, la prueba EEEA-cog y la prueba del dibujo del reloj, o en el que la prueba adicional comprende detectar al menos un biomarcador adicional para la enfermedad de Alzheimer.

20 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico para el Alzheimer o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente, en el que el agente terapéutico para el Alzheimer se selecciona del grupo que consiste en galantamina, rivastigmina y donepezilo.

25 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nivel de un miARN se detecta usando un agente que hibrida de forma específica con el miARN o en el que el nivel de un miARN se detecta usando métodos de amplificación, hibridación y/o secuenciación (p. ej, PCR cuantitativa).

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la diferencia en el nivel de al menos un miARN en relación con un control adecuado se determina ejecutando un algoritmo de clasificación informático.

30 15. Un *kit* para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, que consiste en:

35 (i) agentes de detectan selectivamente la presencia de miR-191, miR-15b, miR-142-3p, Let-7g y Let-7d en una muestra, que contiene miARN circulantes extracelulares de un sujeto, en el que la muestra no es líquido cefalorraquídeo (LCR), y

(ii) instrucciones para determinar el nivel de dicho al menos un miARN, en el que una diferencia en el nivel del al menos un miARN frente al de un sujeto normal determinada en relación con un control adecuado es indicativa de enfermedad de Alzheimer en el sujeto,

40 que opcionalmente comprende además un agente que detecta selectivamente la presencia de al menos un miARN adicional en la muestra, en la que el miARN adicional se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-301a; miR-545; y miR-301a y miR-545 y/o en el que el agente hibrida específicamente con el miARN, y/o en el que la muestra procede de sangre, opcionalmente en el que la muestra es una muestra acelular, opcionalmente en el que la muestra es una muestra sin microvesículas y/o en el que la diferencia en el nivel de al menos un miARN en relación con un control adecuado se determina ejecutando un algoritmo de clasificación informático y/o en el que la  
45 diferencia en el nivel del miARN frente al de un sujeto normal es un descenso, y/o en el que el sujeto es un mamífero, opcionalmente en el que el sujeto es un ser humano.

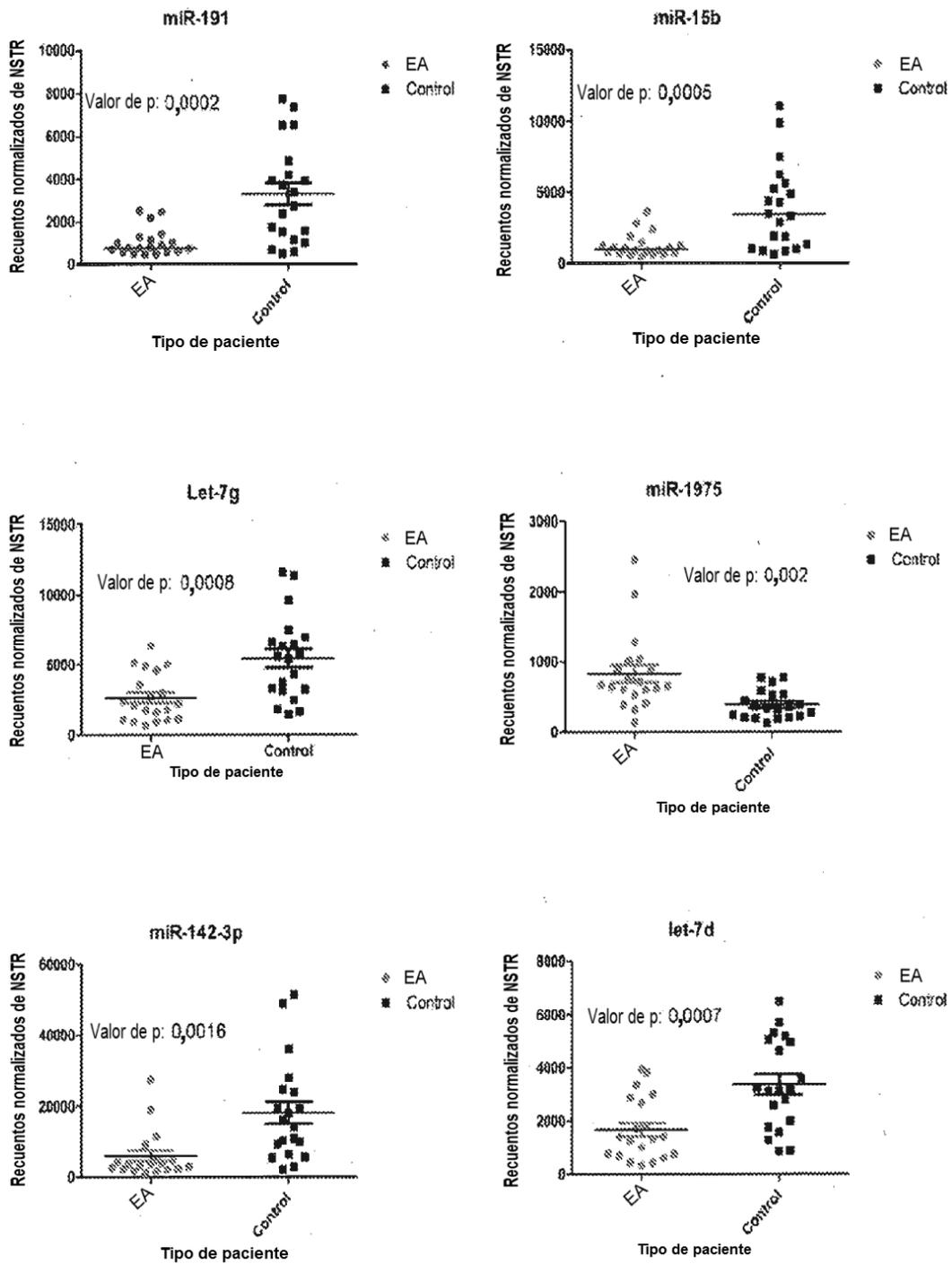


Figura 1A: Gráficos de dispersión de valores individuales de miARN tras la normalización con respecto a 20 pacientes con (EA+DCL) y 20 de control (cohorte 1) usando Nanostring.

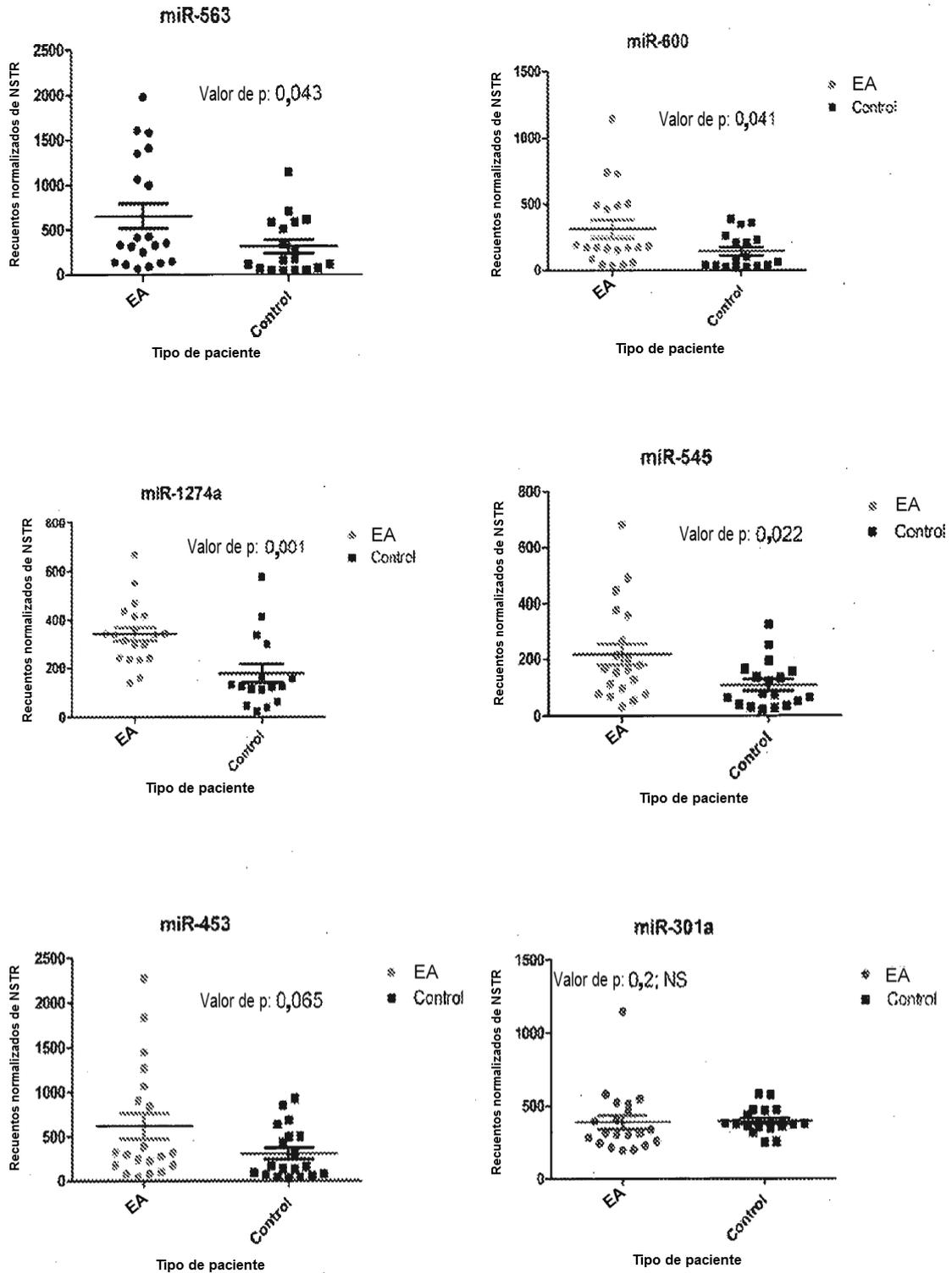
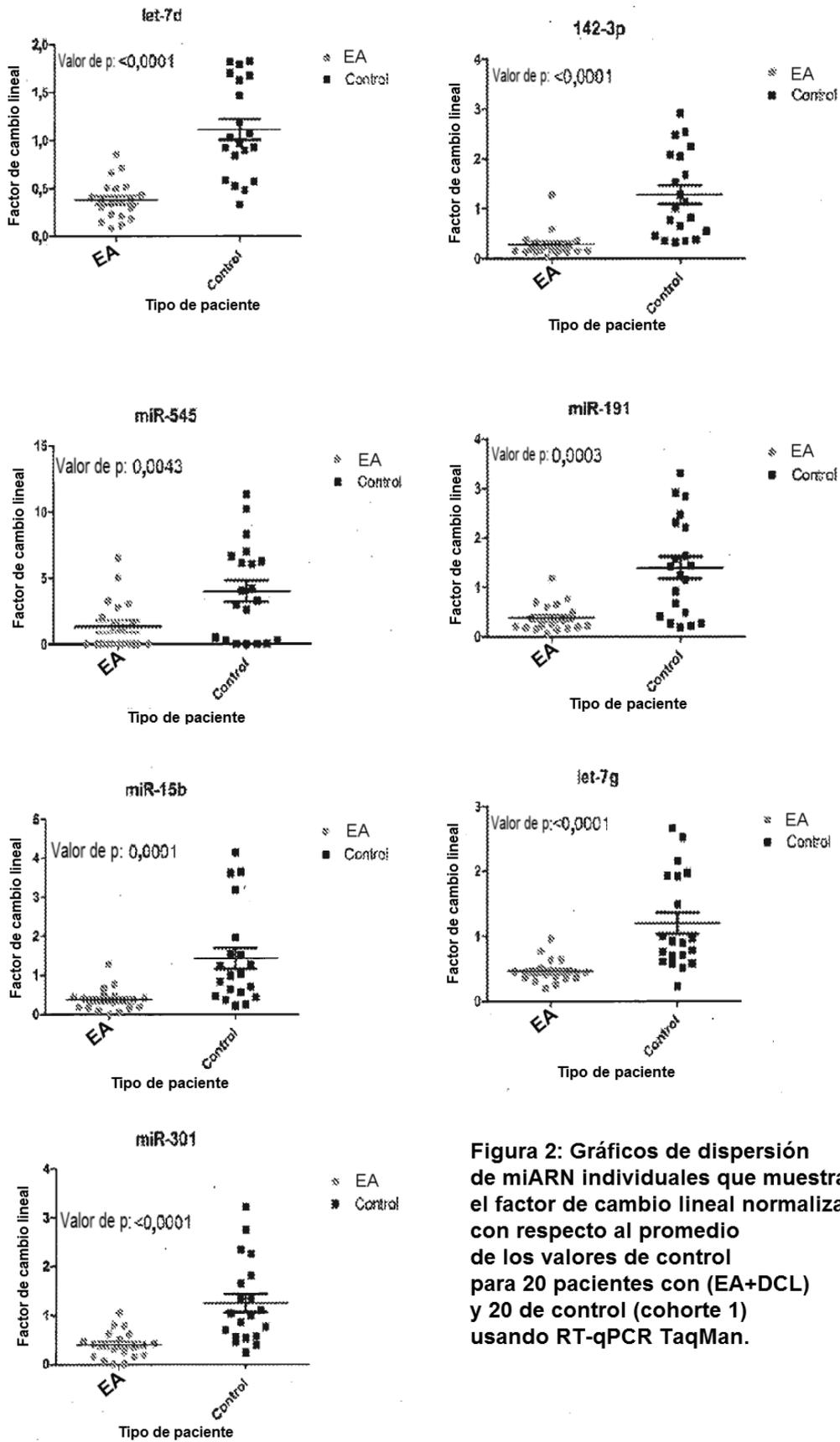
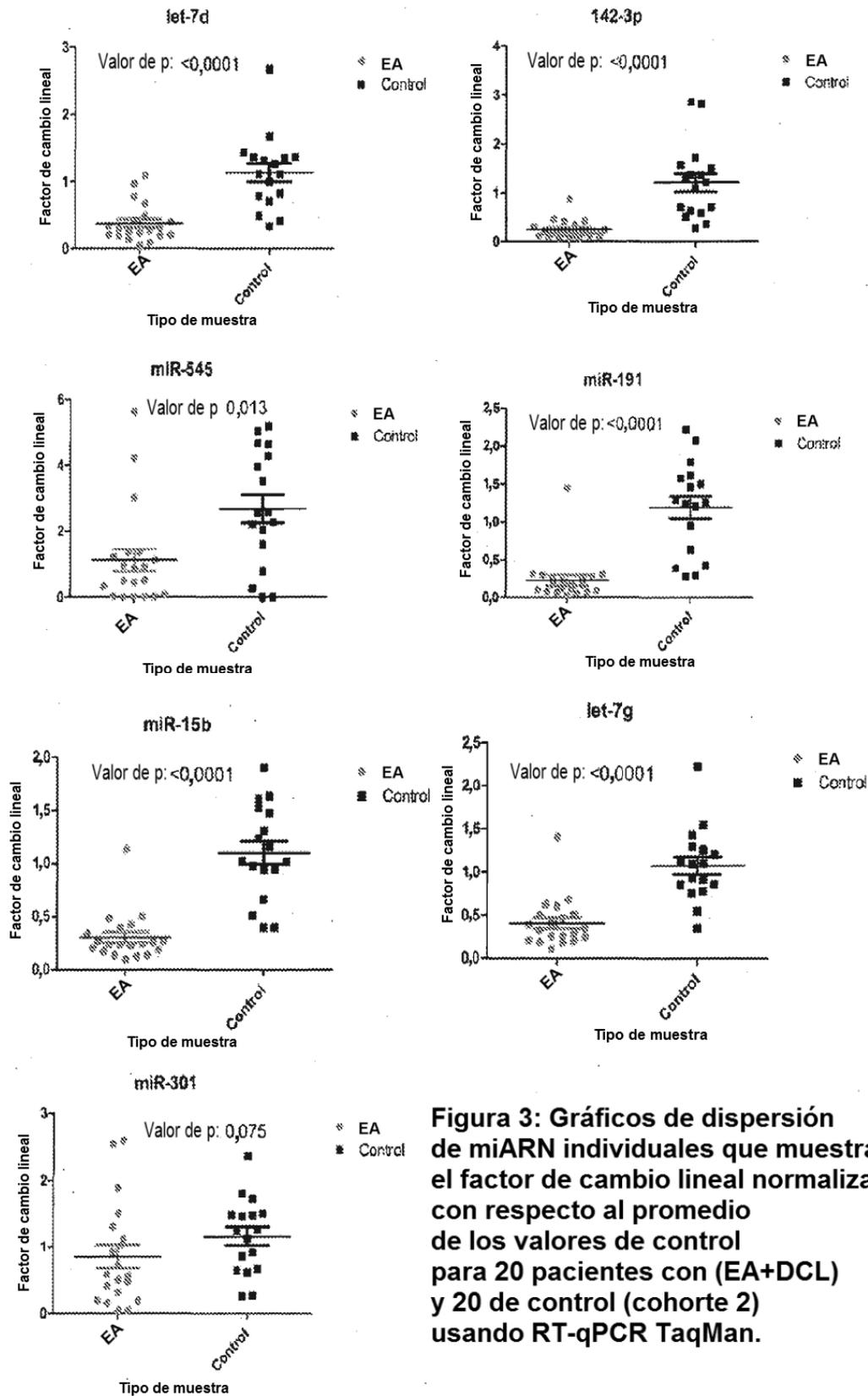


Figura 1B: Gráficos de dispersión de valores individuales de miARN tras la normalización con respecto a 20 pacientes con (EA+DCL) y 20 de control (cohorte 1) usando Nanostring.



**Figura 2: Gráficos de dispersión de miARN individuales que muestran el factor de cambio lineal normalizado con respecto al promedio de los valores de control para 20 pacientes con (EA+DCL) y 20 de control (cohorte 1) usando RT-qPCR TaqMan.**



**Figura 3: Gráficos de dispersión de miARN individuales que muestran el factor de cambio lineal normalizado con respecto al promedio de los valores de control para 20 pacientes con (EA+DCL) y 20 de control (cohorte 2) usando RT-qPCR TaqMan.**

Tabla 1: Muestras de pacientes de la cohorte 1

ID de muestra	Diagnóstico	MEEM	Visita	Edad	Sexo
1	Enfermedad de Alzheimer (EA)	17	Visita 3	83	V
2	Enfermedad de Alzheimer (EA)	17	Visita 3	80	V
3	Enfermedad de Alzheimer (EA)	22	Visita 3	91	V
4	Enfermedad de Alzheimer (EA)	16	Visita 3	78	M
5	Enfermedad de Alzheimer (EA)	23	Visita 2	74	V
6	Deterioro cognitivo leve (DCL)	23	Visita 1	82	M
7	Deterioro cognitivo leve (DCL)	23	Visita 2	80	M
8	Deterioro cognitivo leve (DCL)	27	Visita 2	79	M
9	Enfermedad de Alzheimer (EA)	24	Visita 2	88	V
10	Enfermedad de Alzheimer (EA)	18	Visita 2	76	M
11	Deterioro cognitivo leve (DCL)	26	Visita 1	63	M
12	Enfermedad de Alzheimer (EA)	14	Visita 2	78	M
13	Deterioro cognitivo leve (DCL)	23	Visita 2	79	M
14	Enfermedad de Alzheimer (EA)	15	Visita 2	74	V
15	Deterioro cognitivo leve (DCL)	25	Visita 1	80	V
16	Deterioro cognitivo leve (DCL)	26	Visita 1	74	M
17	Deterioro cognitivo leve (DCL)	26	Visita 1	84	V
18	Deterioro cognitivo leve (DCL)	23	Visita 1	76	V
19	Enfermedad de Alzheimer (EA)	15	Visita 2	72	M
20	Enfermedad de Alzheimer (EA)	16	Visita 2	82	M
21	Control normal (CN)	30	Visita 4	60	M
22	Control normal (CN)	30	Visita 3	71	V
23	Control normal (CN)	27	Visita 4	60	V
24	Control normal (CN)	30,0	Visita 2	63	M
25	Control normal (CN)	30,0	Visita 4	68	M
26	Control normal (CN)	30,0	Visita 1	60	V
27	Control normal (CN)	30,0	Visita 4	64	V
28	Control normal (CN)	27,0	Visita 4	77	V
29	Control normal (CN)	30,0	Visita 2	69	V
30	Control normal (CN)	30,0	Visita 2	60	M
31	Control normal (CN)	30,0	Visita 1	72	V
32	Control normal (CN)	30,0	Visita 1	66	M
33	Control normal (CN)	30,0	Visita 3	71	V
34	Control normal (CN)	29,0	Visita 2	60	M
35	Control normal (CN)	30,0	Visita 2	61	V
36	Control normal (CN)	30,0	Visita 2	69	V
37	Control normal (CN)	30,0	Visita 2	74	M
38	Control normal (CN)	30,0	Visita 1	71	M
39	Control normal (CN)	27,0	Visita 1	63	V
40	Control normal (CN)	30,0	Visita 1	74	M

Tabla 2: Secuencias y números de acceso de los miARN

<b>Nombre del miARN</b>	<b>N.º de miRBASE</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Clasificación</b>
hsa-miR-142-3p	MIMAT0000434	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA	Biomarcadores
hsa-miR-545	MIMAT0003165	UCAGCAAACAUUUUAUUGUGUGC	Biomarcadores
hsa-let-7d	MIMAT0000065	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	Biomarcadores
hsa-miR-191	MIMAT0000440	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	Biomarcadores
hsa-miR-301a	MIMAT0000688	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAGC	Biomarcadores
hsa-let-7g	MIMAT0000414	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	Biomarcadores
hsa-miR15b	MIMAT0000417	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	Biomarcadores
Hsa-miR106a	MIMAT0000103	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	Normalización endógena
ath-159a	MIMAT0000177	UUUGGAUUGAAGGGAGCUGUA	Adición para la normalización/CC

Tabla 3: Correlación del promedio del factor de cambio para los biomarcadores de miARN candidatos entre las plataformas Nanostring y TaqMan para las muestras de la cohorte 1 (20 EA o DCL y 20 de control)

Nombre del miARN	Factor de cambio (EA o DCL/Control)		
	Nanostring	TaqMan individual (validación)	Valor de p (validación de TaqMan)
miR-191	0,316	<b>0,27</b>	0,0003
miR-15b	0,324	<b>0,26</b>	0,0001
Let-7g	0,487	<b>0,39</b>	<0,0001
miR-1975	2,1	<b>ND</b>	-
miR-142-3p	0,330	<b>0,22</b>	<0,0001
Let-7d	0,498	<b>0,34</b>	<0,0001
miR-563	2,0	<b>ND</b>	-
miR-600	2,15	<b>ND</b>	-
miR-1274a	2,0	<b>ND</b>	-
miR-545	2,0	<b>0,34</b>	0,0043
miR-453	2,0	<b>ND</b>	-
miR-301a	0,98	<b>0,32</b>	<0,0001
miR-126	0,5	<b>ND</b>	-

Tabla 4: Valores relativos de Ct procedentes de qPCR Taq-Man usando muestras de la cohorte 1 (11 EA y 20 CN)

ID de muestra	Diagnóstico	let-7d	miR-142-3p	miR-545	miR-191	miR-15b	let-7g	miR-301a
1	Enfermedad de Alzheimer (EA)	8,540791	2,01874076	10,40079	0,363541	6,102791	3,080041	7,398741
2	Enfermedad de Alzheimer (EA)	8,937076	3,85737609	11,25863	1,114926	7,078176	3,666526	8,732426
3	Enfermedad de Alzheimer (EA)	9,023966	3,13166583	11,1 1847	0,977966	6,820116	3,666466	7,797966
4	Enfermedad de Alzheimer (EA)	8,654064	3,79946354	11,68221	1,624964	7,634964	3,380114	8,619664
5	Enfermedad de Alzheimer (EA)	9,792846	4,80644563	22,07135	2,925596	8,910896	4,545396	9,141346
9	Enfermedad de Alzheimer (EA)	10,48618	5,06017738	20,62383	3,207077	8,149977	4,396227	8,960277
10	Enfermedad de Alzheimer (EA)	11,15515	7,64369649	20,1158	4,643996	11,05585	4,961646	20,1158
12	Enfermedad de Alzheimer (EA)	9,416403	4,72435258	12,09635	2,262453	7,971353	4,289153	8,752953
14	Enfermedad de Alzheimer (EA)	9,344	4,6593001	11,0176	2,2575	8,91005	4,0972	8,44855
19	Enfermedad de Alzheimer (EA)	11,605	5,29145381	20,56	3,048704	9,079354	4,128504	9,454554
20	Enfermedad de Alzheimer (EA)	10,2997	5,17454576	19,2392	3,316046	8,943146	4,184996	19,2392
21	Normal	7,273151	1,32550086	10,12855	-0,9376	4,593301	1,636051	6,252251
22	Normal	8,078551	2,02195104	11,3447	0,394351	5,821251	3,063451	7,484751
23	Normal	7,939583	1,34528261	10,10233	-0,05252	7,694383	5,124883	8,397333
24	Normal	7,487848	1,76844769	9,922598	-0,1038	5,837348	2,445198	6,760498
25	Normal	8,155692	2,19514238	10,71304	0,076742	6,152942	3,517942	7,052242
26	Normal	8,142765	2,65471547	11,00932	0,722665	6,426765	3,360265	7,357215
27	Normal	7,171389	1,20833879	9,993589	-0,90111	4,602389	1,912039	6,311339
28	Normal	7,177904	1,07655392	10,07705	-1,117	4,405304	1,608854	5,801854
29	Normal	8,202322	2,35257153	9,674122	0,098522	6,103872	3,173272	7,053222
30	Normal	7,29832	0,83892007	9,37852	-0,60273	4,78577	2,03822	7,88337
31	Normal	7,785341	2,75779064	13,70764	0,297941	6,460341	3,131991	7,424641
32	Normal	8,846498	4,02119775	18,1417	2,786098	7,889448-	3,975748	8,281548
33	Normal	7,998234	3,52878449	10,65888	1,656234	7,126034	3,020084	8,020384
34	Normal	8,962006	3,79490644	14,42796	2,494706	8,515456	3,729506	8,306006
35	Normal	8,288766	3,91951614	20,72537	2,491266	8,714366	3,813466	9,563516
36	Normal	7,337816	1,63681634	11,15697	-0,54093	5,485716	2,079266	6,623316
37	Normal	9,629814	3,90871352	19,87646	3,008464	7,576264	3,809114	8,826014
38	Normal	9,100729	3,00967889	14,51308	1,160629	6,719479	3,409629	7,697779
39	Normal	7,202229	1,04167868	9,225629	-0,69757	6,967829	2,073929	6,024629
40	Normal	8,798427	3,25992712	19,86573	1,904427	7,270777	3,539177	8,613227

Tabla 5: Muestras de pacientes de la cohorte 2

ID de muestra	Diagnóstico	MEEM	Visita	Edad	Sexo
1	Enfermedad de Alzheimer (EA)	14	1	78	M
2	Enfermedad de Alzheimer (EA)	15	1	76	V
3	Enfermedad de Alzheimer (EA)	17	2	75	V
4	Enfermedad de Alzheimer (EA)	13	2	76	M
5	Enfermedad de Alzheimer (EA)	22	2	61	V
6	Enfermedad de Alzheimer (EA)	18	2	70	M
7	Enfermedad de Alzheimer (EA)	9	2	77	M
8	Enfermedad de Alzheimer (EA)	21	1	66	M
9	Enfermedad de Alzheimer (EA)	18	2	67	M
10	Enfermedad de Alzheimer (EA)	15	1	70	M
11	Enfermedad de Alzheimer (EA)	6	2	71	M
12	Enfermedad de Alzheimer (EA)	18	2	74	V
13	Enfermedad de Alzheimer (EA)	17	1	72	V
14	Enfermedad de Alzheimer (EA)	18	1	69	M
15	Enfermedad de Alzheimer (EA)	18	1	76	V
16	Enfermedad de Alzheimer (EA)	15	1	62	V
17	Enfermedad de Alzheimer (EA)	20	1	63	V
18	Enfermedad de Alzheimer (EA)	22	1	59	M
19	Enfermedad de Alzheimer (EA)	18	1	62	V
20	Control normal (CN)	30	2	62	V
21	Control normal (CN)	30	2	63	M
22	Control normal (CN)	30	2	66	V
23	Control normal (CN)	30	2	64	M
24	Control normal (CN)	29	2	62	M
25	Control normal (CN)	30	2	75	M
26	Control normal (CN)	24	2	75	V
27	Control normal (CN)	30	2	63	M
28	Control normal (CN)	30	2	60	M
29	Control normal (CN)	30	2	69	V
30	Control normal (CN)	30	2	68	V
31	Control normal (CN)	30	2	66	V
32	Control normal (CN)	30	1	64	M
33	Control normal (CN)	30	1	60	M
34	Control normal (CN)	30	1	63	V
35	Control normal (CN)	29	1	67	V
36	Control normal (CN)	30	1	68	V
37	Enfermedad de Alzheimer (EA)	16	2	62	V

Tabla 6: Correlación del promedio del factor de cambio (normalizado con respecto a los valores de control) para los biomarcadores de miARN candidatos entre la cohorte 1 y la cohorte 2 usando qPCR TaqMan.

Nombre del miARN	Factor de cambio (EA o DCL/Control)		
	TaqMan individual (cohorte 1)	TaqMan individual (cohorte 2)	Valor de p (cohorte 2)
miR-191	0,27	0,2	<0,0001
miR-15b	0,26	0,27	<0,0001
miR-142-3p	0,22	0,2	<0,0001
Let-7g	0,39	0,38	<0,0001
Let-7d	0,34	0,3	<0,0001
miR-301a	0,32	0,7	0,075
miR-545	0,34	0,42	0,013

Tabla 7: Valores de Ct relativos procedentes de qPCR Taq-Man usando las muestras de la cohorte 2 (20 EA y 17 CN)

	ID de muestra	Let-7d	miR-191	miR-301a	miR-545	let-7g	miR-15b	miR-142-3p
EA	1	9,824295	3,098545	6,976695	18,7577	5,202645	8,820145	4,099645
EA	2	12,89131	4,622906	8,268856	21,82076	6,257256	9,206956	5,283656
EA	3	10,52676	5,147009	8,432209	1636401	5,782509	9,066209	5,114409
EA	4	10,92046	4,689505	9,087305	13,52516	5,633905	9,793255	4,450655
EA	5	11,6412	3,934905	9,312455	13,4799	5,857755	9,294355	4,289305
EA	6	10,35952	3,218769	7,737069	12,19887	5,350119	8,726569	3,922869
EA	7	10,42707	2,989324	7,409774	12,60472	4,944774	7,737674	2,931624
EA	8	9,120479	2,975929	6,952529	12,54638	4,571929	8,295279	3,727279
EA	9	10,16382	5,406315	10,69702	22,67052	6,290865	10,12647	5,468315
EA	10	9,805652	3,448502	9,156852	14,09495	5,438552	8,792552	3,973952
EA	11	8,117455	3,774155	9,403655	10,90145	4,812105	8,654655	3,231055
EA	12	8,645876	2,920626	7,949176	12,03438	4,845676	7,780126	2,740676
EA	13	9,641232	3,356682	8,810432	17,63533	4,512332	8,080632	3,316432
EA	14	9,340862	4,311362	9,979162	12,04816	5,784462	8,785662	4125662
EA	15	8,436459	3,708709	8,162859	12,67881	4,411259	7,979409	2,895409
EA	16	9,406506	5,208356	10,67176	10,42276	5,118006	9,577656	4,690756
EA	17	9,9741	4,8933	12,92685	21,51865	7,0431	8,6345	4,6715
EA	18	10,24597	4,318268	1100422	13,65562	6,088668	8,856068	4,787318
EA	19	7,943852	0,738802	9,593602	10,009	3,351652	6,555602	1829852
Control	20	7,615908	0,954308	7,540308	10,27971	4,076908	6,346108	1246608
Control	21	7,538733	0,724883	8,446883	10,26723	3,465433	6,172333	1047233
Control	22	7,724992	0,936692	8,541842	11,45884	3,970342	6,816892	2,280492
Control	23	7,317299	0,682199	7,735899	10,51125	3,703249	6,764599	2,131749
Control	24	7,630084	0,428384	7,473584	10,67928	3,936634	6,050384	0,981734
Control	25	9,104217	1,340517	8,891017	14,40147	4,064617	6,708767	,2,137517
Control	26	7,908233	0,121183	8,003333	11,14918	3,514683	6,703883	0,851033
Control	27	7,910895	0,215295	8,152195	11,30549	3,211795	6,021045	1358545
Control	28	7,612373	0,996223	7,756173	1112332	3,675973	6,520023	1516723
Control	29	9,364145	3,015545	10,2347	11,8139	5,328945	8,050045	3,499895
Control	30	9,666285	3,083535	9,025385	20,51988	4,704485	8,046835	3,117535
Control	31	8,413839	2,617189	8,961839	12,85379	4,197289	7,335889	2,402489
Control	32	8,558735	2,492235	10,18563	24,08808	4,250335	7,707735	2,604835
Control	33	8,339448	0,579248	7,986598	10,1653	3,573948	6,122248	0,138598
Control	34	7,666189	0,903339	7,761739	10,40154	3,324539	6,429139	1,181639
Control -	35	6,645039	0,617089	7,084739	10,12354	2,686589	5,804439	0,117289
Control	36	8,074962	1,928062	7,781412	1135086	3,708162	6,809062	1180012
EA	37	10,51991	6,314958	12,85451	12,31906	6,176558	9,642558	4,850308

Tabla 8A: Distintivos de biomarcadores de miARN candidatos

Distintivos de miARN
miR-545 let-7g miR-15b
miR-545 miR-15b
miR-301a miR-545 let-7g miR-15b
miR-191 miR-15b
let-7g miR-15b
miR-191 miR-301aa miR-545
miR-301aa let-7g miR-15b
miR-191 miR-301a miR-545 miR-15b
miR-191
miR-15b
miR-191 miR-301a
miR-191 miR-545
miR-191 let-7g
miR-301a let-7g
miR-191 miR-301a let-7g
miR-191 miR-545 miR-15b
miR-191 let-7g miR-15b
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g
miR-191 miR-301a let-7g miR-15b
miR-191 miR-545 let-7g miR-15b
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b
let-7d miR-545
let-7d miR-301a miR-545
let-7d miR-545 miR-15b
miR-191 miR-301a miR-15b
miR-191 miR-545 let-7g
miR-301a miR-545 miR-15b
let-7d miR-301a miR-545 miR-15b
let-7d
miR-142-3p
let-7d miR-301a
let-7d miR-142-3p
miR-301a miR-15b
miR-301a miR-142-3p
let-7g miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-545
let-7d miR-301a miR-142-3p
let-7d miR-545 miR-142-3p
let-7d let-7g miR-142-3p
miR-301a miR-545 let-7g
miR-301a let-7g miR-142-3p
miR-545 let-7g miR-142-3p
let-7d miR-301a miR-545 miR-142-3p
let-7d miR-301a let-7g miR-142-3p
let-7d miR-545 let-7g miR-15b
let-7d miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p
miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p

Tabla 8B: Distintivos de biomarcadores de miARN candidatos

let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-15b
let-7d miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d let-7g
let-7d miR-15b
miR-545 miR-142-3p
let-7d miR-301a let-7g
let-7d miR-301a miR-15b
let-7d miR-545 let-7g
let-7d let-7g miR-15b
let-7d miR-15b miR-142-3p
miR-301a miR-545 miR-142-3p
let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-545
let-7d miR-191 miR-545 let-7g
let-7d miR-191 miR-545 miR-15b
let-7d miR-301a miR-545 let-7g
let-7d miR-301a miR-15b miR-142-3p
miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 miR-15b
let-7d miR-191 miR-545 let-7g miR-15b
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b
let-7g
miR-545 let-7g
miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-301a let-7g miR-15b
let-7d miR-545 let-7g miR-142-3p
miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p
let-7d miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 let-7g
let-7d miR-191
miR-15b miR-142-3p
miR-301a miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-15b
let-7d miR-191 miR-301a let-7g
let-7d miR-191 miR-301a
let-7d miR-191 miR-301a miR-15b
let-7d miR-191 miR-545 miR-142-3p
let-7d miR-191 let-7g miR-15b
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a let-7g miR-15b
let-7d miR-191 miR-545 let-7g miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p

Tabla 8C: Distintivos de biomarcadores de miARN candidatos

let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-301a
miR-301a miR-545
miR-545
let-7d miR-191 miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-142-3p
let-7d miR-191 let-7g miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a let-7g miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-191 let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-142-3p
miR-191 miR-545 miR-142-3p
miR-191 let-7g miR-142-3p
miR-191 miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-545 miR-142-3p
miR-191 miR-301a let-7g miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-545 let-7g miR-142-3p
miR-191 miR-545 miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p

Tabla 9A: Precisión, especificidad, sensibilidad y ABC (área bajo la curva) para los distintivos de miARN que tienen una precisión >75 %, usando muestras de la cohorte 2 para la predicción

Distintivo de miARN	Precisión (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	ABC
miR-545 let-7g miR-15b	94,5946	95	94,11765	0,952941
miR-545 miR-15b	91,8919	90	94,11765	0,964706
miR-301a miR-545 let-7g miR-15b	91,8919	95	88,2353	0,964706
miR-191 miR-15b	89,18919	95	82,35294	0,961765
let-7g miR-15b	89,18919	95	82,35294	0,941177
miR-191 miR-301a miR-545	89,18919	95	82,35294	0,955882
miR-301a let-7g miR-15b	89,18919	95	82,35294	0,932353
miR-191 miR-301a miR-545-miR-15b	89,18919	95	8235294	0,955882-
miR-191	86,48649	95	76,47059	0,952941
miR-15b	86,48649	85	88,2353	0,955882
miR-191 miR-301a	86,48649	95	76,47059	0,929412
miR-191 miR-545	86,48649	95	76,47059	0,952941
miR-191 let-7g	86,48649	95	76,47059	0,938235
miR-301a let-7g	86,48649	95	76,47059	0,920588
miR-191 miR-301a let-7g	86,48649	95	76,47059	0,932353
miR-191 miR-545 miR-15b '	86,48649	95	76,47059	0,952941
miR-191 let-7g miR-15b	86,48649	95	76,47059	0,95
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g	86,48649	95	76,47059	0,95
miR-191 miR-301a let-7g miR-15b	86,48649	95	76,47059	0,935294
miR-191 miR-545 let-7g miR-15b	86,48649	95	76,47059	0,952941
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b	86,48649	95	76,47059	0,95
let-7d miR-545	83,78378	80	88,2353	0,932353
let-7d miR-301a miR-545	83,78378	80	88,2353	0,935294
let-7d miR-545 miR-15b	83,78378	80	88,2353	0,938235
miR-191 miR-301a miR-15b	83,78378	85	82,35294	0,944118
miR-191 miR-545 let-7g	83,78378	95	70,58824	0,952941
miR-301a miR-545 miR-15b	83,78378	75	94,11765	0,967647
let-7d miR-301a miR-545 miR-15b	83,78378	80	88,2353	0,935294
let-7d	81,08108	75	88,2353	0,923529
miR-142-3p	81,08108	65	100	0,955882
let-7d miR-301a	81,08108	75	88,2353	0,923529
let-7d miR-142-3p	81,08108	75	88,2353	0,929412
miR-301a miR-15b	81,08108	70	94,11765	0,941177
miR-301a miR-142-3p	81,08108	65-	100	0,955882
let-7g miR-142-3p	81,08108	65	100	0,955882
let-7d miR-191 miR-545	81,08108	75	88,2353	0,929412
let-7d miR-301a miR-142-3p	81,08108	75	88,2353	0,932353
let-7d miR-545 miR-142-3p	81,08108	70	94,11765	0,958824
let-7d let-7g miR-142-3p	8108108	70,	94,11765	0,926471
miR-301a miR-545 let-7g	81,08108	95	64,70588	0,926471
miR-301a let-7g miR-142-3p	81,08108	65	100	0,955882
miR-545 let-7g miR-142-3p	81,08108	70	94,11765	0,967647

Tabla 9B: Precisión, especificidad, sensibilidad y ABC (área bajo la curva) para los distintivos de miARN que tienen una precisión >75 %, usando muestras de la cohorte 2 para la predicción

Distintivo de miARN	Precisión (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	ABC
let-7d miR-301a miR-545 miR-142-3p	81,08108	70	94,11765	0,958824
let-7dmiR-301a let-7g miR-142-3p	81,08108	70	94,11765	0,932353
let-7d miR-545 let-7g miR-15b	81,08108	70	94,11765	0,923529
let-7d miR-545 miR-15b miR-142-3p	81,08108	70	94,11765	0,958824
let-7d let-7g miR-15b miR-142-3p	81,08108	75	88,2353	0,935294
miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p	81,08108	70	94,11765	0,967647
miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p	81,08108	70	94,11765	0,964706
let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-15b	81,08108	70	94,11765	0,923529
let-7d miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p	81,08108	70	94,11765	0,958824
let-7d miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p	81,08108	75	88,2353	0,935294
miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p	81,08108	70	94,11765	0,961765
let-7d let-7g	78,37838	70	88,2353	0,911765
let-7d miR-15b	78,37838	75	82,35294	0,902941
miR-545 miR-142-3p	78,37838	65	94,11765	0,967647
let-7d miR-301a let-7g	78,37838	70	88,2353	0,908824
let-7d,miR-301a miR-15b	78,37838	75	82,35294	0,905882
let-7d miR-545 let-7g	78,37838	70	88,2353	0,926471
let-7d let-7g miR-15b	78,37838	70,	88,2353	0,9
let-7dmiR-15b miR-142-3p	78,37838	70	88,2353	0,935294
miR-301a miR-545 miR-142-3p	78,37838	65	94,11765	0,967647
let-7gmiR-15b miR-142-3p	78,37838	65	94,11765	0,952941
let-7d miR-191 miR-301a miR-545	78,37838	70	88,2353	0,920588
let-7d miR-191 miR-545 let-7g	78,37838	70	88,2353	0,926471
let-7d miR-191 miR-545 miR-15b	78,37838	70	88,2353	0,920588
let-7d miR-301a miR-545 let-7g	78,37838	70	88,2353	0,926471
let-7d miR-301a miR-15b miR-142-3p	78,37838	70	88,2353	0,935294
miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p	78,37838	65	94,11765	0,952941
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g	78,37838	70	88,2353	0,920588
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 miR-15b	78,37838	70	88,2353	0,920588
let-7d miR-191 miR-545 let-7g miR-15b	78,37838	65	94,11765	0,914706
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b	78,37838	65	94,11765	0,905882
let-7g	75,67568	95	52,94118	0,926471
miR-545 let-7g	75,67568	95	52,94118	0,926471
miR-545 miR-15bmiR-142-3p	75,67568	60	94,11765	0,967647
let-7d miR-301a let-7g miR-15b	75,67568	70	82,35294	0,9
let-7d miR-545 let-7g miR-142-3p	75,67568	60	94,11765	0,952941
miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p,	75,67568	60	94,11765	0,967647
let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p	75,67568,	60	94,11765	0,952941
let-7d miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p ,	75,67568	60	94,11765	0,955882
let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p	75,67568	60	94,11765	0,955882

Tabla 10: Precisión, especificidad, sensibilidad y ABC (área bajo la curva) para las mejores 8 combinaciones de distintivos de miARN usando muestras de la cohorte 2 para la predicción.

Distintivo de miARN	Precisión	Especificidad	Sensibilidad	ABC (área bajo la curva)
miR-545, let7g y miR-15b	94,6 %	94,1 %	95 %	0,953
miR-15b y miR-545	91,9 %	94,1 %	90 %	0,96
miR-301a, miR-545, let-7g y miR-15b	91,9 %	88,2 %	95 %	0,96
miR-191 y miR-15b	89,2 %	82,3 %	95 %	0,96
Let-7g y miR-15b	89,2 %	82,3 %	95 %	0,94
miR-191, miR-301a y miR-545	89,2 %	82,3 %	95 %	0,96
miR-301a, let-7g y miR-15b	89,2 %	82,3 %	95 %	0,93
miR-191, miR-301a, miR-545 y miR-15b	89,2 %	82,3 %	95 %	0,96

Tabla 11: Precisión especificidad sensibilidad y ÁBC (área bajo la curva, valor máximo posible de 1) para cada miARN candidato usando muestras de la cohorte 2 de forma individual (20 EA y 20 de control) para la predicción

Distintivo de miARN individual	Precisión	Especificidad	Sensibilidad	ABC (área bajo la curva)
miR-191	86,5 %	95 %	76 %	0,95
miR-15b	86,5 %	85 %	88 %	0,95
miR-142-3p	81,1 %	65 %	100 %	0,95
Let-7g	75,7 %	95 %	53 %	0,92
Let-7d	81,1 %	75 %	88 %	0,92
miR-301a	59,5 %	25 %	100 %	0,67
miR-545	51,4 %	20 %	88 %	0,74