

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 554**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2010 PCT/US2010/055495**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11057003**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2010 E 10779376 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2496714**

54 Título: **Métodos de utilización de micro-ARN de fluidos corporales para el diagnóstico y control del deterioro cognitivo leve**

30 Prioridad:

**04.11.2009 US 258185 P**

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

**19.01.2017**

73 Titular/es:

**DIAMIR, LLC (100.0%)  
3 Orchid Court  
Princeton, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:

**UMANSKY, SAMUIL y  
SHEINERMAN, KIRSA, S.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 597 554 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

Métodos de utilización de micro-ARN de fluidos corporales para el diagnóstico y control del deterioro cognitivo leve

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se dirige a métodos para la detección no invasiva o mínimamente invasiva de cambios patológicos en el cerebro u otras neuronas mediante la cuantificación del miARN de neuritas y/o sinapsis, en los fluidos corporales y a la aplicación de estos métodos para el diagnóstico temprano y el control del deterioro cognitivo leve.

**Antecedentes de la invención**

10 Las enfermedades neurodegenerativas comprenden un gran grupo de patologías causadas por los cambios metabólicos en las células del cerebro, la pérdida de sinapsis y otros compartimentos de las neuronas, y finalmente por la muerte neuronal. Para una revisión, véase *Neurodegenerative diseases: Molecular Concepts to Therapeutic Targets*. Editors: R. von Bernhardi, N.C. Inestrosa, Nova Publishers, 2008. Este grupo de enfermedades incluye el deterioro cognitivo leve (DCL), la enfermedad de Alzheimer (EA), la demencia por cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH), la demencia frontotemporal (DFT), la demencia vascular, los trastornos neurocognitivos asociados al VIH (TNAV), la esclerosis múltiple (EM), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), las enfermedades priónicas, las diferentes ataxias, y otras. Debido al aumento de la esperanza de vida, las enfermedades neurodegenerativas se han vuelto muy comunes en los países desarrollados. Hay alrededor de 6 millones de personas que viven con EA sólo en los EE.UU., 70-80 millones de personas están en el grupo de riesgo y se gastan 148 mil millones de dólares en los EE.UU. para el tratamiento y el cuidado de los pacientes con EA. El desarrollo de fármacos y el éxito del tratamiento de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas se complican significativamente por la ausencia de métodos eficaces para su diagnóstico temprano y su control. El desarrollo de métodos de diagnóstico eficaces se complica aún más por el fuerte potencial cerebral para compensar la disfunción y la pérdida de las neuronas durante un largo período de tiempo. Esto da lugar a una manifestación clínica tardía de los síntomas de la enfermedad cuando el tratamiento no puede ser muy satisfactorio debido a los cambios morfológicos graves en el cerebro, incluyendo la pérdida masiva de neuronas. Por lo tanto, los métodos de diagnóstico basados en la detección de los eventos tempranos en el desarrollo de la enfermedad son particularmente deseables.

30 Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la muerte neuronal en diferentes áreas específicas de la enfermedad en el cerebro. Sin embargo, la pérdida neuronal es un evento relativamente tardío, por lo general después de la disfunción sináptica, la pérdida sináptica, la retracción de las neuritas, y la aparición de otras anomalías tales como defectos de transporte axonal. Véase, por ejemplo, Bredesen, *Molecular Neurodegeneration* 2009, 4:27; Sisková et al., *Am J Pathol.* 2009,175(4): 1610-21; Kielar et al., *Hum Mol Genet.* 2009,18 (21): 4066-4080; Nimmrich y Ebert, *Rev. Neurosci.* 2009, 20:1-12; Bellizzi et al., *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006,1: 20-31; Milnerwood y Raymond, *J Physiol.* 2007, 585: 817-831; Waataja et al., *J Neurochem.* 2008,104: 364-375; Fuhrmann et al., *J Neurosci.* 2007, 27: 6224-6233; Yoshiyama et al., *Neuron.* 2007, 53: 337-351; Wishart et al., *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006,65: 733-739; Gyls et al., *Neurochem Int.* 2004; 44: 125-131; Conforti et al., *Trends Neurosci.* 2007,30: 159-166; Baloyannis et al., *J Neurol Sci.* 2006, 248: 35-41; Díaz-Hernández et al., *FASEB J.* 2009, 23: 1893-1906; Spanpanato et al., 2008 *Neuroscience.*, 157: 606-620; Wade et al., *Brain Res.* 2008,1188: 61-68; Centonze et al., *J Neurosci.* 2009, 29:3442-3452; Wegner et al., *Neurology.* 2006, 67: 960-967; Dupuis y Loeffler, *Curr Opin Pharmacol.* 2009, 9:341-346; Revuelta, et al. *Am J Dis Alzheimer Other Demen* 2008 23: 97-102. Numerosos estudios se dedican a la descripción de la destrucción del axón con desprendimiento de "axosomas" rodeados de membrana, axón, dendrita y corte de espinas, y el desmontaje de las sinapsis (Goda, Davis, *Neuron* 2003, 40: 243-264; Eaton, Davis, *Genes Development* 2003, 17: 2075-2082; Koiral, Ko, *Neuron*, 2004, 44: 578-580; Bishop et al., *Neuron*, 2004, 44: 651-661; Low, Cheng, *Phil. Trans. R. Soc. B* 2006 361, 1531-1544).

45 En la actualidad, el diagnóstico de la EA y otras formas de demencia se basa en el análisis de la función cognitiva del paciente. Como se mencionó anteriormente, debido a los mecanismos de compensación eficaces en el cerebro, la disminución de la función cognitiva se registra normalmente cuando una enfermedad se encuentra en sus últimas etapas y se encuentra disponible un menor número de tratamientos. Las nuevas técnicas de formación de imágenes, que son cada vez más populares (p. ej., la tomografía por emisión de positrones (PET), la tomografía computarizada (TC), la formación de imágenes por resonancia magnética (RM), la formación de imágenes multifotónicas, la magnetoencefalografía (MEG), la electroencefalografía (EEG), etc.), son útiles sin embargo, actualmente no son suficientemente sensibles y específicas como para detectar las primeras etapas de una enfermedad antes de que ocurran grandes cambios morfológicos (Mucke, *Nature*, 2009, 461: 895-897; Mistur et al., *J. Clin. Neurol* 2009, 5: 153-166; Miller, *Science*, 2009, 326: 386-389; Perrin et al., *Nature*, 2009, 461:916-922).

55 Los ensayos moleculares de diagnóstico existentes para la EA y otras formas de demencia se pueden dividir en dos grupos. El primer grupo se basa en el análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNP), que es útil para la predicción de un mayor riesgo de una enfermedad, pero no para el diagnóstico (Bettens et al., *Hum Mol Genet.* 2010,19 (R1): R4-R11). El segundo grupo utiliza el análisis de las proteínas implicadas en la patogénesis de EA o proteínas específicas del cerebro, como la proteína de la cadena neural (NTP), en los fluidos corporales (Schipper,

- Alzheimer's & Dementia. 2007,3: 325-332). Sin embargo, estos ensayos no son suficientemente sensibles y específicos. Los datos recientemente publicados han demostrado una alta sensibilidad de detección de la EA mediante la medición de las concentraciones de tres biomarcadores de proteínas (proteína beta-amiloide 1-42, proteína tau total, y proteína fosforilada tau181P) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Meyer et al., Arch Neurol. 2010,67: 949-956). La alta invasividad del procedimiento para obtener el LCR hace que este tipo de ensayos sea poco práctico y difícil para el uso clínico diario.
- Los cambios metabólicos que se producen en las enfermedades neurodegenerativas causan la destrucción de espinas, dendritas, axones, y pérdida de sinapsis, y lo último, muy probablemente, induce la muerte neuronal (Bredesen, Molecular Neurodegeneration 2009, 4:27). Se producen procesos similares durante el desarrollo embrionario del cerebro. Numerosas neuronas están tratando de establecer contactos intercelulares, esas neuronas que lo hacen sobreviven con éxito, y otras neuronas mueren (Butts et al., Cell Death Differ. 2008,15: 1178-1186; Enokido y Hatanaka, Gan Para Kagaku Ryoho. 1994, 21:615-620; Gasic y Nicotera, Toxicol Lett. 2003,139:221-227).
- La destrucción del axón con el desprendimiento de "axosomas" rodeados de membrana, axón, dendrita y recorte de la columna vertebral, y el desensamblaje de las sinapsis conducen a la aparición de vesículas libres de células que contienen componentes citoplasmáticos de neuronas, axones, neuritas, espinas y sinapsis, incluyendo proteínas, ARN y sus productos de degradación. Existen otros procesos que conducen a la liberación de estos compuestos al medio extracelular, en particular, la formación de ampollas (Charras et al., Biophys. J. 2008, 94: 1836-1853; Fackler, Grosse, J. Cell Biol. 2008,181:879-884), exocitosis (Skog et al. Biol Nat Cell, 2008, 10:1470-1476) y otras formas de secreción activa.
- Los microARN (miARN) son una clase de ARN no codificantes cuyo producto final es una molécula de ARN funcional de aproximadamente 22 nt. Juegan un papel importante en la regulación de los genes diana mediante la unión a regiones complementarias de los transcritos mensajeros para reprimir su traducción o regular su degradación (Griffiths-Jones Nucleic Acids Research, 2006, 34, Database Issue: D140-D144). Con frecuencia, un miARN puede elegir como diana múltiples ARNm y un ARNm puede ser regulado por múltiples miARN dirigidos a diferentes regiones de la UTR 3'. Una vez unido a un ARNm, el miARN puede modular la expresión génica y la producción de proteína, afectando, p. ej. a la traducción y la estabilidad del ARNm (p. ej., Baek et al., Nature 455 (7209): 64 (2008); Selbach et al., Nature 455(7209): 58 (2008); Ambros, 2004, Nature, 431, 350-355; Bartel, 2004, Cell, 116, 281-297; Cullen 2004, Virus Research, 102, 3-9; He et al., 2004, Nat. Rev. Genet., 5, 522-531; y Ying et al., 2004, Gene, 342, 25-28). Existen otras clases de ARN pequeños menos caracterizados (revisado por Kim, Mol. Cells, 2005, 19:1-15).
- Muchos miARN son específicos para o se expresan en exceso en ciertos órganos/tejidos/células. Véase, por ejemplo, Hua et al., BMC Genomics 2009, 10: 214.; Liang et al., BMC Genomics. 2007,8:166; Landgraf et al., Cell. 2007,129: 1401-1414; Lee et al., RNA. 2008, 14: 35-42.
- Determinados compartimentos celulares están enriquecidos en algunos miARN, incluyendo aquellos que son específicos de las células, en particular en los axones, dendritas y sinapsis. Véase, p. ej., Schratz et al., Nature. 439: 283-289, 2006; Lugli et al., J Neurochem. 106: 650-661, 2008; Bicker y Schratz, J Cell Mol Med., 12: 1466-1476, 2008; Smalheiser y Lugli, Neuromolecular Med. 11: 133-140, 2009; Rajasethupathy, Neuron. 63: 714-716, 2009; Kye, RNA 13: 1224-1234, 2007; Yu et al., Exp Cell Res. 314: 2618-2633, 2008; Cougot, et al., J Neurosci. 28: 13793-13804 2008; Kawahara, Brain Nerve. 60: 1437-1444, 2008; Schratz G. Rev Neurosci. 2009; 10: 842-849.
- La expresión y concentraciones de los miARN están reguladas por diversas señales fisiológicas y patológicas. Se encontraron cambios en la expresión de algunos miARN en neuronas de pacientes con enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas. Hébert y De Strooper, Trends Neurosci. 32: 199-206, 2009; Saba et al., PLoS One. 2008; 3: e3652; Kocerha et al., Neuromolecular Med. 2009; 11:162-172; Sethi y Lukiw, Neurosci Lett. 2009,459: 100-104; Zeng, Mol Pharmacol. 75: 259-264, 2009; Cogswell et al., Journal of Alzheimer's Disease. 14:27-41, 2008; Schaefer et al., J. Exp. Med. 204: 1553-1558, 2007; Hébert, Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105:6415-6420; Wang et al., J Neurosci. 2008, 28:1213-23; Nelson et al., Brain Pathol. 2008; 18:130-138; Lukiw, Neuroreport. 2007; 18:297-300.
- Debido a su pequeño tamaño, los miARN pueden atravesar las barreras hematoencefálica, de la placenta y del riñón. Se propuso el análisis de los miARN específicos de células/tejidos en los fluidos corporales para la detección de la muerte celular *in vivo* (Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 20090081640; Laterza et al., Clin Chem. 2009, 55:1977-83).
- La solicitud de patente internacional WO2008/153692 describe los perfiles de miARN de líquido cefalorraquídeo.
- La solicitud de patente internacional WO2009/025852 describe métodos de detección de la muerte celular mediante la medición de los niveles de miARN ubicuos y específicos de tejido.
- La solicitud de patente internacional WO2009/009457 proporciona una lista de miARN que se correlacionan con la enfermedad de Alzheimer.
- Los ensayos de la función cognitiva y de formación de imágenes del cerebro, que se utilizan actualmente como

métodos principales para el diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas tales como la EA, sólo permiten la detección de etapas tardías de la enfermedad y no son suficientemente específicos. Hay todavía una gran necesidad en la técnica de desarrollar métodos para el diagnóstico precoz de enfermedades neurodegenerativas y otros trastornos neurológicos en los mamíferos antes de la aparición de importantes cambios morfológicos y de la muerte celular neuronal masiva.

**Compendio de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente descripción aborda estas y otras necesidades proporcionando métodos de diagnóstico y control novedosos altamente sensibles no invasivos o mínimamente invasivos basados en la cuantificación en fluidos corporales de ARN pequeños de sinapsis y/o neuritas. Los métodos de la presente descripción permiten el diagnóstico y control de las enfermedades neurodegenerativas y otros trastornos neurológicos antes de la aparición de importantes cambios morfológicos y de muerte celular neuronal masiva y por lo tanto tienen numerosas implicaciones clínicas. Por ejemplo, el uso de los métodos de la presente descripción puede conducir a una mayor eficacia de los tratamientos disponibles en la actualidad para las enfermedades neurodegenerativas y otros trastornos neurológicos ya que tales tratamientos podrían administrarse en una etapa significativamente más temprana de la enfermedad. El uso de los métodos de la presente descripción también puede permitir el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos y/o preventivos eficaces y puede disminuir los costes y aumentar la eficacia de las pruebas clínicas asociados con dicho desarrollo.

En el primer objeto, la presente descripción proporciona un método para diagnosticar una patología neuronal en un sujeto, que comprende:

- a. determinar el nivel de al menos un ARN pequeño de sinapsis y/o neuritas en una muestra de fluido corporal del sujeto;
- b. comparar el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto con un nivel de control del ARN pequeño, y
- c. (i) identificar el sujeto por estar afectado por la patología neuronal cuando el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto se incrementa en comparación con el control o (ii) identificar el sujeto por no estar afectado por la patología neuronal cuando el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto no se incrementa en comparación con el control.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para diagnosticar una patología neuronal en un sujeto, que comprende:

- a. determinar el nivel de ARN pequeño de sinapsis y/o neuritas en una muestra de fluido corporal del sujeto;
- b. determinar el nivel de ARN pequeño en el cuerpo neuronal (p. ej., miR-181a o miR-491-5p) en una muestra de fluido corporal del sujeto;
- c. determinar la razón de los niveles de los ARN pequeños determinados en las etapas (a) y (b);
- d. comparar la razón de los niveles de los ARN pequeños determinados en la etapa (c) con una razón de control correspondiente, y
- e. (i) identificar el sujeto por estar afectados por la patología neuronal cuando la razón de los niveles de los ARN pequeños determinados en la etapa (c) es superior a la razón de control correspondiente o (ii) identificar el sujeto por no estar afectado por la patología neuronal cuando la razón de los niveles de los ARN pequeños determinada en la etapa (c) no es mayor que la razón de control correspondiente.

En un aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer (EA) en un sujeto, que comprende:

- a. determinar el nivel de al menos un ARN pequeño de sinapsis o neuritas en una muestra de fluido corporal del sujeto;
- b. comparar el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto con un nivel de control del ARN pequeño, y
- c. (i) identificar el sujeto por estar afectados por EA cuando el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto se incrementa en comparación con el control o (ii) identificar el sujeto por no estar afectado por EA cuando el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto no se incrementa en comparación con el control.

En otro aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para diagnosticar el deterioro cognitivo leve (DCL) en un sujeto, que comprende:

a. determinar el nivel de al menos un ARN pequeño de sinapsis o neuritas en una muestra de fluido corporal del sujeto;

b. comparar el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto con un nivel de control del ARN pequeño, y

5 c. (i) identificar el sujeto por estar afectados por DCL cuando el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto se incrementa en comparación con el control o (ii) identificar el sujeto por no estar afectados por DCL cuando el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto no se incrementa en comparación con el control.

10 En cualquiera de los métodos de diagnóstico anteriores, el nivel de control del ARN pequeño puede ser, por ejemplo, (i) el nivel de dicho ARN pequeño en una muestra de fluido corporal procesada de manera similar a partir de un sujeto de control de la misma edad, (ii) el nivel de dicho ARN pequeño en una muestra de fluido corporal procesada de una manera similar a partir del mismo sujeto obtenida en el pasado, o (iii) un patrón predeterminado.

15 Cualquiera de los métodos de diagnóstico anteriores puede comprender adicionalmente la normalización del nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto y en el control al nivel de un ARN pequeño que no se expresa en el cerebro (p. ej., miR-10b o miR-141).

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para el control del desarrollo de una patología neuronal en un sujeto, que comprende:

20 a. determinar el nivel de al menos un ARN pequeño de sinapsis o neuritas en dos o más muestras de fluidos corporales del sujeto, en donde las muestras se han obtenido en puntos de tiempo separados entre sí (p. ej., en intervalos de 1-48 meses), y

b. comparar los niveles del ARN pequeño entre las muestras de fluido corporal obtenidas antes y después.

25 Dicho método puede comprender adicionalmente (c) (i) determinar que el desarrollo de la patología neuronal en el sujeto se acelera si el nivel del ARN pequeño es mayor en la muestra o las muestras de fluido corporal obtenidas después en comparación con la muestra o las muestras obtenidas anteriormente; (ii) determinar que la patología neuronal en el sujeto continúa desarrollándose a la misma velocidad si el nivel del ARN pequeño no cambia en la muestra o las muestras de fluido corporal obtenidas después en comparación con la muestra o las muestras obtenidas anteriormente, y (iii) determinar que el desarrollo de la patología neuronal en el sujeto se ralentiza si el nivel del ARN pequeño se reduce en la muestra o las muestras de fluido corporal obtenidas después en comparación con la muestra o las muestras obtenidas anteriormente.

30 En un aspecto adicional, la descripción proporciona un método para controlar la eficacia de un tratamiento de una patología neuronal en un sujeto, que comprende:

a. determinar el nivel de al menos un ARN pequeño de sinapsis o neuritas en una muestra de fluido corporal del sujeto obtenida antes del inicio del tratamiento;

35 b. determinar el nivel del ARN pequeño en una o más muestras de fluido corporal del sujeto obtenidas en el curso de o después del tratamiento (p. ej., a intervalos de 1 semana-12 meses), y

c. comparar el nivel del ARN pequeño determinado en las etapas (a) y (b), y opcionalmente entre diferentes muestras en la etapa (b).

40 Semejante método puede comprender adicionalmente (d) (i) determinar que el tratamiento es eficaz si el nivel del ARN pequeño ha disminuido en el transcurso de o después del tratamiento o (ii) determinar que el tratamiento no es eficaz si el nivel del ARN pequeño no ha disminuido en el curso o después del tratamiento.

45 Los ejemplos no limitantes de las patologías neuronales que pueden ser diagnosticadas y controladas utilizando cualquiera de los métodos anteriores incluyen enfermedades neurodegenerativas (tales como, p. ej., enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), demencia por cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington (EH), demencia frontotemporal (DFT), demencia vascular, trastornos neurocognitivos asociados al VIH (TNAV), deterioro cognitivo leve (DCL), demencia mixta, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), hidrocefalia de presión normal, síndrome de Wernicke-Korsakoff, esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedades priónicas, y diferentes ataxias) y patologías neuronales asociadas con una encefalopatía o neuropatía.

En cualquiera de los métodos anteriores, se puede diagnosticar y controlar una patología neuronal antes de la muerte masiva de células neuronales característica de dicha patología.

50 En una realización, el ARN pequeño utilizado en cualquiera de los métodos de la descripción está presente en las sinapsis. En otra realización, el ARN pequeño utilizado en cualquiera de los métodos de la descripción está presente en las espinas. En otra realización más, el ARN pequeño utilizado en cualquiera de los métodos de la descripción está presente en los axones. En otra realización adicional, el ARN pequeño utilizado en cualquiera de los métodos

de la descripción está presente en las dendritas.

En una realización, el ARN pequeño utilizado en cualquiera de los métodos de la descripción es miARN. Los ejemplos no limitantes de miARN sinapsis y/o neuritas útiles en cualquiera de los métodos de la descripción incluyen miR-7, miR-9, miR-9 \*, miR-25, miR-26a, miR-26b, miR-98, miR-124, miR-125b, miR-128, miR-132, miR-134, miR-138, miR-146, miR-182, miR-183, miR-200b, miR-200c, miR-213, miR-292-5p, miR-297, miR-322, miR-323-3p, miR-325, miR-337, miR-339, miR-345, miR-350, miR-351, miR-370, miR-425, miR-429, miR-433-5p, miR-446, miR-467 y miR-874. En una realización específica, el miARN se selecciona del grupo que consiste en miR-7, miR-125b, miR-128, miR-132, miR-323-3p, miR-370 y miR-874.

En una realización, cualquiera de los métodos de la descripción comprende determinar el nivel de dos o más ARN pequeños de sinapsis y/o neuritas.

Los ejemplos no limitantes de muestras de fluidos corporales útiles en cualquiera de los métodos de la descripción incluyen plasma sanguíneo, suero, orina y saliva.

Los ejemplos no limitantes de los métodos para la determinación del nivel de ARN pequeños útiles en cualquiera de los métodos de la descripción incluyen hibridación, RT-PCR y secuenciación.

En una realización, antes de la etapa (a) en cualquiera de los métodos anteriores, el ARN pequeño se purifica a partir de la muestra de fluido corporal.

Cualquiera de los métodos anteriores puede comprender adicionalmente la etapa de reducir o eliminar la degradación del ARN pequeño.

#### Breve descripción de los dibujos

**Las Figuras 1A-G** son gráficos que muestran las comparaciones de las concentraciones de miARN en el plasma de pacientes con EA y controles de la misma edad. Todas las concentraciones se normalizaron para miR-16 ubicuo y se presentan en unidades relativas (eje de ordenadas). miR-7 (**A**), miR-125b (**B**), miR-128 (**C**), miR-132 (**D**), y miR-323-3p (**E**) son miARN de neuritas y/o sinapsis; miR-181a (**F**) y miR-491-5p (**G**) son miARN de cuerpos neuronales.

**Las Figuras 2A-D** son gráficos que muestran la comparación de las concentraciones de miARN en el plasma de pacientes con DCL y controles de la misma edad. Todas las concentraciones se normalizaron para miARN incorporado y se presentan en unidades relativas (eje de ordenadas). miR-7 (**A**) y miR-874 (**B**) son miARN de neuritas y/o sinapsis; miR-181a (**C**) y miR-491-5p (**D**) son miARN de cuerpos neuronales.

**Las Figuras 3A-B** son gráficos que muestran la comparación de las concentraciones de miARN en el plasma de los pacientes con DCL y controles de la misma edad. Todas las concentraciones se normalizaron para miR-141 y se presentan en unidades relativas (eje de ordenadas). miR-128 (**A**) es miARN de neuritas y sinapsis; miR-539 (**B**) es miARN de cuerpos neuronales.

**Las Figuras 4A-D** son gráficos que muestran la comparación de las concentraciones de miARN en plasma de pacientes con DCL y EA y controles de la misma edad. Las concentraciones de miARN de neuritas y/o sinapsis miR-128 (**A**), miR-132 (**B**), miR-370(**C**), y miR-125b (**D**) se normalizaron para miR-181a (miARN de cuerpo neuronal) y se presentan en unidades relativas (eje de ordenadas).

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de los inventores de que, dado que la destrucción de las neuritas (axón y/o dendritas y/o espina) y la pérdida de sinapsis, así como algunos eventos metabólicos preceden a la muerte neuronal en el curso del desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, los métodos basados en la detección de esos fenómenos podrían ser utilizados para el diagnóstico de la enfermedad antes de los basados en la detección de la muerte celular.

La presente invención se basa adicionalmente en el descubrimiento de los autores de la invención de que los niveles de miARN de sinapsis y/o neuritas aumentan en los fluidos corporales de los pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) y/o enfermedad de Alzheimer (EA) en comparación con los respectivos controles de la misma edad que reflejan una excesiva destrucción de neuritas y/o pérdida de sinapsis.

En el sentido de la presente invención, el término "ARN pequeño de sinapsis y/o neuritas" se refiere a ARN pequeño (p. ej., miARN o ARN BC200) que (i) se encuentra "enriqueciendo neuronas", es decir, está presente en mayores cantidades (p. ej., concentraciones al menos 5 veces mayores) en las neuronas, en comparación con tipos de células que puede ser una fuente de cantidades significativas de ARN pequeño en un fluido corporal que se está sometiendo a ensayo y (ii) está presente en una sinapsis y/o neurita (es decir, axón y/o dendrita y/o espina). Para que sea útil en los métodos de diagnóstico de la presente invención, tal ARN pequeño de sinapsis y/o neuritas debe ser detectable en los fluidos corporales, como resultado de su liberación desde las neuronas (p. ej., debido a la destrucción de neuritas/sinapsis o a la muerte neuronal).

La presente descripción proporciona un nuevo método altamente sensible y no invasivo o mínimamente invasivo para el diagnóstico de una patología neuronal (p. ej., una patología neuronal asociada con una enfermedad neurodegenerativa u otro trastorno neurológico) en un sujeto, comprendiendo dicho método determinar el nivel en una muestra de fluido corporal del sujeto (p. ej., plasma sanguíneo o suero, orina, saliva, u otros fluidos corporales) de uno o más ARN pequeños de sinapsis y/o neuritas (p. ej., miARN o ARN BC200). Específicamente, este método comprende (a) determinar el nivel de al menos un ARN pequeño de sinapsis y/o neuritas en una muestra de fluido corporal del sujeto; (b) comparar el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal con un nivel de control del ARN pequeño (p. ej., una muestra de fluido corporal procesada de una manera similar a partir de un sujeto de control [p. ej., un control de la misma edad o el mismo sujeto en el pasado (p. ej., 1, 3, 6, 12, 24, 36, o 48 meses antes)] o un patrón predeterminado), y (c) (i) identificar el sujeto por estar afectado por la patología neuronal cuando el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto se incrementa en comparación con el control o (ii) identificar al sujeto por no estar afectados por la patología neuronal cuando no se incrementa el nivel del ARN pequeño en la muestra de fluido corporal del sujeto en comparación con el control.

El método de diagnóstico de la descripción hace posible el diagnóstico precoz de enfermedades neurodegenerativas y otros trastornos neurológicos, p. ej., antes de la aparición de importantes cambios morfológicos y/o de la muerte masiva de células neuronales asociadas con tales enfermedades y trastornos.

Además, el análisis del ARN pequeño de sinapsis y/o neuritas mejora significativamente la sensibilidad de la detección de ARN pequeño en comparación con la detección de ARN pequeños de cuerpos neuronales que no están presentes o están agotados en sinapsis y neuritas, porque la cantidad de sinapsis y neuritas en el cerebro es  $10^3$  veces mayor que la cantidad de neuronas. Este enfoque también proporciona información detallada y completa para el control del desarrollo de la enfermedad y la efectividad del tratamiento, ya que varios eventos específicos en las neuronas (p. ej., cambios en el perfil de miARN, su secreción, la degradación de las neuritas, la pérdida de sinapsis, y finalmente la muerte neuronal) pueden ser detectados y cuantificados.

Las diferencias en los niveles de los ARN pequeños en sinapsis y/o neuritas en fluidos corporales de sujetos que tienen enfermedades neurodegenerativas u otros trastornos neurológicos en comparación con sujetos normales detectables por el método de la presente descripción pueden ser debidas a (i) destrucción asociada a la enfermedad de neuritas y/o sinapsis, (ii) cambios asociados a la enfermedad en la expresión o el metabolismo de estos ARN pequeños, (iii) cambios asociados a la enfermedad en el transporte y la distribución intracelular de estos ARN pequeños, (iv) cambios asociados a la enfermedad en la secreción de estos ARN pequeños (Rabinowits et al. Clin Lung Cancer, 2009, 10:42-46), así como otras causas.

En una realización separada, la descripción proporciona un método de diagnóstico relacionado para el diagnóstico de una patología neuronal que comprende (a) determinar el nivel de un ARN pequeño de sinapsis y/o neuritas en una muestra de fluido corporal del sujeto; (b) determinar el nivel de un ARN pequeño de cuerpo neuronal en una muestra de fluido corporal del sujeto; (c) determinar la razón de los niveles de los ARN pequeños determinados en las etapas (a) y (b); (d) comparar la razón de los niveles de los ARN pequeños determinados en la etapa (c) con una razón de control correspondiente, y (e) (i) identificar al sujeto por estar afectado por la patología neuronal cuando la razón de los niveles de los ARN pequeños determinada en la etapa (c) es mayor que la razón de control correspondiente o (ii) identificar al sujeto por no estar afectado por la patología neuronal cuando la razón de los niveles de los ARN pequeños determinada en la etapa (c) no es mayor que la razón de control correspondiente.

En el sentido de la presente invención, el término "ARN pequeño de cuerpo neuronal" se refiere a ARN pequeño (p. ej., miARN) que (i) se encuentra "enriqueciendo neuronas", es decir, está presente en mayores cantidades (p. ej., concentraciones al menos 5 veces más altas) en las neuronas, en comparación con los tipos de células que pueden ser una fuente de importantes cantidades significativas de ARN pequeños en un fluido corporal que está siendo sometido a ensayo y (ii) está ausente de o está presente en concentraciones significativamente más bajas en las neuritas o sinapsis que en los cuerpos de las células neuronales.

En otra realización relacionada, la presente descripción proporciona un método para el control del desarrollo de una patología neuronal (p. ej., una patología neuronal asociada con una enfermedad neurodegenerativa u otro trastorno neurológico) por medio de la obtención periódica (p. ej., cada 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 meses) de muestras de un fluido corporal de un sujeto en observación y la determinación de los cambios en el nivel de uno o más ARN pequeños de sinapsis y/o neuritas (p. ej., miARN o ARN BC200) en el fluido corporal. Específicamente, este método comprende (a) determinar el nivel de al menos un ARN pequeño de sinapsis y/o neuritas en dos o más muestras de fluido corporal del sujeto, en donde las muestras se han obtenido en puntos de tiempo separados entre sí, y (b) comparar los niveles del ARN pequeño entre las muestras de fluido corporal obtenidas antes y después. Si el nivel del ARN pequeño es mayor en la muestra o las muestras de fluido corporal obtenidas después en comparación con la muestra o las muestras obtenidas antes, esto es indicativo de la aceleración del desarrollo de la patología neuronal en el sujeto. Si el nivel del ARN pequeño no cambia en la muestra o las muestras de fluido corporal obtenidas después en comparación con la muestra o las muestras obtenidas antes, esto es indicativo de que la patología neuronal en el sujeto se continúa desarrollando a la misma velocidad. Si el nivel del ARN pequeño se reduce en la muestra o las muestras de fluido corporal obtenidas después en comparación con la muestra o las muestras obtenidas antes, esto es indicativo de ralentización en el desarrollo de la patología neuronal en el sujeto.

En otra realización relacionada, la descripción proporciona un método para controlar la eficacia de un tratamiento de una patología neuronal (p. ej., una patología neuronal asociada con una enfermedad neurodegenerativa u otro trastorno neurológico) en un sujeto mediante la determinación de cambios en el nivel de uno o más ARN pequeños de sinapsis y/o neuritas en muestras de fluidos corporales del sujeto, en donde dichas muestras se han obtenido antes del inicio del tratamiento y en diferentes puntos de tiempo (p. ej., cada semana, 2 semanas, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 12 meses, 24 meses, 36 meses, 48 meses) en el curso o después del tratamiento. Específicamente, este método comprende (a) determinar el nivel de al menos un ARN pequeño de sinapsis y/o neuritas en una muestra de fluido corporal del sujeto obtenida antes del inicio del tratamiento; (b) determinar el nivel del ARN pequeño en una o más muestras de fluido corporal del sujeto obtenidas en el curso de o después del tratamiento, y (c) comparar el nivel del ARN pequeño determinado en las etapas (a) y (b), y opcionalmente entre diferentes muestras en la etapa (b). Si el nivel del ARN pequeño ha disminuido en el transcurso de o después del tratamiento, esto es indicativo de que el tratamiento es eficaz. Si el nivel del ARN pequeño no ha disminuido en el transcurso de o después del tratamiento, esto es indicativo de que el tratamiento no es eficaz. Este método también puede incluir la comparación con los pacientes tratados con placebo u otros controles relevantes.

Los métodos de diagnóstico y control de la descripción son útiles para detectar y controlar cualquier fase del desarrollo de una patología neuronal (p. ej., una patología neuronal asociada con una enfermedad neurodegenerativa u otro trastorno neurológico) y ofrecen la ventaja de un análisis simple y mínimamente invasivo (o no invasivo). Como se señaló anteriormente, a diferencia de los métodos conocidos en la técnica, los métodos de la descripción permiten el diagnóstico y control de patologías neuronales antes de la aparición de importantes cambios morfológicos y/o muerte masiva de células neuronales asociadas con tales patologías.

Los métodos de la presente descripción se pueden utilizar para diagnosticar y controlar diversas patologías neuronales que incluyen, sin limitación, enfermedades neurodegenerativas (p. ej., enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), demencia por cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington (EH), demencia frontotemporal (DFT), demencia vascular, trastornos neurocognitivos asociados al VIH (TNAV), deterioro cognitivo leve (DCL), demencia mixta, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), hidrocefalia de presión normal, síndrome de Wernicke-Korsakoff, esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedades priónicas, diferentes ataxias, etc.), diversas encefalopatías (p. ej., encefalopatías víricas tales como demencia por SIDA) y neuropatías (p. ej., glaucoma [neuropatía óptica], atrofia muscular de la espina, etc.). En una realización separada de la presente descripción, se puede analizar un espectro de diferentes ARN pequeños (p. ej., varios miARN) para el diagnóstico diferencial de diversas enfermedades neurodegenerativas con síntomas clínicos similares, por ejemplo, diferentes formas de demencia.

Los ARN pequeños de neuritas y/o sinapsis útiles en los métodos de la presente descripción incluyen, sin limitación, los miARN tales como miR-7; miR-9; miR-9\*; miR-25; miR-26a; miR-26b; miR-98; miR-124; miR-125b; miR-128; miR-132; miR-134; miR-138; miR-146; miR-182; miR-183; miR-200b; miR-200c; miR-213; miR-292-5p; miR-297; miR-322; miR-323-3p; miR-325; miR-337; miR-339; miR-345; miR-350; miR-351; miR-370; miR-425; miR-429; miR-433-5p; miR-446; miR-467; miR-874 (véanse Schrott et al., *Nature* 439: 283-289, 2006; Lugli et al., *J Neurochem.* 106:650-661, 2008; Bicker y Schrott, *J Cell Mol Med.* 12: 1466-1476, 2008; Smalheiser y Lugli, *Neuromolecular Med.* 11:133-140, 2009; Rajasethupathy, *Neuron*, 63:714-716, 2009; Kye, *RNA*, 13: 1224-1234, 2007; Yu, et al., *Exp Cell Res.* 314:2618-2633, 2008; Cougot et al., *J Neurosci.* 28:13793-13804, 2008; Kawahara, *Brain Nerve*, 60:1437-1444, 2008), y otros ARN pequeños tales como ARN BC200 (Brain Cytoplasmic RNA 200 nucleótidos; Dahm et al., *Seminars in Cell Dev. Biol.* 18:216-223, 2007; Mus et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104: 10679-10684, 2007). Otros ARN pequeños útiles en los métodos de la descripción se pueden identificar, por ejemplo, basándose en su enriquecimiento en las neuronas (y en ciertas regiones del cerebro dependiendo de la enfermedad) y en la localización intracelular en los axones y/o dendritas y/o espinas y/o sinapsis. Si se seleccionan muestras de orina para la realización de métodos de diagnóstico de la descripción, Los ARN pequeños preferidos para la detección serían aquellos ARN pequeños que no se expresan de manera significativa en las células del sistema urinario. Del mismo modo, si se utilizan muestras de sangre (p. ej., suero o plasma) para la realización de métodos de diagnóstico de la descripción, Los ARN pequeños preferidos para la detección serían aquellos ARN pequeños que no se expresan o están presentes a niveles muy bajos en las células sanguíneas.

Los métodos de la presente descripción se basan en la medición de los niveles de ciertos ARN pequeños en los fluidos corporales. El uso de fluidos corporales que se pueden obtener por técnicas no invasivas o mínimamente invasivas (p. ej., en oposición a la detección en el cerebro o LCR) permite un procedimiento de diagnóstico barato y mínimamente invasivo o no invasivo. Los fluidos corporales preferidos para su uso en los métodos de la descripción son plasma sanguíneo, suero, orina y saliva. Sin embargo, también se puede utilizar cualquier otro fluido corporal.

Los ejemplos de los métodos útiles para la medición del nivel de ARN pequeño en los fluidos corporales incluyen la hibridación con sondas selectivas (p. ej., mediante transferencia Northern, citometría de flujo basada en cuentas, microchips de oligonucleótidos [micromatrices], o análisis de hibridación en solución, tales como el kit de detección de miRNA mirVana Ambion), la detección basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa-tallo bucle [RT-PCR], el método de la matriz basada en RT-PCR cuantitativa [qPCR-matriz]), o la secuenciación directa por medio de una de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (p. ej., secuenciación de ARN pequeño Helicos, miARN BeadArray (Illumina), Roche 454 (FLX-Titanium), y ABI SOLiD). Para una revisión de las técnicas aplicables adicionales véanse, p. ej., Chen et al., *BMC*

Genomics, 2009, 10: 407; Kong et al., J Cell Physiol. 2009; 218: 22-25.

5 En algunas realizaciones, los ARN pequeños se purifican antes de la cuantificación. Los ARN pequeños (p. ej., los miARN) se pueden aislar y purificar a partir de fluidos corporales por varios métodos, incluyendo el uso de kits comerciales (p. ej., miRNeasy kit [Qiagen], kit de aislamiento de ARN mirVana [Ambion/ABI], MiRACLE [Agilent], kit de aislamiento de miARN High Pure [Roche], y kit de Purificación de miARN [Norgen Biotek Corp.]), la extracción con Trizol (véase el Ejemplo 1, más adelante), la concentración y la purificación sobre intercambiadores aniónicos, cuentas magnéticas cubiertas por sustancias de unión a ARN, o la adsorción de ciertos miARN sobre oligonucleótidos complementarios.

10 En algunas realizaciones, la degradación del ARN pequeño en muestras de fluidos corporales y/o durante la purificación del ARN pequeño se reduce o elimina. Los métodos útiles para reducir o eliminar la degradación del ARN pequeño, incluyen, sin limitación, la adición de inhibidores de ARNasa (p. ej., RNasin Plus [Promega], SUPERase-In [ABI], etc.), el uso de cloruro de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de sodio (SDS), o una combinación de los mismos. Asimismo, cuando se trabaja con muestras de orina, se puede lograr un menor riesgo de degradación del ARN cuando la muestra se ha mantenido en la vejiga durante un tiempo más corto (p. ej., menos de 4 horas). La reducción de la degradación del ARN pequeño en muestras de fluidos corporales es particularmente importante cuando se requiere el almacenamiento y el transporte de muestras antes de la cuantificación del ARN pequeño.

15 Para tener en cuenta las posibles pérdidas de un ARN pequeño dado durante la purificación, la inhibición potencial de RT-PCR, pequeños contaminantes de ARN derivados de células de sangre u orina muertas o dañadas durante el aislamiento y el tratamiento de la muestra, las variaciones en la filtración del riñón, etc., se pueden emplear diversos métodos de normalización de datos experimentales. Por ejemplo, se pueden utilizar los siguientes métodos de normalización en la presente descripción:

25 a) La concentración de un ARN pequeño diana se puede normalizar a uno de los miARN ubicuos (p. ej., el miR-16), los ARN pequeños nucleolares (ARNpno), los miARN que no se expresan en las neuronas (p. ej., miR-122a, miR-10b, miR-141), los ARN pequeños nucleares U6 (ARN U6), o los miARN de cuerpos neuronales (p. ej., el miR-137, miR-181a, miR-491-5p, miR-298, miR-339 [Kye, ARN, 13:1224-1234, 2007], y otros).

30 b) Se pueden sintetizar y utilizar oligonucleótidos de ARN pequeño sintéticos (p. ej., miARN) como controles para las pérdidas durante la purificación y la inhibición de RT-PCR (mediante su inclusión en muestras de fluido corporal antes de la purificación del ARN).

c) Para tener en cuenta las variaciones en la filtración renal (cuando se trabaja con muestras de orina), se puede normalizar la concentración de ARN pequeño en la orina a nivel de creatinina y/o albúmina.

## Definiciones

35 El término "cuerpo de célula neuronal" se refiere a la porción de una célula nerviosa que contiene el núcleo rodeado por el citoplasma y la membrana plasmática, pero no incorpora las dendritas o axones.

El término "neurita" según se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier proyección desde el cuerpo celular de una neurona. Esta proyección puede ser un axón, una dendrita, o una espina.

40 El término "axón" se refiere a una proyección larga, delgada de una neurona que conduce los impulsos eléctricos lejos del cuerpo celular de la neurona o soma. Los axones se distinguen de las dendritas por varias características, incluyendo la forma (las dendritas a menudo se estrechan mientras que los axones suelen mantener un radio constante), la longitud (las dendritas se restringen a una pequeña región en torno al cuerpo de la célula, mientras que los axones pueden ser mucho más largos), y la función (las dendritas generalmente reciben señales, mientras que los axones normalmente las transmiten). Los axones y las dendritas hacen contacto con otras células (por lo general, otras neuronas pero a veces células de músculos o glándulas) en uniones denominadas sinapsis.

45 El término "dendrita" se refiere a una proyección ramificada de una neurona que actúa para llevar a cabo la estimulación electroquímica recibida de otras células nerviosas hacia el cuerpo celular de la neurona desde la que se proyectan las dendritas.

50 Los términos "espina" o "espina dendrítica" se refieren a una pequeña protuberancia membranosa de la dendrita de una neurona que normalmente recibe la entrada de una sola sinapsis de un axón. Las espinas dendríticas sirven como un sitio de almacenamiento de la fuerza sináptica y ayudan a transmitir señales eléctricas al cuerpo de la célula neuronal. La mayoría de las espinas tienen una cabeza bulbosa (la cabeza de la espina), y un cuello delgado que conecta la cabeza de la espina con el eje de la dendrita. Las dendritas de una sola neurona pueden contener cientos o miles de espinas. Además de que las espinas proporcionen un sustrato anatómico para el almacenamiento de memoria y la transmisión sináptica, también pueden servir para aumentar el número de posibles contactos entre neuronas.

55

El término "sinapsis" se refiere a uniones especializadas, a través de las cuales las neuronas se señalan entre sí y a las células no neuronales, tales como las de los músculos o glándulas. Una neurona típica da lugar a varios miles de sinapsis. La mayoría de las sinapsis conectan los axones a las dendritas, pero también hay otros tipos de conexiones, incluyendo axón a cuerpo celular, axón a axón y dendrita a dendrita. En el cerebro, cada neurona forma sinapsis con muchas otras, y, del mismo modo, cada uno recibe entradas sinápticas de muchas otras. Como resultado, la salida de una neurona puede depender de la entrada de muchas otras, cada una de las cuales puede tener un grado diferente de influencia, en función de la fuerza de su sinapsis con esa neurona. Existen dos tipos principales de las sinapsis, las sinapsis químicas y las sinapsis eléctricas. En las sinapsis eléctricas, las células se acercan a aproximadamente 3,5 nm una de otra, en lugar de la distancia de 20 a 40 nm que separa las células en las sinapsis químicas. En las sinapsis químicas, el potencial postsináptico está causado por la apertura de los canales iónicos por transmisores químicos, mientras que en las sinapsis eléctricas está causado por el acoplamiento eléctrico directo entre ambas neuronas. Las sinapsis eléctricas son por lo tanto más rápidas que las sinapsis químicas.

En el sentido de la presente invención, el término "ARN pequeño de sinapsis y/o neuritas" se refiere a un ARN pequeño (p. ej., miARN o ARN BC200) que (i) se encuentra "enriqueciendo neuronas", es decir, está presente en mayores cantidades (p. ej., concentraciones al menos 5 veces mayores) en las neuronas, en comparación con tipos de células que puede ser una fuente de cantidades significativas de ARN pequeño en un fluido corporal que se está sometiendo a ensayo y (ii) está presente en una sinapsis y/o neurita (es decir, axón y/o dendrita y/o espina). Para ser útil en los métodos de diagnóstico de la presente invención, semejante ARN pequeño de sinapsis y/o neurita debe ser detectable en los fluidos corporales, como resultado de su liberación desde las neuronas (p. ej., debido a la destrucción de neuritas/sinapsis o a la muerte neuronal).

El término "ARN pequeño de cuerpo neuronal" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un ARN pequeño (p. ej., miARN), que (i) se encuentra "enriqueciendo neuronas", es decir, está presente en cantidades mayores (p. ej., concentraciones al menos 5 veces mayores) en neuronas, en comparación con los tipos de células que pueden ser una fuente de cantidades significativas de ARN pequeño en un fluido corporal que se está sometiendo a ensayo y (ii) está ausente o presente a concentraciones significativamente más bajas en las neuritas o sinapsis que en los cuerpos celulares neuronales.

Los términos "patología neuronal" y "cambios patológicos en las neuronas" se utilizan en la presente memoria para hacer referencia a cambios metabólicos y/o estructurales en las neuronas asociadas con disfunción de neuritas y/o sinapsis y/o destrucción de neuritas y/o pérdida de sinapsis.

El término "asociado con" se utiliza para abarcar cualquier correlación, aparición simultánea y cualquier relación de causa-efecto.

El término "desarrollo de una patología neuronal" se utiliza en la presente memoria para referirse a cualquier cambio negativo en el grado/gravedad de un cambio metabólico y/o estructural en las neuronas individuales y/o cualquier aumento en el número de neuronas afectadas. La frase "mejoría de una patología neuronal" y términos similares se refieren a cualquier cambio positivo en el grado/gravedad de un cambio metabólico y/o estructural en las neuronas individuales y/o cualquier disminución en el número de neuronas afectadas.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "ARN pequeño" generalmente se refiere a un grupo heterogéneo de ARN no codificantes con una variedad de funciones reguladoras incluyendo la arquitectura de la cromatina/memoria epigenética, la transcripción, el empalme de ARN, la edición del ARN, la traducción del ARNm, y el recambio del ARN. Los métodos de diagnóstico de la presente invención dependen de la detección de ARN pequeños de neuritas y/o sinapsis, que se pueden detectar en los fluidos corporales, tales como, por ejemplo, microARN (miARN), ARN Citoplásmicos del Cerebro BC1/BC200, etc. Hay otras clases de ARN pequeños menos caracterizados que pueden ser también útiles en los métodos de la presente invención (revisado en Kim, Mol. Cells, 2005, 19:1-15).

Los términos "microARN" o "miARN" según se utilizan en la presente memoria, se refieren a una clase de moléculas de ARN pequeñas, maduras, no codificantes de aproximadamente 22 nt de longitud. Juegan un papel importante en la regulación de los genes diana mediante la unión a regiones complementarias de los transcritos mensajeros (ARNm) para reprimir su traducción o regular su degradación (Griffiths-Jones Nucleic Acids Research, 2006, 34, Database Issue: D140-D144). Con frecuencia, un miARN puede dirigirse a múltiples ARNm y un ARNm puede ser regulado por múltiples miARN dirigidos a diferentes regiones de la UTR 3'. Una vez unido a un ARNm, el miARN puede modular la expresión génica y la producción de proteína, afectando, p. ej., a la traducción y la estabilidad del ARNm (Baek et al., Nature 455 (7209):64 (2008); Selbach et al., Nature 455 (7209): 58 (2008); Ambros, 2004, Nature, 431, 350-355; Bartel, 2004, Cell, 116, 281-297; Cullen 2004, Virus Research., 102, 3-9; He et al., 2004, Nat. Rev. Genet., 5, 522-531; y Ying et al., 2004, Gene, 342, 25-28). Los ejemplos de los ARN pequeños de neuritas y/o sinapsis útiles en los métodos de la presente descripción incluyen, sin limitación, miR-7, miR-9, miR-9\*, miR-25, miR-26a, miR-26b, miR-98, miR-124, miR-125b, miR-128, miR-132, miR-134, miR-138, miR-146, miR-182, miR-183, miR-200b, miR-200c, miR-213, miR-292-5p, miR-297, miR-322, miR-323-3p, miR-325, miR-337, miR-339, miR-345, miR-350, miR-351, miR-370, miR-425, miR-429, miR-433-5p, miR-446, miR-467 y miR-874. Se puede encontrar más información sobre los miARN más conocidos en la actualidad en la base de datos de miARN miRBase (disponible en

la red en mirbase.org). Véanse también Burside et al., *BMC Genomics* 9: 185 (2008); Williams et al., *BMC Genomics* 8: 172 (2007); Landgraf et al., *Cell* 129: 1401 (2007).

El término "matriz de miARN" se refiere a una tecnología múltiple utilizada en biología molecular y en la medicina. Consiste en una serie de múltiples (p. ej. miles) puntos microscópicos de oligonucleótidos ordenados, que contienen cada uno una secuencia específica (sonda) complementaria a un miARN diana particular. Después de la hibridación sonda-diana en condiciones muy rigurosas los híbridos resultantes son generalmente detectados y cuantificados mediante la cuantificación de dianas marcadas con fluoróforos, plata, o quimioluminiscencia para determinar la abundancia relativa del miARN. En los métodos de la presente descripción, se pueden utilizar matrices de miARN tanto hechas a medida como disponibles en el mercado. Los ejemplos de matrices de miARN disponibles comercialmente útiles (basadas en diversos métodos de marcaje de la diana, detección de híbridos y el análisis) incluyen matrices producidas por Agilent, Illumina, Invitrogen, Febit, y LC Sciences.

El término "tecnologías de secuenciación de la próxima generación" se refiere en sentido amplio a los métodos de secuenciación que generan múltiples reacciones de secuenciación en paralelo. Esto permite incrementar enormemente la productividad y el rendimiento de los datos. Los ejemplos no limitantes de plataformas de secuenciación de la próxima generación comúnmente utilizadas incluyen la secuenciación de ARN pequeño Helicos, miRNA BeadArray (Illumina), Roche 454 (FLX-Titanium), y ABI SOLiD.

Un "individuo" o "sujeto" o "animal", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a seres humanos, animales veterinarios (p. ej., gatos, perros, vacas, caballos, ovejas, cerdos, etc.) y en modelos animales experimentales de enfermedades neurodegenerativas u otras patologías neuronales (véanse los Ejemplos, más abajo). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

El término "tracto urinario" se refiere a órganos y conductos, que participan en la secreción y eliminación de la orina del organismo.

El término "purificado" según se utiliza en la presente memoria se refiere a material que ha sido aislado bajo condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluyendo materiales nativos a partir de los cuales se obtiene el material. Por ejemplo, la purificación del ARN incluye la eliminación de las proteínas, lípidos, sales y otros compuestos no relacionados presentes en los fluidos corporales. Además, para algunos métodos de análisis un miARN purificado se encuentra preferiblemente sustancialmente libre de otros oligonucleótidos de ARN contenidos en las muestras de fluido corporal (p. ej., fragmentos de ARNr y ARNm, miARN ubicuos, que se expresan a niveles altos en casi todos los tejidos [p. ej., miR-16], etc.). Según se utiliza en la presente memoria, el término "sustancialmente libre" se utiliza operacionalmente, en el contexto de los ensayos analíticos del material. Preferiblemente, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es al menos 50% puro; más preferiblemente, al menos 90% puro, y aún más preferiblemente al menos 99% puro. La pureza se puede evaluar por cromatografía, electroforesis en gel, análisis de la composición, análisis biológico, y otros métodos conocidos en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "procesado de manera similar" se refiere a las muestras (p. ej., muestras de fluidos corporales o ARN purificados) que se han obtenido utilizando el mismo protocolo.

El término "un nivel de control", según se utiliza en la presente memoria abarca patrones predeterminados (p. ej., un valor publicado en una referencia), así como los niveles determinados experimentalmente en muestras procesadas de manera similar de sujetos de control (p. ej., sujetos sanos de la misma edad, pacientes tratados con placebo, etc.).

El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor. Semejante intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 50%, más preferiblemente dentro de 20%, aún más preferiblemente dentro de 10%, e incluso más preferiblemente dentro de 5% de un valor o intervalo dados. La variación permitida abarcada por el término "alrededor" o "aproximadamente" depende del sistema concreto en estudio, y puede ser apreciada fácilmente por un experto normal en la técnica.

De acuerdo con la presente descripción se pueden emplear técnicas convencionales de la biología molecular, la microbiología y el ADN recombinante dentro de la experiencia práctica de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, p. ej., Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición. Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (en la presente memoria "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J.; Higgins eds. (1985)]; *Transcripción and Translation* [B. D. Hames & S.J. Higgins, cds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Ausubel, F.M. et al. (eds.). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 1994. Estas técnicas incluyen la mutagénesis dirigida al sitio como describe Kunkel, en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488- 492 (1985), Patente de los Estados Unidos Núm. 5.071. 743, Fukuoka et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 357-360 (1999); Kim y Maas, *BioTech.* 28: 196-198 (2000); Parikh y Guengerich, *BioTech.* 24: 4 28-431 (1998); Ray y Nickoloff, *BioTech.* 13: 342-346 (1992); Wang et al., *BioTech.* 19: 556-559 (1995); Wang y Malcolm, *BioTech.* 26:

- 680-682 (1999); Xu y Gong, *BioTech.* 26: 639-641 (1999), Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.789.166 y 5.932.419, Hogrefe, *Strategies* 14. 3:74-75 (2001), Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.702.931, 5.780.270, y 6.242.222, Angag y Schutz, *Biotech.* 30: 486-488 (2001), Wang y Wilkinson, *Biotech.* 29: 976-978 (2000), Kang et al., *Biotech.* 20: 44-46 (1996), Ogel y McPherson, *Protein Engineer.* 5: 467-468 (1992), Kirsch y Joly, *Nuc. Acids. Res.* 26: 1848-1850 (1998), Rhem y Hancock, *J. Bacteriol.* 178: 3346-3349 (1996), Boles y Miogsa, *Curr. Genet.* 28: 197-198 (1995), Barrentino et al., *Nuc. Acids. Res.* 22: 541-542 (1993), Tessier y Thomas, *Meths. Molec. Biol.* 57: 229-237, y Pons et al., *Meth. Molec. Biol.* 67: 209-218.

### Ejemplos

- 10 La presente invención también se describe y se demuestra por medio de los siguientes ejemplos. Sin embargo, el uso de estos y otros ejemplos en cualquier lugar de la memoria descriptiva es sólo ilustrativo y de ninguna manera limita el alcance y el significado de la invención o de cualquier término ilustrado. Del mismo modo, la invención no se limita a cualquiera de las realizaciones preferidas concretas descritas en la presente memoria. La invención por lo tanto va a estar limitada solamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas.
- 15 Ejemplo 1: Comparación de los diferentes métodos utilizados para la purificación de miARN a partir de suero o plasma.

Dado que la mayoría de los kits disponibles en el mercado para el aislamiento de miARN se han desarrollado para la purificación de miRNA de las células y tejidos, se comparan diversos kits con modificaciones propias para ajustarlos para el aislamiento de miARN a partir de suero o plasma. Los kits comerciales incluyen el kit miRNeasy (Qiagen), el kit de aislamiento de ARN mirVana (Ambion/ABI), MirACLE (Agilent), el kit de aislamiento de miARN High Pure (Roche), y el kit de Purificación de miARN (Norgen Biotek Corp.). Además, se han desarrollado técnicas propias basadas en el uso de Trizol (Invitrogen). En algunos experimentos, el miARN es previamente adsorbido sobre intercambiadores aniónicos, tales como Q-Sefarosa, o sobre cuentas magnéticas cubiertas con un material de unión a ARN (Q-Sefarosa (GE Healthcare), PEI-polietiliminina, u otros). Después de la desproteínización con Trizol, el ARN se hace precipitar con alcohol isopropílico o se purifica adicionalmente en columnas de sílice. En algunos experimentos, el ARN purificado se trata con ADNasa libre de ARNasa (Qiagen, ABI, Invitrogen u otro). Las preparaciones de miARN obtenidos por diferentes métodos se comparan mediante RT-PCR. La calidad de las preparaciones de miARN también se evalúa mediante la medición de la inhibición de RT PCR (véase el Ejemplo 3, a continuación).

- 30 Se purificó miARN a partir de muestras de plasma y suero obtenidas de los mismos 5 donantes sanos. Se incorporaron  $10^7$  copias de miR-159a (ath-miR-159a) de *Arabidopsis thaliana* por 1 ml de plasma o suero después de la adición de la solución que contenía guanidina para la evaluación del rendimiento de miARN. Se compararon dos técnicas, una basada en el kit mirVana París (Ambion/ABI), y otra basada en la desproteínización con Trizol (Invitrogen), y la posterior purificación en columnas de sílice. Después de la purificación del ARN, se midieron las concentraciones de miARN incorporado y miR-9, miR-16 y miR-134 humanos endógenos en preparaciones finales por medio de RT-PCR. El kit Mirvana Paris fue más eficaz en el aislamiento de miARN que la técnica basada en Trizol y fue seleccionado para futuros experimentos. Aunque todos los miARN analizados fueron detectables en suero y plasma y ambos tipos de muestras son adecuados para los ensayos de miARN, los valores finales de Ct de PCR fueron alrededor de 2 ciclos más bajos para plasma, y este último se utilizó en los experimentos posteriores.
- 40 Basándose en la medición cuantitativa de ath-miR-159a incorporado, el rendimiento promedio de miARN aislado de plasma con el kit mirVana fue de 71,4%.

### Ejemplo 2: Selección de miARN para ensayos.

Los miARN sometidos a ensayo fueron seleccionados inicialmente basándose en datos de la bibliografía sobre su enriquecimiento en los compartimentos del cerebro y su presencia en las neuritas (es decir, los axones y/o dendritas y/o espinas) y/o las sinapsis (Hua et al., *BMC Genomics* 2009, 10: 214; Liang et al., *BMC Genomics*. 2007, 8:166; Landgraf et al., *Cell*. 2007,129: 1401-1414; Lee et al., *RNA*. 2008, 14: 35-42; Schratt et al., *Nature*. 439: 283-289, 2006; Lugli et al., *J Neurochem*. 106: 650-661, 2008; Bicker y Schratt, *J Cell Mol Med.*, 12: 1466-1476, 2008; Smalheiser y Lugli, *Neuromolecular Med.* 11: 133-140, 2009; Rajasethupathy, *Neuron*. 63: 714-716, 2009; Kye, *RNA* 13: 1224-1234, 2007; Yu et al., *Exp Cell Res.* 314: 2618-2633, 2008; Cougot, et al., *J Neurosci.* 28: 13793-13804 2008; Kawahara, *Brain Nerve.* 60: 1437-1444, 2008; Schratt G. *Rev Neurosci.* 2009; 10: 842-849), así como en su participación en los procesos asociados con neuritas y sinapsis (The miR-Ontology Data Base: disponible en la red en [ferrolab.dmi.unict.it/miro/](http://ferrolab.dmi.unict.it/miro/)). Para la normalización, además del miARN incorporado, se utilizaron miARN ubicuos, tales como miR-16, y miARN expresado en numerosos tejidos, pero no en el cerebro, tales como miR-10b y miR-141.

- 55 Ejemplo 3: Detección de un aumento en los niveles de miARN de sinapsis y/o neuritas en el plasma de pacientes con EA.

Las muestras de plasma se obtuvieron de pacientes a los que se había diagnosticado EA desarrollada por medio de ensayo cognitivo y formación de imágenes del cerebro. Los perfiles de varias neuronas enriquecidas con miARN procedentes del plasma de estos pacientes se analizaron mediante RT-PCR con los cebadores y sondas para cada

miARN individual (ABI). Se tomó la cantidad de ARN equivalente a 30  $\mu$ L de plasma en cada reacción de PCR, y 1/15 del producto de RT se llevó a la PCR final. Por lo tanto, se detectó una cantidad de miARN equivalente a 2  $\mu$ L de plasma. Los resultados se normalizaron para varios miARN, por lo general para miR-16 ubicuo, se convirtieron en Cantidad Relativa (CR) de miARN según el protocolo ABI ( $2^{-\Delta C_t}$ ), y se compararon con los perfiles de miARN de los controles de la misma edad. Además, los datos obtenidos con miARN de neuritas y/o sinapsis se compararon con los datos obtenidos con el miARN de cuerpos neuronales.

Como se muestra en las Figuras 1A-G, los datos obtenidos demuestran claramente que las concentraciones de muchas neuronas enriquecidas con miRNA aumentan en plasma de pacientes con EA. Sin embargo, este efecto es mucho más prominente para los miARN de neuritas y/o sinapsis (miR-7 (A), el miR-125b (B), miR-128 (C), miR-132 (D), y miR-323-3p (E)) que para los miARN de los cuerpos neuronales (miR-181a (F) y miR-491-5p (G)).

Se pueden utilizar otras técnicas para medir la concentración de miARN en los fluidos corporales con algunas precauciones. Por ejemplo, la aplicación de las tecnologías de secuenciación de nueva generación al análisis cuantitativo de los miARN y otros ARN pequeños en fluidos corporales se complica por dos factores. En primer lugar, los fragmentos de RNA ribosomal (ARNr) y en un menor grado ARN mensajero (ARNm) comprenden la mayor parte de los pequeños oligonucleótidos presentes en los fluidos corporales, lo que complica la secuenciación de los miARN y algunos de los otros ARN pequeños, que están presentes en un número de copias mucho menor. En segundo lugar, algunos miARN ubicuos, que se expresan a niveles altos en casi todos los tejidos (p. ej., miR-16), pueden estar presentes en los fluidos corporales en un número de copias un millón de veces más grande que los miARN de interés. Para superar estos problemas, antes de realizar la secuenciación cuantitativa de miARN de neuritas y/o sinapsis relativamente raros y otros ARN pequeños de neuritas y/o sinapsis, se pueden agotar los fragmentos de ARNr de las preparaciones de ARN de fluidos corporales utilizando, por ejemplo, el kit de Hibridación Selectiva y Eliminación de ARNr (Invitrogen), y se pueden eliminar otros oligonucleótidos presentes en un gran número de copias mediante hibridación con las respectivas secuencias de ADN complementarias. Estas preparaciones con ARN agotado pueden ser analizadas a continuación mediante una de las técnicas de secuenciación de nueva generación, tal como, por ejemplo, secuenciación ARN pequeño Helicos o miRNA BeadArray (Illumina). Los miARN y/u otros ARN pequeños, que proporcionan los resultados más reproducibles y fiables (es decir, el cambio en el nivel característico de una determinada enfermedad neurodegenerativa), se pueden seleccionar como biomarcadores potenciales y analizar por medio de RT-PCR u otros métodos.

Ejemplo 4: Demostración de que el aumento de los niveles de miARN de neuritas y/o sinapsis en pacientes con DCL es más significativo y precede al aumento de los niveles de miARN de cuerpos neuronales.

Las muestras de plasma se obtuvieron de pacientes con diagnóstico de DCL. Los perfiles de las neuronas enriquecidas en miARN de plasma de estos pacientes se analizaron mediante RT-PCR con los cebadores y sondas para cada miARN individual (ABI). En cada reacción se tomó la cantidad de ARN equivalente a 30  $\mu$ L de plasma, y 1/15 del producto de RT se llevó a la PCR final. Por lo tanto, se detectó la cantidad de miARN equivalente a 2  $\mu$ L de plasma. Los resultados se normalizaron para varios miARN, se convirtieron en Cantidad Relativa (CR) de miARN según el protocolo ABI ( $2^{-\Delta C_t}$ ), y se compararon con los perfiles de miARN de los controles de la misma edad.

Cuando se realizó la normalización por incorporación de miRNA no humano, que proporciona una concentración relativa de miARN por 1 ml de plasma, algunas muestras de plasma de pacientes de DCL contenían más miARN de neuritas y/o sinapsis (Figura 2, miR-7 (A) y miR-874 (B)).

Al mismo tiempo las concentraciones de miARN de cuerpos neuronales no se modificaron en el plasma de pacientes con DCL (Figura 2, miR-181a (C) y miR-491-5p (D)).

Se obtuvieron resultados similares, cuando las concentraciones de miARN en plasma se normalizaron para miR-141, que es expresado en muchos órganos, pero no en el cerebro (Figuras 3A-B).

Ejemplo 5: Comparación de los niveles de neuronas enriquecidas con miARN en el plasma de pacientes de control, con DCL y con EA.

Dado que las concentraciones de miARN de neuritas y/o sinapsis aumentan y las concentraciones de miARN de cuerpo neuronales permanecen prácticamente sin cambios en el plasma de pacientes con DCL, se utilizaron sus razones para el análisis del desarrollo de la enfermedad. Las muestras de plasma se obtuvieron de pacientes con diagnóstico de DCL y EA. Los perfiles de neuronas enriquecidas con miARN del plasma de estos pacientes se analizaron mediante RT-PCR con los cebadores y sondas para cada miRNA individual (ABI). Se tomó una cantidad de ARN equivalente a 30  $\mu$ L de plasma en cada reacción de PCR, y 1/15 del producto de RT se llevó a la PCR final. Por lo tanto, se detectó la cantidad de miARN equivalente a 2  $\mu$ L de plasma. Luego se normalizaron las concentraciones de miARN de neuritas y/o sinapsis para miARN, localizado principalmente en el cuerpo neuronal, de acuerdo con el protocolo ABI ( $2^{-\Delta C_t}$ ), y se compararon con los números respectivos de los controles de la misma edad.

Como se muestra en las Figuras 4A-D, los datos obtenidos demuestran una tendencia clara de aumento de las concentraciones de algunos miARN de neuritas y/o sinapsis (es decir, miR-128 (A), miR-132 (B), miR-370 (C), y miR-125b (D)) del Control al DCL y EA. Estos datos sugieren que el escrutinio periódico de las personas de edad

avanzada puede ayudar en el diagnóstico precoz y el control del DCL y la EA.

Ejemplo 6: Detección de la destrucción de las neuritas y la pérdida de sinapsis (en ausencia de muerte masiva de células neuronales) en modelos animales de EA temprana y leve mediante el análisis de los miARN de neuritas y/o sinapsis en sangre.

- 5 Los siguientes modelos animales de EA se pueden utilizar para detectar la destrucción de neuritas y/o la pérdida de sinapsis (en ausencia de muerte masiva de células neuronales), utilizando el análisis de los miARN de neuritas y/o sinapsis en los fluidos corporales. Los mismos modelos animales son útiles para someter a ensayo la sensibilidad y ajustar de las condiciones de los métodos de diagnóstico y de control de la presente descripción y para identificar otros miARN de neuritas y/o sinapsis y otras moléculas de ARN pequeño que se pueden utilizar como marcadores de enfermedades neurodegenerativas.

10 Se encuentran disponibles en la actualidad diversos modelos de ratones transgénicos que expresan en exceso las formas mutantes de APP humano de la enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF). Los modelos más actualmente estudiados muestran déficits cognitivos y trastornos relacionados con la edad de los marcadores sinápticos y depósito de la placa amiloide, pero algunas cepas muestran indicios de muerte celular significativa (Janus et al., 15 2000; Ashe 2001; Chapman et al., 2001; Richardson y Burns 2002). Los ejemplos de tales ratones transgénicos son (i) ratones PDAPP que expresan en exceso hAPP V717F, (ii) ratones Tg2576 que expresan en exceso hAPP 695 mutado tanto con K670N como con M671L (Hsiao et al., 1996), (iii) ratones TgAPP/Ld/2 que expresan en exceso hAPP V6421 ; (iv) ratones que expresan en exceso hAPP V717I; (v) ratones transgénicos para APP humanos con la mutación de Asp-664, que impide la escisión de caspasa y la acumulación del péptido citotóxico APP-C31 con 20 inversión parcial de la patología de tipo Alzheimer (Galvan et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103: 7130-7135). También es útil un modelo de ratón transgénico doble mutante que expresa minigenes APP que codifican mutantes de APP ligados a EAF y una variante (A246E) de presenilina 1 humana (PS1) ligada a Alzheimer familiar (EAF) de aparición temprana y un APP humano quimérico ratón/humano que alberga mutaciones ligadas a los linajes de EAF Swedish (APPswe) (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.912.410; Borchelt et al., Neuron 1997, 19: 939- 25 945; Holcomb et al., 1998). Estos ratones desarrollan numerosos depósitos de amiloide mucho más temprano que los ratones de la misma edad que expresan APPswe y PS1 humana de tipo salvaje. La expresión de minigenes de APP que codifican mutantes de AAP ligados a EAF y, en particular, la expresión simultánea del PS1 mutante humano A246E y APPswe eleva los niveles de A $\beta$  en el cerebro, y estos ratones desarrollan numerosos depósitos y placas de A $\beta$  difusos en el hipocampo y la corteza (Calhoun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96: 14088- 30 14093). De manera similar a los seres humanos que padecen EA, estos y otros modelos de animales transgénicos se caracterizan por diversos defectos cognitivos tales como la pérdida de neuronas, déficits de aprendizaje, problemas en la memoria de reconocimiento de objetos, y problemas con alternancia- referencia espacial y la memoria de trabajo (Chen et al., Nature 2000; 408:975-979).

35 Para detectar la destrucción de las neuritas y la pérdida de sinapsis (en ausencia de muerte masiva de células neuronales), se aíslan miARN de neuritas y/o sinapsis del suero/plasma sanguíneos de ratones transgénicos modelo de EA y se analizan por medio de RT-PCR, y los datos obtenidos se comparan con histopatología cerebro.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, pero se define en las reivindicaciones adjuntas a la presente memoria.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, en donde la enfermedad neurodegenerativa es un deterioro cognitivo leve, cuyo método que comprende:

5 a. determinar el nivel de un ARN pequeño de sinapsis o neuritas en una muestra de fluido corporal del sujeto, en donde el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en plasma sanguíneo, suero, orina y saliva, y en donde el ARN pequeño de sinapsis o neuritas es un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR-7, miR-125b, miR-128, miR-132, miR-134, miR-323-3p, y miR-874;

10 b. determinar el nivel de un ARN pequeño de la misma muestra de fluido corporal del sujeto, en donde el ARN pequeño es un miARN que no se expresa en el cerebro o un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR-181a, miR-491-5p, miR-10b y miR-141;

c. determinar la razón de los niveles de los ARN pequeños determinada en las etapas (a) y (b);

d. comparar la razón de los niveles de los ARN pequeños determinada en la etapa (c) con una razón de control correspondiente, y

15 e. (i) identificar el sujeto por estar afectados por la enfermedad neurodegenerativa cuando la razón de los niveles de los ARN pequeños determinada en la etapa (c) es superior a la razón de control correspondiente o (ii) identificar el sujeto por no estar afectado por la enfermedad neurodegenerativa cuando la razón de los niveles de los ARN pequeños determinada en la etapa (c) no es mayor que la razón de control correspondiente.

20 2. Un método para el control del desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, en donde la enfermedad neurodegenerativa es un deterioro cognitivo leve, cuyo método comprende:

25 a. determinar el nivel de al menos un ARN pequeño de sinapsis o neuritas en dos o más muestras de fluidos corporales del sujeto, en donde las muestras se han obtenido en puntos de tiempo separados entre sí, y en donde el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en plasma sanguíneo, suero, orina y saliva, y el ARN pequeño de sinapsis o neuritas se selecciona del grupo que consiste en miR-7, miR-125b, miR-128, miR-132, miR-134, miR-323-3p y miR 874,

b. determinar el nivel de un ARN pequeño en las mismas muestras de fluidos corporales del sujeto, en donde el ARN pequeño es un miARN que no se expresa en el cerebro o un miRNA seleccionado del grupo que consiste en miR-181a, miR-491-5p, miR-10b y miR-141;

c. determinar la razón de los niveles de los ARN pequeños determinada en las etapas (a) y (b);

30 d. comparar la razón de los niveles de dichos ARN pequeños entre la muestra o las muestras de fluido corporales obtenidas antes y obtenidas después, y

35 e. (i) determinar que el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto se acelera si la razón de los niveles de dichos ARN pequeños determinada en la etapa (c) se incrementa en la muestra o las muestras de fluido corporal obtenidas después en comparación con la muestra o las muestras obtenidas anteriormente; (ii) determinar que la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto continúa desarrollándose a la misma velocidad si la razón de los niveles de dichos ARN pequeños determinada en la etapa (c) no cambia en la muestra o las muestras de fluido corporal obtenidas más tarde en comparación con la muestra o las muestras obtenidas anteriormente, y (iii) determinar que el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto se ralentiza si la razón de los niveles de dichos ARN pequeños determinada en la etapa (c) se reduce en la muestra o las muestras de fluido corporal obtenidas más tarde en comparación con la muestra o las muestras obtenidas anteriormente.

40 3. Un método para el control de la eficacia de un tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, en donde la enfermedad neurodegenerativa es un deterioro cognitivo leve, cuyo método comprende:

45 a. determinar el nivel de al menos un ARN pequeño de sinapsis o neuritas en una muestra de fluido corporal del sujeto obtenida antes del inicio del tratamiento, y determinar el nivel de dicho ARN pequeño en una o más muestras de fluidos corporales del sujeto obtenidas en el transcurso o después del tratamiento, en donde el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en plasma sanguíneo, suero, orina y saliva, y el ARN pequeño de sinapsis o neuritas es miARN seleccionado del grupo que consiste en miR-7, miR-125b, miR-128, miR-132, miR-134, miR-323-3p, y miR-874,

50 b. determinar el nivel de un pequeño ARN en las mismas muestras de fluidos corporales del sujeto que en la etapa (a), en donde el ARN pequeño es un miARN que no se expresa en el cerebro o un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR-181a, miR-491-5p, miR-10b y miR-141;

c. determinar la razón de los niveles de los ARN pequeños determinados en las etapas (a) y (b) para cada

muestra de fluido corporal;

- 5 d. comparar las razones de los niveles de los ARN pequeños determinados en la etapa (c) para la muestra obtenida antes del inicio del tratamiento y de la muestra o las muestras obtenidas en el transcurso de o después del tratamiento, y, opcionalmente, entre las diferentes muestras obtenidas en el transcurso de o después del tratamiento, y
- e. (i) determinar que el tratamiento es eficaz si la razón de los niveles de los ARN pequeños ha disminuido en el transcurso de o después del tratamiento o (ii) determinar que el tratamiento no es eficaz si la razón de los niveles de los ARN pequeños no ha disminuido en el transcurso de o después del tratamiento.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la razón de control es un patrón predeterminado.
- 10 5. El método de la reivindicación 1, en donde la razón de control es la razón de dichos ARN pequeños en una muestra de fluido corporal procesada de una manera similar del mismo sujeto obtenido en el pasado.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el nivel del ARN pequeño se determina utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en hibridación, RT-PCR y secuenciación.

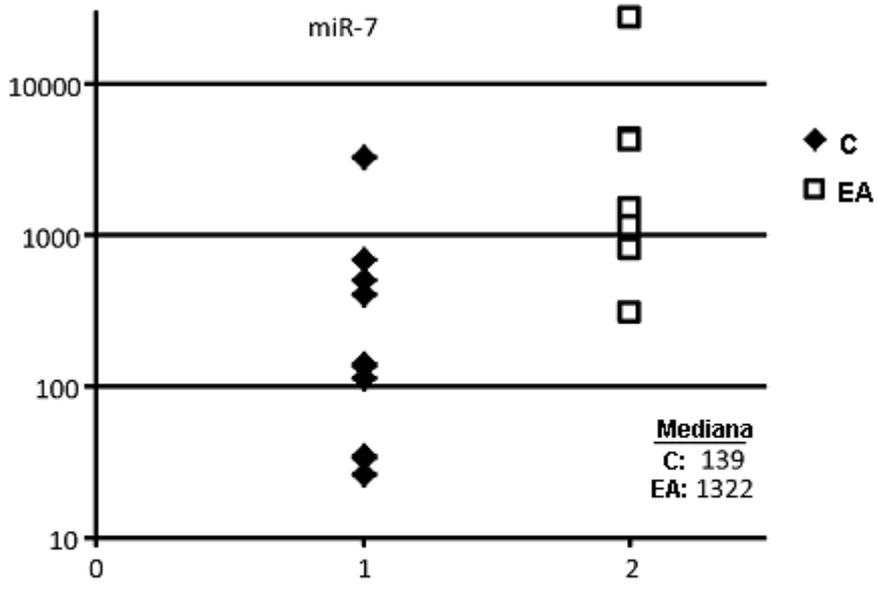


FIG. 1A

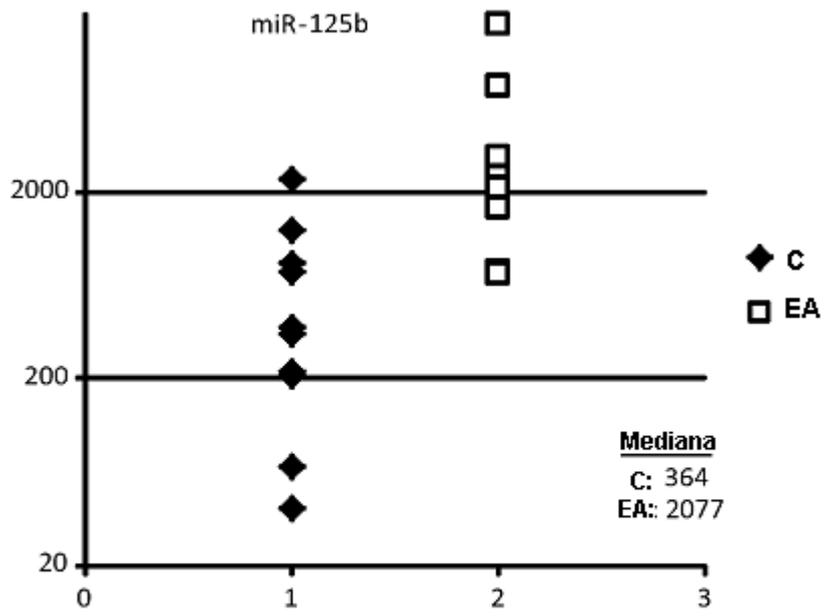


FIG. 1B

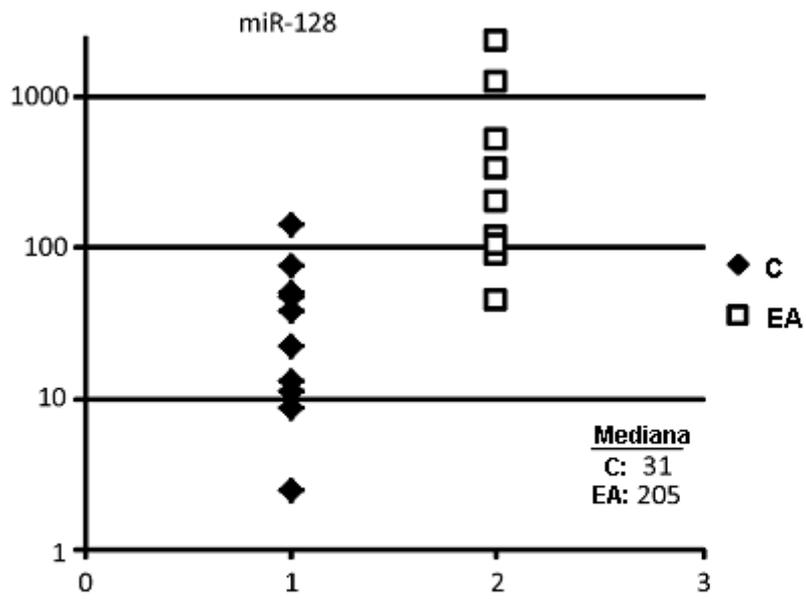


FIG. 1C

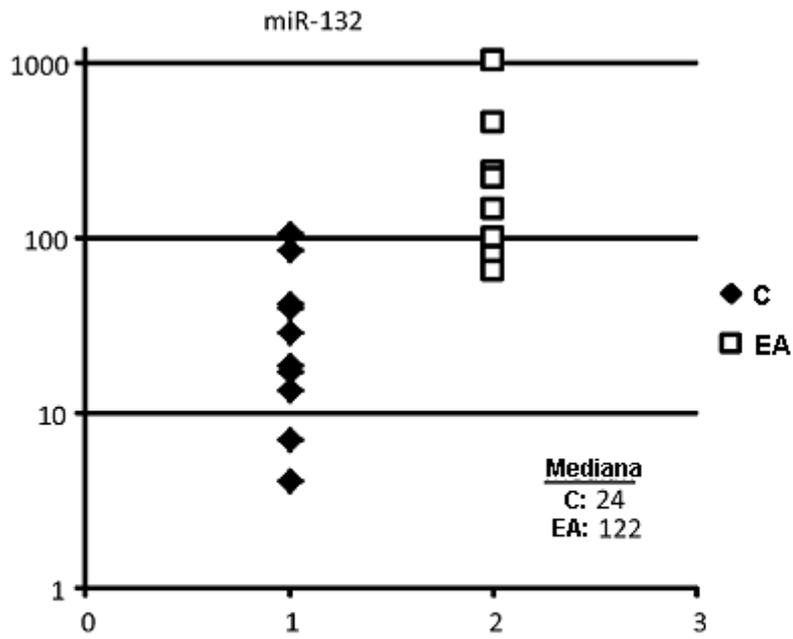


FIG. 1D

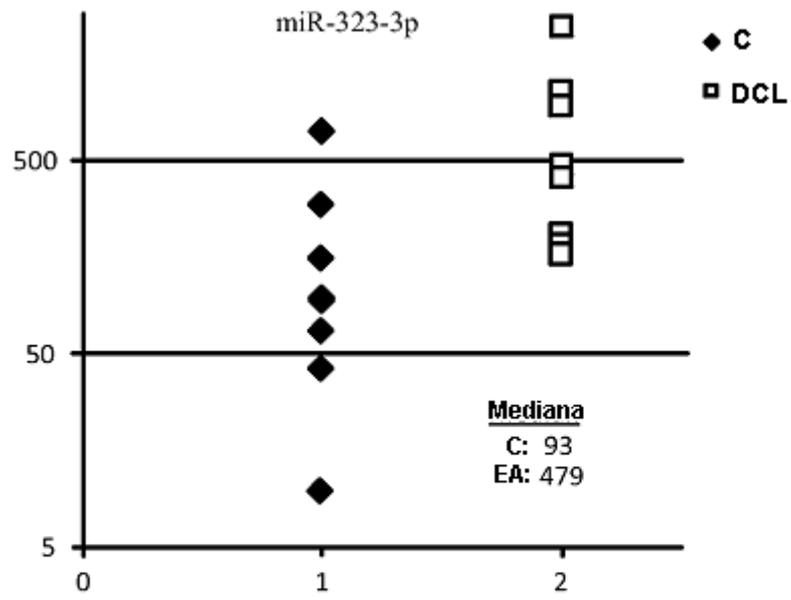


FIG. 1E

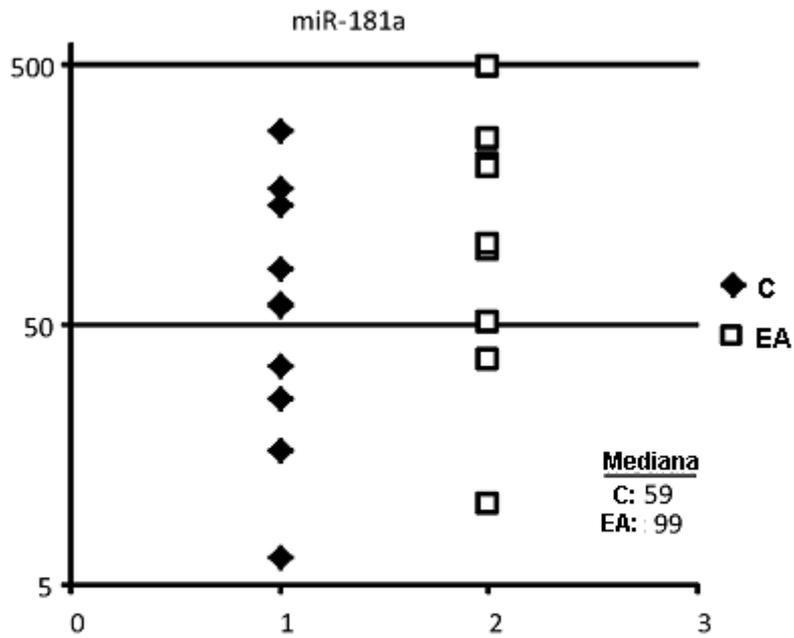


FIG. 1F

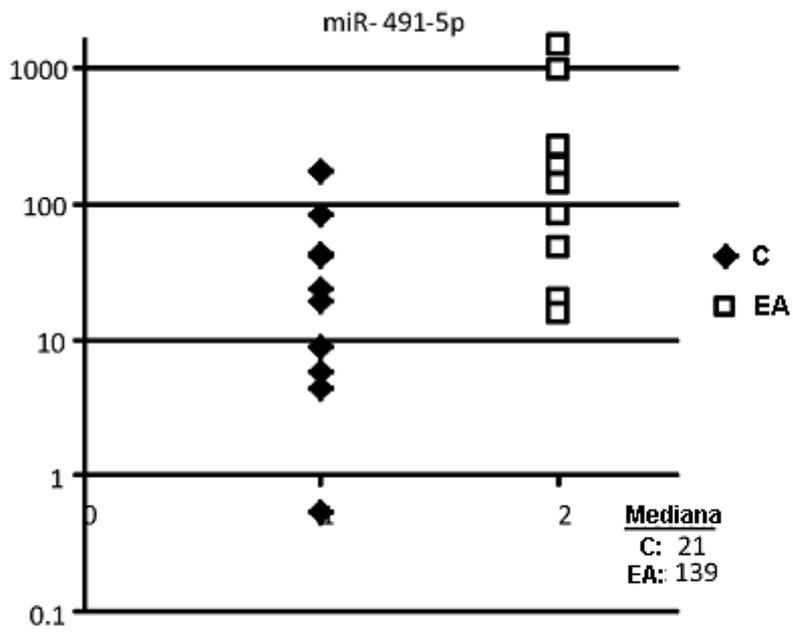


FIG. 1G

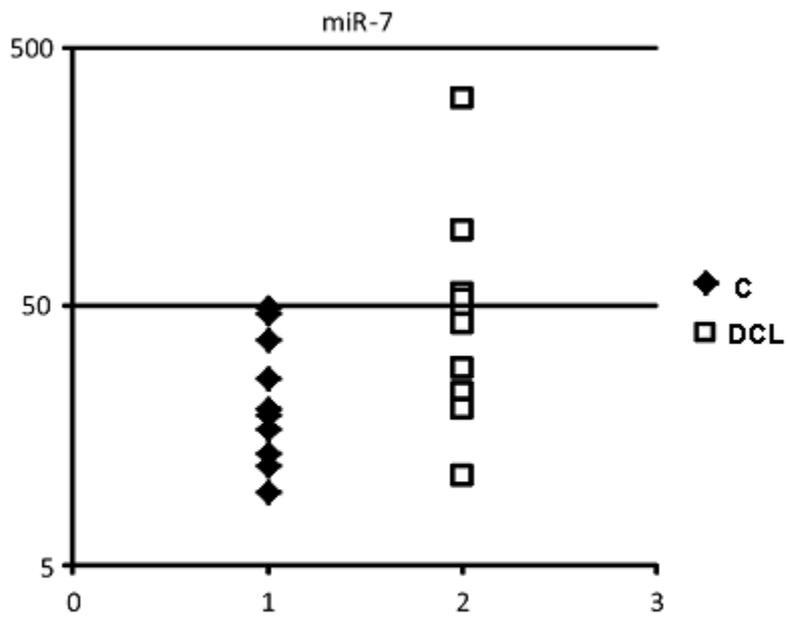


FIG. 2A

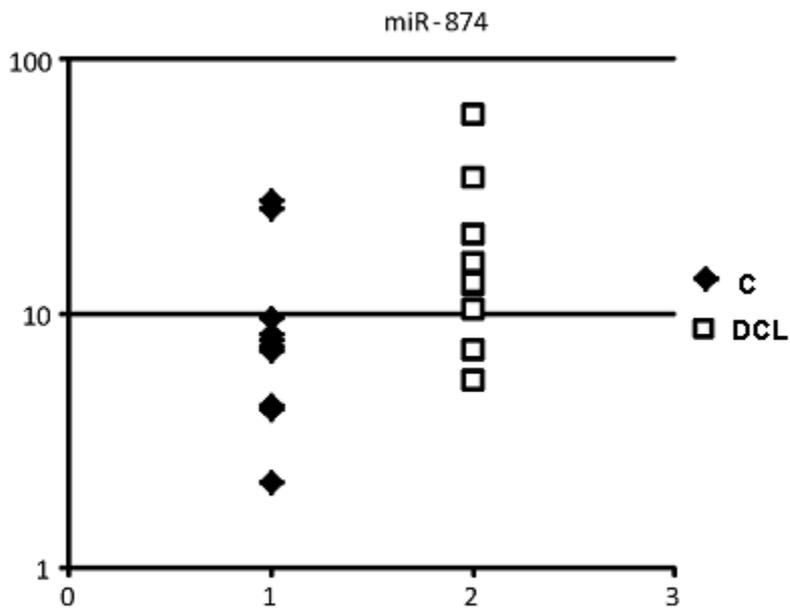


FIG. 2B

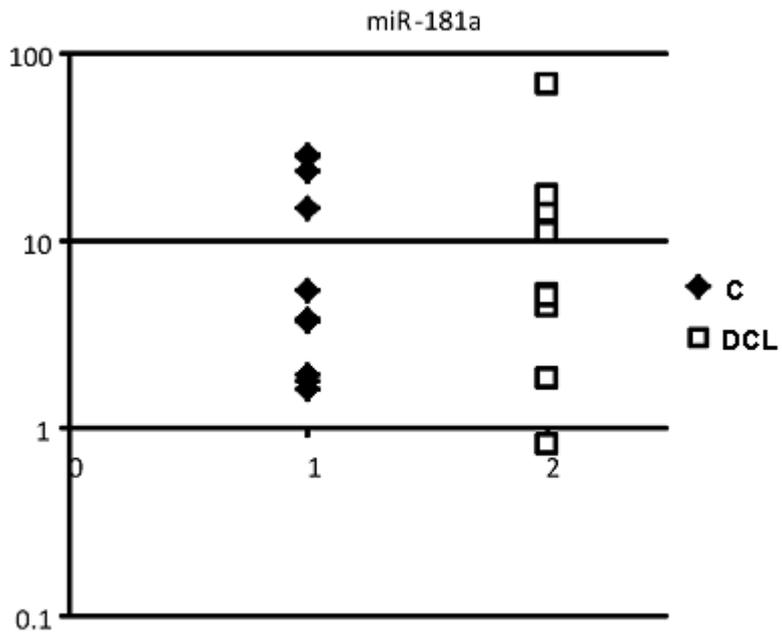


FIG. 2C

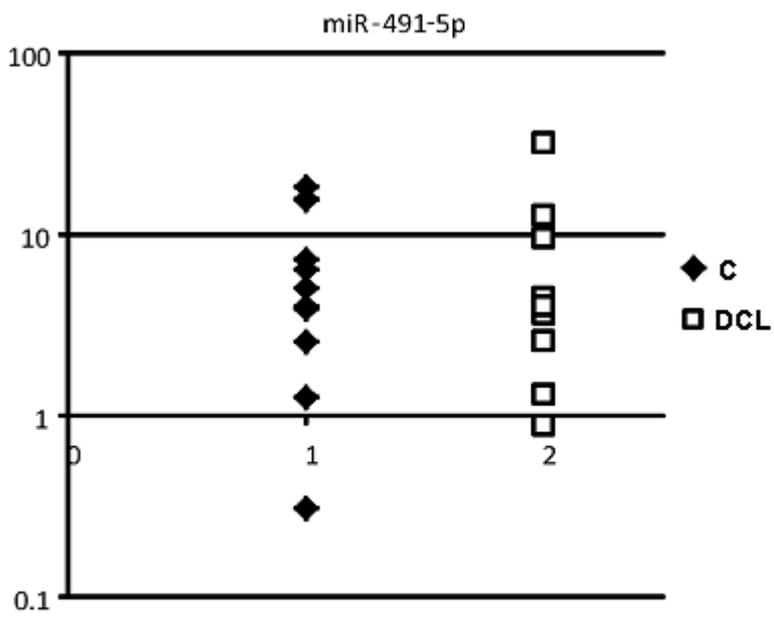


FIG. 2D

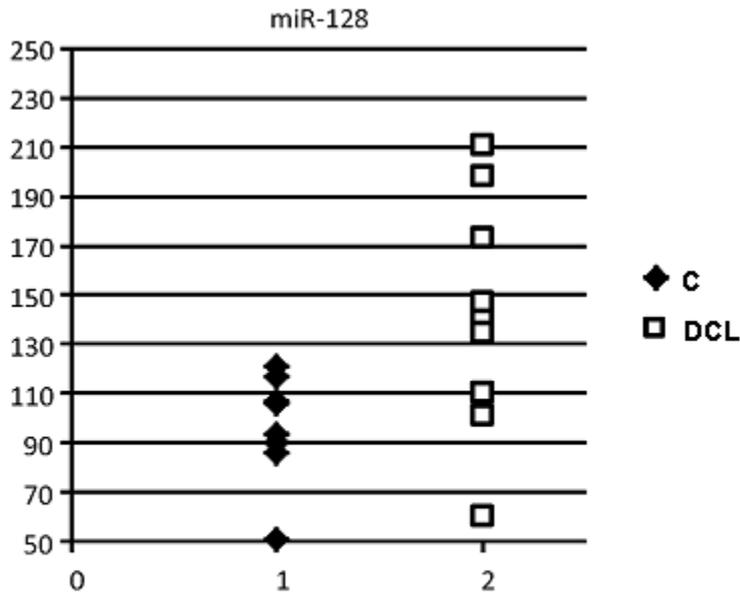


FIG. 3A

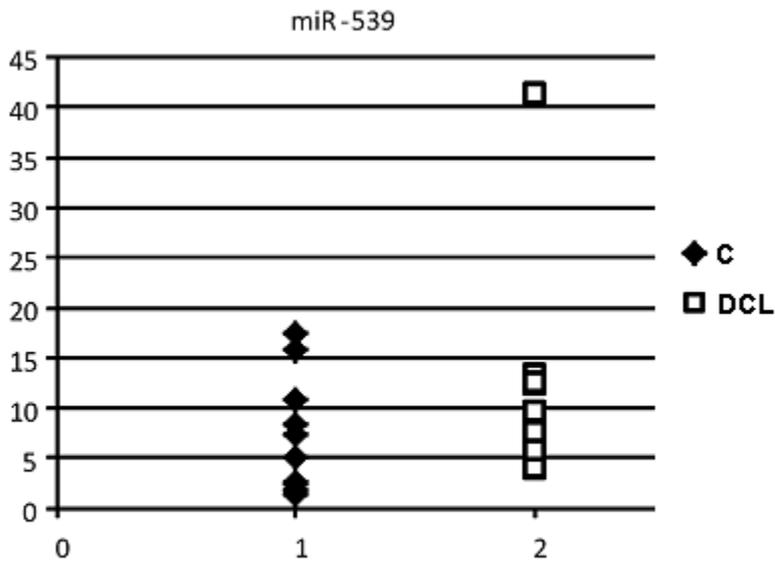


FIG. 3B

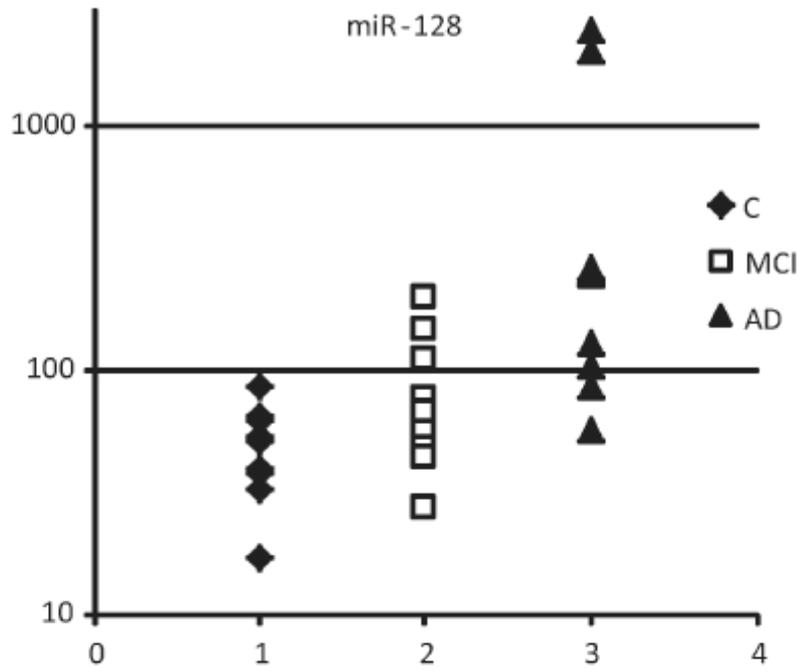


FIG. 4A

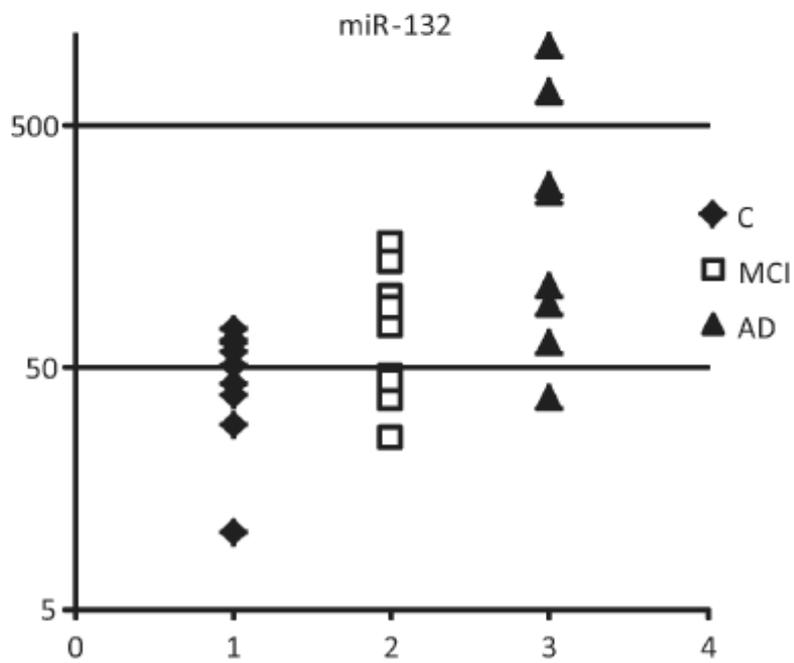


FIG. 4B

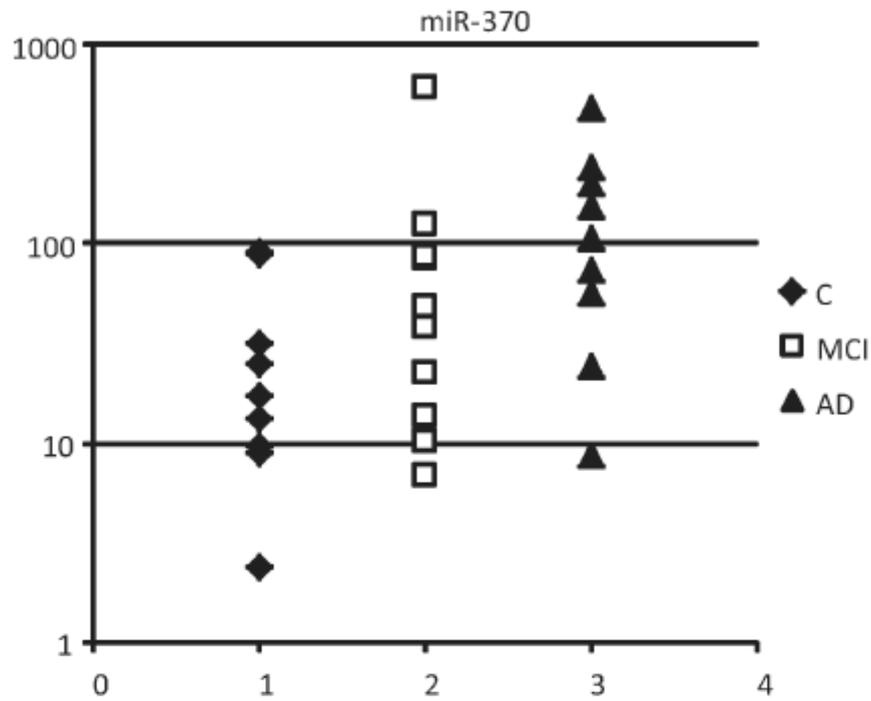


FIG. 4C

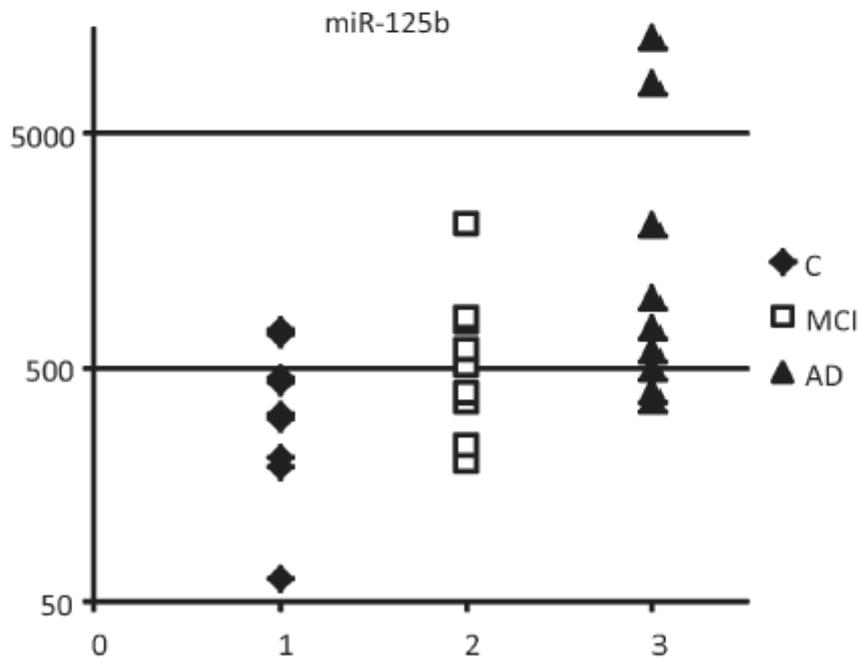


FIG. 4D