

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 678**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2015** **E 15201815 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 3184646**

54 Título: **Firmas específicas en enfermedad de alzheimer por perfiles de miarn multicéntricos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2019

73 Titular/es:

SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
Werner-von-Siemens-Strasse 1
80333 München, DE

72 Inventor/es:

KELLER, ANDREAS;
STÄHLER, CORD FRIEDRICH;
SICKERT, DANIEL y
BACKES, CHRISTINA

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 734 678 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

Firmas específicas en enfermedad de alzheimer por perfiles de miARN multicéntricos

5

La invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (AD, Alzheimer's Disease) en un paciente, en el que se determina el perfil de expresión de miARN en una muestra de sangre y una comparación del nivel de expresión de miARN definidos con una muestra de referencia, y el uso de estos miARN definidos como marcador para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

10

La enfermedad de Alzheimer generalmente se diagnostica clínicamente a partir del historial del paciente, de la anamnesis media de los parientes y las observaciones clínicas basadas en la presencia de características neurológicas y neuropsicológicas características y la ausencia de condiciones alternativas como otras enfermedades o condiciones transitorias como la alcoholización (procedimiento de exclusión). Además se pueden utilizar las imágenes médicas modernas con tomografía computarizada (CT), tomografía de resonancia magnética (MRI, magnetic resonance imaging), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT, single photon emission computed tomography) y/o tomografía por emisión de positrones (PET, positron emission tomography), para excluir otros síntomas cerebrales o subespecies de demencia. Además, se puede predecir la transición de las fases prodrómicas (deterioro cognitivo leve, MCI (mild cognitive impairment)) a la enfermedad de Alzheimer. Cuando están disponibles como herramienta de diagnóstico se utilizan la neuroimagen por SPECT y PET para confirmar el diagnóstico de Alzheimer junto con las evaluaciones que involucran la evaluación del estado mental. En una persona que ya tiene demencia, la SPECT parece ser mejor para diferenciar entre el Alzheimer y otras causas potenciales en comparación con los enfoques habituales que utilizan pruebas psicológicas y un análisis de anamnesis.

25

Los avances han llevado a propuestas de nuevos criterios diagnósticos. Se pudo desarrollar una nueva técnica, conocida como PiB PET, para mapear directa y claramente los depósitos de beta-amiloide in vivo usando un trazador que se une selectivamente a los depósitos de A-beta. El compuesto PiB-PET utiliza la exploración PET con carbono-11. Estudios recientes sugieren que PiB-PET es preciso en un 86% en cuanto a la predicción de qué pacientes con deterioro cognitivo leve desarrollarán Alzheimer dentro de dos años, y este procedimiento es aproximadamente 92% preciso en cuanto a la exclusión de la probabilidad de desarrollar Alzheimer. Se ha sugerido que la tomografía amiloide probablemente se usará en conjunto con otras marcas en el futuro, y no como alternativa. Estudios recientes han demostrado que los pacientes con AD presentan valores de glutamato (Glu) reducidos como también relaciones reducidas de Glu/creatina (Cr), Glu/Myo-inositol (ml), Glu/N-acetilaspártato (NAA) y NAA/Cr en comparación con las personas sin AD. Tanto la relación reducida de NAA/Cr como también el nivel de Glu reducido en el hipocampo pueden ser una indicación temprana de la enfermedad de Alzheimer. También se ha encontrado que el control de las desviaciones de la dehidroepiandrosterona (DHEA) en la sangre en respuesta al estrés oxidativo puede ser una prueba útil: Los pacientes con MCI no mostraron ningún cambio en la DHEA, mientras que los controles sanos sí lo hicieron. Recientemente, se ha propuesto una prueba de diagnóstico de miARN (microARN) del suero (H. Geekiyange, GA Jicha, P.T. Nelson, und C. Chan; Blood serum miRNA: Noninvasive biomarkers for Alzheimer's disease, Exp Neurol. 2012 235 2 491-496. doi: 10.1016 / j.expneurol.2011.11.026).

30

35

40

45

Hui Dong et al .; Los perfiles de microARN en suero sirven como nuevos biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, marcadores de enfermedad 2015, 14 (1): 27, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/625659>, describe la identificación y validación del potencial de los miARN circulantes como biomarcador para la enfermedad de Alzheimer.

50

El documento EP 2 733 220 A1 se refiere a marcadores de miARN que son particularmente útiles para el diagnóstico de enfermedades neuronales tales como la enfermedad de Alzheimer.

El documento WO 2013/003350 A2 describe un procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, en el que se determina el nivel de al menos un miARN en una muestra de un paciente.

55

Además, el documento WO 2009/009457 A1 describe procedimientos para diagnosticar y/o pronosticar la enfermedad de Alzheimer en pacientes mediante la medición de la cantidad de uno o más micro-ARN en una muestra biológica.

60

El documento WO 2011/057003 A2 describe procedimientos para la detección de patologías neuronales utilizando un análisis cuantitativo en fluidos corporales de ARN sináptico y/o neurítico y el uso de los mismos para el diagnóstico temprano y el monitoreo de enfermedades neurodegenerativas.

65

Michel J. Weber, New human and mouse microRNA genes found by homology search, FEBS Journal 2005, 272(1), páginas 59-73 dan a conocer la determinación de miARN mediante la determinación sistemática de inter-especies ortólogos de precursores de miARN.

El documento WO 2013/118066 A1 se refiere al uso del perfil de expresión de miARN y los genes diana regulados de este modo para el diagnóstico, pronóstico y el uso de inhibidores de miR-199a-5p para el tratamiento de enfermedades fibroproliferativas.

5 Sin embargo, el diagnóstico precoz y seguro de la enfermedad de Alzheimer (AD) basado en biomarcadores moleculares no invasivos sigue siendo un desafío. Para lograr el objetivo de la presente invención, los inventores proponen la creación de un perfil de expresión de una combinación de micro-ARN no codificantes (miARN) para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer a partir de muestras de sangre, en particular células sanguíneas.

10 Los inventores han encontrado que un cambio en el perfil de expresión de ciertos miARN en comparación con pacientes sanos hace posible diagnosticar la enfermedad de Alzheimer.

Según un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende: proporcionar una muestra de sangre de un paciente, creando un perfil de expresión de miARN a partir de la muestra de sangre y comparar el nivel de expresión de un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p y/o que comprende una secuencia de los mismos, que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, con un nivel de referencia, permitiendo la comparación el diagnóstico de una enfermedad con Alzheimer.

20 Otro aspecto de la invención se relaciona con el uso de un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, como marcadores para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

25 Otros aspectos de la presente invención se pueden encontrar en las reivindicaciones dependientes y en la descripción detallada.

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica.

30 Los micro-ARN o miARN o los ácidos micro-ribonucleicos son una clase de ARN cortos no codificantes, por ejemplo, desempeñan un papel en la expresión génica. Un miARN es aquí un polinucleótido que tiene un número fijo de bases, por ejemplo, menos de 500, menos de 200, menos de 100, menos de 50 o menos de 30, pero por ejemplo más de 5, 10 o 14 bases, y una secuencia definida. Por ejemplo, también se puede obtener ADNc a partir de él, de modo que también se pueden preparar ADNc a partir de los miARN en el procedimiento de acuerdo con la invención, que luego se pueden comparar de manera similar con los niveles de ADNc que se obtienen a partir de miARN de pacientes que no tienen MS, en particular sin RRMS.

40 En lo sucesivo como también previamente, las referencias a ciertos miARN se refieren a las secuencias como se pueden encontrar en la base de datos Mirbase (<http://mirbase.org/>), en particular Mirbase20, es decir, la versión 20 de Mirbase.

Además, las secuencias también se muestran en la Tabla 1 a continuación. La Tabla 1 muestra los miARN en la forma madura (mature Form), que puede diferir de la forma de horquilla (stem loop form).

45

Tabla 1: Secuencias de miARN

Forma madura	Secuencia de la forma madura	SEC ID NO:
hsa-miR-345-5p	gcugacuccuaguccagggcuc	1
hsa-miR-5006-3p	uuuccuuuccauccuggcag	2
hsa-miR-7848-3p	cuaccucggucugcuaccaca	3
hsa-miR-6817-3p	ucucucugacuccauggca	4
hsa-miR-361-5p	uuacagaaucuccagggguac	5
hsa-miR-3157-3p	cugccuagucuagcugaagcu	6
hsa-miR-4482-3p	uuucuauuucucaguggggcuc	7
hsa-miR-28-3p	cacuagauugugagcuccugga	8
hsa-miR-151a-3p	cuagacugaagcuccuugagg	9
hsa-miR-1468-5p	cuccguuugccguuucgcug	10

Forma madura	Secuencia de la forma madura	SEC ID NO:
hsa-miR-532-5p	caugccuugaguguaggaccgu	11
hsa-miR-17-3p	acugcagugaaggcacuuguag	12
hsa-miR-30a-3p	cuucagucggauguuugcagc	13

La presente invención en un primer aspecto se refiere a un procedimiento para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende:

5 proporcionar una muestra de sangre de un paciente,

crear un perfil de expresión de miARN a partir de la muestra de sangre, y

10 comparar el nivel de expresión de un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p y/o que comprende una secuencia que difiere de esta secuencia respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, con un nivel de referencia, permitiendo la comparación el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Se describe un procedimiento para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente que comprende:

15 proporcionar una muestra de sangre de un paciente,

crear un perfil de expresión de miARN a partir de la muestra de sangre, y

20 comparar el nivel de expresión de al menos un miARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa-miR-6817 3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3157-3p, y hsa-miR-4482-3p, preferiblemente hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-361 -5p, y hsa-miR-3157-3p, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, con un nivel de referencia, permitiendo la comparación el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

30 El perfil de expresión aquí es un perfil de la expresión de los miARN, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19. 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más miARN, en la muestra, según ciertas realizaciones en forma cuantitativa, mientras que el nivel de expresión indica la cantidad respectiva de un miARN expresado.

35 La provisión de la muestra de sangre no está particularmente limitada en este caso, pero es en particular no invasiva, sino que se usa una muestra de sangre ya tomada. Según ciertas realizaciones, también se puede incluir la extracción y/o preparación de una muestra de sangre. Aquí, una muestra de sangre comprende una muestra de sangre completa, así como fracciones de muestras de sangre, como el plasma, suero, etc., o también células en la muestra de sangre como las células mononucleares de sangre periférica. Según ciertas realizaciones, la muestra de sangre comprende células sanguíneas o consiste en células sanguíneas.

40 El paciente del que se proporciona la muestra de sangre tampoco está particularmente limitado, y puede incluir, por ejemplo, vertebrados, particularmente mamíferos, pero según ciertas realizaciones es un ser humano. En particular, de acuerdo con ciertas realizaciones, el presente procedimiento se aplica a pacientes, por ejemplo, personas sospechosas de tener la enfermedad de Alzheimer y/o que fueron diagnosticadas con deterioro cognitivo leve (MCI).

45 Las secuencias que se usan en el procedimiento según la invención se pueden usar aquí de forma particular en el caso de un cambio en el nivel de expresión de uno o más de los miARN, que comprenden una secuencia correspondiente.

50 Además, el procedimiento para crear un perfil de expresión de miARN no está particularmente limitado y puede incluir, por ejemplo, procedimientos microbiológicos comunes para la determinación de ácidos nucleicos, en cuyo caso se usa un procedimiento semicuantitativo o cuantitativo, en particular cuantitativo para la comparación con el nivel de referencia según ciertas realizaciones. Según ciertas realizaciones, el establecimiento del perfil de expresión de los miARN comprende al menos un procedimiento seleccionado del grupo que comprende una hibridación de ácido nucleico, una amplificación de ácido nucleico, una extensión de polimerasa, una secuenciación, una espectrometría de masas y cualquier combinación de las mismas.

60 En este caso, una hibridación de ácidos nucleicos puede incluir el uso de matrices, por ejemplo, micromatrices y/o hibridación *in situ*. Por ejemplo, una matriz puede incluir el uso de secuencias complementarias a las secuencias particulares, es decir, miARN que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR Hsa-miR-3617-5p, hsa-miR-3157-3p, y hsa-miR-4482-3p, preferiblemente hsa-

miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-361-5p, y hsa-miR-3157-3p, y adicionalmente, según ciertas realizaciones miARN adicionales que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-28-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-1468-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-17-3p, y hsa-miR-30a, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, que por ejemplo puede aplicarse adecuadamente a un soporte. Para la cuantificación es posible, por ejemplo, realizar un marcado los miARN de la muestra con marcadores como marcadores de fluorescencia o marcadores de radionucleótidos.

Alternativa o adicionalmente también se puede llevar a cabo de una manera adecuada una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), preferiblemente una PCR cuantitativa (qPCR), en particular una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR, PCR cuantitativa en tiempo real).

También se pueden concebir procedimientos de secuenciación, como la secuenciación de próxima generación y/o la espectrometría de masas, en particular la espectrometría de masas cuantitativa.

La comparación con un nivel de referencia en el procedimiento según la invención no está particularmente limitada y puede comprender en particular una comparación con la muestra de un individuo sano y/o un individuo con un diagnóstico de MCI en el que no se diagnostica la enfermedad de Alzheimer. Así, el procedimiento no solo permite un diagnóstico, sino también una determinación de estadios (Staging). Mediante tal comparación, por ejemplo, se puede hacer posible el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, una comparación puede basarse en enfoques matemáticos tales como correlaciones, procedimientos estadísticos, teorías de probabilidad, enfoques de teoría de la información o combinaciones de los mismos.

Para una declaración mejorada, es ventajosa una comparación estadística con un gran número de muestras de pacientes sanos que padecen Alzheimer, por lo que dichos datos también pueden tomarse, por ejemplo, de una base de datos adecuada y/o determinarse utilizando una función matemática o un algoritmo desarrollado a partir de ellos. El procedimiento estadístico no está particularmente limitado en este caso y se puede llevar a cabo, por ejemplo, asistido por computadora. Por ejemplo, se puede usar una prueba t, una prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, la determinación del área bajo la curva (AUC), etc.

Según ciertas realizaciones el nivel de referencia se obtiene a partir de una pluralidad de muestras de pacientes a los que un primer grupo ha sido diagnosticado con AD, y un segundo grupo no tiene un diagnóstico de AD, que es saludable a este respecto, preferiblemente los grupos de edad y sexo y el nivel de referencia se determina a partir del grupo de pacientes sanos. Para una declaración más extensa según ciertas realizaciones, también es posible considerar grupos de control con un diagnóstico de MCI y/o MS. Según ciertas realizaciones, en este caso se determina un nivel de referencia del mismo tipo de muestra que la muestra que se va a determinar.

Como desviación de la secuencia aquí debe entenderse como una variación en la secuencia, por ejemplo, una adición, una inserción, una eliminación o un intercambio de una base en la secuencia en comparación con la secuencia original, que se proporciona por ejemplo en la Tabla 1, en particular una supresión y/o un intercambio de una única base. Así, por ejemplo, una supresión de 1 o 2 bases puede tener lugar en uno y/o ambos extremos de la secuencia, en donde se suprimen un máximo de 3 bases, preferiblemente un máximo de 2 bases, más preferiblemente 1 base y en particular no se elimina ninguna base. También adicionalmente o alternativamente, es posible un cambio de 1 o más bases dentro de la secuencia, nuevamente con un cambio máximo de 3 bases, preferiblemente 2 bases, más preferiblemente 1 base, y lo más preferiblemente no base en comparación con las secuencias de hsa-miR 345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa-miR-6817-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3157-3p y hsa-miR-4482 3p, preferiblemente hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-361-5p, y hsa-miR-3157-3p, y/o hsa-miR-28-3p, hsa miR-151a-3p, hsa-miR-1468-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-17-3p, y hsa-miR-30a.

Por lo tanto según ciertas realizaciones tiene lugar una comparación del nivel de expresión de al menos un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p con un nivel de referencia.

Se describe una comparación del nivel de expresión de al menos un miARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa miR-6817-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3157-3p, y hsa-miR-4482-3p, preferiblemente hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa miR-361-5p, y hsa-miR-3157-3p, con un nivel de referencia.

Tiene lugar al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-345-5p y/o una secuencia que difiere de esta secuencia, es decir, de la secuencia de miARN, hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-5006-3p y/o una secuencia que difiere de esta secuencia hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-7848-3p y/o una secuencia que difiere de esta secuencia hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-6817-3p y/o una secuencia que difiere de esta secuencia hasta

en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-361-5p y/o una secuencia que difiere de esta secuencia hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-3157-3p y/o una secuencia que difiere de esta secuencia hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-4482-3p y/o una secuencia que difiere de esta secuencia hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base.

Según ciertas realizaciones, tiene lugar al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-345-5p. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-5006-3p. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-7848-3p. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-6817-3p. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-361-5p. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-3157-3p. Se describe al menos una comparación con una secuencia que comprende el miARN hsa-miR-4482-3p.

Además, según ciertas realizaciones, se compara el nivel de expresión de al menos un miARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa-miR-6817-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3157-3p, hsa-miR-4482-3p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-1468-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-17-3p, y hsa-miR-30a-3p, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, con un nivel de referencia, permitiendo la comparación el diagnóstico de una enfermedad con Alzheimer.

Además, según ciertas realizaciones, el nivel de expresión de al menos un miARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-28-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-1468-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-17-3p, y hsa-miR-30a-3p, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, se compara con un nivel de referencia, permitiendo la comparación el diagnóstico de una enfermedad con Alzheimer.

Según ciertas realizaciones, en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 miARN que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa-miR-6817-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3157-3p, hsa-miR-4482-3p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-1468-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-17-3p, y hsa-miR-30a-3p, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, observando un cambio en el nivel de expresión comparado con un nivel de referencia, en donde en un miARN que comprende una secuencia que se selecciona de hsa-miR-345-5p, y/o que comprende una secuencia que difiere de esta secuencia respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, observándose un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia. Según ciertas realizaciones, en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 miARN que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa-miR-6817-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3157-3p, hsa-miR-4482-3p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-1468-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-17-3p, y hsa-miR-30a-3p, se observa un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia, en donde en un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p, se observa un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia.

Según ciertas realizaciones, en al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 miARN que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa-miR-6817-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3157-3p, y hsa-miR-4482-3p, preferiblemente hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-361-5p, y hsa-miR-3157-3p, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, se observa un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia, en donde en un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p, y/o que comprende una secuencia que difiere de esta secuencia respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, observándose un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia. Según ciertas realizaciones, en al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 miARN que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa-miR-6817-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3157-3p, y hsa-miR-4482-3p, preferiblemente hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-361-5p, y hsa-miR-3157-3p, se observa un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia, observándose en un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p, un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia.

En el caso de un cambio en el nivel de expresión de más de un miARN, el nivel de importancia para un diagnóstico con enfermedad de Alzheimer puede aumentar considerablemente.

El miARN se selecciona del grupo que consiste en hsa-miR-345, y/o que tiene una secuencia que difiere de esta secuencia hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base. En ciertas realizaciones el miARN es hsa-miR-345. Según ciertas realizaciones el otro miARN que también está determinado al miARN

que es hsa-miR-345-5p y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en hsa-miR-5006, hsa-miR-7848, hsa-miR-6817, hsa-miR-361, hsa-miR-3157, hsa -miR-4482, hsa-miR-28, hsa-miR-151a, hsa-miR-1468, hsa-miR-532, hsa-miR-17, y hsa-miR-30a, y/o con una secuencia que difiere de esta secuencia hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base. Según ciertas realizaciones, el otro miARN que también está determinado al miARN que es hsa-miR-345-5p y/o comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en hsa-miR-5006, hsa-miR-7848, hsa-miR-6817, hsa-miR-361, hsa-miR-3157, hsa -miR-4482, hsa-miR-28, hsa-miR-151a, hsa-miR-1468, hsa-miR-532, hsa-miR-17 y hsa-miR-30a. Según ciertas realizaciones también se determina adicionalmente el nivel de expresión de al menos un miARN seleccionado del grupo que consiste en hsa-miR-5006, hsa-miR-7848, hsa-miR-6817, hsa-miR-361, hsa-miR. 3157, hsa-miR-4482, hsa-miR-28, hsa-miR-151a, hsa-miR-1468, hsa-miR-532, hsa-miR-17 y hsa-miR-30a.

Estas realizaciones del miARN corresponden aquí a la forma de tallo-bucle o a la forma en horquilla que se correlaciona con la forma madura detectada como se muestra en la Tabla 2 (tanto para los miARN de uso según la invención como para los otros miARN que pueden usarse en el procedimiento según la invención), y por ejemplo, en las muestras se pueden incluir como tales. En consecuencia, la comparación se puede hacer en lugar de con la forma madura correspondiente también con la forma tallo-bucle correspondiente.

Tabla 2: Correlación entre la forma del tallo-bucle y la forma madura

Forma de tallo-bucle	SEC ID NO:	Forma madura	Secuencia de la forma madura
hsa-miR-345	14	hsa-miR-345-5p	gcugacuccuaguccagggcuc
hsa-miR-5006	15	hsa-miR-5006-3p	uuuccuuuccauccuggcag
hsa-miR-7848	16	hsa-miR-7848-3p	cuaccucggucugcuuaccaca
hsa-miR-6817	17	hsa-miR-6817-3p	ucucucugacuccauggca
hsa-miR-361	18	hsa-miR-361-5p	uuaucagaauccagggguac
hsa-miR-3157	19	hsa-miR-3157-3p	cugccuagucuagcugaagcu
hsa-miR-4482	20	hsa-miR-4482-3p	uuucuauuucucaguggggcuc
hsa-miR-28	21	hsa-miR-28-3p	cacuagauugugagcuccugga
hsa-miR-151a	22	hsa-miR-151a-3p	cuagacugaagcuccuugagg
hsa-miR-1468	23	hsa-miR-1468-5p	cuccguuugccguuucgcug
hsa-miR-532	24	hsa-miR-532-5p	caugccuugaguguaggaccgu
hsa-miR-17	25	hsa-miR-17-3p	acugcagugaaggcacuuguag
hsa-miR-30a	26	hsa-miR-30a-3p	cuucagucggauguuugcagc

Las secuencias de ácido nucleico de las formas de tallo-bucle según la Tabla 2 son las siguientes:

14
 acccaaacc uaggucugcu gacuccuagu ccagggcucg ugauggcugg
 uggggccuga acgagggguc uggaggccug gguuugaaua ucgacagc

15
 aaccuuagg gggcuguggu uugccagggc aggaggugga agggagcccc
 auuuacagug guaacuuccu uuuccuuucc auccuggcag gcuucagaga
 acuuuaccag

16
 gcuggggcug ggugggugug gcaggccac cuuggguaug caaagcucug
 acaguguuuc acuugcuacc cucggucugc uuaccacacu cccaguucug c

ES 2 734 678 T3

17

aggauucugc cauaggaagc uuggagugga acugaccugc cccuuucuc
ucugacucca uggcag

18

ggagcuuauc agaaucucca gggguacuuu auaauucaa aaagucuccc
aggugugauu cugauuugcu uc

19

5 ggggaagggcu ucagccaggc uagugcaguc ugcuuugugc caacacuggg
gugaugacug ccuagucua gcugaagcuu uuccc

20

agugagcaac ccaguggggcu auggaaaugu guggaagaug gcauuucua
uucucagugg ggcucuace

10

21

gguccuugcc cucaaggagc ucacagucua uugaguacc uuucugacuu ucca-
cuaga uugugagcuc cuggagggca ggcacu

22

uuuccugccc ucgaggagcu cacagucuaug uaugucucau cccuacuag a-
cugaagcuc cuagaggaca gggauugua uacucaccuc

23

gguggguggu uucuccguuu gccuguuucg cugaugugca uucaacucau
15 ucucagcaaa auaagcaau ggaaaauucg uccauc

24

cgacuugcuu ucucuccucc augccuugag uguaggaccg uuggcaucuu
aaauaccuc ccacaccaa ggcuuugcaga agagcgagcc u

25

gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu
acugcaguga aggcacuugu agcauuauugg ugac

20

26

gcgacuguaa acauccugca cuggaagcug ugaagccaca gaugggcuuu
cagucggaug uuugcagcug c

25

Según ciertas realizaciones, en al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7, miARN que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345, hsa-miR-5006, hsa-miR -7848, hsa-miR-6817, hsa-miR-361, hsa-miR-3157 y hsa-miR-4482, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, se observa un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia, en donde en un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p, y/o que comprende una secuencia, que difiere de esta secuencia respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, se observa un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia. Según ciertas realizaciones, en al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7, miARN que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345, hsa-miR-5006, hsa-miR Hsa-miR-6817, hsa-miR-361, hsa-miR-3157 y hsa-miR-4482, se observa un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia, en donde en un miARN, que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p, se observa un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia.

35

Según un aspecto adicional la invención se relaciona con el uso de un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p y/o que comprende una secuencia que difiere de esta secuencia respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, como marcador para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

5

Se describe el uso de al menos un miARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa-miR Hsa-miR-3157-3p, y hsa-miR-4482-3p, preferiblemente hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR 361-5p, y hsa-miR-3157-3p, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, como marcador para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones se utiliza un miARN que comprende una secuencia que consiste en hsa-miR-345-5p. Se describe el uso de al menos un miARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa-miR Hsa-miR-3157-3p, y hsa-miR-4482-3p, preferiblemente hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR 361-5p, y hsa-miR-3157-3p.

10

15

Aquí se describe que el miARN es al menos uno que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345, hsa-miR-5006, hsa-miR-7848, hsa-miR-6817, hsa -miR-361, hsa-miR-3157 y hsa-miR-4482, preferiblemente hsa-miR-345, hsa-miR-5006, hsa-miR-361, y hsa-miR-3157, y/o que presenta una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base. Aquí se describe que el miARN es al menos uno que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345, hsa-miR-5006, hsa-miR-7848, hsa-miR-6817, hsa -miR-361, hsa-miR-3157 y hsa-miR-4482, preferiblemente hsa-miR-345, hsa-miR-5006, hsa-miR-361, y hsa-miR-3157.

20

25

También se describe un kit para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en una muestra de sangre de un paciente, que comprende:

30

sondas y/o cebadores para detectar al menos una secuencia de miARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p , hsa-miR-6817-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3157-3p, y hsa-miR-4482-3p, preferiblemente hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p , hsa-miR-361-5p, y hsa-miR-3157-3p, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base.

35

El kit puede comprender sondas y/o cebadores para detectar al menos una secuencia de miARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR Hsa-miR-3617-5p, hsa-miR-3157-3p, y hsa-miR-4482-3p, preferiblemente hsa-miR-345-5p, hsa-miR 5006-3p, hsa-miR-361-5p, y hsa-miR-3157-3p.

40

El kit puede comprender sondas y/o cebadores para detectar al menos una secuencia de miARN que presente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345, hsa-miR-5006, hsa-miR-7848, hsa miR-6817, hsa-miR-361, hsa-miR-3157 y hsa-miR-4482, preferiblemente hsa-miR-345, hsa-miR-5006, hsa-miR-361, y hsa-miR-3157, y/o que presenta una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base.

45

El kit puede comprender sondas y/o cebadores para detectar al menos una secuencia de miARN que presente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-345, hsa-miR-5006, hsa-miR-7848, hsa miR-6817, hsa-miR-361, hsa-miR-3157 y hsa-miR-4482, preferiblemente hsa-miR-345, hsa-miR-5006, hsa-miR-361, y hsa-miR-3157.

50

El kit puede comprender además sondas y/o cebadores para detectar al menos una secuencia de miARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-28-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa miR-1468-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-17-3p, y hsa-miR-30a-3p, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, preferiblemente sondas y/o cebadores para la detección de al menos una secuencia de miARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-28-3p, hsa miR-151a-3p, hsa-miR-1468-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-17-3p, y hsa-miR-30a-3p. En particular el kit puede comprender además sondas y/o cebadores para detectar al menos una secuencia de miARN que presente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-28, hsa-miR-151a, hsa-miR-1468 , hsa-miR-532, hsa-miR-17 y hsa-miR-30a, y/o que presente una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, preferiblemente sondas y/o cebadores para la detección de al menos una secuencia de miARN que presente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-28, hsa-miR-151a, hsa-miR-1468, hsa-miR 532, hsa-miR-17 y hsa-miR-30a.

55

60

El kit puede comprender sondas y/o cebadores para detectar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de las secuencias anteriores.

65

Las sondas y/o cebadores no están particularmente limitados en este caso y pueden comprender, por ejemplo, oligómeros que presentan una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, también una secuencia de ADNc que es complementaria de la secuencia a detectar.

5 Además, también se pueden proporcionar otras sondas y/o cebadores como controles, por ejemplo, de otros miARN en los que no se producen cambios en el perfil de expresión en comparación con los pacientes sin enfermedad AD. También se pueden proporcionar controles para la unión no específica y/o la hibridación.

Los cebadores y/o sondas así como, dado el caso, los controles pueden aplicarse a un sustrato adecuado.

10 El kit puede incluir además enzimas y/o reactivos para llevar a cabo una RT-PCR, en particular qRT-PCR, aunque estos no están particularmente limitados. Los reactivos también pueden incluir, por ejemplo, marcadores, por ejemplo para marcado de fluorescencia y/o marcado con radionucleótidos. El kit también puede comprender reactivos para la síntesis de ADNc a partir de los miARN antes de la PCR, preferiblemente qPCR y/o RT-PCR, en particular qRT-PCR.

15 Las realizaciones, configuraciones y perfeccionamientos anteriores pueden, si es apropiado, combinarse entre sí según se desee. Otras posibles configuraciones, perfeccionamientos e implementaciones de la invención también incluyen combinaciones de características de la invención que no se han mencionado explícitamente anteriormente o se describen a continuación en relación a los ejemplos de realización. En particular, el experto en la materia también añadirá aspectos individuales como mejoras o adiciones a la forma básica respectiva de la presente invención.

20 La invención se aclarará adicionalmente a continuación por medio de realizaciones ejemplo que, sin embargo, no limitan la invención.

Ejemplo 1

30 En el ejemplo, se examinaron muestras de individuos mediante secuenciación de alto rendimiento (high throughput sequencing) como una tecnología imparcial. Se realizó un estudio multicéntrico de casos y controles a ciegas (multi-centric case-control study) con 294 individuos, incluidos 107 pacientes con AD, 20 pacientes con MCI, 90 pacientes con MS y 77 controles de edad y sexo. Se examinaron los miRNomes -es decir unidades completas de microARN- de todos los individuos de manera convencional utilizando la secuenciación de próxima generación (NGS). Los pacientes con AD y los controles se dividieron a este respecto en una primera cohorte de 54 pacientes con AD y 22 controles de los Estados Unidos, que fueron revisados inicialmente, y una segunda cohorte de replicación con 53 pacientes con AD y 55 controles de un hospital universitario alemán.

40 Al llevar a cabo la NGS con los 294 individuos, se generaron aproximadamente 6 mil millones de secuencias cortas de ARN como valores leídos (reads). A partir de los datos de EE.UU. Y de Alemania se perfilaron un grupo de AD y un grupo de control. Se encontraron un total de 586 miARN en la sangre. En la cohorte de los EE.UU. se modificaron 210 miARN en la expresión entre las muestras de AD y de control, y en la cohorte alemana de 135 miARN. En ambos estudios se encontró una superposición significativa ($p < 0,00001$) de 69 miARN. De estos el 96% de la dirección de expresión fue consistente en ambas cohortes y los valores del área bajo la curva (AUC, area under curve) mostraron una correlación altamente significativa ($p < 10^{-16}$) de 0,92 (95% intervalo de confianza (IC)). desde 0,87-0,95).

Los miARN estadísticamente significativos encontrados aquí que pueden usarse para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer se dan en la Tabla 3.

50 Los miARN en la firma parecen estar involucrados en la disfunción mitocondrial por los posibles genes objetivos / objetivo PARL ($p = 0,004$) y SLC25A5 ($p = 0,002$).

Tabla 3: miARN con niveles de expresión significativamente diferentes en pacientes con AD en comparación con el grupo control.

Forma madura	Ensayo t AD vs control	AUC AD vs control
hsa-miR-345-5p	3,20E-04	0,33
hsa-miR-5006-3p	1,26E-04	0,36
hsa-miR-7848-3p	2,28E-03	0,40
hsa-miR-6817-3p	1,02E-03	0,42
hsa-miR-361-5p	1,25E-07	0,29

Forma madura	Ensayo t AD vs control	AUC AD vs control
hsa-miR-3157-3p	1,14E-07	0,29
hsa-miR-4482-3p	3,46E-03	0,35
hsa-miR-28-3p	1,70E-10	0,24
hsa-miR-151a-3p	7,13E-11	0,25
hsa-miR-1468-5p	7,11E-08	0,32
hsa-miR-532-5p	6,94E-04	0,65
hsa-miR-17-3p	5,63E-08	0,78
hsa-miR-30a-3p	1,65E-08	0,24

Se muestran en la Tabla 4 otras secuencias de miARN maduras relevantes encontradas para las dos cohortes estudiadas, determinadas a partir de una prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, con los valores encontrados de cada prueba realizada de la cohorte Wilcoxon-Mann-Whitney.

5

Tabla 4: miARN con diferentes niveles de expresión en pacientes con AD en comparación con el grupo de control según los resultados de las pruebas de Wilcoxon-Mann-Whitney para la primera y la segunda cohorte

miARN	Secuencia madura	SEC ID NO:	Prueba de Wilcoxon Mann Whitney (1ª cohorte)	Prueba de Wilcoxon Mann Whitney (2ª cohorte)
hsa-miR-17-3p	acugcagugaaggcacuuguag	12	1,15E-05	0,00020271
hsa-miR-30a-3p	cuuucagucggauguuugcagc	13	0,0035552	4,14E-06
hsa-miR-28-3p	cacuagauugagcuccugga	8	0,00038033	6,33E-06
hsa-miR-30e-3p	cuuucagucggauguuuacagc	27	0,0073513	2,34E-06
hsa-miR-151a-3p	cuagacugaagccuugagg	9	1,70E-07	0,0045649
hsa-miR-4781-3p	aauguuggaauccucgcuagag	28	2,44E-06	0,043509
hsa-miR-4508	gcggggcugggcgcgcg	29	0,020063	0,0011682
hsa-miR-361-5p	uuuacagaauccaggguuac	5	3,13E-05	0,00010372
hsa-miR-3157-3p	cugccuagucagcugaagcu	6	5,74E-06	0,0052611
hsa-miR-33b-5p	gugcauugcuguugcauugc	30	9,95E-05	0,0035992
hsa-miR-16-2-3p	ccaauuuacugugcugcuua	31	0,027024	0,00018878
hsa-miR-574-5p	ugagugugugugugagugugu	32	0,025881	0,0046907
hsa-miR-5690	ucagcuacuaccuauuagg	33	0,0023133	0,0067456
hsa-miR-363-3p	aauugcacgguauccaucgua	34	0,0043552	0,0017395
hsa-miR-4746-5p	ccgguccaggagaaccucgaga	35	0,018015	0,003912
hsa-let-7b-5p	ugagguaguagguuguguu	36	0,029466	0,0060788
hsa-miR-1468-5p	cuccguuugccguuucgug	10	0,0041147	0,0019343
hsa-miR-345-5p	gcugacuccuaguccagggcuc	1	0,0012034	0,019022
hsa-miR-378d	acuggacuuggagucagaaa	37	0,0027945	0,00033694
hsa-miR-378g	acugggcuuggagucagaag	38	0,0031832	0,00021093
hsa-miR-221-3p	agcuacauugucugggguuuc	39	0,004188	0,0068757
hsa-miR-378f	acuggacuuggagccagaag	40	0,0024916	0,0023304
hsa-miR-340-3p	uccgucacaguuacuuuauagc	41	0,0002208	0,00063591
hsa-let-7c-5p	ugagguaguagguuugauuu	42	8,00E-06	0,0047904
hsa-miR-532-5p	caugccuugaguguaggaccgu	11	0,0056523	0,0061427
hsa-miR-3605-3p	ccuccguguuaccuguccuag	43	0,031272	8,42E-06
hsa-miR-340-5p	uuauaaagcaaugagacugauu	44	0,00092804	0,0023566

ES 2 734 678 T3

miARN	Secuencia madura	SEC ID NO:	Prueba de Wilcoxon Mann Whitney (1ª cohorte)	Prueba de Wilcoxon Mann Whitney (2ª cohorte)
hsa-miR-5006-3p	uuuccuuuccauccuggcag	2	0,015025	0,034036
hsa-miR-3909	uguccuaggccugcagucu	45	0,00072755	0,0072214
hsa-let-7d-3p	cuauacgaccugcuccuuucu	46	0,014922	0,00060374
hsa-miR-128-3p	ucacagugaaccggucucuuu	47	1,04E-05	0,010414
hsa-miR-330-5p	ucucuggccugugucuuaggc	48	7,40E-05	0,00086506
hsa-miR-548e-3p	aaaacugagacuauuuugca	49	0,0090437	0,036586
hsa-miR-548ad-5p	aaaaguaauugugguuuuug	50	0,0047025	0,00040004
hsa-miR-548d-5p	aaaaguaauugugguuuuugcc	51	0,0047025	0,00040004
hsa-miR-548ae-5p	aaaaguaauugugguuuuug	52	0,0031776	0,0040292
hsa-miR-548ay-5p	aaaaguaauugugguuuuugc	53	0,0031776	0,0040292
hsa-miR-107	agcagcauuguacagggcuauc	54	6,13E-05	0,00026867
hsa-miR-106b-5p	uaagugcugacagugcagau	55	0,028274	0,0020005
hsa-miR-548az-5p	caaagugauugugguuuuugc	56	0,0051462	0,0037591
hsa-miR-103a-3p	agcagcauuguacagggcuauga	57	0,00017315	0,00048883
hsa-let-7d-5p	agagguaguagguugcauuu	58	0,014163	0,0079347
hsa-miR-190a-5p	ugauauguuugauauuuaggu	59	1,61E-05	0,0019051
hsa-miR-3074-5p	guuccugcugaacugagccag	60	0,0081401	0,018552
hsa-miR-550a-3p	ugucuuacuccucaggcacau	61	0,0066173	0,0034703
hsa-miR-106a-5p	aaaagugcuuacagugcagguag	62	0,014462	0,016999
hsa-miR-598-3p	uacgucaucguugucaucguca	63	0,0042481	0,0055876
hsa-miR-1294	ugugagguuggcauuguugucu	64	1,88E-05	0,026805
hsa-miR-5010-3p	uuuugugucucccauuccccag	65	2,25E-05	0,037426
hsa-let-7i-5p	ugagguaguaguugugcuguu	66	0,00012721	0,042682
hsa-miR-17-5p	caaagugcuuacagugcagguag	67	0,039237	0,033477
hsa-miR-660-5p	uaccuauugcauucggaguug	68	3,50E-06	0,011728
hsa-miR-6754-3p	ucucaccugccucugccugca	69	0,018408	0,013335
hsa-miR-101-3p	uacaguacugugauaacugaa	70	1,06E-06	0,0019576
hsa-let-7e-5p	ugagguaggagguuguauagu	71	8,31E-07	0,0034125
hsa-miR-6842-3p	uuggcugugucucugcccgag	72	0,0030116	0,0022308
hsa-miR-328-3p	cuggccucucugcccuuccgu	73	0,0087011	0,0018858
hsa-miR-1285-5p	gaucucacuuuguucccagg	74	6,09E-05	0,0048518
hsa-let-7f-5p	ugagguaguagauuguauagu	75	4,82E-09	0,0028229
hsa-let-7a-5p	ugagguaguagguuguauagu	76	1,51E-08	0,004414
hsa-miR-301a-3p	cagugcauaguauugucaaagc	77	0,0018718	0,012808
hsa-miR-3127-3p	ucccuucugcaggccugcugg	78	2,04E-05	0,045572
hsa-miR-20a-5p	uaagugcuuauagugcagguag	79	0,025138	0,010058
hsa-miR-6783-3p	uuccugggcuuccucugugag	80	0,029479	0,0093665
hsa-miR-3615	ucucucggcuccucgcccuc	81	0,016317	0,046337
hsa-miR-98-5p	ugagguaguaguuguuuuuuu	82	9,18E-07	0,020253
hsa-miR-5001-3p	uucugccucuguccaggucuu	83	2,24E-06	0,01183
hsa-let-7 g-5p	ugagguaguaguuguuacagu	84	1,81E-07	0,017748

Ejemplo 2

5 Para evaluar la especificidad de los miARN para la enfermedad de Alzheimer encontrada en el Ejemplo 1, se compararon sus niveles de expresión aún más con los de pacientes con MCI y esclerosis múltiple (MS) obtenidos como en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

10 Tabla 5: miARN con niveles de expresión significativamente diferentes en pacientes con AD en comparación con pacientes con MCI y MS.

Forma madura	Ensayo t AD vs MCI	AUC AD vs MCI	Ensayo t AD vs MS	AUC AD vs MS
hsa-miR-345-5p	4,96E-02	0,38	6,83E-04	0,39
hsa-miR-5006-3p	2,88E-02	0,32	1,16E-02	0,37
hsa-miR-7848-3p	8,76E-01	0,44	1,81E-06	0,27
hsa-miR-6817-3p	5,03E-01	0,40	3,98E-10	0,28
hsa-miR-361-5p	3,81E-02	0,28	3,93E-04	0,36
hsa-miR-3157-3p	1,74E-02	0,29	5,17E-13	0,21
hsa-miR-4482-3p	8,30E-02	0,38	4,83E-03	0,37
hsa-miR-28-3p	3,56E-01	0,44	1,24E-06	0,32
hsa-miR-151a-3p	5,87E-01	0,44	1,29E-15	0,20
hsa-miR-1468-5p	7,11E-02	0,39	8,61E-17	0,14
hsa-miR-532-5p	5,89E-03	0,71	4,37E-21	0,87
hsa-miR-17-3p	2,59E-01	0,59	1,23E-16	0,82
hsa-miR-30a-3p	5,84E-01	0,58	6,06E-03	0,44

Mientras que los miARN de AD más significativos del panel del Ejemplo 1 también fueron desregulados entre la MS y la AD, los pacientes con MCI fueron más similares a los pacientes con AD.

15 Dado que el mismo panel de miARN puede distinguir entre MCI, MS y AD, se puede concluir que los miARN en la firma encontrada son específicos para enfermedad de Alzheimer y se pueden usar en consecuencia para la detección o el diagnóstico temprano de la enfermedad.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Siemens Healthcare GmbH

5 <120> Firmas específicas en enfermedades de Alzheimer por perfiles de miARN multicéntricos

<130> 201519137

<160> 84

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 22

15 <212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 1

gcugacuccu aguccagggc uc 22

20 <210> 2

<211> 21

<212> ARN

<213> Homo sapiens

25 <400> 2

uuucccuuc cauccuggca g 21

<210> 3

30 <211> 23

<212> ARN

<213> Homo sapiens

35 <400> 3

cuaccucgg ucugcuuacc aca 23

<210> 4

<211> 19

<212> ARN

40 <213> Homo sapiens

<400> 4

ucucucugac uccauggca 19

45 <210> 5

<211> 22

<212> ARN

<213> Homo sapiens

50 <400> 5

uuaucagaau cuccaggggu ac 22

<210> 6

<211> 22

55 <212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 6

cugcccuagu cuagcugaag cu 22

60 <210> 7

<211> 22

<212> ARN

<213> Homo sapiens

ES 2 734 678 T3

	<400> 7	uuucuauuuuc ucaguggggc uc	22
5	<210> 8 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens		
10	<400> 8	cacuagauug ugagcuccug ga	22
15	<210> 9 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens		
20	<400> 9	cuagacugaa gcuccuugag g	21
25	<210> 10 <211> 21 <212> ARN <213> Homo sapiens		
30	<400> 10	cuccguuugc cuguuucgcu g	21
35	<210> 11 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens		
40	<400> 11	caugccuuga guguaggacc gu	22
45	<210> 12 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens		
50	<400> 12	acugcaguga aggcacuugu ag	22
55	<210> 13 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens		
60	<400> 13	cuuucagucg gauguuugca gc	22
60	<210> 14 <211> 98 <212> ARN <213> Homo sapiens		
	<400> 14	acccaaacc uaggucugcu gacuccuagu ccagggcucg ugauggcugg ugggccuga	60
		acgagggguc uggaggccug gguuugaaua ucgacagc	98
	<210> 15		

ES 2 734 678 T3

<211> 110
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 15

aaccuuagg gggcuguggu uugccagggc aggaggugga agggagcccc auuuacagug 60

guaacuuccu uuccuuucc auccuggcag gcuucagaga acuuuaccag 110

<210> 16
 <211> 101
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 16

15 gcuggggcug ggugggugug gcaggccac cuuggguaug caaagcucug acaguguuuc 60

acuugcuacc cucggucugc uuaccacacu cccaguucug c 101

<210> 17
 <211> 66
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 17

aggauucugc cauaggaagc uuggagugga acugaccugc cccuuucuc ucugacucca 60

25 uggcag 66

<210> 18
 <211> 72
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 18

ggagcuuauc agaauccuca gggguacuuu auuuuucaa aaagucuccc aggugugauu 60

35 cugauuugcu uc 72

<210> 19
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 19

gggaagggu ucagccaggc uagugcaguc ugcuuuguc caacacuggg gugaugacug 60

cccuagucua gcugaagcu uuccc 85

<210> 20
 <211> 70
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 20

agugagcaac ccagugggcu auggaaaugu guggaagaug gcauuucua uucucagugg 60

55 ggcucuacc 70

<210> 21
 <211> 86

ES 2 734 678 T3

	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 21		
5	gguccuugcc cucaaggagc ucacagucua uugaguuacc uuucugacuu ucccacuaga	60	
	uugugagcuc cuggagggca ggcacu	86	
	<210> 22		
	<211> 90		
10	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 22		
	uuuccugccc ucgaggagcu cacagucuaug uaugucucau ccccuacuag acugaagcuc	60	
15	cuugaggaca gggauuguca uacucaccuc	90	
	<210> 23		
	<211> 86		
	<212> ARN		
20	<213> Homo sapiens		
	<400> 23		
	gguggguggu uuucuccguuu gccuguuucg cugaugugca uucaacucau ucucagcaaa	60	
25	auaagcaaa uggaaaauucg uccauc	86	
	<210> 24		
	<211> 91		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
30	<400> 24		
	cgacuugcuu ucucuccucc augccuugag uguaggaccg uuggcaucuu aauuaccuc	60	
	ccacacccaa ggcuuugcaga agagcgagcc u	91	
35	<210> 25		
	<211> 84		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
40	<400> 25		
	gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga	60	
	aggcacuugu agcauuauug ugac	84	
	<210> 26		
45	<211> 71		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 26		
50	gcgacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca gaugggcuuu cagucggaug	60	
	uuugcagcug c	71	
	<210> 27		
	<211> 22		
55	<212> ARN		

<213> Homo sapiens
 <400> 27
 cuuucagucg gauguuuaca gc 22
 5
 <210> 28
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 28
 aauguuggaa uccucgcuag ag 22
 <210> 29
 <211> 17
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 29
 20 gcggggcugg gcgcgcg 17
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 30
 gugcauugcu guugcauugc 20
 30
 <210> 31
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 31
 ccaauuuuac ugugcugcuu ua 22
 <210> 32
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 32
 ugagugugug ugugugagug ugu 23
 45
 <210> 33
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 33
 ucagcuacua ccucuauuag g 21
 <210> 34
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55
 <400> 34
 60 aaugcacgg uauccaucug ua 22
 <210> 35
 <211> 23

ES 2 734 678 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 35
 5 ccggucccag gagaaccugc aga 23

 <210> 36
 <211> 22
 <212> ARN
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 36
 ugagguagua gguugugugg uu 22

 15 <210> 37
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 37
 acuggacuug gagucagaaa 20

 <210> 38
 <211> 20
 25 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 38
 acugggcuug gagucagaag 20
 30
 <210> 39
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 39
 agcuacauug ucugcugggu uuc 23

 <210> 40
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 40
 45 acuggacuug gagccagaag 20

 <210> 41
 <211> 22
 <212> ARN
 50 <213> Homo sapiens

 <400> 41
 uccgucucag uuacuuuuaa gc 22

 55 <210> 42
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 60 <400> 42
 ugagguagua gguuguaugg uu 22

 <210> 43

ES 2 734 678 T3

<211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 43
 ccuccguguu accuguccuc uag 23
 <210> 44
 <211> 22
 10 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 uuauaaagca augagacuga uu 22
 15 <210> 45
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 45
 uguccucuag ggccugcagu cu 22
 <210> 46
 <211> 22
 25 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 30 cuauacgacc ugcugccuuu cu 22
 <210> 47
 <211> 21
 <212> ARN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 ucacagugaa cggucucuu u 21
 40 <210> 48
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 48
 ucucugggcc ugugucuuag gc 22
 <210> 49
 <211> 22
 50 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 aaaaacugag acuacuuuug ca 22
 55 <210> 50
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 50
 aaaaguaauu gugguuuuug 20

ES 2 734 678 T3

<210> 51
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 51
 aaaaguaauu gugguuuuug cc 22
 <210> 52
 10 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 52
 15 aaaaguaauu gugguuuuug 20
 <210> 53
 <211> 21
 <212> ARN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 aaaaguaauu gugguuuuug c 21
 25 <210> 54
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 54
 agcagcauug uacagggcua uca 23
 <210> 55
 <211> 21
 <212> ARN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 uaaagugcug acagucaga u 21
 40 <210> 56
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 56
 caaaagugau ugugguuuuu gc 22
 <210> 57
 50 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 55 agcagcauug uacagggcua uga 23
 <210> 58
 <211> 22
 <212> ARN
 60 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 agagguagua gguugcauag uu 22

<210> 59
 <211> 22
 <212> ARN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 59
 ugauauguuu gauauuuag gu 22

 10 <210> 60
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 60
 guuccugcug aacugagcca g 21

 <210> 61
 <211> 22
 20 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 61
 ugucuuacuc ccucaggcac au 22

 25 <210> 62
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 62
 aaaagugcuu acagugcagg uag 23

 <210> 63
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 <400> 63
 35 uacgucaucg uugucaucgu ca 22

 <210> 64
 <211> 22
 <212> ARN
 45 <213> Homo sapiens

 <400> 64
 ugugagguug gcauuguugu cu 22

 50 <210> 65
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 55 <400> 65
 uuuugugucu cccauucucc ag 22

 <210> 66
 <211> 22
 <212> ARN
 60 <213> Homo sapiens

 <400> 66

ugagguagua guuugugcug uu 22
 <210> 67
 <211> 23
 5 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 67
 caaagugcuu acagugcagg uag 23
 10 <210> 68
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 68
 uacccauugc auaucggagu ug 22
 <210> 69
 20 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 69
 25 ucuucaccug ccucugccug ca 22
 <210> 70
 <211> 21
 <212> ARN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 70
 uacaguacug ugauaacuga a 21
 35 <210> 71
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 71
 ugagguagga gguuguauag uu 22
 <210> 72
 <211> 22
 45 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 uuggcugguc ucugcuccgc ag 22
 50 <210> 73
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 73
 cuggcccucu cugcccuucc gu 22
 <210> 74
 60 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

ES 2 734 678 T3

<400> 74
 gaucucacuu uguugcccag g 21

5 <210> 75
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 75
 ugagguagua gauuguauag uu 22

15 <210> 76
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 76
 ugagguagua gguuguauag uu 22

25 <210> 77
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 77
 cagugcaaua guauugucaa agc 23

35 <210> 78
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 78
 ucccccucug caggccugcu gg 22

45 <210> 79
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 79
 uaaagucuu auagucagg uag 23

55 <210> 80
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 80
 uuccugggcu ucuccucugu ag 22

65 <210> 81
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

70 <400> 81
 ucucucggcu ccucgaggcu c 21

75 <210> 82
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

ES 2 734 678 T3

<400> 82
ugagguagua aguuguauug uu 22

5 <210> 83
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

10 <400> 83
uucugccucu guccaggucc uu 22

<210> 84
<211> 22

15 <212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 84
ugagguagua guuuguacag uu 22

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende:

5 crear un perfil de expresión de miARN a partir de una muestra de sangre proporcionada de un paciente, y comparar el nivel de expresión de un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p, y/o que comprende una secuencia que difiere de esa secuencia respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, con un nivel de referencia, permitiendo la comparación el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

10
2. Procedimiento de la reivindicación 1, en donde además se compara el nivel de expresión de al menos un miARN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa-miR-6817-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3157-3p, hsa-miR-4482-3p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-1468-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-17-3p, y hsa-miR-30a-3p, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, con un nivel de referencia, permitiendo la comparación el diagnóstico de una enfermedad con Alzheimer.

15
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el paciente es un ser humano.

20
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 miARN que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en hsa -miR-345-5p, hsa-miR-5006-3p, hsa-miR-7848-3p, hsa-miR-6817-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-3157-3p, hsa-miR -4482-3p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-1468-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-17-3p y hsa-miR 30a-3p, y/o que comprende una secuencia que difiere de estas secuencias respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, se observa un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia, en donde en al menos un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p y/o que comprende una secuencia que difiere de esta secuencia respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, se observa un cambio en el nivel de expresión en comparación con un nivel de referencia.

25

30
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la creación del perfil de expresión comprende una hibridación de ácido nucleico, una amplificación de ácido nucleico, una extensión de polimerasa, una secuenciación, una espectrometría de masas, o cualquier combinación de los mismos.

35
6. Uso de un miARN que comprende una secuencia seleccionada de hsa-miR-345-5p, y/o que comprende una secuencia que difiere de esta secuencia respectivamente hasta en 3 bases, preferiblemente hasta 2 bases, más preferiblemente 1 base, como marcador para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.