

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 894 875**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/6883 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2016 E 19173376 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.09.2021 EP 3556865**

(54) Título: **Método para ayudar a la detección de la enfermedad de Alzheimer o de una discapacidad cognitiva moderada**

(30) Prioridad:

13.03.2015 JP 2015051327

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

16.02.2022

(73) Titular/es:

HIROSHIMA UNIVERSITY (100.0%)
3-2 Kagamiyama 1-chome, Higashi-Hiroshima-shi
Hiroshima 739-8511, JP

(72) Inventor/es:

TAHARA, HIDETOSHI;
MATSUMOTO, MASAYASU y
NINOSE, YU

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 894 875 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

Método para ayudar a la detección de la enfermedad de Alzheimer o de una discapacidad cognitiva moderada

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para ayudar a la detección de la enfermedad de Alzheimer (AD) o discapacidad cognitiva moderada (MCI).

10 **Técnica antecedente**

La enfermedad de Alzheimer es el tipo más común de demencia, que supone más de la mitad de los casos, y se espera que el número de pacientes con esta enfermedad aumente cada vez más en la sociedad anciana del futuro. Como enfermedad progresiva, la enfermedad de Alzheimer no se puede curar completamente o no se puede 15 bloquear completamente la progresión de la enfermedad por la ciencia médica actual, pero hay disponibles medicinas y tratamientos médicos que enlentecen la progresión. Por lo tanto, es deseable detectar la enfermedad de Alzheimer lo antes posible. En particular, aunque la discapacidad cognitiva moderada (a la que se hace referencia como MCI) a menudo se desarrolla como una etapa anterior a la aparición de la enfermedad de Alzheimer, la 20 detección de la discapacidad cognitiva moderada puede ayudar a enlentecer tanto como sea posible la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Aunque la enfermedad de Alzheimer se diagnostica actualmente mediante entrevistas médicas, exploración por MRI del cerebro, y similares, no es una tera fácil para detectar la enfermedad de Alzheimer temprana o la discapacidad cognitiva moderada.

25 Por lo tanto, para detectar la enfermedad de Alzheimer en su estadio temprano, se han propuesto métodos en los que se utiliza la cantidad de microARN (a los que se hace referencia de aquí en adelante como "miARN") en la sangre como indicador (Documentos de patente 1 a 3, Documentos no patentes 1 a 3).

Referencias de la técnica anterior

30 **Documentos de patente**

Documento de patente 1: Solicitud de patente japonesa abierta a la inspección pública (Kokai) N.º 2014-132863.
 Documento de patente 2: Solicitud de patente japonesa traducida a PCT abierta a la inspección pública - N.º 2014-520529.

35 Documento de patente 3: Documento EP 2733219 A1

Documentos no patentes

40 Documento no patente 1: Pavan Kumar et al., PLOS ONE, julio de 2013, Volumen 8, Edición 7, e69807, pp.1-10.
 Documento no patente 2: Petra Leindinger et al., Genome Biology 2013, 14: R78.
 Documento no patente 3: Wang-Xia Wang et al., The Journal of Neuroscience, 30 de enero de 2008, 28(5): 1213-1223.

Sumario de la invención

45 **Problema para resolver por la invención**

Como se ha descrito anteriormente, se han propuesto distintos miARN como índices para la detección de la enfermedad de Alzheimer, y no es necesario decir, lo ventajoso que sería poder detectar la enfermedad de 50 Alzheimer con una precisión mayor.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para ayudar a la detección de la enfermedad de Alzheimer o la discapacidad cognitiva moderada, siendo el método adecuado para ayudar a la detección altamente precisa de la enfermedad de Alzheimer o la discapacidad cognitiva moderada.

55 **Medio para resolver el problema**

Los inventores estudiaron intensamente y descubrieron posteriormente un miARN específico cuya cantidad aumentaba en la enfermedad de Alzheimer o la discapacidad cognitiva moderada y distintos miARN cuyas 60 cantidades disminuían en la enfermedad de Alzheimer o la discapacidad cognitiva moderada, y descubrieron que la enfermedad de Alzheimer o la discapacidad cognitiva moderada se detectaba satisfactoriamente con alta precisión utilizando miARN particulares entre ellos como índices, y de esta manera se completaba la presente invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método tal como se define en las reivindicaciones.

65 En el método, las cantidades de miARN que se van a usar como un indicador se seleccionan de una de las

siguientes combinaciones:

- (I) miR-122 y el miR-144; y
- (II) miR-122 y let-7f

5 En algunas realizaciones, la muestra de ensayo es suero o plasma.
En algunas realizaciones, al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en let-7g-5p, miR425-5p se usa como un control interno.

10 **Efecto de la invención**

De acuerdo con el método de la presente invención, la enfermedad de Alzheimer o la discapacidad cognitiva moderada se puede detectar con alta precisión y muy convenientemente. Por lo tanto, el método de la presente invención contribuirá mucho a la detección de la enfermedad de Alzheimer o discapacidad cognitiva moderada.

15 **Breve descripción de los dibujos**

20 Las Figuras 1-A y 1-B muestran los microARN en los que se ha indicado una diferencia significativa entre los grupos de Alzheimer y de individuos sanos mediante análisis de secuencia de próxima generación en el ejemplo posterior. El eje vertical representa el número de lecturas para cada miARN por millón de lecturas en total. Debido a las secuencias maduras de let-7f-1 y let-7f-2 son idénticas entre ellas, se utilizaron en el análisis como let-7f.

25 Las Figuras 2-A y 2-B indican los resultados de los análisis de datos de qRT-PCR utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ en el ejemplo posterior. Siete de 10 miARN candidatos obtenidos por el análisis de secuencia de próxima generación indicaban una diferencia significativa.

30 Las Figuras 3-A y 3-B muestran las curvas ROC y los gráficos de dispersión de los valores de ΔCt a partir de cada muestra generada basándose en los resultados de la qRT-PCR del ejemplo posterior.

35 Las Figuras 4-A y 4-B muestran los gráficos de dispersión y curvas ROC generadas basándose en la diferencia calculada en el valor ΔCt entre let-7f y miR-122 así como la diferencia calculada del valor ΔCt entre miR-144 y miR-122 en el ejemplo posterior.

40 Las Figuras 5-A a 5-C muestran cuadros de gráficos de los valores de ΔCt de miR-122, let-7f y miR-144 en el grupo de Alzheimer, el grupo de MCI, y el grupo de individuos normales en el ejemplo posterior. Se observó una diferencia significativa entre el grupo de MCI y el grupo de individuos sanos a nivel de $P < 0,05$.

45 La Figura 6-A es un diagrama que muestra la comparación de la medición de los resultados basándose en la fórmula $\Delta Ct(\text{let-7f}) - (\text{miR-122})$, en la que cada valor se ha medido para el grupo de la enfermedad de Alzheimer, el grupo de MCI y el grupo de individuos sanos en el ejemplo posterior.

50 La Figura 6-B es un diagrama que muestra la comparación de la medición de los resultados basándose en la fórmula $\Delta Ct(\text{miR-144}) - (\text{miR-122})$, en la que cada valor se ha medido para el grupo de la enfermedad de Alzheimer, el grupo de MCI y el grupo de individuos sanos en el ejemplo posterior.

55 La Figura 6-C es un diagrama que muestra la comparación de la medición de los resultados basándose en la fórmula $\Delta Ct(\text{miR-128-3p}) - (\text{miR-122-5p})$, en la que cada valor se ha medido para el grupo de la enfermedad de Alzheimer, el grupo de MCI y el grupo de individuos sanos en el ejemplo posterior.

60 La Figura 7 es un diagrama que muestra la medición de los resultados para el miR-128-3p que se ha identificado como un miARN que disminuye en la enfermedad de Alzheimer en el ejemplo posterior.

65 La Figura 8 es un diagrama que muestra la medición de los resultados para el miR-107 que se ha identificado como un miARN que disminuye en la enfermedad de Alzheimer en el ejemplo posterior.

La Figura 9 es un diagrama que representa la información acerca de las muestras en el ejemplo posterior.

La Figura 10 es un diagrama que muestra la comparación de los valores de expresión relativa de let-7g entre individuos sanos y pacientes con enfermedad de Alzheimer obtenidos en el ejemplo posterior.

La Figura 11-A es un diagrama que indica la medición de los resultados de miR-122 y let-7f obtenidos en el ejemplo posterior, que se han normalizado con respecto al ΔCt de let-7g utilizado como control interno. La Figura 11-B es un diagrama que indica la medición de los resultados de miR-144 y let-7f obtenidos en el ejemplo posterior, que se han normalizado con respecto al ΔCt de let-7g utilizado como control interno.

La Figura 12 es un diagrama que presenta el AUC para el valor de la fórmula $\Delta Ct^{(\text{miR-128})} - \Delta Ct^{(\text{miR-122})}$ obtenida en el ejemplo posterior.

60 **Descripción detallada de la invención**

Tal como se describe anteriormente, el método de la invención es tal como se define en las reivindicaciones. Los miARN descritos en el presente documento se conocen bien y también son bien conocidas las secuencias de bases. A modo de confirmación, las secuencias de bases de estos miARN descritos en el presente documento se indican posteriormente:

5 miR-122: uggagugugacaauggguuug (SEQ ID NO: 1);
 miR-144: ggauaucauauacuguaag (SEQ ID NO: 2);
 let-7f: ugagguguagauuguauaguu (SEQ ID NO: 3);
 miR-128-3p: ucacagugaaccggucucuuu (SEQ ID NO: 4);
 miR-107: agcagcauuguacaggcuauc (SEQ ID NO: 5).

10 En estos miARN, la cantidad de miR-122 es mayor en pacientes con enfermedad de Alzheimer o discapacidad cognitiva moderada que en individuos normales, mientras que la cantidad de miR-144, let-7f, miR-128-3p y miR-107 es menor en pacientes con enfermedad de Alzheimer o discapacidad cognitiva moderada que en individuos normales.

15 Estos cinco miARN se pueden utilizar individualmente o en combinación y el uso de la combinación aumenta adicionalmente la precisión. En el miR-144 y let-7f cuya cantidad está disminuyendo en pacientes con enfermedad de Alzheimer o discapacidad cognitiva moderada, al menos uno de estos miARN se utiliza como un indicador junto con el miR-122. Utilizando como indicador la cantidad de al menos una combinación seleccionada de entre el grupo que consiste en (I) miR-122 y miR-144, y (II) miR-122 y let-7f, se consigue un nivel de precisión muy alto como se indica por una AUC (área bajo la curva) de la curva ROC (curva de eficacia diagnóstica) de 0,9, como se describe específicamente en el Ejemplo posterior. Una AUC de 1,00 representa una tasa falsa positiva del 0 % y una tasa de falsos negativos de 0 % así como la consecución de la precisión más alta.

20 La muestra de ensayo no está particularmente limitada a condición de sea un fluido corporal que contenga miARN, pero normalmente se utiliza una muestra de sangre (incluyendo plasma, suero y sangre completa) preferentemente.

25 El propio método de cuantificación de miARN es bien conocido y todos los reactivos y aparatos necesarios para la cuantificación están disponibles en el mercado, de manera que la cuantificación se puede llevar a cabo fácilmente por los expertos en la técnica. Un ejemplo se describe específicamente en el Ejemplo posterior. En el método descrito en el Ejemplo posterior, una cola poli-A se añade a cada miARN en su extremo 3' utilizando reactivos disponibles en el mercado y la cuantificación de cada miARN se lleva a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) utilizando un oligonucleótido como cebador inverso que se hibrida a la región añadida (es decir, el poli-T) y un oligonucleótido como cebador directo que se hibrida con cada miARN (la cadena complementaria de cada miARN). Cada miARN puede cuantificarse fácilmente mediante este método, aunque el método de cuantificación no se limita a este, y se cuantifica de igual manera, por ejemplo, mediante un método que utilice un llamado "secuenciador de próxima generación" disponible en el mercado, y similares.

30 35 Como muestra de ensayo, se va a utilizar preferentemente una muestra de sangre, como se ha descrito anteriormente, y se pueden utilizar preferentemente suero y plasma. En los casos en los que se midan los miARN descritos anteriormente en el suero o plasma, se utiliza al menos un microARN seleccionado de entre el grupo que consiste en let-7g-5p, miR 425-3p y miR 425-5p como un control interno, que es un miARN con una ligera variación en la cantidad en el suero o plasma.

40 45 50 55 En el método de la presente invención, si la cantidad de miR-122 es mayor que en individuos sanos y la cantidad de al menos un miARN seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-144 y let-7f es menor que en individuos sanos, se juzga como que sugiere una alta posibilidad de enfermedad de Alzheimer o discapacidad cognitiva moderada. Debido a que se observaba una diferencia estadísticamente significativa (En los Ejemplos, $p < 0,001$ o $p < 0,01$ en el ensayo t) para cada miARN utilizado en el presente documento entre pacientes con enfermedad de Alzheimer o discapacidad cognitiva moderada e individuos sanos incluso cuando se utilizan individualmente, la presencia o ausencia de una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$, preferentemente $p < 0,01$, más preferentemente $p < 0,001$ en el ensayo t) de los individuos sanos se utiliza preferentemente como criterio. Específicamente, como se muestra en el Ejemplo posterior, preferentemente, si el valor de ΔCt (el valor de corte) en la combinación de miR-122 y let-7f ($\Delta Ct(let-7f)-(miR-122)$) en el punto del gráfico correspondiente con el mejor valor (el valor más bajo) para la tasa de falsos positivos, por ejemplo, es no menos de 1,49 se juzga que sugiere una alta posibilidad de enfermedad de Alzheimer o discapacidad cognitiva moderada (véase la Figura 4-B). De manera alternativa, como se ha descrito anteriormente, una combinación de miR-122, que aumenta en la enfermedad de Alzheimer o la disfunción cognitiva moderada, y miR-144 o let-7f, que disminuye en la enfermedad de Alzheimer o disfunción cognitiva moderada, como se muestra posteriormente se utiliza preferentemente como un indicador:

$\Delta Ct(miR-144) - (miR-122)$; o
 $\Delta Ct(let-7f) - (miR-122)$.

60 65 La presente invención se describirá específicamente a continuación mediante ejemplos. Por supuesto, la presente invención no se limitará al ejemplo posterior.

Ejemplos

65 Materiales y métodos

Sección 1. Muestras clínicas

Subsección 1. Muestras clínicas utilizadas

- 5 La sangre periférica se recolectó basándose en el plan para un genoma humano y la investigación del análisis genético aprobada por el Ethics Committee of Hiroshima University for Human Genome and Gene Analysis Research. Los detalles de la sangre periférica utilizada para el análisis en este Ejemplo se mostrarán en la tabla posterior.
- 10 Subsección 2. Recuperación de plasma a partir de sangre entera y conservación del plasma
- 1) Cinco ml de sangre completa recolectada en un tubo de recolección de sangre al vacío VENOJET II suplementado con EDTA-2K se transfirió a un tubo de 15 ml y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 15 2) La centrifugación produce tres capas separadas en el siguiente orden desde la parte superior: capa de plasma, capa de leucocitos sanguíneos, y capa de glóbulos rojos sanguíneos. Entre estas capas, solo se transfirió la capa de plasma a un nuevo tubo de 2 ml.
- 20 3) El plasma recolectado en la etapa 2 se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar los componentes celulares de la sangre que lo contaminaran.
- 4) Solo la capa de plasma se distribuyó en alícuotas de 250 μ l en nuevos tubos de 1,5 ml y se congelaron a -80 $^{\circ}$ C para su conservación.

Sección 2. Extracción de ARN en el plasma

- 25 La extracción de ARN en el plasma se llevó a cabo utilizando el Mini kit miRNeasy (QIAGEN).
- 1) La muestra de plasma congelada se descongeló y centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para precipitar las proteínas agregadas y los componentes celulares de la sangre.
- 30 2) A un nuevo tubo de 1,5 ml, se transfirieron 200 μ l del sobrenadante.
- 3) Al tubo, se añadieron 1000 μ l de Reactivo de Lisis QIAzol y el resultado se mezcló completamente para desnaturizar los componentes proteicos.
- 4) Al tubo, se añadieron 10 μ l de 0,05 nM de cel-miR-39 se añadió como ARN control para la extracción de ARN y el resultado se mezcló mediante pipeteo y entonces se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 35 5) Para promover la separación de capas de disolvente orgánico y acuoso, se añadieron 200 μ l de cloroformo al tubo y el resultado se mezcló completamente y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- 6) El tubo se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos a 4 $^{\circ}$ C y 650 μ l de la capa acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo de 2 ml.
- 40 7) Para la separación de ARN, se añadieron 975 μ l de etanol al 100 % al tubo y se mezcló el resultado pipeteando.
- 8) Se transfirieron a una columna Mini spin miRNeasy (a la que se hace referencia de aquí en adelante como columna), se transfirieron 650 μ l de la mezcla de la etapa 7 y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 minuto y entonces se centrifugó a 8000 x g durante 15 segundos a temperatura ambiente para permitir que el ARN se adsorba al filtro de la columna. La solución de flujo directo de la columna se desechará.
- 45 9) La etapa 8 se repitió hasta que el volumen total de la solución de la etapa 7 se filtró a través de la columna para permitir que todo el ARN se adsorba en el filtro.
- 10) Para eliminar las impurezas unidas al filtro, se añadieron 650 μ l de tampón RWT a la columna y se centrifugó a 8000 x g durante 15 segundos a temperatura ambiente. La solución de flujo directo de la columna se desechará.
- 50 11) Para limpiar el ARN adsorbido en el filtro, se añadieron 500 μ l de tampón RPE a la columna y se centrifugó a 8000 x g durante 15 segundos a temperatura ambiente. La solución de flujo directo de la columna se desechará.
- 12) Para limpiar el ARN adsorbido en el filtro, se añadieron 500 μ l de tampón RPE a la columna y se centrifugó a 8000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente. La solución de flujo directo de la columna se desechará.
- 13) Para eliminar completamente cualquier solución unida al filtro, se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 ml y se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- 55 14) La columna se colocó en un tubo de 1,5 ml y se añadieron 50 ml de agua libre de RNasa a este y el resultado se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- 15) Se llevó a cabo la centrifugación a 8000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente para eluir el ARN adsorbido en el filtro. El ARN eluído se utiliza en el siguiente experimento sin purificación adicional y la parte restante del ARN eluído se almacenó a -80 $^{\circ}$ C.

60 Sección 3. Análisis de microARN en el plasma

Subsección 1. Análisis completo en el secuenciador de próxima generación

- 65 En este Ejemplo, la concentración de la solución de ARN no se ajustó debido a que la cantidad extraíble de ARN del plasma era muy pequeña y por lo tanto la determinación de la concentración era difícil. En consecuencia, el análisis

comparaba las muestras no con respecto a "cuanta cantidad de un miARN de interés estaba contenida en la misma masa de ARN" sino con respecto a "cuanta cantidad de un miARN de interés estaba contenida en una solución de ARN extraída del mismo volumen de plasma". Esto también es aplicable al análisis de qRT-PCR posterior.

- 5 El análisis mediante un secuenciador de próxima generación se llevó a cabo utilizando el kit Ion Total RNA-seq v2, el Ion PGM (Life Technologies), y el Bioanalyzer (Agilent). Una solución de 50 μ l que contenía los microARN derivados del plasma extraído en la Sección 2 se concentró al vacío hasta 10 μ l.
 Para la hibridación del adaptador, a 4 μ l de la solución de ARN concentrada en 1), se añadieron 1 μ l de Ion Adaptor Mix v2 y 3 μ l de tampón de hibridación.
- 10 Esto se mezcló mediante pipeteado lento arriba y abajo 10 veces y luego se precipitó por centrifugación.
 Se permitió que la reacción progresara a 65 °C durante 10 minutos y luego a 16 °C durante 5 minutos en un ciclador térmico.
 Para la ligadura del adaptador, a la solución de reacción de 4), se añadieron 10 μ l de 2x tampón de ligadura y 2 μ l de Mezcla de enzimas de ligadura.
- 15 Esto se mezcló suavemente mediante pipeteado lento arriba y abajo y luego se precipitó por centrifugación.
 Se permitió que la reacción progresara a 16 °C durante 16 horas en un ciclador térmico.
 Para la transcripción inversa de los microARN ligados al adaptador, a la solución de 7), se añadieron 2 μ l de agua libre de nucleasas, 4 μ l de 10x tampón RT, 2 μ l de mezcla de dNTP 2,5 mM y 8 μ l de cebador Ion RT v2.
 Esto se mezcló suavemente mediante pipeteado lento arriba y abajo y luego se precipitó por centrifugación.
- 20 Esto se permitió que la reacción progresara a 70 °C durante 10 minutos en un ciclador térmico.
 La solución de reacción se colocó inmediatamente en hielo y se suplementó con 4 μ l de 10x Mezcla de enzimas SuperScript III.
 Esto se mezcló suavemente mediante pipeteado lento arriba y abajo y luego se precipitó por centrifugación.
- 25 Esto se permitió que la reacción progresara a 42 °C durante 30 minutos en un ciclador térmico. Los ácidos nucleicos con una longitud similar a la del ADNc de interés se extrajeron por purificación con perlas. Las perlas unidas a ácidos nucleicos se removieron suavemente.
 En una placa de procesamiento, se aplicaron 5 μ l de las perlas unidas a ácido nucleico a cada pocillo.
 En cada pocillo de 15), se añadieron 250 μ l de Solución concentrada de unión y se mezclaron pipeteando arriba y abajo 10 veces.
- 30 A la solución de ADNc de 13) se añadieron 60 μ l de agua libre de nucleasas.
 La solución de 17) se añadió a la mezcla de 16).
 Se ajustó un pipettor P-1000 a 275 μ l y se aclaró una punta de pipeta tres veces con etanol al 100 %.
 La punta de la pipeta de 19) se utilizó directamente para añadir 275 μ l de etanol al 100 % a la solución de 17) y para mezclar la solución pipeteando arriba y abajo 10 veces.
- 35 La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
 La placa de procesamiento se dejó en reposo durante 5 minutos en un soporte magnético.
 Se desechó el sobrenadante de la placa, y luego se separaron las perlas unidas a ácido nucleico al aire durante 2 minutos dejando la placa en el soporte magnético. Se retiró la placa de procesamiento del soporte magnético y se añadieron 13 μ l de agua libre de nucleasas y el resultado se mezcló entonces pipeteando arriba y abajo 10 veces.
- 40 La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 minuto.
 La placa de procesamiento se colocó en el soporte magnético durante 1 minuto y entonces se recuperaron 13 μ l de la solución.
 Para la amplificación del ADNc purificado, se pusieron 6 μ l de la solución de ADNc de 26) en un tubo de 0,2 ml.
 Al tubo de 27), se añadieron 45 μ l de Platinum PCR SuperMix High Fidelity, 1 μ l de Ion Xpress RNA-Seq Barcode, y 1 μ l de cebador en Xpress RNA 3' Barcode.
 Se dejó progresar la reacción en un ciclador térmico en las condiciones siguientes:
- 94 °C durante 2 minutos;
 (2 ciclos) 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos, y 68 °C durante 30 segundos;
 50 (19 ciclos) 94 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 30 segundos, y 68 °C durante 30 segundos; y 68 °C durante 5 minutos.
- Para la retirada de los dímeros de adaptador, los ADNc amplificados se sometieron a electroporación en un gel, y una parte de los mismos se escindió. Se preparó un gel de acrilamida TBE al 10 % y se ejecutó a 120 V. Se utilizó 1x de TBE como tampón de ejecución.
 En un recipiente Tupperware, se colocaron 20 ml del 1x de TBE y el gel de acrilamida TBE al 10 % de 30).
 Al recipiente, se añadieron 2 μ l de SYBR oro y se agitó el recipiente durante 5 minutos.
 Se escindió una banda de ADN de alrededor de 100 a 106 pb bajo iluminación con UV.
 El gel escindido se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se aplastó moderadamente con la punta de una punta de pipeta.
- 60 Al tubo, se añadieron 500 μ l de tampón TE.
 Se llevó a cabo la incubación a 37 °C durante una noche.
 Se llevó a cabo la centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml y se añadió 1 μ l de glicogen de 20 mg/ml al mismo como agente de co-precipitación.
 Se añadieron al tubo, 50 μ l de acetato sódico 3 M.
 65 Se añadieron al tubo, 400 μ l de isopropanol y se removió. El tubo se dejó en reposo a -80 °C durante 30 minutos.
 Se llevó a cabo la centrifugación a 15.000 x g durante 30 minutos a 4 °C.

El sobrenadante se desechó del tubo y se añadió a este 1 ml de etanol al 70 %. Se llevó a cabo la centrifugación a 15.000 x g durante 5 minutos a 4 °C.

Se desechó el sobrenadante del tubo y se secó al aire el tubo.

Se añadieron al tubo, 15 μ l de agua libre de nucleasas.

5 Se llevó a cabo la medición de la concentración utilizando el kit DNA High Sensitivity en el Bioanalyzer.

La muestra de ADNc se diluyó a una concentración de 20 pM para llevar a cabo la emulsión de PCR. Se utilizó el Ion OneTouch 2 (Life Technologies) para la emulsión de PCR.

Los tubos de recuperación y la placa de amplificación se instalaron en el Ion OneTouch 2.

10 Se llenó a la mitad un tubo de reactivo con el aceite y se llenó un cuarto de otro tubo de reactivo con la solución de recuperación, y entonces se instalaron en el Ion OneTouch 2.

En un tubo de baja unión de 1,5 ml, se mezclaron 25 μ l del ADNc diluido en 48), 25 μ l de agua libre de nucleasas, 500 μ l de la mezcla de reactivo, 300 μ l de reactivo B de PCR, y 50 μ l de mezcla de enzimas.

Se removieron las partículas Ion Sphere, se precipitaron por centrifugación, y entonces se añadieron a 100 μ l de la mezcla de 51).

15 La mezcla se removió y entonces se precipitó por centrifugación.

El conjunto de filtro de reacción se llenó con la mezcla de reacción y se instaló en el Ion OneTouch 2 y entonces se inició la emulsión de PCR.

Se recuperó una muestra de la emulsión de PCR y se purificó mediante purificación con perlas utilizando el Ion One Touch ES (Life Technologies).

20 La muestra se recuperó y se transfirió el volumen completo de la muestra a un tubo de 0,2 ml.

Se añadieron al tubo, 5 μ l de Control Ion Sphere.

Se llevó a cabo la centrifugación a 15.500 x g durante 2 minutos. El sobrenadante se desechó dejando 15 μ l en el tubo. Al tubo, se añadieron 12 μ l cebador de secuenciación.

25 Se permitió que la reacción progresara a 95 °C durante 2 minutos y luego a 37 °C durante 2 minutos en un ciclador térmico. Después de la reacción, la temperatura se devolvió a la temperatura ambiente.

La muestra se cargó en un chip 318.

El chip se instaló en el Ion PGM y se llevó a cabo el análisis.

Subsección 2. Análisis de los resultados

30 Se llevó a cabo el análisis utilizando el CLC bio Genomics Workbench. El número de lecturas de cada microARN se normalizó a un número de lecturas por millón de cada muestra. Se llevó a cabo un ensayo t de cada microARN entre el grupo de Alzheimer y el grupo de individuos normales, y se seleccionaron los microARN que se identificaron porque presentaban una diferencia a nivel de $P < 0,05$ y tenían una media de recuento de lecturas no menor de 50 en al menos un grupo para análisis adicionales mediante qRT-PCR posteriormente.

Sección 4. Cuantificación de microARN en el plasma mediante qRT-PCR

40 Se llevaron a cabo análisis exhaustivos de los miARN del plasma que se muestran en la Subsección 1 utilizando el miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, el kit Universal cDNA synthesis II y la placa multipocillo del LightCycler480 (Exiqon).

45 El kit Universal cDNA synthesis II es un kit de síntesis de ADNc para miARN diseñado para permitir que los miARN de una muestra se transcriban inversamente en un tubo mediante la adición de una cola poli-A al extremo 3' del miARN maduro y la transcripción inversa utilizando un cebador que incluye un cebador poli-T.

50 Se inició una reacción de PCR y progresó mediante la adición del ADNc sintetizado y la mezcla maestra SYBR Green, un reactivo de reacción en el que se mezclan un material fluorescente y una enzima, y los cebadores a un conjunto de placa multipocillo para el LightCycler480 y se podía determinar la cantidad de un miARN en la muestra por la diferencia entre intensidades de fluorescencia. El segundo método derivado se utilizó en el cálculo de un valor de Ct, cuyo valor de Ct se determinó como el correspondiente a un punto que mostraba el cambio máximo de fluorescencia en la curva de amplificación, mientras que se utilizó el método $\Delta\Delta Ct$ para el análisis, en el que las cantidades de miARN se comparan relativamente sin la generación de una curva de referencia.

55 Subsección 2. Transcripción inversa de microARN

Se llevó a cabo la transcripción inversa de los miARN del plasma utilizando el kit Universal cDNA Synthesis II (EXIQON).

60 1) en un tubo de 0,2 ml, se pusieron 2 μ l de 5x de tampón de reacción, 5 μ l de agua libre de nucleasas, 1 μ l de mezcla de enzimas, y 2 μ l de una solución de ARN derivados del plasma.

2) Se mezcló la mezcla tapando el tubo y luego precipitando por centrifugación.

3) Se permitió que la reacción progresara a 42 °C durante 60 minutos y luego a 95 °C durante 5 minutos en un ciclador térmico.

65 4) Se transfirió el ADNc sintetizado a un tubo de 1,5 ml y se almacenó a -80 °C.

Subsección 3. qRT-PCR con SYBR Green

Se llevó a cabo una reacción PCR en tiempo real utilizando el LightCycler (marca comercial) 480 (Roche), el miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (EXIQON), y la 480 Multiwell Plate 384, blanca para el LightCycler (marca comercial) (Roche) para placas de 384 pocillos. La mezcla de la reacción de PCR y el ADNc diluido se pusieron en la placa de 384 pocillos utilizando la Plataforma Bravo Automated Liquid Handling (Agilent Technologies).

- 5 1) El ADNc sintetizado se diluyó 40 veces en agua libre de DNasea en un tubo de 0,65 ml.
- 10 2) Se preparó una mezcla de reacción PCR en un tubo de 0,65 ml como se indica posteriormente (las cantidades indicadas son para una muestra en una única repetición): Mezcla maestra de PCR, 5 μ l; mezcla de cebadores de PCR, 1 μ l.
- 15 3) La mezcla de reacción de PCR se distribuyó a 6 μ l por pocillo en la placa de 384 pocillos.
- 4) El ADNc diluido preparado en 1) se distribuyó a 4 μ l por pocillo en la placa de 384 pocillo y se mezcló completamente pipeteando.
- 5) Se selló la placa de 384 pocillos para evitar la evaporación de la muestra y se centrifugó a 1500 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- 6) Se llevó a cabo la PCR en tiempo real utilizando el LightCycler (marca registrada) 480 (Roche) en las condiciones siguientes:

20 95 °C durante 10 minutos;
(45 ciclos) 95 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 1 minuto.

Subsección 4. Análisis de los resultados

25 El segundo método derivado se utilizó en el cálculo de un valor de Ct, cuyo valor de Ct se determinó como el correspondiente a un punto que mostraba el cambio máximo de fluorescencia en la curva de amplificación, mientras que se utilizó el método $\Delta\Delta Ct$ para el análisis, en el que las cantidades de miARN se comparan relativamente sin la generación de una curva de referencia. Además, como la cantidad del miARN se tenía que normalizar para hacer la comparación entre las muestras, se añadió un control externo cel-miR-39 en 4) en la sección 2 que se utilizó para la normalización. Se muestra posteriormente un método para calcular un valor normalizado (valor ΔCt):

$$\Delta Ct = Ct - Ct_{cel-miR-39}.$$

- 35 En el análisis de qRT-PCR, se utilizó para el análisis el valor de ΔCt obtenido restando el valor Ct de cel-miR-39, contenido en una muestra medida, de un valor Ct de la misma muestra de acuerdo con la fórmula anterior.

Evaluación de la precisión de los microARN marcadores basándose en la curva ROC

- 40 Un método que comprende la graficación de una curva ROC (curva de eficacia diagnóstica) y el cálculo de la AUC con fines de comparación es un método para evaluar la precisión de un marcador diagnóstico. La ROC representa una curva obtenida graficando "1-Especificidad (tasa de falsos positivos) en el eje horizontal y "Sensibilidad" en el eje vertical variando un valor de corte que determine los resultados positivos y negativos, como un parámetro. AUC (área bajo la curva) se refiere al área bajo la curva ROC que varía de 0,5 a 1. Cuando se genera una curva ROC y se calcula un AUC utilizando un cierto marcador diagnóstico, un valor del AUC más próximo a 1 significa que el marcador se evalúa como un marcador más preciso. En general, un marcador diagnóstico con un AUC de $\geq 0,7$ se considera que tienen alta precisión.

Resultados

- 50 55 Sección 1. Identificación de microARN en el plasma que presenten una variación específica en pacientes con enfermedad de Alzheimer

Subsección 1.

- En esta sección, se analizaron exhaustivamente los perfiles de miARN del plasma de individuos sanos y pacientes con la enfermedad de Alzheimer y se compararon para identificar los miARN que eran variables en los pacientes con enfermedad de Alzheimer.
- 60 Subsección 2. Análisis exhaustivo y comparación de microARN en el plasma de individuos sanos y pacientes con enfermedad de Alzheimer
- (Primera exploración)
- 65 La cantidad de cada miARN en el plasma se analizó completamente en 62 individuos de cada grupo de individuos sanos y el grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer utilizando el secuenciador de próxima generación Ion

PGM (Life Technologies), y entonces se comparó la cantidad de cada miARN en cada uno de los grupos. El valor medio de la cantidad de cada miARN se calculó para cada grupo y se comparó entre los grupos (Figuras 1-A y 1-B).

5 Se identificaron tres miARN con una cantidad aumentada significativamente en el grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con el grupo de individuos sanos, mientras que se identificaron siete miARN con una cantidad disminuida en el grupo de pacientes con Alzheimer (Figuras 2-A y 2-B).

10 Estos 10 miARN se consideraron como candidatos a miARN marcadores para la enfermedad de Alzheimer para analizarse por qRT-PCR. Los miARN se describen posteriormente.

15 Los miARN cuya cantidad estaba aumentada en el plasma en los pacientes con enfermedad de Alzheimer con respecto a los individuos sanos: miR-122-5p, miR-185-5p.

20 Subsección 3. Comparación de la cantidad de los microARN candidatos a marcador entre individuos sanos y pacientes con la enfermedad de Alzheimer por qRT-PCR

25 (Segunda exploración)

30 La diferencia entre los individuos sanos y los pacientes con enfermedad de Alzheimer que se demostró en la primera exploración con respecto a la cantidad de miARN en el plasma se consideró que estaba influenciada sustancialmente por diferencias individuales de cada muestra que se utilizó en el experimento. Entonces, con el fin de eliminar la influencia de las diferencias individuales en la cantidad de cada miARN candidato a marcador en el plasma, se aumentó el número de muestras a 62 en cada grupo de individuos sanos y cada grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer y, como segunda exploración, se midió la cantidad del miARN candidato individual en el plasma de cada muestra mediante qRT-PCR. La determinación de las cantidades de los miARN candidatos a marcadores en la segunda exploración se llevó a cabo por el método qRT-PCR utilizando SYBR Green.

35 En cada muestra, se calcularon los valores de ΔCt y se analizaron mediante el ensayo t a un nivel de significancia del 5 %. Entre los 10 miARN candidatos a marcadores, se observó una diferencia significativa para siete especies que consistían en miR-122, miR-185, let-7f, miR-15b, miR-484, y miR-144 entre el grupo de individuos sanos y el grupo de Alzheimer. No se observó ninguna diferencia significativa para los otros tres. Además, cuando se generaron las curvas ROC utilizando los valores de ΔCt de estos siete miARN, los pacientes se diagnosticaron satisfactoriamente de la enfermedad de Alzheimer mediante miR-122, let-7f o miR-144 con un nivel de precisión indicado por una AUC de $\geq 0,8$ (Figuras 3-A y 3-B). De manera alternativa, cuando las diferencias del valor ΔCt entre miR-122 y let-7f y entre miR-122 y miR-144 se calcularon y se generaron de nuevo las curvas ROC, se podía diagnosticar con más precisión a un nivel indicado por una AUC de $> 0,9$ (Figuras 4-A y 4-B).

40 En consecuencia, el miR-122 cuya cantidad aumenta en pacientes con enfermedad de Alzheimer, así como let-7f y miR-144 cuya cantidad disminuye se identificaron satisfactoriamente como miARN candidatos a marcadores.

45 Subsección 4. Comparación de la cantidad de los microARN candidatos a marcador entre individuos sanos y pacientes con discapacidad cognitiva moderada (MCI) por qRT-PCR

50 Se llevó a cabo un análisis similar por qRT-PCR sobre miR-122, let-7f y miR-144 que se habían identificado en la Subsección 3 como miARN candidatos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Cuando se calcularon los valores de ΔCt en 42 pacientes con MCI y se analizaron contra el grupo de individuos sanos mediante el ensayo t, se observó una diferencia significativa a un nivel de $P < 0,05$. También se observó una tendencia similar que en los pacientes con enfermedad de Alzheimer, incluyendo la tendencia hacia arriba del miR-122 y la tendencia hacia abajo de let-7f y miR-144, en los pacientes con MCI (Figuras 5-A, 5-B y 5-C).

55 Subsección 5. Combinaciones de miARN

60 Se hizo un examen de la precisión conseguida por la combinación de dos miARN diferentes. Específicamente se llevó a cabo el siguiente experimento. Se llevó a cabo un análisis por qRT-PCR en las muestras utilizadas en las Subsecciones 3 y 6 para calcular los valores del ΔCt . Entonces, se calcularon las diferencias en el valor ΔCt entre dos miARN incluyendo $\Delta Ct(\text{let-7f}) - (\text{miR-122})$, $\Delta Ct(\text{miR-144}) - (\text{miR-122})$, $\Delta Ct(\text{miR-128-3p}) - (\text{miR-122-5p})$, y $\Delta Ct(\text{miR-107}) - (\text{miR-122-5p})$. Los resultados se muestran por separado en las Figuras 6-A a 6-D.

65 Subsección 6. Identificación de los microARN disminuidos en la enfermedad de Alzheimer por análisis exhaustivo de qRT-PCR

66 A modo de referencia, el análisis exhaustivo de qRT-PCR descrito anteriormente identificaba el miR-128-3p y el miR-107 como microARN disminuidos en la enfermedad de Alzheimer. Los resultados se muestran por separado en las

Figuras 7 y 8. Además, la información acerca de las muestras se muestra en la Figura 9.

Subsección 7. Una ventaja de let-7g como control interno

- 5 La medición de let-7g se llevó a cabo en individuos sanos y en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Los resultados se muestran en la Figura 10. Se descubrió que el let-7g presentaba menos variación de manera que se utilizaba satisfactoriamente como control interno y tenía éxito ventajosamente en aumentar la precisión del diagnóstico. Adicionalmente, la secuencia de bases del let-7g es el siguiente: ugaggaguaguu-uguacaguu
- 10 (SEQ ID NO: 6).

Los valores ΔCt se normalizaron utilizando el let-7g como control interno. Los resultados de la medición del miR-122, let-7f, y el miR-144 se muestran en las Figuras 11-A y 11-B.

15 Subsección 8. La combinación de miR-122 y miR-128-3p

A modo de referencia, y de manera similar a la Subsección 5, se calculó $\Delta Ct(\text{miR-128}) - (\text{miR-122})$ en 42 pacientes de MCI. Los resultados se muestran en la Figura 12.

- 20 Como se muestra en la Figura 12, la combinación de miR-122 y miR-128-3p proporcionaba un resultado sorprendente como se indica por una AUC de 1,00 (es decir, una tasa de falsos positivos del 0 % y una tasa de falsos negativos del 0 %).

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> HIROSHIMA UNIVERSITY

<120> MÉTODO PARA AYUDAR A LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER O UNA DISCAPACIDAD COGNITIVA MODERADA

30 <130> TEK/FP7471063

<140> EP

<141> 11-03-2016

35 <150> EP 16764903.7
<151> 11-03-2016

40 <150> PCT/JP2016/057827
<151> 11-03-2016

<150> JP 2015-051327
<151> 13-03-2015

45 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1
<211> 22
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 1
uggaguguga caaugguguu ug

22

<210> 2

<211> 22

<212> ARN

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ggauaucauc auauacugua ag

<210> 3

<211> 22

<212> ARN

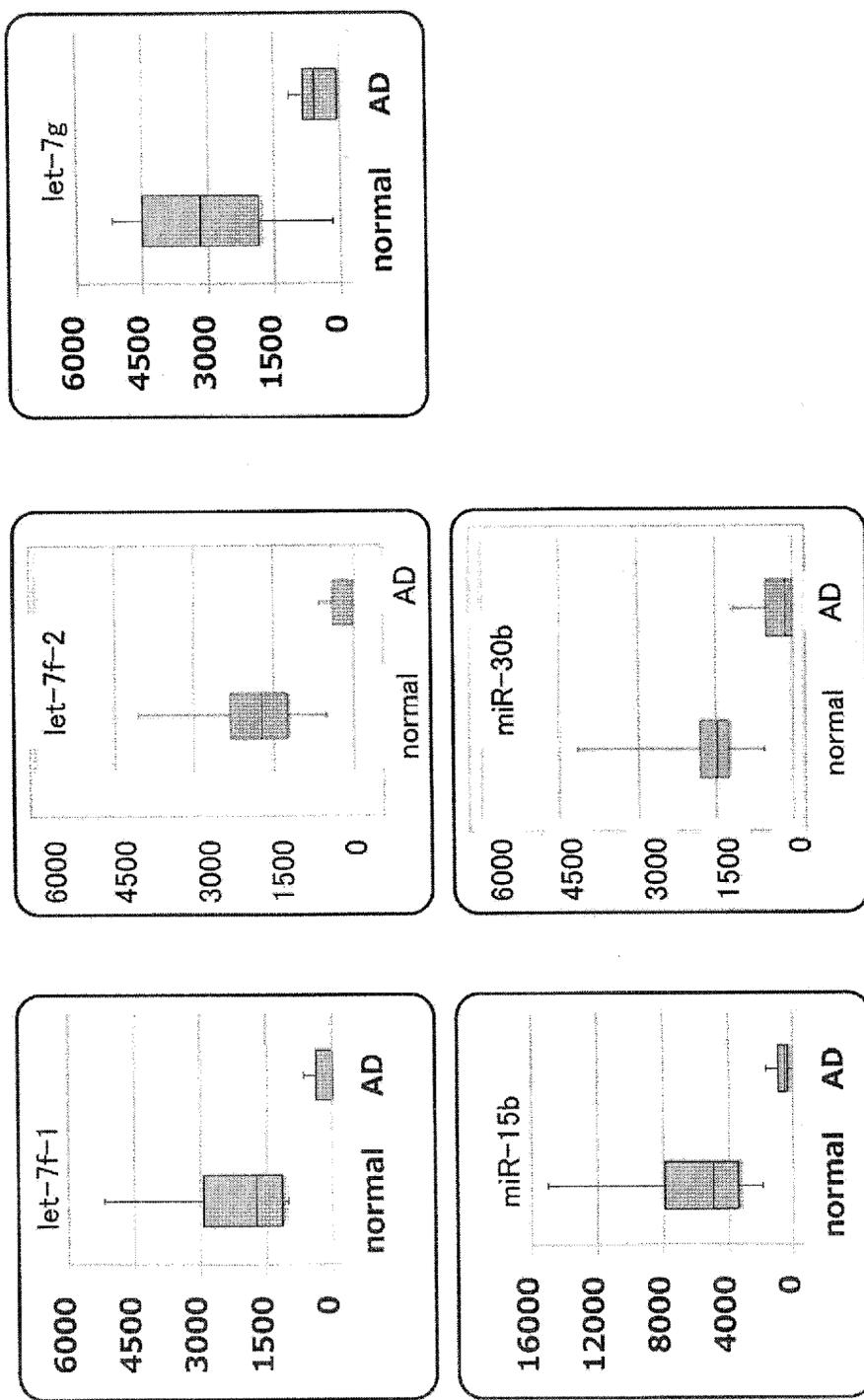
22

65 <213> *Homo sapiens*

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
	ugagguagua gauuguauag uu	22
5	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ARN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 4	
	ucacagugaa ccggucucuu u	21
	<210> 5	
	<211> 23	
15	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	
	agcagcauug uacagggcua uca	23
20	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 6	
	ugagguagua guuuguacag uu	22

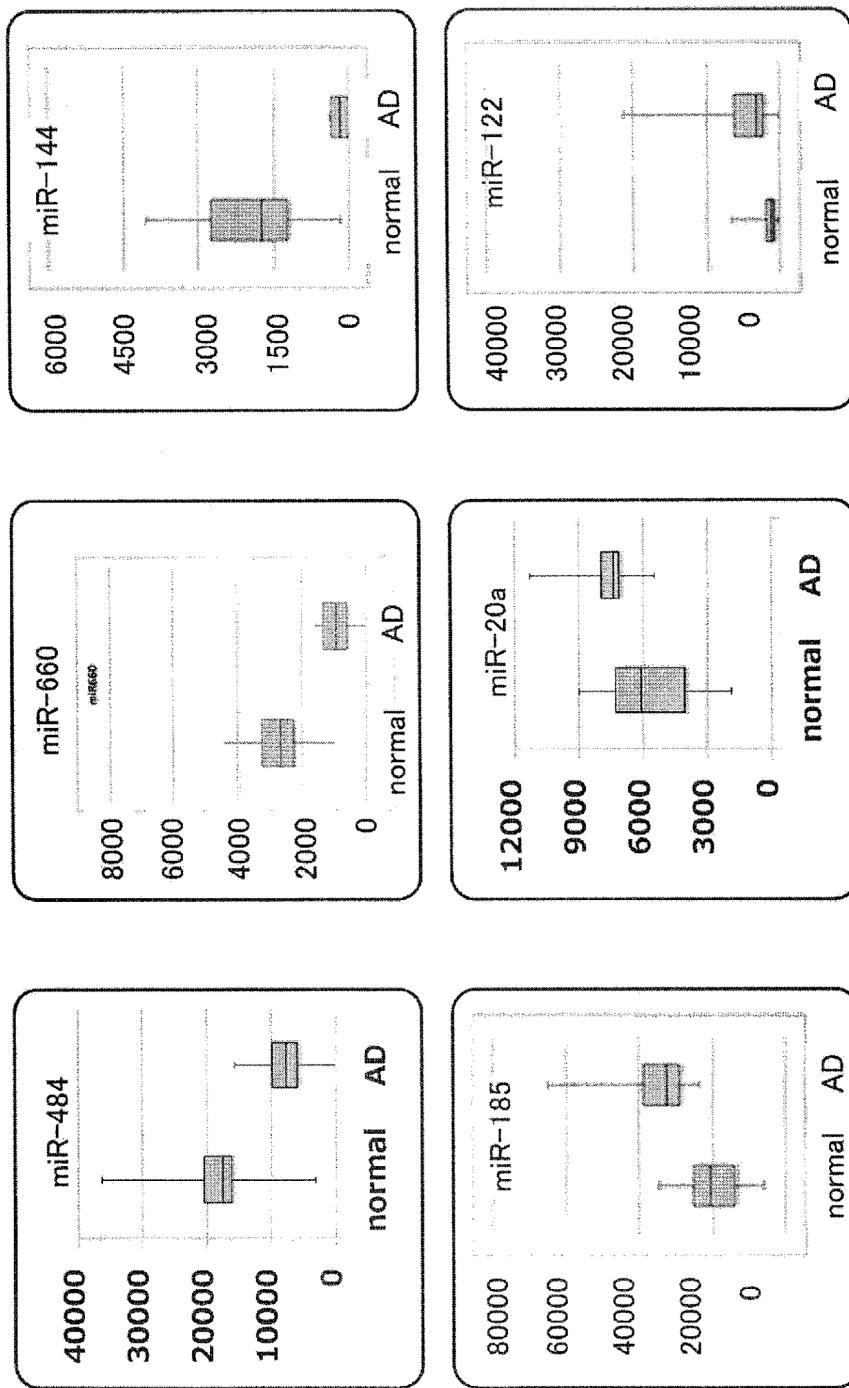
REIVINDICACIONES

1. Un método para ayudar a la detección de la enfermedad de Alzheimer o de una discapacidad cognitiva moderada, utilizando el método como indicador
 - 5 (i) las cantidades de miR-122 y let-7f contenidas en una muestra de prueba separada de un cuerpo vivo, en donde una mayor cantidad de miR-122 que la de un individuo sano y una cantidad menor de let-7f que la de un individuo sano es indicativo de que el cuerpo vivo es más probable que haya desarrollado la enfermedad de Alzheimer o una discapacidad cognitiva moderada; o
 - 10 (ii) las cantidades de miR-122 y miR-144 contenidas en una muestra de ensayo separada de un cuerpo vivo, en donde una cantidad de miR-122 mayor que la de un individuo sano, y una cantidad de miR-144 menor que la de un individuo sano es indicativa de que es más probable que el cuerpo vivo haya desarrollado la enfermedad de Alzheimer o una discapacidad cognitiva moderada.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo es suero o plasma.
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que al menos un microARN seleccionado de entre el grupo que consiste en let-7g-5p, miR 425-3p y miR 425-5p se utiliza como control interno.



Cuadros de gráficos del nivel de expresión de los miARN que muestran cada uno una diferencia entre individuos sanos y pacientes de Alzheimer
 * eje vertical: número de recuentos de lectura de un miARN por 1.000.000 de lecturas.

Fig.1-A



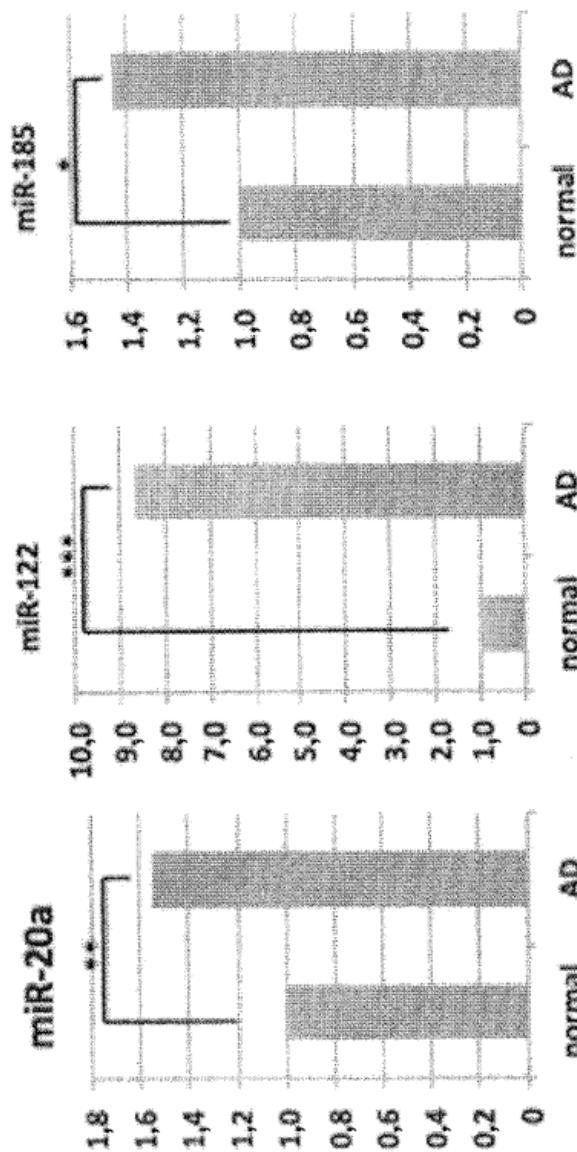
Cuadros de gráficos del nivel de expresión de los miARN que muestran cada uno una diferencia entre individuos sanos y pacientes de Alzheimer
 * eje vertical: número de recuentos de lectura de un miARN por 1.000.000 de lecturas.

Fig.1-B

MicroARN cuya expresión está aumentada en pacientes con enfermedad de Alzheimer

MiARN que presentan una diferencia significativa

Cantidad de la expresión relativa basándose en la cantidad de expresión en individuos sanos como 1 (método $\Delta\Delta Ct$)



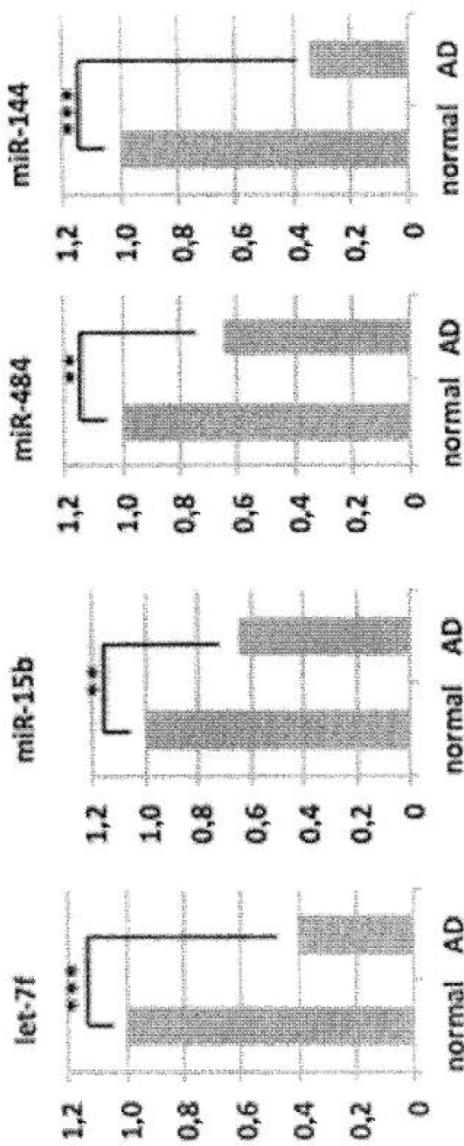
*:P <0,05, **:P <0,01, ***:P<0,001 (ensayo-t)

Fig.2-A

MicroARN cuya expresión está disminuida en pacientes con enfermedad de Alzheimer

MiARN que presentan una diferencia significativa

Cantidad de la expresión relativa basándose en la cantidad de expresión en individuos sanos como 1 (método $\Delta\Delta Ct$)



*:P <0,05, **:P <0,01, ***:P<0,001 (ensayo-t)

Fig.2-B

MicroARN cuya expresión está aumentada en pacientes con enfermedad de Alzheimer
Distribución de la expresión y curva ROC de miR-122

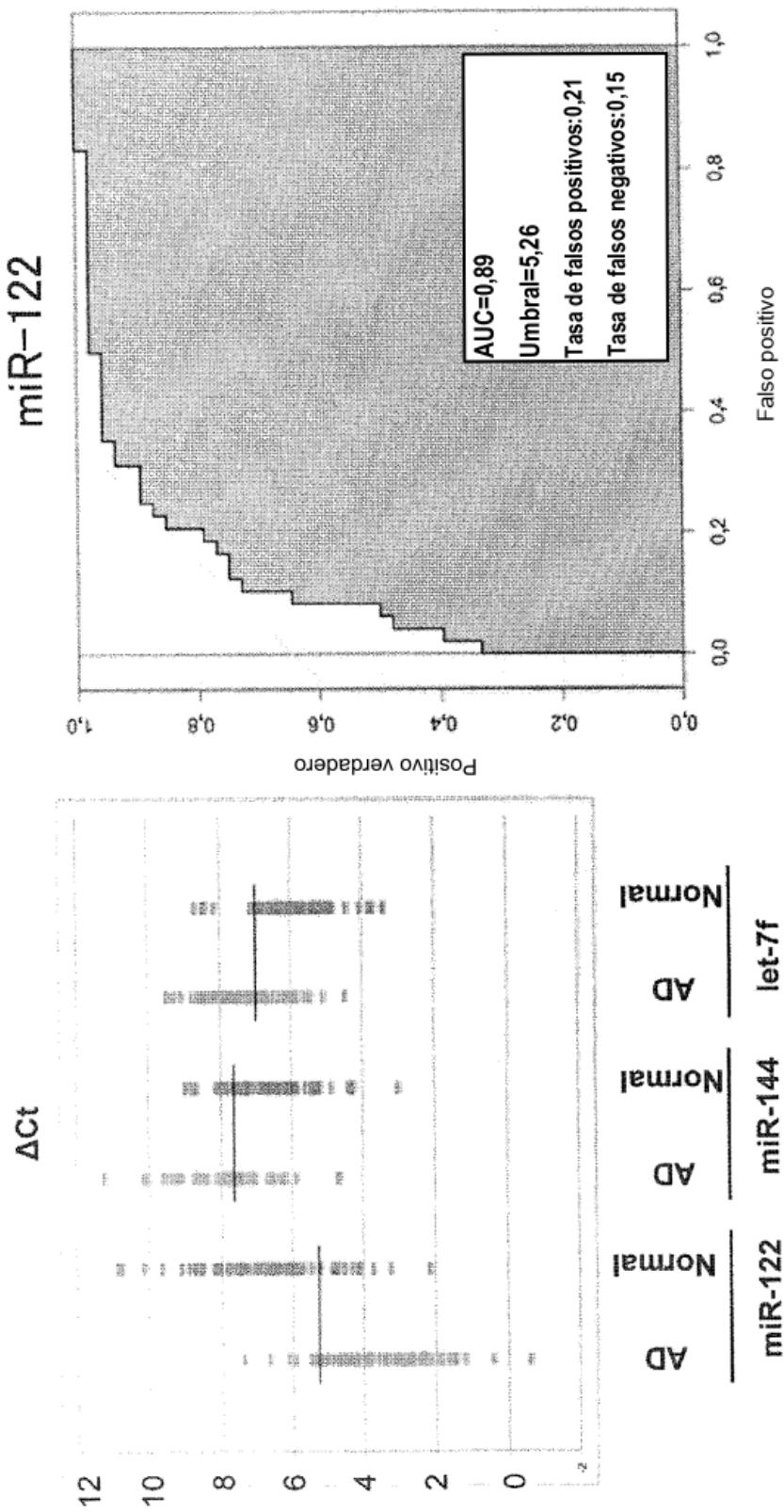
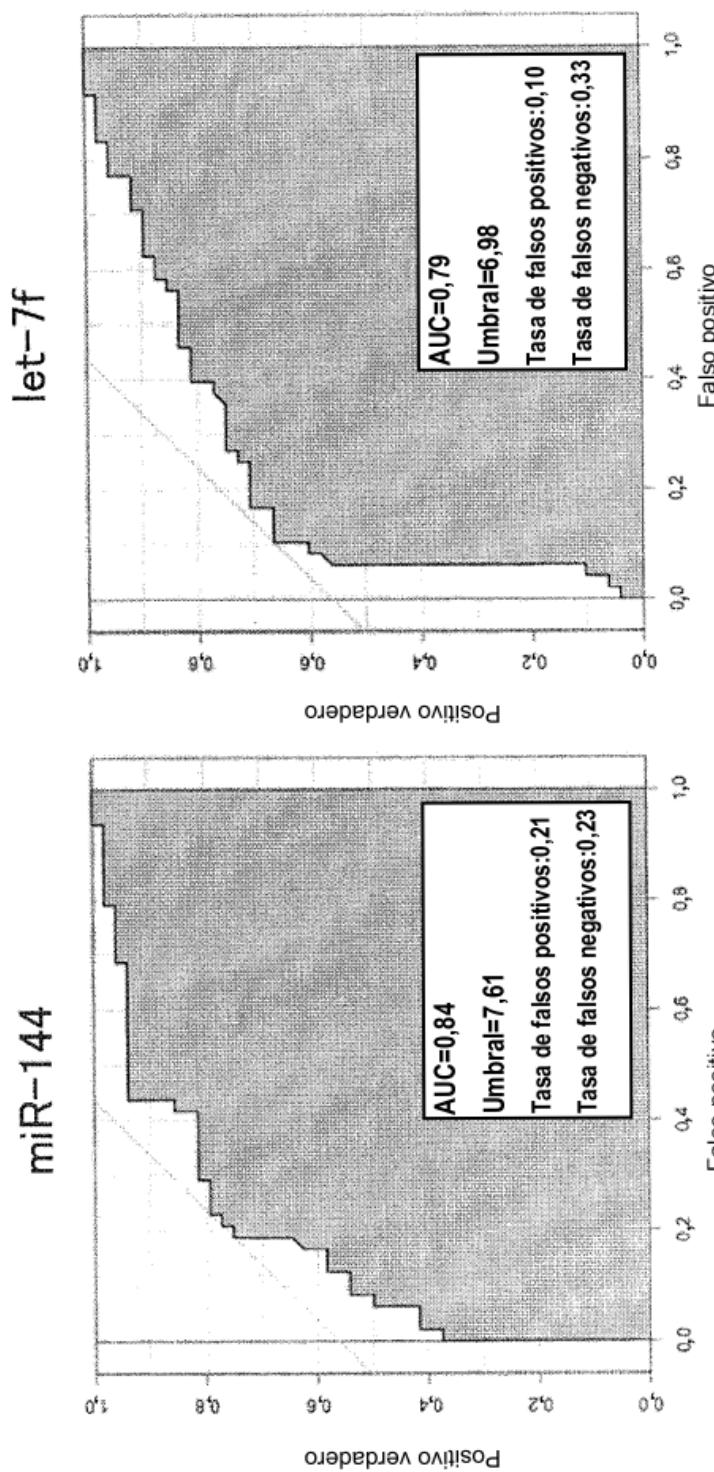


Fig.3-A

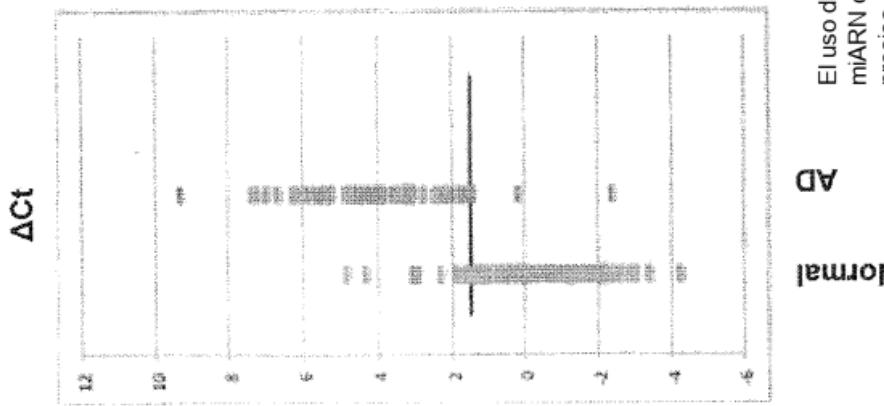
MicroARN cuya expresión está disminuida en pacientes con enfermedad de Alzheimer
Curvas ROC de miR-144 y let-7f



Generando las curvas ROC, se indica que había tres miARN disponibles para distinguir entre los individuos sanos y los pacientes con alta precisión diagnóstica

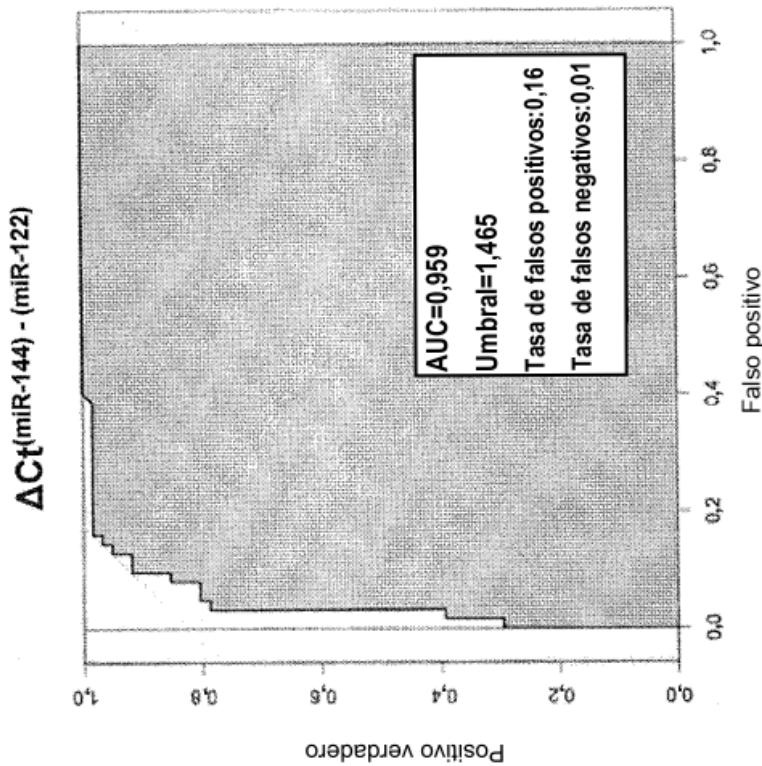
Fig.3-B

Distribución de la expresión y curva ROC de la combinación de miR-122 y miR-144 en pacientes con enfermedad de Alzheimer



AD

Normal



El uso de la diferencia del valor de ΔCt entre un miARN cuya expresión está aumentada y un miARN cuya expresión está disminuida en pacientes con AD hace posible el diagnóstico más preciso

Fig.4-A

Distribución de la expresión y curva ROC de la combinación del miR-122 y let-7f en pacientes con enfermedad de Alzheimer

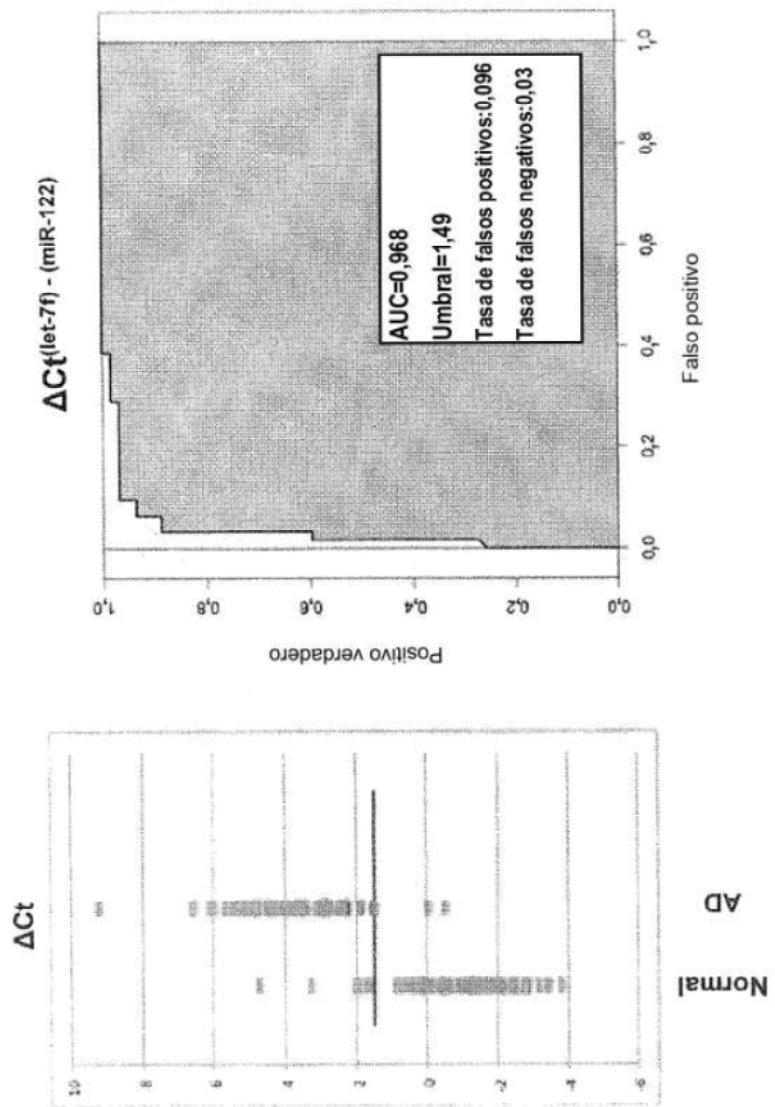
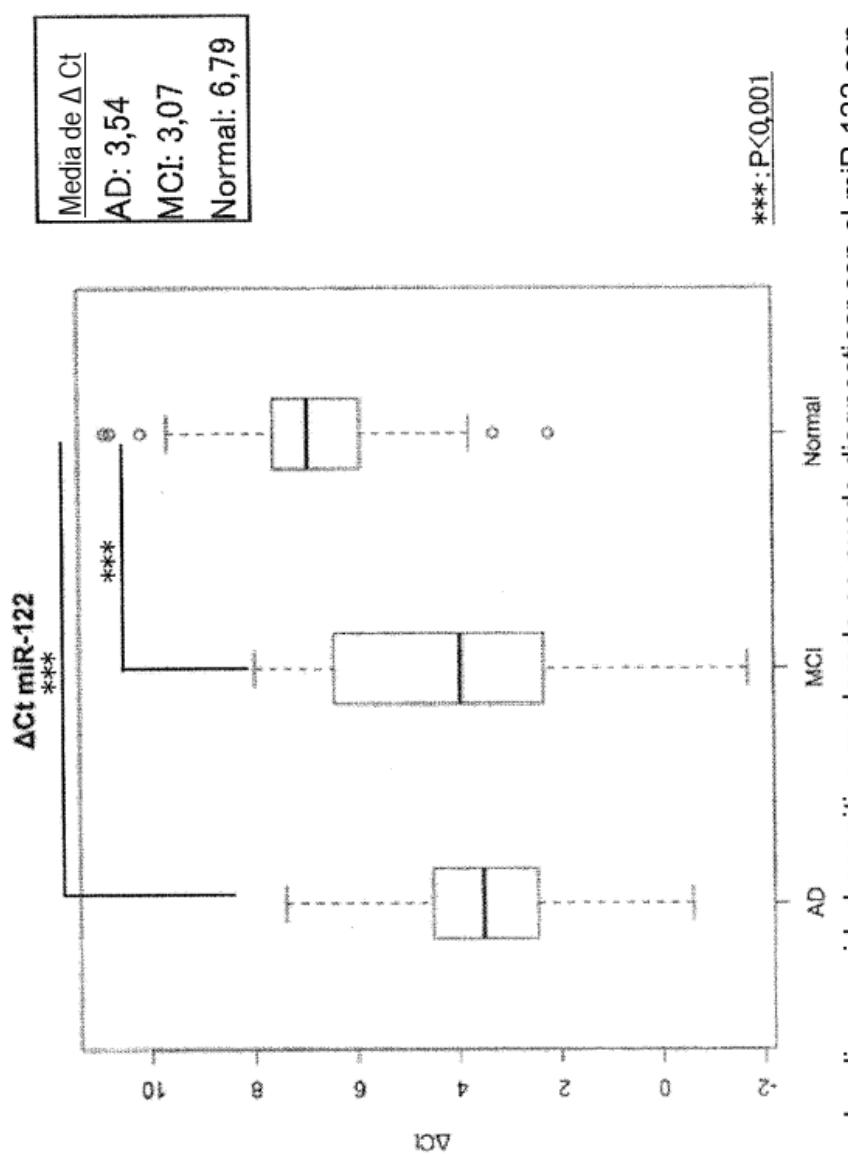


Fig.4-B

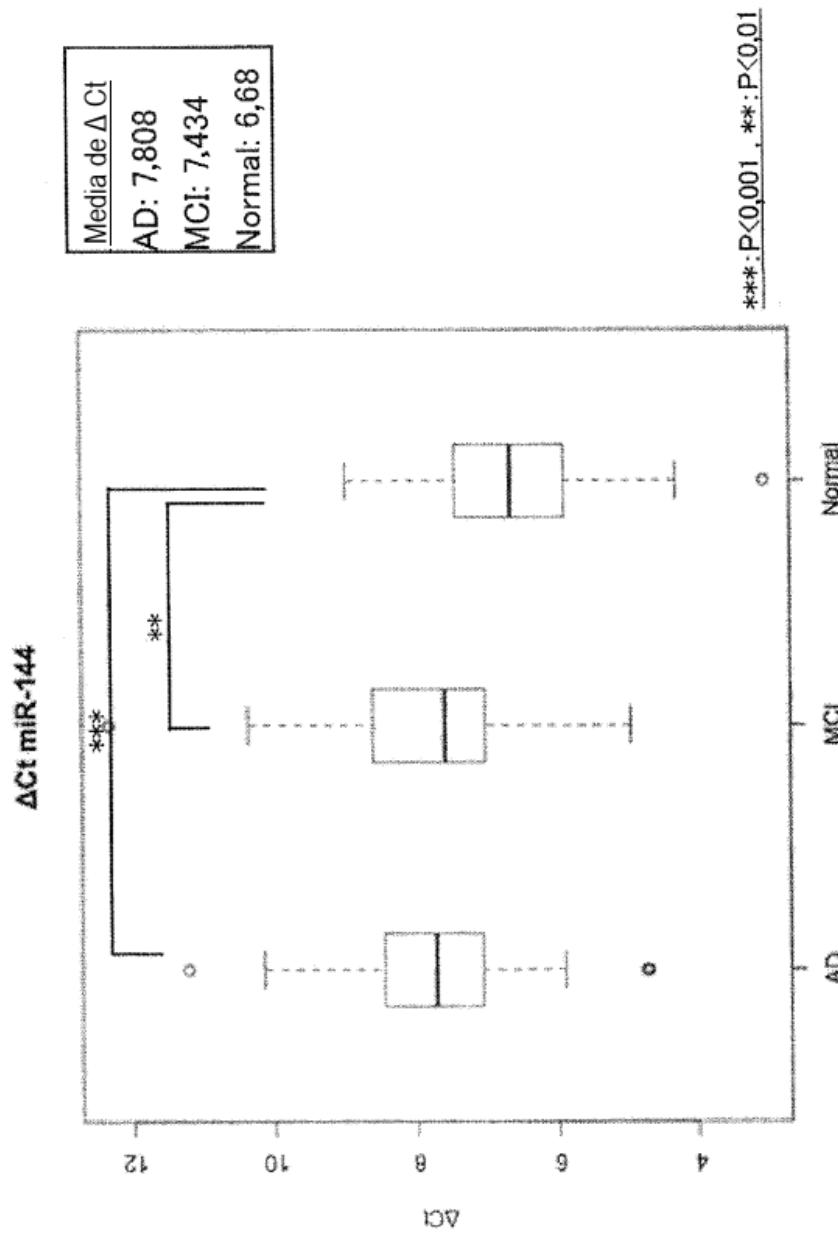
Distribución de la expresión de miR-122 en pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes con discapacidad cognitiva moderada



La discapacidad cognitiva moderada se puede diagnosticar con el miR-122 con un nivel de precisión similar al que está disponible para diagnosticar pacientes con la enfermedad de Alzheimer

Fig.5-A

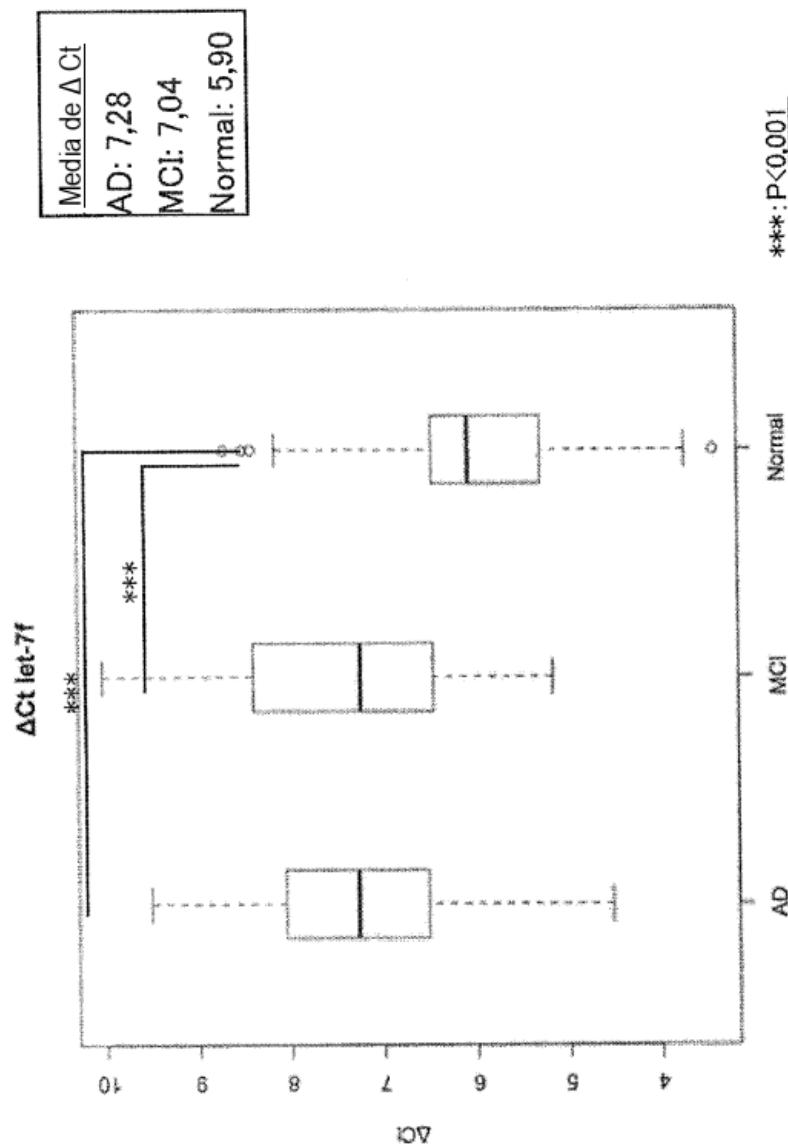
Distribución de la expresión de miR-144 en pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes con discapacidad cognitiva moderada



La discapacidad cognitiva moderada se puede diagnosticar con el miR-144 con un nivel de precisión similar al que está disponible para diagnosticar pacientes con la enfermedad de Alzheimer

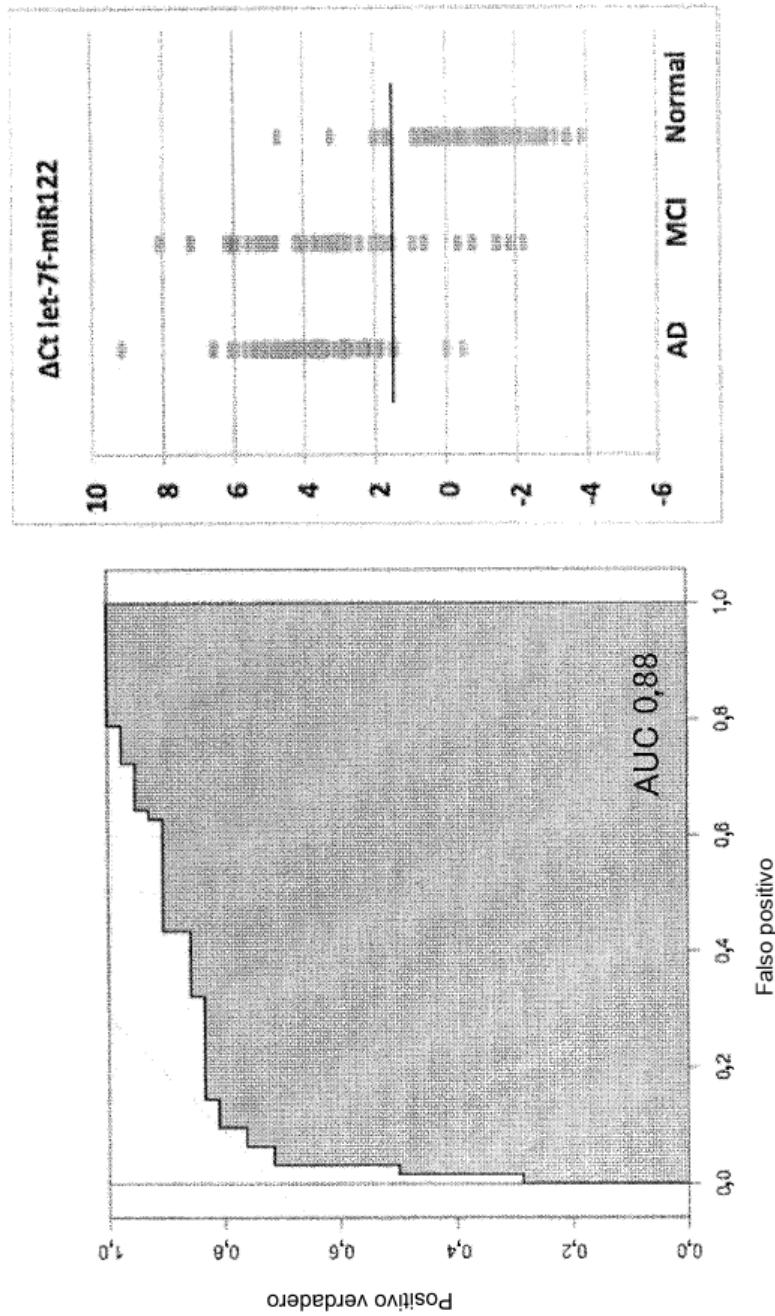
Fig.5-B

Distribución de la expresión de let-7f en pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes con discapacidad cognitiva moderada



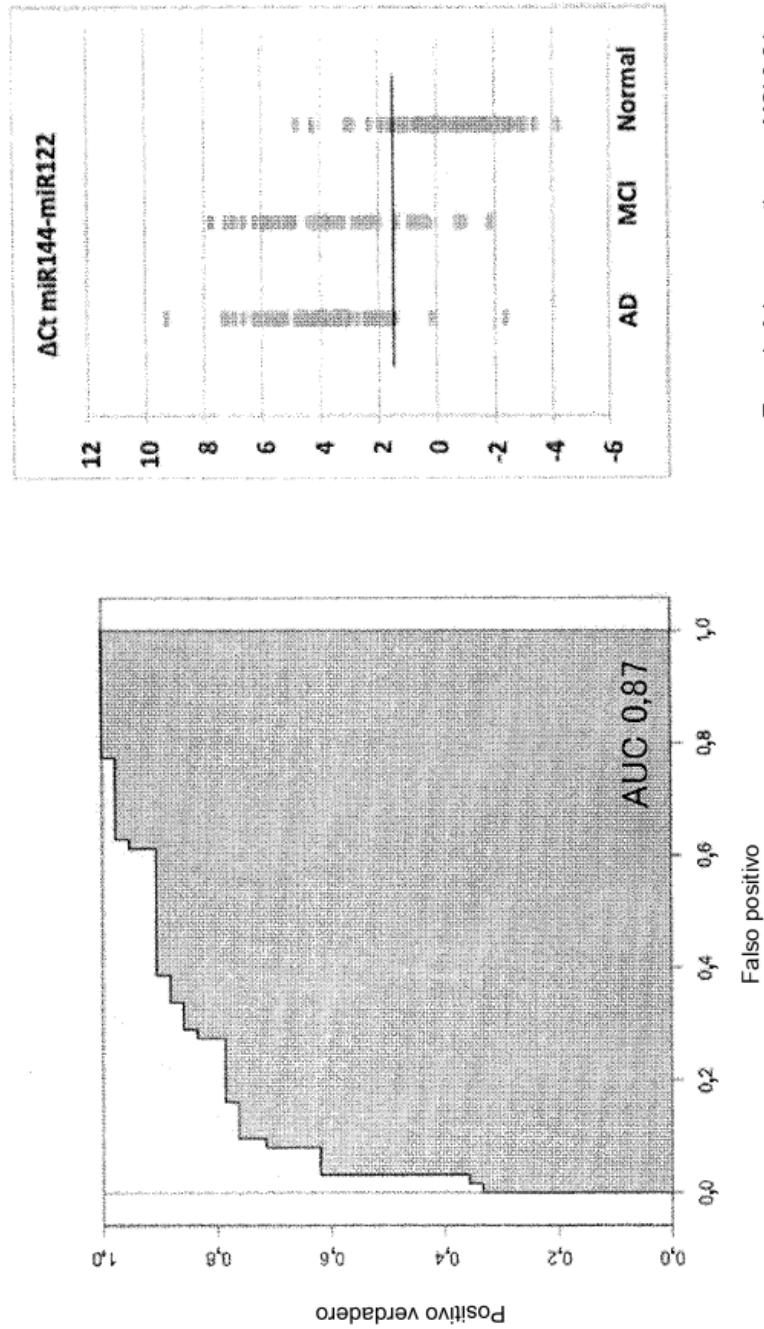
La discapacidad cognitiva moderada se puede diagnosticar con el let-7f con un nivel de precisión similar al que está disponible para diagnosticar pacientes con la enfermedad de Alzheimer

Fig.5-C

ΔCt (let-7f) – (miR-122) en MCI vs individuos sanos

Tasa de falsos negativos en MCI 0,21
El umbral es el mismo que se muestra en la Figura 4.

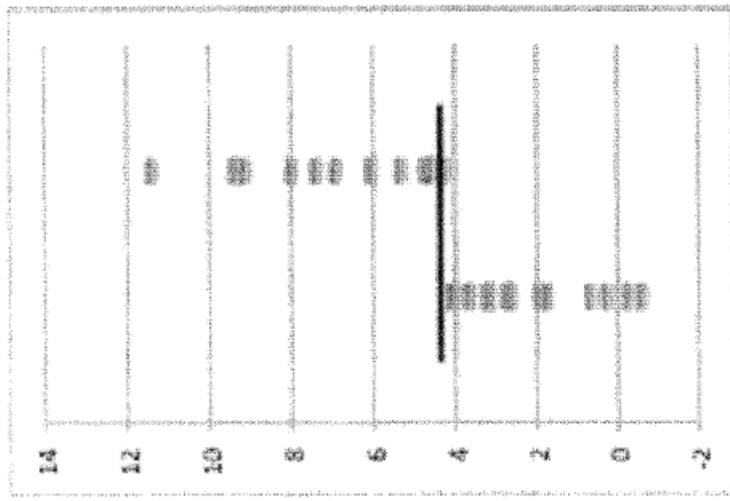
Fig.6-A

ΔCt (miR-144) – (miR-122) en MCI vs individuos sanos

Tasa de falsos negativos en MCI 0,24
El umbral es el mismo que se muestra en la Figura 4.

Fig.6-B

$\Delta Ct^{(miR-128-3p)-(miR-122-5p)}$

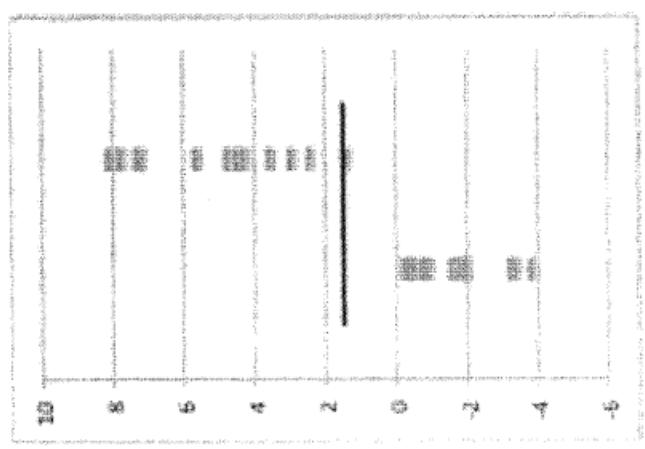


Umbral=4,365
12 muestras de cada uno de los
individuos sanos y los individuos
con AD

Normal
AD

Fig.6-C

$\Delta Ct^{(miR-107)-(miR-122-5p)}$



Umbral=1,495
12 muestras de cada uno de los
individuos sanos y los individuos
con AD

Fig.6-D

Identificación de los microARN disminuidos en AD mediante un análisis completo de qRT-PCR
 El miR-128-3p es un marcador diagnóstico disminuido en la enfermedad de Alzheimer

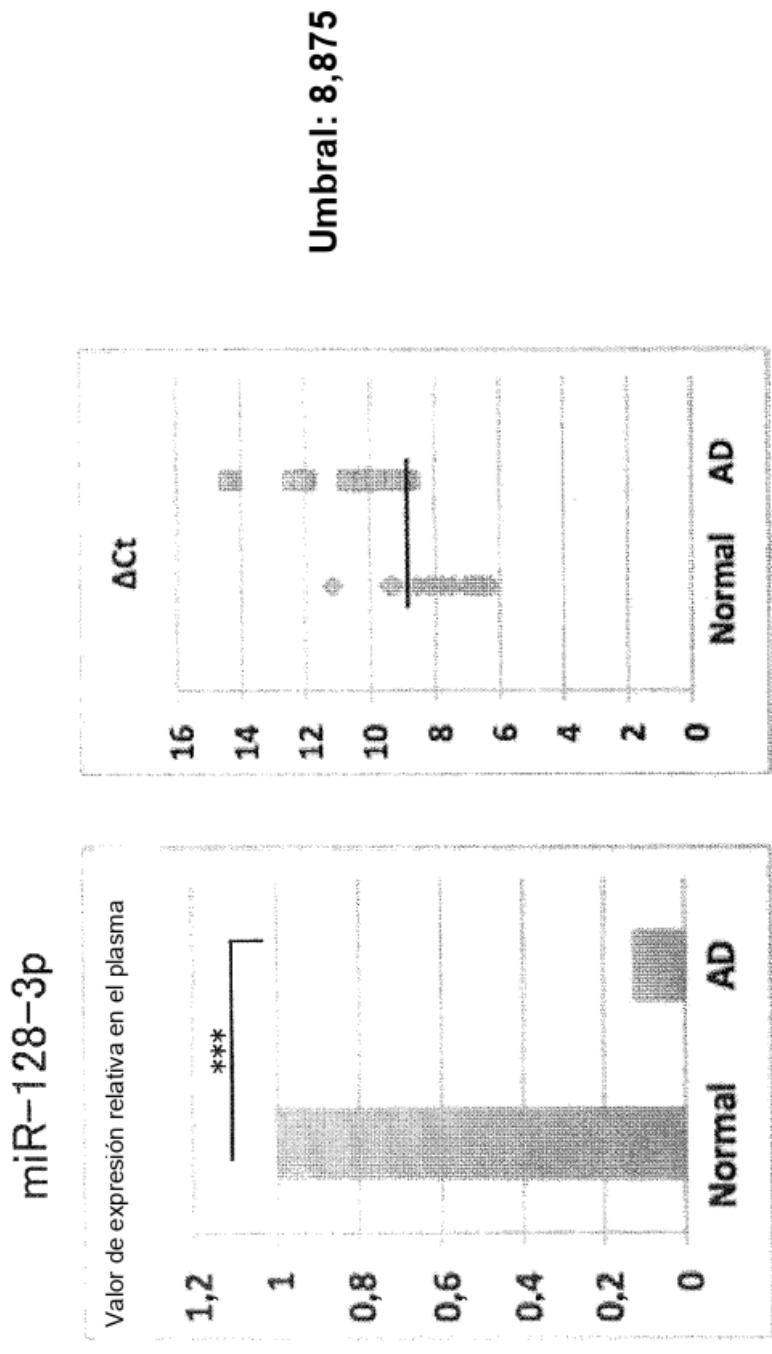
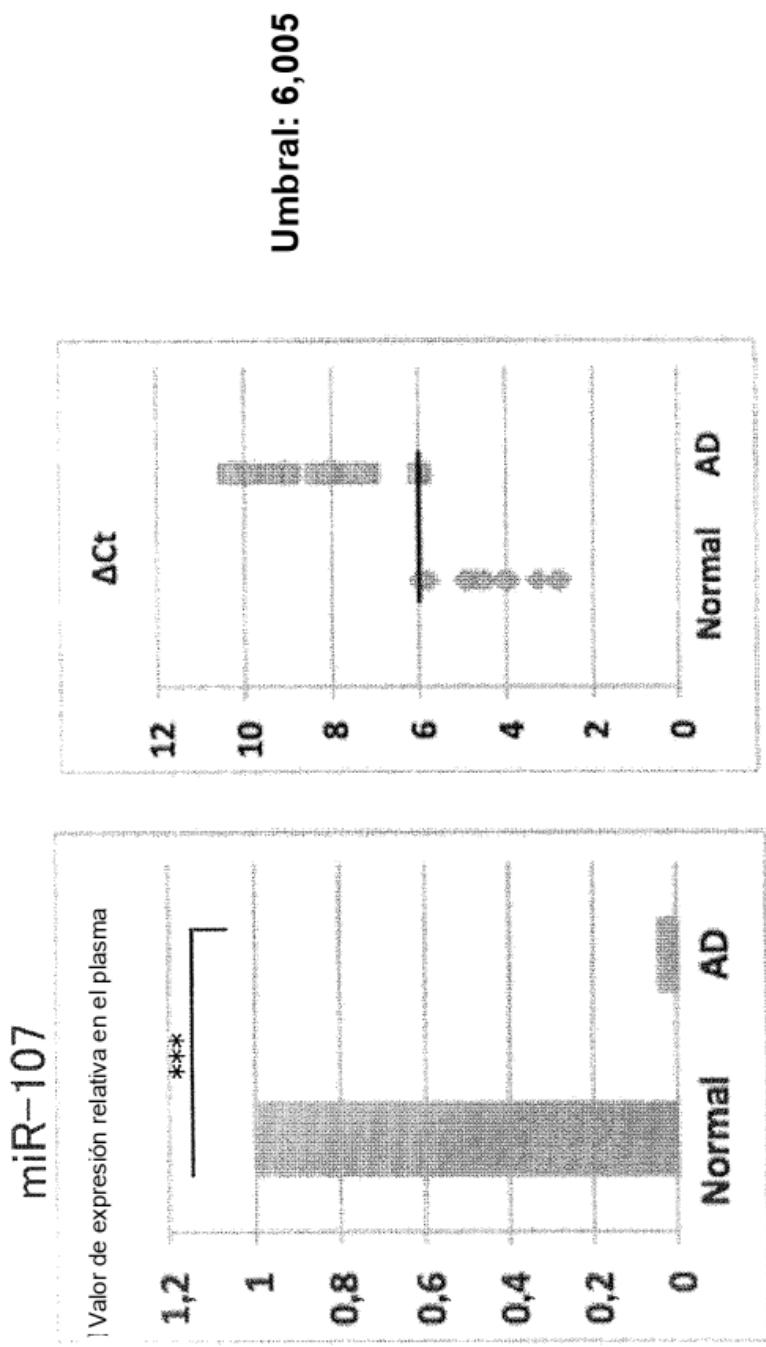


Fig.7

Identificación de los microARN disminuidos en AD mediante un análisis completo de qRT-PCR
 El miR-107 es un marcador diagnóstico disminuido en la enfermedad de Alzheimer



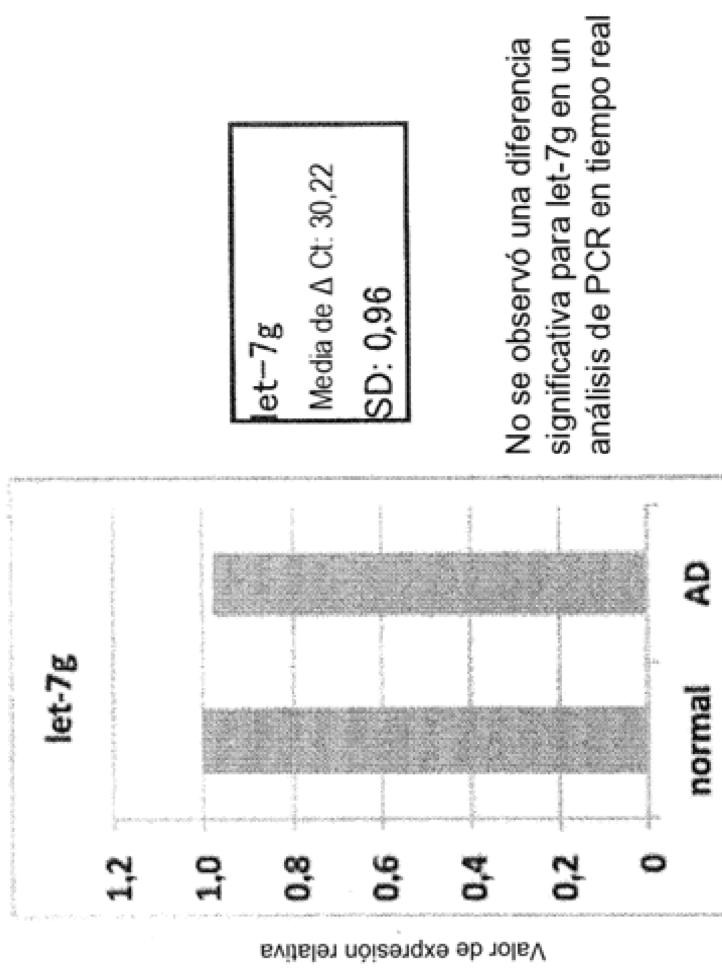
12 muestras de cada grupo

Fig.8

Información sobre las muestras		
De Alzheimer	Número de muestras 62 (Masculinas 21, Femeninas 41) Edad media 79,8 (Máxima 93, Mínima 53)	
MCI	Número de muestras 25 (Masculinas 16, Femeninas 9) Edad media 74,5 (Máxima 88, Mínima 53)	
Individuos sanos	Número de muestras 62 (Masculinas 21, Femeninas 41) Edad media 74,9 (Máxima 97, Mínima 51)	

Fig.9

Una ventaja de la utilización de let-7g como control interno en el diagnóstico utilizando miR-122 y/o let-7f



No se observó una diferencia significativa para let-7g en un análisis de PCR en tiempo real

Debido a que let-7g muestra menos variación en individuos sanos, se puede utilizar como un control interno y aumenta ventajosamente la precisión del diagnóstico.

Fig.10

Una ventaja de la utilización de let-7g como control interno en el diagnóstico utilizando miR-122 y/o let-7f

Caso en el que se utiliza let-7g para la normalización del cálculo de ΔCt
 $(\Delta Ct = (\text{miR candidato}) - (\text{let-7g}))$

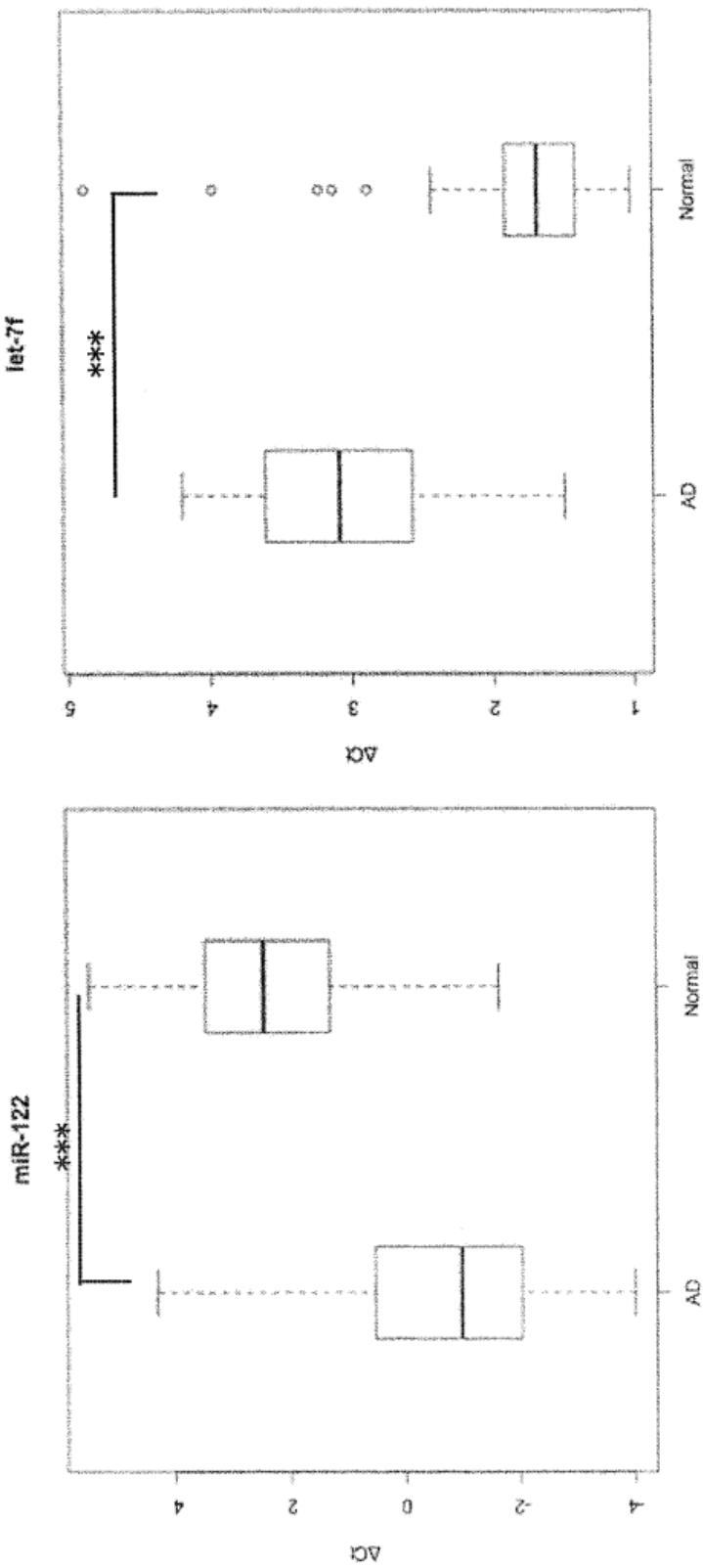


Fig.11-A

Una ventaja de la utilización de let-7g como control interno en el diagnóstico utilizando miR-144

Caso en el que se utiliza let-7g para la normalización del cálculo de ΔCt
($\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ candidato}) - (\text{let-7g})$)

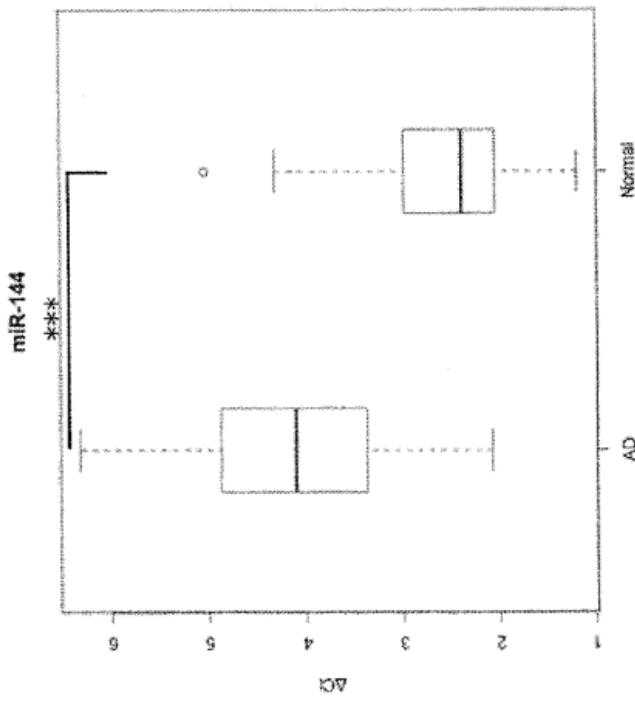


Fig.11-B

$$\Delta Ct^{(miR-128)} - \Delta Ct^{(miR-122)}$$

Tasa de falso positivo - tasa de falso negativo : 0%

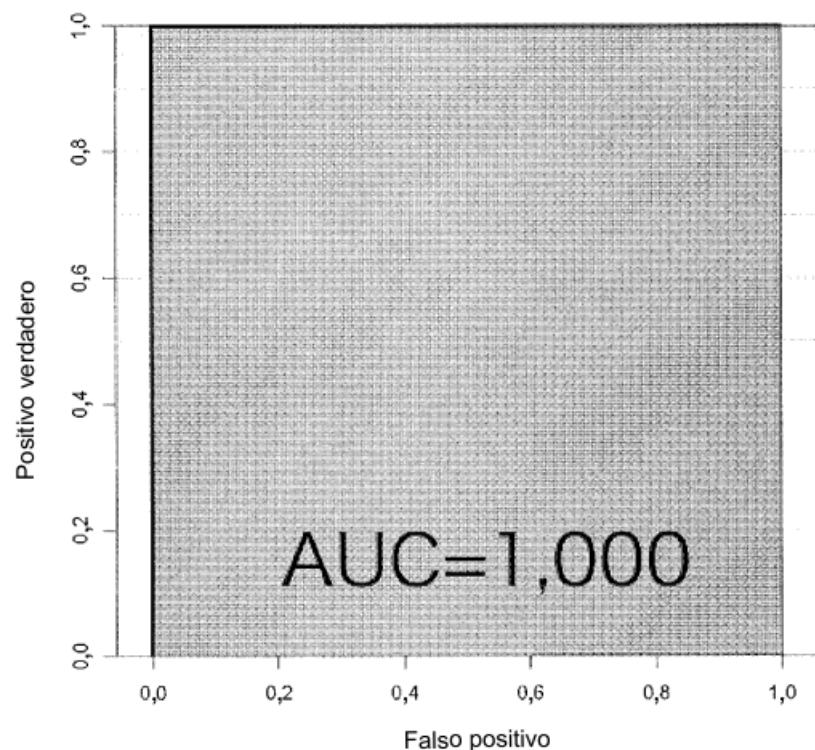


Fig.12