

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
30 de mayo de 2014 (30.05.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2014/080054 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2013/070713

(22) Fecha de presentación internacional:  
17 de octubre de 2013 (17.10.2013)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P201231807  
22 de noviembre de 2012 (22.11.2012) ES

(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS (CIBERNED)** [ES/ES]; C/ Valderrebollo, 5, E-28031 Madrid (ES).

(72) Inventores: **TRULLAS OLIVA, Ramon**; Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB), C/ Rosselló, 161, 6ª i, 7ª planta, E-08036 Barcelona (ES). **FIGUEIRÓ SILVA, Joana**; Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB), C/ Rosselló, 161, 6ª i, 7ª planta, E-08036 Barcelona (ES). **MIHAYLOVICH PODLESNIY, Petar**; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), C/ Valderrebollo, 5, E-28031 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR THE DIAGNOSIS AND/OR PROGNOSIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

(54) Título : MÉTODO DE DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

(57) Abstract: The invention relates to the use of mitochondrial DNA as a quantitative biomarker of neurodegenerative diseases, preferably of Alzheimer disease. The invention also relates to a method and to a kit for the diagnosis and/or prognosis of said diseases using said biomarker.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso del ADN mitocondrial como biomarcador cuantitativo de enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente de la enfermedad de Alzheimer, así como a un método y a un kit diagnóstico y/o pronóstico de dichas enfermedades mediante el uso de dicho biomarcador.



WO 2014/080054 A1

## **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

### **DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se encuadra en el campo de las enfermedades neurodegenerativas, concretamente dentro de los métodos de diagnóstico y/o pronóstico de este tipo de enfermedades, preferiblemente Alzheimer, que se basan en la cuantificación de biomarcadores en muestras biológicas aisladas.

10

### **ESTADO DE LA TÉCNICA**

Recientes evidencias indican que la enfermedad de Alzheimer (EA) es precedida por una larga fase preclínica con cambios bioquímicos anormales, estructurales y funcionales en el cerebro. Estos cambios sugieren que el proceso fisiopatológico de la neurodegeneración de la EA se inicia mucho antes de la aparición de síntomas clínicos de demencia. Por lo tanto, la identificación de nuevos biomarcadores que preceden a la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad es esencial para avanzar en el conocimiento de la EA y poder desarrollar posibles métodos diagnósticos y/o pronósticos y tratamientos terapéuticos tempranos y eficientes.

En la actualidad se conocen dos biomarcadores utilizados en procedimientos en forma de kit diagnóstico que utilizan ensayos con anticuerpos para detectar los niveles de proteínas  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y de tau total (t-tau) y tau fosforilado (f-tau) para diagnosticar la EA en un estado pre-clínico, antes de que se manifiesten los síntomas clínicos de demencia. Una acumulación de  $A\beta$  en cerebro o una baja concentración de  $A\beta_{1-42}$  en líquido cefalorraquídeo (LCR) o un aumentado nivel de t-tau y f-tau en LCR (Jack, C. R. *et al.*, 2010, Lancet Neurol. 9, 119-128) indican un diagnóstico positivo de la EA. Utilizados en combinación, estos dos biomarcadores respaldan un buen valor predictivo de un diagnóstico negativo de la EA. Aun así, el diagnóstico de la EA es todavía

probabilístico y requiere la presencia de síntomas clínicos. Además, la relación entre los niveles de proteínas en cerebro y en LCR en la EA no es sencilla debida a que los niveles de proteínas en LCR como tau total y fosforilado se correlacionan positivamente, mientras que los niveles de A $\beta$  se correlacionan negativamente con una acumulación en cerebro y una baja concentración en LCR. La razón por la cual se asocia la acumulación de A $\beta$  en cerebro con bajas concentraciones de A $\beta_{1-42}$  en LCR no está clara, aunque puede ser debido a una disminución de la liberación de A $\beta_{1-42}$  desde el cerebro al LCR (Mawuenyega, K.G. *et al.* 2010, Science. 330, 1774). Por el contrario, se considera que una alta concentración de tau total en el LCR refleja una lesión neuronal asociada con la acumulación de tau en el cerebro. Sin embargo, otras tau-patías en las cuales hay una alta acumulación de tau en los ovillos neurofibrilares en cerebro, no muestran un aumento correspondiente de tau total en el LCR (Bian, H. *et al.* 2008, Neurology. 70, 1827-1835).

Existe la hipótesis de que la disfunción mitocondrial está involucrada en la fisiopatología de la EA, pero si ésta precede o es una consecuencia del proceso neurodegenerativo todavía no está claro. Además, la EA se asocia con alteraciones en la bioenergética y función mitocondrial, dado que las neuronas son altamente dependientes de la energía aeróbica proporcionada por las mitocondrias (Swerdlow, R.H. *et al.* J. Alzheimers. Dis., 2010, 293-310).

En el estado de la técnica se describe además, que pacientes que sufren de la EA tienen en el cerebro una mayor incidencia de mutaciones localizadas en la región control (CR) del ADN mitocondrial dentro de los elementos que se sabe están involucrados en la transcripción de la cadena-L y la replicación de la cadena-H (WO2007011322A2). Para ello, el documento WO2007011322A2 aporta métodos y sistemas analíticos para el diagnóstico pre- o post-sintomático de trastornos neurodegenerativos asociados con la formación de depósitos de  $\beta$ -amiloide y/o fibrillas de  $\beta$ -amiloide, mediante la cuantificación o detección de dichas mutaciones en el ADN mitocondrial en tejido o células de un individuo. Otro método está descrito en el documento WO9409162A1 para

diagnosticar o pronosticar una predisposición a la EA que comprende la detección de mutaciones o inserciones en el ADN mitocondrial.

Otros estudios asocian polimorfismos con la EA. Están descritos 138  
5 polimorfismos asociados con dicha enfermedad ("Alzheimer's Disease  
Neuroimaging Initiative"). Lakatos *et al.* aportan, en su estudio sobre el papel  
de los haplogrupos mitocondriales procedentes de 138 polimorfismos  
mitocondriales en 358 individuos de raza caucásica, 5 polimorfismos más a los  
ya descritos, que se pueden asociar con EA (Lakatos A. *et al.* Neurobiol Aging,  
10 2010, 31(8): 1355-1363). Por otro lado, un estudio de 138 polimorfismos de  
nucleótido único realizado en 3.250 pacientes con EA y 1.221 controles,  
concluye que no hay ninguna evidencia consistente de asociación entre las  
variaciones del ADN mitocondrial y la EA.

15 En resumen, hasta el momento, se han descrito métodos diagnósticos y/o  
pronósticos de la EA en los cuales se miden los niveles de biomarcadores  
como  $\beta$ -amiloide y tau total y fosforilado, así como mutaciones o polimorfismos  
en el ADN mitocondrial. También se sabe que el LCR está en contacto directo  
con el parénquima cerebral, por lo que se considera que es el mejor fluido para  
20 identificar posibles alteraciones del metabolismo cerebral. Sin embargo, estos  
métodos tienen el inconveniente de que el diagnóstico y/o pronóstico se realiza  
en muestras biológicas de tejido o LCR, lo cual requiere la obtención de dichas  
muestras a través de un procedimiento invasivo en el paciente, además de ser  
métodos poco fiables para el diagnóstico y/o prevención precoz de la  
25 enfermedad. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar otros métodos de  
diagnóstico y/o pronóstico precoces de la EA que puedan emplear muestras  
biológicas cuya obtención no implique realizar un método invasivo en el  
paciente. Además, sería deseable que estos procedimientos fueran más  
sencillos de realizar, más sensibles, más específicos, más reproducibles entre  
30 los laboratorios y con menor variabilidad que la medida de niveles de proteínas  
con anticuerpos que se utiliza en los kits actualmente disponibles para el  
diagnóstico de la enfermedad de EA.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en un primer aspecto al uso del ADN  
5 mitocondrial como biomarcador cuantitativo para el diagnóstico y/o pronóstico  
de enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente de la EA.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método  
diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de una enfermedad neurodegenerativa,  
10 preferiblemente de la EA, basado en la cuantificación del ADN mitocondrial en  
una muestra biológica aislada de un sujeto.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un kit para el  
diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad neurodegenerativa,  
15 preferiblemente de la EA, caracterizado porque comprende al menos un  
conjunto de cebadores o sondas para la cuantificación del ADN mitocondrial.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un uso del kit que  
comprende cebadores y/o sondas específicos para el ADN mitocondrial, para el  
20 diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad neurodegenerativa,  
preferiblemente de la EA.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 La presente invención propone el uso del ADN mitocondrial como biomarcador  
cuantitativo para el diagnóstico y/o pronóstico precoz de una enfermedad  
neurodegenerativa, preferiblemente de la EA, y por tanto proporciona un  
método mejorado de diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad  
neurodegenerativa, preferiblemente de la EA, basado en el uso de dicho  
30 biomarcador.

El método descrito en la presente invención aporta la ventaja de que permite

llevar a cabo un diagnóstico y/o pronóstico precoz de la enfermedad neurodegenerativa, es decir, antes de que se manifiesten los síntomas clínicos asociados a dicha enfermedad. Esto permite administrar al paciente tratamientos terapéuticos y/o profilácticos tempranos y eficientes.

5

Además, dicho método puede llevarse a cabo en una amplia variedad de muestras biológicas sin que su fiabilidad y reproducibilidad se vean alteradas, entre ellas, por ejemplo aunque sin limitarnos, sangre, suero o plasma del sujeto en estudio. Así, el método de la invención no requiere necesariamente la  
10 realización de un procedimiento invasivo en el paciente como ocurre con otros métodos de diagnóstico conocidos hasta la fecha que necesitan de la obtención de tejido cerebral o líquido cefalorraquídeo. Además, este procedimiento es sencillo de realizar, ya que la cuantificación del ADN mitocondrial puede realizarse mediante técnicas ampliamente utilizadas de cuantificación de ácidos  
15 nucleicos, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, PCR. El método aquí descrito es un método sensible, específico, reproducible entre los laboratorios y con menor variabilidad que la medida de niveles de proteínas con anticuerpos que se utiliza en los kits actualmente disponibles para el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas.

20

Así, la presente invención supone una solución a la necesidad de aportar un método mejorado de diagnóstico y/o pronóstico precoz de enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente de la EA, detectable en una muestra biológica.

25

Por todo ello, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso del ADN mitocondrial como biomarcador cuantitativo para el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente, de la EA.

30 Se entiende por “diagnóstico” el procedimiento mediante el cual se identifica la presencia o ausencia de una enfermedad en un sujeto, preferiblemente, de una enfermedad neurodegenerativa, más preferiblemente de la EA. El término

“pronóstico” se refiere al procedimiento mediante el cual se establece una predicción de los sucesos que ocurrirán en el desarrollo o curso de una enfermedad, preferiblemente, de una enfermedad neurodegenerativa, más preferiblemente de la EA, incluyendo, aunque sin limitarnos, la predisposición a

5 padecer dicha enfermedad, la recaída o la capacidad de respuesta a un determinado tratamiento.

El término “precoz”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a al diagnóstico o pronóstico de una enfermedad, preferiblemente de una

10 enfermedad neurodegenerativa, más preferiblemente de la EA, en un sujeto en las primeras etapas de la misma, es decir, antes de la aparición de síntomas clínicos.

El término “biomarcador cuantitativo”, tal y como se emplea en la presente

15 descripción, se refiere a la cantidad o concentración de ADN mitocondrial utilizada como indicador de una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente de la EA, y de su estado de desarrollo.

En la presente invención, se entiende por “ADN mitocondrial” el material

20 genético de las mitocondrias que se puede encontrar tanto a nivel intracelular como extracelular o circulante. El material genético intracelular se encuentra dentro de la célula y el material genético extracelular o circulante se encuentra fuera de la célula, como puede ser, aunque sin limitarse, en el ambiente del líquido cefalorraquídeo, de la sangre, del suero, del plasma sanguíneo, de la

25 saliva, de la orina, de la lágrima o del sudor. Por ello, en una realización preferida, el ADN mitocondrial al que se refiere la presente invención es ADN mitocondrial extracelular o circulante.

En una realización más preferida, las regiones de ADN mitocondrial que se

30 cuantifican en la presente invención son al menos una de las siguientes: ADNmt-515, ADNmt-85, ADNmt-153 o ADNmt-123, en humano. Las tres primeras regiones se localizan en la secuencia que se encuentra entre las

bases 14418 y 14932 (la localización exacta se muestra en la tabla 5) de la secuencia completa de ADN mitocondrial humano de referencia de Cambridge (RefSeq: NC\_012920.1). Estas tres regiones codifican los genes mitocondriales ND6, tRNA-Gly y CYTB; la región ADNmt-123 se encuentra entre las bases  
5 805 y 927 de la secuencia completa de ADN mitocondrial humano de referencia de Cambridge (RefSeq: NC\_012920.1). En otra realización preferida, las regiones de ADN mitocondrial que se cuantifican en la presente invención son al menos una de las siguientes: ADNmt-115 o ADNmt-699, en ratón, que se localizan en la secuencia que se encuentra entre las bases 214 y 912 (la  
10 localización exacta se muestra en la tabla 5) que codifica el gen mitocondrial 12S RNA ribosomal según la secuencia completa de referencia de ADN mitocondrial de ratón (RefSeq: NC\_005089.1).

En la presente descripción, se entiende por “enfermedad neurodegenerativa”  
15 un tipo de enfermedades que agrupa a un género de desórdenes cognitivos, tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Creutzfeldt-Jakob y esclerosis múltiple. Estos trastornos cognitivos se deben a un aumento en los procesos de muerte celular, reduciendo el número de neuronas y generando cambios en la conducta. La  
20 definición de enfermedad neurodegenerativa en la presente invención excluye la demencia frontotemporal (DFT).

El término “enfermedad de Alzheimer” o “EA”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a una enfermedad neurodegenerativa que se  
25 manifiesta como deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza en su forma típica por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales, a medida que las células nerviosas degeneran y/o mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian.

30 En la presente invención, se entiende por “demencia frontotemporal” o “DFT”, un síndrome clínico causado por la degeneración del lóbulo frontal del cerebro humano, que puede extenderse al lóbulo temporal. Es uno de los tres



síndromes provocados por la degeneración lobular frontotemporal, y la segunda causa más común de la demencia de inicio temprano tras la enfermedad de Alzheimer.

- 5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente de la EA, de ahora en adelante “método de la invención”, que comprende las siguientes etapas:

- 10 a) cuantificar el ADN mitocondrial en una muestra biológica aislada de un sujeto; y  
b) comparar el valor obtenido en la etapa (a) con un valor estándar.

En una realización preferida, el ADN mitocondrial al que se refiere el paso (a) del método de la presente invención es ADNmt-515, ADNmt-85, ADNmt-123  
15 y/o ADNmt-153, si el sujeto es humano; ADNmt-115 y/o ADNmt-699, si el sujeto es ratón. En una realización más preferida, el ADN mitocondrial al que se refiere el paso (a) del método de la invención es ADN mitocondrial extracelular.

- 20 La expresión “cuantificar” el ADN mitocondrial en una muestra biológica aislada de un sujeto, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a la medida de la cantidad o la concentración. La medida se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del ADN mitocondrial tanto intracelular como extracelular, mediante técnicas de medida de ADN, como por ejemplo aunque  
25 sin limitarnos, PCR, PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), PCR digital en gotas (ddPCR) o *Southern Blot*. Preferiblemente, la cantidad cuantificada en la presente invención se expresa como número de copias de ADN mitocondrial.

En una realización preferida, la etapa (a) del método de la invención se lleva a  
30 cabo mediante PCR, qPCR, ddPCR o *Southern Blot*. Más preferiblemente, la etapa (a) se lleva a cabo mediante qPCR o ddPCR. Aun más preferiblemente, la etapa (a) se lleva a cabo mediante ddPCR.

En la presente descripción, se entiende por “PCR” la reacción en cadena de la polimerasa. Es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un

5 mínimo. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar hebras de ADN partiendo de cebadores que se unen en los extremos de las hebras, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y la unión del cebador y, a continuación,

10 dejar que vuelvan a unirse las polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. En la presente invención la PCR se emplea para la amplificación y posterior cuantificación del ADN mitocondrial de la muestra biológica, preferiblemente para amplificar las secuencias ADNmt-515, ADNmt-85, ADNmt-123 y/o ADNmt-153, si el sujeto es humano; ADNmt-115 y/o ADNmt-699, si el sujeto es ratón.

15 Existen varios tipos de PCR como la PCR a tiempo real o cuantitativa y la PCR digital en gotas, entre otras. La principal característica de la qPCR es que permite cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra original o identificar, con una muy alta probabilidad, muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión. La ddPCR es un perfeccionamiento de los

20 métodos convencionales de reacción en cadena de polimerasa que puede ser utilizada para cuantificar directamente el contenido de ácido nucleico a un nivel de resolución de una sola molécula y amplificar (“clonally amplify”) ácidos nucleicos como el ADN, ADNc o ARN. En la presente invención las dos variantes de PCR se pueden utilizar para la cuantificación del ADN

25 mitocondrial, preferiblemente extracelular, en una muestra biológica.

El término “*Southern Blot*”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a un método de biología molecular que permite detectar la presencia de una secuencia de ADN en una mezcla compleja de este ácido nucleico y

30 cuantificar el ADN presente en una muestra biológica. Para ello, se emplea la técnica de electroforesis en gel de agarosa con el fin de separar los fragmentos de ADN de acuerdo a su longitud y, después, una transferencia a una

membrana en la cual se efectúa la hibridación de la sonda.

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de ADN mitocondrial, preferiblemente expresada como número de copias de ADN mitocondrial, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con la misma o que pueda derivarse de ésta. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas del ADN mitocondrial obtenidas mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopía de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta como producción de proteínas codificadas por el ADNmt, generación de radicales libres o producción de energía.

El término “muestra biológica aislada”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una muestra aislada de un organismo que puede provenir de un fluido fisiológico y/o de cualquier célula o tejido de un organismo. En una realización preferida, la muestra biológica aislada de la etapa (a) se selecciona de la lista que consiste en: saliva, sudor, lágrimas, orina, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero y plasma sanguíneo. En una realización más preferida, la muestra biológica es líquido cefalorraquídeo. En otra realización preferida, la muestra biológica es sangre, suero o plasma sanguíneo. En una realización más preferida, la muestra biológica es suero.

El término “líquido cefalorraquídeo”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un líquido de color transparente, que baña el encéfalo y la médula espinal. Numerosas enfermedades alteran su composición y su estudio es importante, y con frecuencia determinante, en las enfermedades del sistema nervioso central o periférico. Dentro de esas enfermedades se incluyen las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

Se entiende por “valor estándar” cualquier valor o rango de valores derivado de

la cuantificación del ADN mitocondrial en una muestra biológica control procedente de un individuo sano o en una mezcla de muestras biológicas derivadas de un grupo control.

- 5 En la presente descripción, se entiende por “grupo control”, un grupo de individuos sanos, de la misma o similar edad que el sujeto estudiado, del cual se han obtenido valores o rangos de valores de concentración o cantidad de ADN mitocondrial derivados de la cuantificación de ADN mitocondrial en una colección de muestras biológicas procedente de dichos individuos sanos, y que
- 10 son representativos de la población en la que se va a aplicar el método de la invención. La cuantificación de ADN mitocondrial se ha de realizar de la misma forma, y ser obtenida a partir del mismo tipo de muestra biológica aislada que la procedente del sujeto a estudiar en el paso (a) del método de la invención.
- 15 Se entiende por “sano”, “individuo sano” o “sujeto sano” en la presente invención aquel sujeto o individuo que no padece una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente EA.

Se entiende por “población sana” en la presente invención, un conjunto de

20 individuos o sujetos que no presentan una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente EA.

Se entiende por “individuos sanos representativos de la población en la que se va a aplicar el método de la invención” aquellos sujetos que no padecen

25 enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente EA, en el momento de la extracción de la muestra biológica aislada a analizar y que como grupo tienen un patrón similar en cuanto a por ejemplo, aunque sin limitarnos, raza, edad o distribución por género, que la población de pacientes o sujetos a los que se va a aplicar el método de la invención.

30

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de ADN mitocondrial

determinada en la muestra biológica del paso (a) con un valor estándar. La comparación descrita en el apartado (b) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

5 En otra realización preferida, el método de la invención además comprende:

c) asignar al sujeto del paso (a) al grupo de pacientes con predisposición a padecer una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente la EA, o al grupo de pacientes que padecen una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente la EA, cuando el valor obtenido en la etapa (a) es significativamente menor que el valor estándar.

Una cantidad “significativamente menor” que un valor estándar puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student de dos colas, funciones discriminantes de Fisher, utilizando los análisis de Kruskal-Wallis con la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Dunn, ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Bonferroni o pruebas U de Kursal-Wallis.

El sujeto al que se refiere el paso (a) del método de la invención puede ser un humano, pero también un mamífero no humano, como por ejemplo, pero sin limitarse, roedores, rumiantes, felinos o cánidos. Por ello, en otra realización preferida, el sujeto del cual procede la muestra biológica aislada del paso (a) del método de la invención es un mamífero. En una realización más preferida, el mamífero es un humano.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente de la EA, de ahora en adelante “kit de la invención”, que comprende al menos uno de los siguientes conjuntos de cebadores o sondas:

- a) SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4,
- b) SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y opcionalmente SEQ ID NO: 8,
- c) SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4,
- d) SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 y opcionalmente SEQ ID NO: 5, o
- 5 e) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

En una realización preferida, el kit de la invención comprende los cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

- 10 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al uso de un kit que comprende cebadores y/o sondas específicos para el ADN mitocondrial, para el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente de la EA. En una realización preferida, estos cebadores y/o sondas específicos para el ADN mitocondrial, son específicos para el ADN
- 15 mitocondrial ADNmt-515, ADNmt-85, ADNmt-123 y/o ADNmt-153, de humano; o ADNmt-115 y/o ADNmt-699 de ratón. En una realización más preferida del cuarto aspecto de la invención, dicho kit es el kit de la invención descrito anteriormente.
- 20 El kit de la invención pueden comprender, sin ningún tipo de limitación, cebadores marcados o sin marcar, sondas marcadas o sin marcar, tampones, agentes para prevenir la contaminación, compuestos marcadores como por ejemplo, aunque sin limitarnos, fluorocromos, etc. Por otro lado, el kit de la invención puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su
- 25 puesta en marcha y optimización. El kit de la invención puede contener controles positivos y negativos. Preferiblemente, este kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo la cuantificación del ADN mitocondrial según se describe en la invención.
- 30 En una realización preferida, al menos uno de los conjuntos de cebadores o sondas del kit de la invención está marcado o inmovilizado. En una realización más preferida, al menos uno de los conjuntos de cebadores o sondas del kit de

la invención está marcado con una etiqueta seleccionada de la lista que comprende: un radioisótopo, un marcador fluorescente o luminiscente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima y un sustrato de una enzima. En una realización aun más preferida, al menos  
5 uno de los conjuntos de cebadores o sondas del kit de la invención está inmovilizado en un soporte, como por ejemplo aunque sin limitarnos, en una matriz de nylon, en un soporte de plástico o en cuentas.

En la presente descripción, se entiende por “cebador” una cadena de ácido  
10 nucleico que sirve como punto de partida para la amplificación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3' hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a la hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar y amplificar la hebra molde. En la presente invención los cebadores se unen a los extremos del ADN  
15 mitocondrial para su amplificación y detección mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, PCR.

El término “sonda”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un fragmento de ADN de pequeño tamaño marcado mediante fluorescencia  
20 que emite señales detectadas por un laser y es usada como herramienta en, por ejemplo, aunque sin limitarnos, la qPCR o ddPCR para cuantificar el ADN mitocondrial de una muestra biológica.

Los cebadores y/o sondas específicos para el ADN mitocondrial,  
25 preferiblemente para el ADN mitocondrial ADNmt-515, ADNmt-85, ADNmt-123 y/o ADNmt-153, de humano; ADNmt-115 y/o ADNmt-699 de ratón, se pueden diseñar mediante técnicas de diseño de cebadores y/o sondas ampliamente conocidas en el estado de la técnica. Preferiblemente los cebadores a los que se refiere la presente invención se seleccionan de entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID  
30 NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. Preferiblemente las sondas a las que se refiere la presente invención se seleccionan de entre SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10

**Fig. 1. Disminución de la concentración de ADN mitocondrial en el líquido cefalorraquídeo de sujetos con enfermedad de Alzheimer preclínica.** La concentración de ADN mitocondrial en las muestras de LCR se midió mediante qPCR con cebadores dirigidos a una región entre las bases 14418 y 14932 de la secuencia de ADN mitocondrial humano. **A)** tres diferentes combinaciones de cebadores, dos de ellos anidados, se utilizaron para confirmar la especificidad del ADN mitocondrial amplificado en el LCR. Dos de las parejas de cebadores de PCR (SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 / SEQ ID NO: 4) fueron diseñadas para amplificar dos secuencias cortas (153 pb y 85 pb, el ADN mitocondrial-153 y el ADN mitocondrial-85, respectivamente) situadas en los extremos de una secuencia más larga, 515 bp (ADN mitocondrial-515) que a su vez puede ser amplificada por la combinación de los cebadores directo e inverso de primera y segunda pareja de cebadores respectivamente (SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 4). **B)** Imagen representativa que corresponde a un gel de agarosa mostrando el marcador de tamaño de ADN (M) y los productos ADN mitocondrial-153 (carril 1), ADN mitocondrial-85 (carril 2) y ADN mitocondrial-515 (carril 3) obtenidos respectivamente con cada uno de los tres pares de cebadores diferentes en una muestra de LCR del sujeto número 2 del grupo C1. **C, D)** Cuantificación del contenido de ADN mitocondrial por qPCR en el LCR en sujetos en riesgo de padecer EA (LA ), pacientes sintomáticos con EA pacientes diagnosticados con FTLD (**C**) y pacientes pre-sintomáticos portadores de mutaciones PSEN1 (**D**). Los valores son medias  $\pm$  SEM de la



concentración de ADN mitocondrial en el LCR expresados en fg/ml. El número encima de las barras de error representa el número de sujetos por grupo. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ , significativamente diferente al grupo control de edad correspondiente (Kruskal-Wallis con comparaciones post-hoc de Dunn). #,  $P < 0,05$ , significativamente diferente del grupo control de edad correspondiente (Mann-Whitney U test, dos colas).

**Fig. 2. Análisis de discriminación diagnóstica mediante la curva característica operativa receptor (ROC) entre los grupos EA y FTLD.** La sensibilidad y especificidad del contenido de ADN mitocondrial en LCR, expresado en fg/ml y evaluado por qPCR con el producto de la pareja de cebadores ADN mitocondrial-153, fueron determinadas mediante análisis ROC para clasificar correctamente a los pacientes con un diagnóstico de: **A)** Controles cognitivamente normales, C1 (n=10) frente a pacientes diagnosticados con EA esporádica, EA (n=13); el área bajo la curva es = 0,946,  $p < 0,001$ ; **B)** Pacientes con degeneración frontotemporal con biomarcadores de EA normales, FTLD (n=15) frente a pacientes diagnosticados con EA esporádica, EA (n = 13); área bajo la curva es = 0,959,  $p < 0,001$ .

**Fig. 3. La reducción del número de copias de ADN mitocondrial ocurre antes que el daño sináptico en cultivos de neuronas corticales de ratones APP/PS1.** El número de copias de ADN mitocondrial y las proteínas sinápticas se midieron en cultivos de neuronas corticales de ratones silvestres (WT) y ratones transgénicos APP/PS1. **A)** El ADN mitocondrial se midió en cultivos de neuronas corticales a los 14 días de cultivo (DIV). El número de copias de ADN mitocondrial y 18S rRNA se determinaron frente a plásmidos de referencia que contienen las secuencias amplificadas. Para ADN mitocondrial, se utilizaron dos combinaciones de cebadores diferentes: ADN mitocondrial-115 y 699-ADN mitocondrial, que amplifican productos de 115 y 699 pares de bases, respectivamente. Los valores son la media  $\pm$  SEM de n = número de animales, de número de copias de ADN mitocondrial / copias de rRNA 18S. WT (n = 8), APP/PS1 (n = 16). \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ , significativamente diferente del grupo

control correspondiente (Prueba t de Student no pareada de dos colas). **B)** Western blots representativos que muestran los niveles de proteínas PSD95 y sinaptofisina (syn) en lisados de cultivos de neuronas corticales de ratones control WT y ratones transgénicos APP/PS1 a los 14 y 21 DIV. Las proteínas  
5 fueron separadas por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. C-D) Análisis cuantitativo de los niveles de proteínas PSD95 y sinaptofisina. Los valores densitométricos de las bandas que representan inmunoreactividad a PSD95 (**C**) o sinaptofisina (**D**) se normalizaron con los valores de la banda de inmunoreactividad de actina correspondiente. Los valores son la media  $\pm$  SEM  
10 para PSD95 (WT n = 11 y 11; APP/PS1 DIV n = 9 y 10, el 14 y 21, respectivamente) y para sinaptofisina (WT n = 12 y 10; APP/PS1 n = 9 y 10, para 14 y 21 DIV, respectivamente). \*\*, P <0,01, significativamente diferente del control correspondiente (Prueba t de Student no pareada de dos colas).

15 **Fig. 4. La ultrafiltración elimina del LCR los factores inhibidores de la reacción de PCR.** Las curvas de amplificación de qPCR de (**A**) ADN mitocondrial-85, (**B**) ADN mitocondrial-153 y (**C**) ADN mitocondrial-515 fueron realizadas ya sea en un estándar de calibración de ADN mitocondrial humano purificado (100 copias) de células HEK293T (STANDARD), LCR o en LCR  
20 ultrafiltrada (UF LCR). La amplificación directa en LCR del ADN mitocondrial resulta en una curva de amplificación con una pendiente significativamente menor que la obtenida con el patrón de calibración de ADN mitocondrial humano, indicando la presencia de inhibidores que reducen la eficiencia de la reacción de PCR y comprometen una cuantificación precisa. La ultrafiltración  
25 de las muestras de LCR con filtros de 0,5 ml 10.000 MWCO Amicon Ultra elimina completamente los inhibidores de amplificación por PCR lo que produce que la pendiente de la curva de amplificación y la eficiencia de reacción de PCR de todos los productos amplificados sean equivalentes a la observada en el ADN mitocondrial estándar. Los análisis cuantitativos de las pendientes de  
30 las curvas de amplificación por PCR, expresados en número de ciclos entre 20 y 80 unidades de los umbrales relativos de fluorescencia (CT80-CT20), se representan en los gráficos de la derecha para cada uno de los productos de

ADN mitocondrial. Los valores son la media  $\pm$  SEM de unidades de fluorescencia relativa (panel izquierdo) o ciclos de PCR entre umbral 20 y 80 (panel derecho) de  $n = 3$  reacciones independientes de qPCR. \*\*,  $P < 0,01$ , significativamente diferente del estándar HEK293T correspondiente (ONEWAY ANOVA con comparaciones post-hoc Bonferroni).

**Fig. 5. Cuantificación del número de copias de ADN mitocondrial extracelular circulante en LCR mediante ddPCR.** El número de copias de ADN mitocondrial se midió directamente en muestras de LCR por ddPCR utilizando la plataforma de Bio-Rad QX100 Digital Droplet PCR. La amplificación de ADNmt-153 se obtuvo con los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y una sonda marcada con FAM (SEQ ID NO: 8). Los resultados se analizaron mediante el programa QuantaSoft. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM del número de copias de ADN mitocondrial por ml de LCR. **C1**, Grupo control,  $n = 9$ . **EA**, pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer esporádica con niveles bajos de A $\beta$ 1-42, y altos de T-tau y f-tau en LCR,  $n = 20$ . **FTLD**, pacientes diagnosticados con degeneración frontotemporal y con niveles normales en el LCR de los biomarcadores relacionados con la EA,  $n = 11$ . \*\*,  $P < 0,01$ , significativamente diferente de C1 (Kruskal-Wallis con comparaciones post-hoc de Dunn).

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que demuestran la eficacia del uso del ADN mitocondrial como biomarcador cuantitativo para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente de la EA. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante muestran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

**Ejemplo 1. Grupos de estudio y técnicas utilizadas en los ejemplos.**

A continuación se describen detalladamente los diferentes sujetos de los grupos estudiados en la presente invención y todas las técnicas utilizadas para  
5 llevar a cabo los ejemplos descritos posteriormente.

**Sujetos:**

Los sujetos de estos estudios fueron seleccionados de una cohorte de 282 personas reclutadas en la Unidad de Enfermedad de Alzheimer y otros  
10 trastornos cognitivos del servicio de Neurología del Hospital Clínic de Barcelona. Todos los sujetos se sometieron a evaluación clínica y neuropsicológica y punción lumbar. Los sujetos fueron clasificados por la presencia o ausencia de demencia y según sus concentraciones en LCR de: A $\beta$ 1-42, cantidad total de proteína asociada a microtúbulos tau (t-tau) y tau  
15 fosforilada en la treonina 181 (p-tau) (Tablas 1 a 4). Seis grupos fueron seleccionados para el estudio: 1) EA: pacientes diagnosticados con EA probable utilizando criterios NINCDS / ADRDA 's y con el perfil típico característico de biomarcadores que ocurre en la EA: bajos niveles de A $\beta$ 1-42 y niveles elevados de t-tau y P-tau, 2) LA $\beta$ : sujetos asintomáticos con riesgo de  
20 desarrollar EA esporádica que no tienen déficit cognitivo y sólo tienen niveles bajos de A $\beta$ 1-42 en LCR, 3) FTLD: pacientes sintomáticos diagnosticados con alguno de los síndromes de demencia Frontotemporal incluyendo afasia y demencia semántica, y con biomarcadores de EA normales en LCR. 4) PSEN1: pacientes pre-sintomáticos portadores de una mutación dominante PSEN1  
25 (M139T, K239N o I439S) con biomarcadores normales en LCR y cognición normal, 5) C1: grupo control formado por sujetos sanos sin déficits cognitivos y biomarcadores normales en LCR de edad equivalente a los grupos LA $\beta$  y EA. 6) C2: grupo control de sujetos sanos de edad equivalente al grupo PSEN1 sin alteraciones clínicas, genéticas o bioquímicas. Los valores de corte patológico  
30 utilizados fueron los siguientes: A $\beta$ 1-42 <500 pg / ml; t-tau > 450 pg / ml, y p-tau > 75 pg / ml. Los sujetos de todos los grupos se equilibraron para evitar diferencias significativas de edad entre los grupos (Tablas 1 a 4). Sólo los

sujetos <75 años de edad fueron incluidos en este estudio debido a la falta de controles sanos sin biomarcadores alterados por encima de esta edad. Finalmente, las muestras con señales de contaminación de la sangre o de los sujetos con un nivel de LCR de proteína total por encima de 0.7 mg/ml, fueron  
5 excluidas del estudio.

Tabla 1. Características de edad y biomarcadores de los grupos de estudio analizados por PCR.

GRUPO	N	Edad	A $\beta$ [pg/ml]	t-tau [pg/ml]	f-tau-T181 [pg/ml]
C1	10	62 $\pm$ 1	883 $\pm$ 73	226 $\pm$ 15	52 $\pm$ 3
LA $\beta$	7	67 $\pm$ 3	364 $\pm$ 32**	162 $\pm$ 22	40 $\pm$ 6
EA	13	64 $\pm$ 2	302 $\pm$ 18**	883 $\pm$ 125**	119 $\pm$ 13**
FTLD	15	61 $\pm$ 2	718 $\pm$ 40	268 $\pm$ 27	47 $\pm$ 3
C2	7	38 $\pm$ 3	690 $\pm$ 25	261 $\pm$ 17	53 $\pm$ 1
PSEN1	6	35 $\pm$ 3	908 $\pm$ 163	246 $\pm$ 19	51 $\pm$ 3

10

Tabla 2. Características clínicas y valores individuales de los biomarcadores de los sujetos analizados por qPCR.

Grupo	Código de la muestra	LCR A $\beta$ [pg/ml]	LCR t-tau [pg/ml]	LCR f-tau-T181 [pg/ml]	Alelo ApoE	Edad [Años]	Sexo V-varon M-Mujer
C1	1	860	289	62	3/3	66	V
	2	755	153	41	3/3	64	M
	3	794	169	42	3/3	62	M
	4	616	254	47	3/3	65	M
	5	750	197	44	3/3	68	V
	6	834	274	57	3/3	58	M
	7	862	216	46	3/3	66	V
	8	1161	263	59	3/3	57	V
	9	793	254	52	3/3	59	M
	10	1405	194	67	3/3	57	M
LA $\beta$	11	263	103	27	3/3	55	M
	12	333	120	29	3/3	70	V
	13	274	127	26	3/3	69	M
	14	416	258	61	4/3	56	M
	15	330	220	53	4/3	73	M
	16	467	128	28	3/3	74	M
	17	466	179	55	3/3	69	M
EA	18	286	640	88	4/3	70	V
	19	338	2186	165	3/3	68	M
	20	206	899	127	4/3	58	M
	21	292	530	76	3/3	57	M
	22	313	557	80	3/3	72	M
	23	379	1200	240	3/3	60	M
	24	353	462	75	3/3	62	M
	25	317	987	146	4/3	60	M
	26	428	766	94	4/3	58	V
	27	245	917	116	3/3	69	M
	28	208	553	76	4/3	72	V
	29	243	754	126	4/3	73	V
	30	311	1024	144	3/3	54	V
FTLD	31	545	148	35	3/3	64	M
	32	765	429	59	4/3	54	M
	33	853	223	53	3/3	52	V
	34	922	192	44	3/3	58	V
	35	568	176	46	4/3	49	V
	36	530	98	28	3/3	65	V
	37	556	203	36	3/3	64	M
	38	785	281	53	4/3	72	V
	39	590	211	35	3/2	61	M
	40	831	276	38	3/3	58	M
	41	721	400	74	3/3	69	M
	42	652	430	58	3/3	70	M
	43	992	244	50	3/3	52	V
	44	867	409	52	3/3	52	M
	45	587	293	46	3/2	74	V
C2	46	691	214	56	3/3	35	M
	47	647	240	47	3/3	35	V
	48	578	232	49	3/3	39	M
	49	668	348	57	3/3	25	M
	50	734	293	53	4/3	44	M
	51	769	246	55	3/3	42	M
	52	745	252	55	3/3	44	V
PSEN1	53	823	193	37	3/3	24	M
	54	754	271	49	3/3	33	V
	55	656	324	54	3/3	33	V
	56	506	233	62	3/3	37	V
	57	1619	233	55	3/3	35	M
	58	1091	221	50	3/3	45	M

Tabla 3: Características clínicas y valores individuales de los biomarcadores en

los pacientes analizados mediante ddPCR.

Grupo	Codigo de Muestra	LCR A $\beta$ [pg/ml]	LCR t-tau [pg/ml]	LCR f-tau-T181 [pg/ml]	Alelo ApoE	Edad [Años]	Sexo V-varón H-Hembra
C1	1	860	289	62	3/3	66	V
	2	755	153	41	3/3	64	F
	3	794	169	42	3/3	62	F
	4	616	254	47	3/3	65	F
	5	750	197	44	3/3	68	V
	6	834	274	57	3/3	58	F
	8	1161	263	59	3/3	57	V
	9	793	254	52	3/3	59	F
	10	1405	194	67	3/3	57	F
EA	18	286	640	88	4/3	70	V
	19	338	2186	165	3/3	68	F
	21	292	530	76	3/3	57	F
	22	313	557	80	3/3	72	F
	23	379	1200	240	3/3	60	F
	24	353	462	75	3/3	62	F
	59	382	607	83	3/3	59	F
	60	265	967	135	4/3	64	F
	27	245	917	116	3/3	69	F
	25	317	987	146	4/3	60	F
	61	352	1638	221	3/3	67	F
	28	208	553	76	4/3	72	V
	62	370	783	106	4/3	69	F
	63	360	1314	168	4/3	67	F
	64	326	714	107	4/3	74	F
	29	243	754	126	4/3	73	V
	30	311	1024	144	3/3	54	V
	65	456	606	107	4/3	59	V
	26	428	766	94	4/3	58	V
	66	332	735	115	3/3	56	F
FTLD	31	545	148	35	3/3	64	F
	32	765	429	59	4/3	54	F
	33	853	223	53	3/3	52	V
	34	922	192	44	3/3	58	V
	35	568	176	46	4/3	49	V
	38	785	281	53	4/3	72	V
	67	824	509	80	3/3	69	V
	41	721	400	74	3/3	69	F
	42	652	430	58	3/3	70	F
	43	992	244	50	3/3	52	V
	44	867	409	52	3/3	52	F

5 Tabla 4. Características de Edad y biomarcadores de los grupos analizados mediante ddPCR.

GRUPO	N	Edad	A $\beta$ [pg/ml]	t-tau [pg/ml]	f-tau- T181 [pg/ml]
C1	9	62 $\pm$ 1	885 $\pm$ 81	227 $\pm$ 17	52 $\pm$ 3
EA	20	65 $\pm$ 1	328 $\pm$ 14**	897 $\pm$ 95**	123 $\pm$ 10**
FTLD	11	60 $\pm$ 3	772 $\pm$ 43	313 $\pm$ 38	55 $\pm$ 4

- Los sujetos que fueron incluidos en los estudios qPCR y de los cuales había una cantidad suficiente de muestra de LCR disponible fueron utilizados para
- 5 medir el número de copias de ADN mitocondrial en el LCR por ddPCR. Los sujetos adicionales se incorporaron al grupo de EA. Como en los estudios qPCR, sólo los sujetos <75 años de edad fueron incluidos en este estudio debido a la falta de controles sanos por encima de esta edad. **C1**: grupo control formado por sujetos sanos sin déficits cognitivos, biomarcadores normales en
- 10 LCR, y de edad equivalente a los grupos de pacientes diagnosticados con EA y FTLD. **EA**: pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer esporádica con niveles bajos de A $\beta$ 1-42 y niveles elevados de t-tau y tau-p en el LCR. **FTLD**: pacientes diagnosticados con degeneración lobar frontotemporal y con niveles normales de biomarcadores relacionados con EA en el LCR. \*\*
- 15 Significativamente diferente del grupo de control correspondiente (ONEWAY ANOVA con comparaciones post-hoc de Bonferroni, p <0,01).

#### Obtención de muestras de LCR:

- Todas las muestras de LCR fueron obtenidas con el consentimiento informado
- 20 siguiendo el procedimiento aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínic de Barcelona en la Unidad de Enfermedad de Alzheimer y otros trastornos cognitivos del Servicio de Neurología. Las muestras de LCR se obtuvieron por punción lumbar entre las 09:00 y las 12:00 de la mañana. Un pequeño volumen inicial de LCR se apartó para determinar la presencia de células y realizar otras
- 25 mediciones bioquímicas y a continuación empezó la recogida de 10 ml de LCR. Para evitar la contaminación con células de la sangre, posiblemente adquiridas en el proceso de punción lumbar, se centrifugaron las muestras de LCR inmediatamente después de la recogida a 2000 g durante 10 min a 4 ° C y se



almacenaron a -80 ° C en tubos de polipropileno antes de dos horas después de la extracción. Los biomarcadores Aβ1-42, T-tau y tau-p se midieron mediante ensayos inmunoenzimáticos (Innogenetics, Gante, Bélgica). La amplificación por PCR con cebadores dirigidos a amplificar un gen nuclear con

5 elevado número de copias como el ARN ribosomal 18S, mostró que las muestras de LCR utilizadas en nuestros experimentos no contienen ADN nuclear por encima del límite de detección de 0,6 genomas por muestra, descartando la posibilidad de contaminación del LCR con el ADN de células periféricas.

10

PCR cuantitativa en tiempo real:

En primer lugar, la concentración de ADN mitocondrial circulante en muestras de LCR se evaluó por qPCR con una curva de calibración estándar. Las reacciones se realizaron en al menos diez réplicas en un Corbett Rotor-Gene

15 6000 (Corbett, Mortlake, NSW, 2137, Australia). Cada 20 µl de reacción de PCR consistió en 1X SsoFast EvaGreen (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, EE.UU.), 300 nM de cada uno de los cebadores y 6,2 µl de muestra de LCR. Para detectar ADN mitocondrial en el LCR, se diseñaron cebadores de PCR que amplifican una región entre las bases 14418 y 14932 que codifica los

20 genes mitocondriales ND6, tRNA-Glu y cytB, de acuerdo con la secuencia de referencia de Cambridge para el ADN mitocondrial humano (RefSeq: NC\_012920.1). Se eligieron cebadores que no están asociados con polimorfismos de nucleótido único conocidos. Para confirmar la especificidad de la amplificación de ADN en la reacción de PCR se diseñaron tres

25 combinaciones diferentes de cebadores dirigidos a la misma región del ADN mitocondrial (Fig. 1 A, B). Las secuencias de cebadores 5'-3' son: SEQ ID NO:

1	CCCCTGACCCCCATGCCTCA,	SEQ	ID	NO:	2
	GCGGTGTGGTCGGGTGTGTT-,	SEQ	ID	NO:	3
	CTCACTCCTTGGCGCCTGCC-,	SEQ	ID	NO:	4

30 GGCGGTTGAGGCGTCTGGTG-. Una combinación de cebadores, SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 4, fue diseñada para amplificar una región larga 515 pb (ADN mitocondrial-515). Los otros dos pares de cebadores SEQ ID NO: 1 / SEQ ID

NO: 2 y SEQ ID NO: 3 / SEQ ID NO: 4) fueron diseñados para amplificar dos secuencias cortas (153 y 85 pb, el ADN mitocondrial-153 y el ADN mitocondrial-85, respectivamente) que se encuentran dentro de la región más larga de 515 pb (Fig. 1A). Además, para verificar la detección de ADN mitocondrial en el LCR, se utilizó otra técnica de PCR basado en sondas TaqMan con una combinación de cebadores dirigida a un gen mitocondrial diferente. Para estos estudios, cada uno de 20 l de reacción de PCR consistió en 1X SsoFast Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, EE.UU.), 100 nM de cada uno de los cebadores, 125 nM de sonda SEQ ID NO: 5 (5'-FAM-TGCCAGCCACCGCG-MGB-3') y 6,2 l de muestra de LCR. Los cebadores para esta reacción de PCR fueron diseñados para amplificar una región entre las bases 805 y 927 del genoma del ADN mitocondrial que codifica el gen mitocondrial 12S ribosomal RNA. Las secuencias de esta combinación de cebadores amplifican un producto de 123 pb (ADN mitocondrial-123) y son: Directa (SEQ ID NO: 6), 5'-CCACGGGAAACAGCAGTGAT-3'; Inversa (SEQ ID NO: 7), 'CTATTGACTTGGGTAAATCGTGTGA-3'.

El ADN mitocondrial puede acumular daño oxidativo o estructural, y cuanto más larga es la secuencia de ADN mitocondrial mayor es la probabilidad de tener bases dañadas que impedirían su amplificación por la polimerasa durante la reacción de PCR. La amplificación por PCR de dos diferentes secuencias cortas con las dos primeras combinaciones de cebadores (ADN mitocondrial-85 y ADN mitocondrial-153) se destina a confirmar la especificidad de la diana del ADN mitocondrial. La amplificación de la secuencia más larga (ADN mitocondrial-515) se planificó para evaluar la influencia del daño estructural del ADN mitocondrial en la reacción de PCR y como una confirmación adicional de la especificidad de la diana. Las condiciones para la qPCR se optimizaron utilizando el análisis de curva de temperatura de fusión. El tamaño de los productos amplificados y su homogeneidad se estimaron por electroforesis en gel. La amplificación se realizó usando las siguientes condiciones de ciclo: 95 °C, 2 min seguido de 45 ciclos a 95 °C, 5 s, y 65 °C, 10s, 20s y 60s para el ADN mitocondrial-85, el ADN mitocondrial-153 y ADN mitocondrial 515-

respectivamente. Las mediciones de los Ciclos umbrales (Ct) se establecieron dentro del rango exponencial.

La cuantificación del ADN mitocondrial circulante en el LCR se realizó con una  
5 curva de calibración estándar de ADN mitocondrial humano purificado a partir  
de células HEK293T. El ADN mitocondrial humano purificado se obtuvo de  
mitocondrias aisladas por fraccionamiento subcelular y gradiente de Percoll.  
Las mitocondrias se aislaron de  $1 \times 10^7$  células HEK293T. Las células se  
lavarón, se recogieron en 2 ml de tampón de aislamiento (Hepes 20 mM,  
10 sacarosa 300 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,4), y se homogeneizaron en  
un triturador de tejidos de vidrio / Teflon Potter-Elvehjem. El homogeneizado  
crudo se centrifugó una vez a 1.000 g durante 10 min para eliminar las células  
sin lisar y los núcleos. El sobrenadante conteniendo la fracción mitocondrial  
cruda se depositó sobre un gradiente discontinuo de Percoll, 23/15/10/3% (v /  
15 v), en tampón de aislamiento y se centrifugó a velocidad de 31.000g (Sorvall,  
rotor FIBERLite F21) durante 5 minutos. La fracción que contiene mitocondrias  
situada entre las capas 15 y 23% de Percoll se transfirió a tubos de  
microcentrífuga de 1,5 ml y se diluyó 1:1 (v:v) en tampón de aislamiento.  
Después de mezclar suavemente, las mitocondrias se centrifugaron a 20000 g  
20 durante 20 min. Se descartó el sobrenadante y el ADN se extrajo del sedimento  
mitocondrial mediante un protocolo de lisis alcalina (Wizard Plus Miniprep,  
Promega, Madison, WI, EE.UU.). El contenido de ADN mitocondrial en el  
extracto de ADN mitocondrial se evaluó mediante diferentes métodos: a) por  
qPCR con tres combinaciones de cebadores: una combinación de cebadores,  
25 SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 4, que amplifica la región ADNmt-515; la  
combinación SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 2 que amplifica la región ADNmt-153  
y la combinación SEQ ID NO: 3 / SEQ ID NO: 4 que amplifica la región ADNmt-  
85 (Fig. 1A) contra una curva estándar del producto amplificado  
correspondiente clonado en el plásmido pJET1.2; b) por ddPCR. La  
30 concentración de ADN mitocondrial en LCR se calculó basándose en el cálculo  
de que una copia de ADN mitocondrial corresponde a 18,16 ag. Los estudios  
de caracterización indicaron que el ADN mitocondrial se puede detectar en

muestras humanas de LCR entre 29-35 Ct, correspondiente a un rango de 2-300 fg / ml. En consecuencia, el intervalo de concentraciones de la curva de calibración estándar de ADN mitocondrial usado en los experimentos fue 1-200 copias de ADN mitocondrial por reacción. La eficiencia de la reacción de PCR

5 fue superior a 0,95 en todas las muestras analizadas.

A continuación, la Tabla 5 muestra los cebadores diseñados y las correspondientes secuencias amplificadas por ellos.

10 Tabla 5. Cebadores diseñados y secuencias amplificadas por ellos.

<b>Secuencia amplificada</b>	<b>Región del ADN mitocondrial</b>	<b>Cebador</b>	<b>SEQ ID NO</b>
ADNmt-153	14418-14570 bases de la secuencia NC_012920.1	Cebador directo F1	SEQ ID NO: 1
		Cebador reverso R1	SEQ ID NO: 2
ADNmt-85	14848-14932 bases de la secuencia NC_012920.1	Cebador directo F2	SEQ ID NO: 3
		Cebador reverso R2	SEQ ID NO: 4
ADNmt-515	14418-14932 bases de la secuencia NC_012920.1	Cebador directo F1	SEQ ID NO: 1
		Cebador reverso R2	SEQ ID NO: 4
ADNmt-123	805-927 bases de la secuencia NC_012920.1	Cebador directo 123BP F	SEQ ID NO: 6
		Cebador reverso 123BP R	SEQ ID NO: 7
ADNmt-73	13699-13771 bases de la secuencia NC_012920.1	Cebador directo F3	SEQ ID NO: 9
		Cebador reverso R3	SEQ ID NO: 10

ADNmt-115	214-328 bases de la secuencia NC_005089.1	Cebador directo F4	SEQ ID NO: 11
		Cebador reverso R4	SEQ ID NO: 12
ADNmt-699	214-912 bases de la secuencia NC_005089.1	Cebador directo F4	SEQ ID NO: 11
		Cebador reverso R5	SEQ ID NO: 13
Secuencia de 219 pb del gen que codifica para el 18S rRNA		Cebador directo F6	SEQ ID NO: 14
		Cebador reverso R6	SEQ ID NO: 15
Transgen APP		Cebador directo APP	SEQ ID NO: 16
		Cebador reverso APP	SEQ ID NO: 17
Gen control IL-II		Cebador directo IL-II	SEQ ID NO: 18
		Cebador reverso IL-II	SEQ ID NO: 19

#### PCR digital:

Para validar los resultados obtenidos con qPCR en tiempo real, se realizó la cuantificación adicional de ADN mitocondrial circulante en muestras de LCR de algunos grupos (Tablas 3 y 4) mediante ddPCR utilizando la plataforma Bio-Rad QX100 Digital Droplet PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, EE.UU.). El ADN mitocondrial se amplificó directamente en muestras de LCR con una sonda FAM marcada (SEQ ID NO: 8) y con los cebadores F1 y R1 que producen la amplificación del fragmento ADN mitocondrial-153 utilizado en los anteriores análisis de qPCR. La reacción consistió en 1X ddPCR Mastermix, 900 nm de cada uno de los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y 250 nM

de una sonda marcada con FAM. La secuencia SEQ ID NO: 8 de la sonda fue 6-carboxifluoresceína (FAM)-5'-CGCTGTAGTATATCCAAAGACAACCATCATTCCCCC-3'-BHQ-1. La formación de gotas se llevó a cabo mediante una emulsión formada por la mezcla de 20 µl de la reacción de PCR con 60 l de aceite y las gotas fueron generadas utilizando el cartucho Generador de gotas microfluidico QX100. La amplificación por PCR se realizó usando un termociclador C1000 con las siguientes condiciones: 95 °C 10 minutos, 40 repeticiones de 94 °C 59 ° 1 min 30sec C, 98 °C 10 min. Las condiciones de PCR fueron optimizadas previamente usando ADN mitocondrial purificado a partir de células HEK293T. La presencia o ausencia de amplificación en las gotas se evaluó usando QX100 Droplet Reader (FAM canal) y los resultados se analizaron usando el programa QuantaSoft. Los resultados se expresaron en copias de ADN mitocondrial por ml de LCR (Figura 5).

15

A continuación, la Tabla 6 muestra las sondas diseñadas.

Tabla 6. Sondas diseñadas.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
SONDA	FAM-TGCCAGCCACCGCG-MGB 888-901 bases de la secuencia NC_012920.1_	SEQ ID NO: 5
SONDA2	(FAM)-5'- CGCTGTAGTATATCCAAAGACAACCATCATTCCCCC- 3'-BHQ-1 14458-14493 bases de la secuencia NC_012920.1_	SEQ ID NO: 8

## 20 Ultrafiltración del LCR:

En los estudios de caracterización iniciales observamos que la amplificación directa del ADN mitocondrial en muestras de LCR produce reacciones de PCR con una baja eficiencia (Fig 4), lo que indica que el LCR contiene moléculas que inhiben la detección de ADN por PCR, lo que compromete la cuantificación

precisa, como ya se ha descrito anteriormente para otros ensayos de qPCR en líquidos del cuerpo humano. Para lograr una cuantificación precisa de ADN mitocondrial, hemos tratado el LCR con varios procedimientos para eliminar los inhibidores y obtener eficiencias de PCR equivalentes a las obtenidas en nuestro estándar purificado ADN mitocondrial. De entre los diversos procedimientos, descubrimos que la ultrafiltración del LCR elimina completamente las sustancias inhibidoras del LCR y permite obtener una reacción de PCR con una eficiencia equivalente a la observada con el estándar de ADNmt (Fig. 4), lo que indica que las sustancias inhibidoras presentes en el LCR son solubles y de bajo peso molecular. Las muestras de LCR se ultrafiltraron utilizando filtros Amicon Ultra 0,5 ml (Millipore, MA, EE.UU.) con 10.000 MWCO. Las muestras se diluyeron a 10 veces el volumen inicial con agua y se concentraron de nuevo al volumen inicial por centrifugación a 14.000g durante 10 min. Este procedimiento de ultrafiltración se realizó dos veces.

#### Genotipado de los ratones:

El ADN genómico para genotipar se obtuvo de la cola siguiendo el protocolo del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, Maine, EE.UU.). Una longitud de 1 mm de cola se cortó y se incubó a 55 ° C en un tampón que contiene 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> • 6H<sub>2</sub>O, 0,45% (v / v) de Nonidet P40, 0,45% (v / v) Tween 20 y 150 ug / ml de proteinasa K (Gibco). Después de la digestión del tejido, las muestras se incubaron durante 5 min a 95 ° C para inactivar la proteinasa K y 2 µl de esta muestra se utilizaron para hacer el genotipado por análisis de PCR. Los animales fueron genotipados mediante PCR multiplex usando la reacción SSO Supermix avanzada (Bio-Rad Laboratories) con cebadores dirigidos al transgén APP y al gen de IL-II como control positivo. Los cebadores fueron APP: directo (SEQ ID NO: 16), 5'-CATAGCAACCGTGATTGTCATC-3' y reverso (SEQ ID NO: 17), 5'-TGGATTCTCATATCCGTTCTGC-3'; IL-II: directo (SEQ ID NO: 18), 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3' y reverso (SEQ ID NO: 19) 5'-3' GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC. Las condiciones de PCR fueron: 2 min

a 98 ° C de desnaturalización inicial, seguido por 45 ciclos de 5 s de desnaturalización a 98 ° C, 30 s de hibridación del cebador y extensión a 60 ° C. El genotipo se determinó mediante análisis de curvas de desnaturalización de los productos de PCR.

5

Cultivo de neuronas corticales de ratones transgénicos:

Los cultivos primarios de neuronas corticales se prepararon a partir de cortezas cerebrales de embriones E17 de ratones B6.Cg-Tg (APP<sup>swe</sup>, PSEN1<sup>dE9</sup>) 85Dbo/Mmjax (APP/PS1) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, EE.UU.) de  
10 ambos sexos. Las células fueron disociadas en presencia de tripsina y ADNasa I y se sembraron en pocillos recubiertos de poli-D-lisina (100 µg / ml) a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en medio neurobasal suplementado con 2% B27, 0,1 mg / ml gentamicina y 0,5 mM de GlutaMax. Un tercio del volumen del medio se cambió cada 3-4 días. Las células se mantuvieron a 37 ° C en un  
15 incubador humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Los cultivos se dejaron en reposo hasta el día en que se realizaron los experimentos, y ese periodo de día se denomina en la presente invención como días de cultivo *in vitro* (DIV). Todos los procedimientos con animales y su cuidado fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Barcelona y se llevaron a cabo de acuerdo  
20 con las directrices que se ajustan a las leyes nacionales (Generalitat de Catalunya) e internacionales (Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, National Academy Press, Washington, DC, 1996) (Figura 4).

Determinación del número de copias de ADN mitocondrial en neuronas  
25 corticales cultivadas:

El ADN total se extrajo por incubación de las neuronas corticales en cultivo con tampón SDS (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,5% SDS, 20 g/ml RNasa A, pH 8,0) durante 1 hora a 37 ° C en un volumen de extracción de aproximadamente 1 µl por 1000 células. Los extractos fueron incubados con  
30 proteinasa K (100 µg / ml) durante 1 hora a 56 ° C, seguida por 10 min a 95 ° C para inactivar la enzima. La reacción de qPCR se realizó directamente en tampón de extracción para minimizar la pérdida de ADN mitocondrial en



procedimientos de purificación de columna. Estudios de caracterización demostraron que el tampón de extracción diluido a 1:500 no inhibe la eficiencia de la reacción de PCR. Para la amplificación del ADN mitocondrial, se utilizaron dos combinaciones de cebadores que amplifican productos anidados situados

5 entre las bases 214 a 912 del gen que codifica el ARN ribosomal 12S de la secuencia completa del genoma mitocondrial del *Mus musculus* de referencia NC\_005089.1: El ADN mitocondrial-115 y ADN mitocondrial-699, que producen fragmentos de 115 y 699 pares de bases, respectivamente. Cada reacción contenía 10 µl de 2X SsoAdvanced Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules,

10 CA 94547, EE.UU.), 0,3 mM de cada cebador y 10 µl de una dilución 1:250 de la muestra extraída en un volumen final de 20 µl. Las secuencias de los cebadores son: ADN mitocondrial-115 directo (SEQ ID NO: 11) 5'-CTAGCCACACCCCCACGGGA-3' y reverso (SEQ ID NO: 12) 5'-CGTATGACCGCGGTGGCTGG-3'; ADN mitocondrial-699 el cebador directo de

15 ADN mitocondrial-115 (SEQ ID NO: 11) y el reverso (SEQ ID NO: 13) 5'-3-CGGGCGGTGTGTGCGTACTT'. Las condiciones de PCR fueron: 2 min a 95 ° C de desnaturalización inicial, seguido por 45 ciclos de 5 s de desnaturalización a 95 ° C y 12 o 60 s de hibridación del cebador y extensión a 60 ° C o 65 ° C para el ADN mitocondrial-115 y ADN mitocondrial-699 respectivamente. Para la

20 cuantificación del ADN nuclear (ADNn), utilizamos una secuencia de 219 pb de longitud del gen que codifica para el 18S ribosomal RNA de que se encuentran múltiples copias en el genoma. Las secuencias de los cebadores son: directa (SEQ ID NO: 14), 5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT 3' y reverso (SEQ ID NO: 15) 5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'. Las condiciones de PCR fueron: 2 min

25 a 95 ° C de desnaturalización inicial, seguido de 45 ciclos de 5 s de desnaturalización a 95 ° C y 20 s de hibridación del cebador y extensión a 57 ° C. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Las mediciones de ciclos umbrales (Ct) se establecieron dentro del rango exponencial. Solamente fueron consideradas las reacciones con eficiencias superiores al 90%. La ausencia de

30 productos no específicos se confirmó por análisis de curvas de desnaturalización y por electroforesis en gel. La cuantificación de las copias de ADN mitocondrial y 18S del RNA ribosomal de ADNn se obtuvo mediante una

curva estándar de los productos de amplificación respectivos previamente clonados en plásmidos pJET1.2. Los resultados se expresan como número de copias de ADN mitocondrial dividido por número de copias 18S rRNA. En experimentos de caracterización posteriores, determinamos el número de copias de 18S rRNA presentes en el genoma de neuronas corticales en cultivo en relación a una curva estándar de dos fragmentos diferentes de genes de copia única (IL-II y NP1) clonados en plásmidos pJET1.2. Los resultados revelaron que las neuronas corticales en cultivo tienen aproximadamente 50 copias de ARN ribosómico 18S, lo que indica que estas células contienen un rango de 300-600 copias de ADN mitocondrial por célula (Figura 4).

#### Análisis estadístico:

Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. La significación estadística de las diferencias se examinó utilizando los análisis de Kruskal-Wallis con la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Dunn, ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples post hoc de Bonferroni, o con pruebas t de Student de dos colas o pruebas U de Kruskal-Wallis dependiendo de las características de las muestras. Los análisis de curva característica operativa del receptor (ROC) y el análisis del área bajo la curva se realizaron con el software GraphPad Prism.

#### **Ejemplo 2. Detección de ADN mitocondrial extracelular circulante en el LCR.**

En primer lugar se examinó la posibilidad de detectar ADN mitocondrial extracelular circulante en el LCR. Los estudios de caracterización mostraron que es posible detectar ADN mitocondrial extracelular a partir de un pequeño volumen (10  $\mu$ l) de LCR humano mediante amplificación por PCR. Para confirmar la especificidad de la amplificación de ADN, se emplearon tres combinaciones diferentes de cebadores (Fig. 1); un primer par de cebadores (SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 4) que amplifica una región de 515 pares de bases de longitud (ADN mitocondrial-515) y otros dos pares de cebadores

(SEQ ID NO: 3 / SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 2 respectivamente) anidados dentro de esta región, que amplifican 85 (ADN mitocondrial-85) y 153 (ADN mitocondrial-153) pares de bases respectivamente (Figuras 1A, B). Para determinar la concentración de ADN mitocondrial extracelular en LCR, a continuación se hizo un análisis por qPCR de las muestras de LCR utilizando un amplio rango de concentraciones de un estándar externo de ADN mitocondrial humano aislado de células HEK 293T. Los resultados demostraron que se puede detectar ADN mitocondrial en LCR en un rango entre 29-35 Cts, que corresponde a concentraciones de mtDNA circulante entre 2-300 fg/ml. Se obtuvieron resultados similares con una técnica de análisis de qPCR diferente basado en sondas TaqMan y utilizando una combinación de cebadores diferente dirigida a una región del ADN mitocondrial que codifica el gen mitocondrial RNA 12S ribosómico.

**Ejemplo 3. Análisis de los niveles de ADN mitocondrial circulante en LCR en individuos asintomáticos con riesgo de desarrollar EA y en pacientes diagnosticados con EA esporádica.**

A continuación, se analizó el contenido de ADN mitocondrial extracelular en LCR de pacientes con EA preclínica (escogidos por tener un nivel bajo de A $\beta$  en LCR) y en pacientes sintomáticos ya diagnosticados con EA esporádica (Tabla 1). La amplificación de la región del ADN mitocondrial-85 reveló una marcada reducción del contenido de ADN mitocondrial circulante en muestras de LCR de ambos grupos de pacientes: los sujetos asintomáticos con riesgo de padecer EA por tener niveles bajos de A $\beta$  en el LCR (LA $\beta$  =  $28 \pm 4$  fg / ml, n = 7) y los pacientes sintomáticos con EA diagnosticada (EA =  $48 \pm 7$  fg / ml, n = 13), correspondientes a una disminución de  $85 \pm 2\%$  y  $74 \pm 3\%$ , respectivamente, en comparación con el control del mismo grupo de edad C1 (C1 =  $188 \pm 49$  fg / ml, n = 10). Un efecto equivalente se observó cuando la concentración de ADN mitocondrial en LCR se ensayó con las otras dos combinaciones de cebadores (SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 2; y SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 4). Así, la amplificación por qPCR del producto ADN mitocondrial-153 mostró una reducción del contenido ADN mitocondrial en LCR de  $96 \pm 1\%$

y de  $84 \pm 4\%$  en los grupos LA $\beta$  ( $6 \pm 1$  fg / ml, n = 7) y EA ( $23 \pm 6$  fg / ml, n = 13), respectivamente, en comparación con el grupo C1 ( $142 \pm 44$  fg / ml, n = 10). Asimismo, amplificación por qPCR del producto ADN mitocondrial-515 mostró una reducción del contenido de ADN mitocondrial en el LCR de  $92 \pm 3\%$  y  $70 \pm 7\%$  en los grupos LA $\beta$  ( $3 \pm 1$  fg / ml, n = 7) y EA ( $11 \pm 3$  fg / ml, n = 13) respectivamente, en comparación con el grupo control C1 ( $37 \pm 4$  fg / ml, n = 10) (Fig. 1C). El grupo de pacientes EA mostró una tendencia a tener un mayor contenido de ADN mitocondrial en el LCR que el grupo LA $\beta$  en las tres combinaciones de cebadores (SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 4; y SEQ ID NO: 3 / SEQ ID NO: 4), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En general, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en el porcentaje de disminución de la amplificación de ADN mitocondrial entre los productos de mayor longitud (mtDNA-515) y los fragmentos más cortos (ADN mitocondrial y ADN mt-85-153). La disminución en la amplificación de ADN mitocondrial podría indicar un número menor de copias de ADN mitocondrial o también pérdida de la integridad del ADN. En este último caso, se esperaría que la amplificación por PCR del fragmento más largo mostrase una reducción mayor, porque los fragmentos largos de ADN son más propensos a acumular bases dañadas que impiden amplificación por la polimerasa. De este modo, la observación de que con tres fragmentos de diferente longitud se obtiene una disminución equivalente en la amplificación de ADN mitocondrial en los grupos LA $\beta$  y EA, indica que en estos grupos hay un descenso del número de copias en lugar de una diferencia en la integridad del ADN mitocondrial. En resumen, estos resultados muestran que el contenido de ADN mitocondrial circulante en el LCR disminuye antes de la aparición de los síntomas clínicos de la EA, lo que indica que niveles bajos de ADN mitocondrial se asocian con el riesgo a desarrollar EA.

**Ejemplo 4. Análisis diferencial de los niveles de ADN mitocondrial en pacientes diagnosticados con Demencia Frontotemporal (FTLD) y pacientes con EA.**

Para evaluar si la disminución en el contenido de ADN mitocondrial circulante en el LCR también ocurre en otras demencias que no son del tipo Alzheimer, analizamos la concentración de ADN mitocondrial en el LCR de pacientes sintomáticos diagnosticados con Demencia Frontotemporal (FTLD) (Tabla 1). El análisis de qPCR reveló que la concentración de ADN mitocondrial en el LCR de estos pacientes, medido por las tres combinaciones de cebadores diferentes (ADN mitocondrial-85 =  $132 \pm 35$  fg / ml, ADN mitocondrial-153 =  $234 \pm 160$  fg / ml y ADN mitocondrial-515 =  $77 \pm 27$  fg / ml, n = 15), no fue significativamente diferente de la observada en los controles C1, pero era significativamente mayor que la observada en los grupos LA $\beta$  y EA (Fig. 1C), lo que indica que EA y FTLD no comparten la disminución en la concentración de ADN mitocondrial extracelular en el LCR.

Para determinar si la cantidad de ADN mitocondrial en el LCR discrimina eficientemente entre pacientes con EA y controles esporádicos o pacientes con FTLD se realizó un análisis estadístico de característica operativa del receptor (análisis ROC) del contenido de ADN mitocondrial en LCR medido con ADN mitocondrial-153 (Fig. 2). Los resultados mostraron que con un valor de corte de  $<51$  fg / ml, la concentración de ADN mitocondrial en LCR distingue a los pacientes con EA de los sujetos control cognitivamente normales con sensibilidad y especificidad del 85% y 80%, respectivamente, y con un área bajo la curva ROC de 0,946 (intervalo de confianza 95% = 0,86 a 1), significativamente más alto que el azar (p  $<0,001$ ) (Fig. 2 A). Además, el análisis ROC mostró que con un valor de corte  $<51$  fg / ml, el contenido de ADN mitocondrial en LCR distingue el diagnóstico de EA del diagnóstico de FTLD con una sensibilidad del 85%, una especificidad del 87% y una área bajo la curva ROC de 0,959 (95 % intervalo de confianza = 0.895-1), significativamente más alto que al azar (p  $<0,001$ ) (Fig. 2 B). Se obtuvieron resultados similares cuando el análisis ROC del contenido de ADN mitocondrial entre los diferentes grupos se realizó con los datos de los otros fragmentos de ADN mitocondrial o cuando los datos de amplificaciones con las tres parejas de cebadores se normalizaron y se combinaron. Estos resultados proporcionan

evidencia adicional para sugerir que un nivel bajo de ADN mitocondrial en el LCR está específicamente relacionado con la EA.

**Ejemplo 5. Análisis de ADN mitocondrial en pacientes jóvenes sin alteraciones cognitivas y sin biomarcadores Tau y Amiloide- $\beta$  pero portadores de una mutación patogénica en PSEN1.**

Para explorar si la disminución del ADN mitocondrial circulante en el LCR ocurre también en las primeras etapas preclínicas de la EA, se estudió el contenido de ADN mitocondrial en el LCR de sujetos pre-sintomáticos jóvenes portadores de mutaciones génicas que causan EA, y antes de llegar a una etapa en la que aparecen alteraciones en biomarcadores relacionados con la EA. Así, se cuantificó la concentración de ADN mitocondrial circulante en el LCR de un joven grupo de sujetos cognitivamente normales que no muestran ninguna alteración en los biomarcadores A $\beta$  y tau, pero que tienen una mutación patogénica PSEN1 (M139T, K239N o I439S) que provocará la aparición completa de los síntomas clínicos de la EA en promedio al menos una década más tarde. El análisis del LCR de estos sujetos pre-sintomáticos también reveló una marcada reducción en la concentración de ADN mitocondrial circulante en el LCR en comparación con el grupo control de edad correspondiente. La magnitud de la reducción de contenido de ADN mitocondrial en portadores de mutaciones en comparación con los controles fue similar en las tres amplificaciones con parejas de cebadores diferentes:  $54 \pm 10\%$  (PSEN1 =  $27 \pm 6$  fg / ml, n = 6; C2 =  $59 \pm 9$  fg / ml, n = 7),  $68 \pm 11\%$  (PSEN1 =  $14 \pm 5$  fg / ml, n = 6; C2 =  $43 \pm 12$  fg / ml, n = 7) y  $66 \pm 11\%$  (PSEN1 =  $4 \pm 1$  fg / ml, n = 5; C2 =  $13 \pm 3$  fg / ml, n = 7) para el ADN mitocondrial-85, el ADN mitocondrial-153 y el ADN mitocondrial-515, respectivamente (Fig. 1D). Los resultados obtenidos en estos sujetos pre-sintomáticos PSEN1 son consistentes con los encontrados en sujetos en riesgo de desarrollar la EA (Fig. 1C) y proporcionan más pruebas que indican que la disminución de la concentración de ADN mitocondrial en el LCR ocurre ya en las primeras etapas preclínicas de la EA. En contraste con la disminución del contenido de ADN

mitocondrial que se observar en el LCR de los grupos de pacientes, se encontró que en todas las combinaciones de cebadores, el contenido de ADN mitocondrial en el LCR es significativamente mayor ( $p < 0,01$ ) en el grupo control de edad avanzada C1 (ADN mitocondrial-85 =  $188 \pm 49$ , el ADN mitocondrial-153 =  $142 \pm 44$  y ADN mitocondrial-515 =  $37 \pm 4$  fg / ml,  $n = 10$ ) en comparación con el grupo control de edad joven C2 (ADN mitocondrial-85 =  $59 \pm 9$ , el ADN mitocondrial-153 =  $43 \pm 12$  y ADN mitocondrial-515 =  $13 \pm 3$  fg / ml,  $n = 10$ ). Esto indica que la concentración de ADN mitocondrial circulante en el LCR incrementa con la edad, un proceso que es opuesto a lo que encontramos en los sujetos preclínicos y diagnosticados con EA.

#### **Ejemplo 6. Análisis de los niveles de ADN mitocondrial circulante en LCR mediante ddPCR en pacientes diagnosticados con EA esporádica.**

A continuación se procedió a determinar si las diferencias en el contenido de ADN mitocondrial en el LCR encontrado en nuestros experimentos podría ser validada con un nuevo método de PCR, conocido como PCR digital en gotas, que recientemente ha hecho posible cuantificar directamente el contenido de ácido nucleico a un nivel de resolución de una sola molécula. La medición del número de copias de ADN mitocondrial en LCR mediante esta nueva técnica de ddPCR usando la pareja de cebadores (SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 2) y la sonda SEQ ID NO:8 que amplifican el ADN mitocondrial-153 confirmó que los pacientes diagnosticados con EA esporádica tienen un número significativamente menor de copias de ADN mitocondrial en el LCR (EA =  $915 \pm 192$  copias / ml,  $n = 20$ ) en comparación con el grupo control de la misma edad C1 y con el grupo de demencia frontotemporal FTLD (C1 =  $2092 \pm 399$ ,  $n = 9$ ; FTLD =  $2053 \pm 666$ ,  $n = 11$ , copias / ml). Este efecto corresponde a una disminución de  $56 \pm 9\%$  de ADN mitocondrial en pacientes con EA en comparación con el grupo C1 (Fig. 5). Estos resultados son equivalentes a los obtenidos utilizando qPCR y confirman los datos de los experimentos anteriores que muestran que la concentración de ADN mitocondrial en el LCR en pacientes con diagnóstico de EA es menor que la que tienen las personas

diagnosticadas con FTLD.

**Ejemplo 7. Análisis del número de copias ADN mitocondrial por célula en neuronas corticales en cultivo de ratones transgénicos APP/PS1 como modelo animal de la EA.**

Estudios previos han demostrado que hay una disminución en el número de copias de ADN mitocondrial en el cerebro post mortem de pacientes con EA, pero en el tejido cerebral humano no es posible determinar cuando este efecto se inicia y si es causado por el proceso neurodegenerativo. Para evaluar si la disminución de la concentración de LCR de ADN mitocondrial asociada con la EA se produce en el sistema nervioso central antes de la aparición de daño neuronal, se mide la cantidad de copias de ADN mitocondrial en cultivos de neuronas corticales de ratones transgénicos que expresan los genes humanos de APP/PS1 mutados. Las neuronas de estos ratones mostraron una disminución significativa (~ 28%) de copias de ADN mitocondrial por célula, según se mide con dos combinaciones de cebadores diferentes (SEQ ID NO:11 / SEQ ID NO:12; y SEQ ID NO:11 / SEQ ID NO:13) (Fig. 3 A). Esta disminución del número de copias de ADN mitocondrial se produce en cultivos de neuronas corticales en 14 DIV mucho antes de la aparición del daño sináptico, medido por la sinaptofisina y los niveles de proteína PSD95 (Figuras 3 B-D). Estos resultados son consistentes con la interpretación de que la disminución en el contenido de ADN mitocondrial circulante en el LCR de pacientes con EA refleja un menor número de copias de ADN mitocondrial por célula en las neuronas del sistema nervioso y que la disminución del contenido de ADN mitocondrial aparece tempranamente en el proceso neurodegenerativo de la EA.



**REIVINDICACIONES**

1. Uso del ADN mitocondrial como biomarcador cuantitativo para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer.  
5
2. Uso según la reivindicación 1, donde el ADN mitocondrial es extracelular.
3. Un método para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer que comprende las siguientes etapas:  
10
  - a) cuantificar el ADN mitocondrial en una muestra biológica aislada de un sujeto; y
  - b) comparar el valor obtenido en la etapa (a) con un valor estándar.
4. El método según la reivindicación 3, que además comprende:  
15
  - c) asignar al sujeto del paso (a) al grupo de pacientes con predisposición a padecer la enfermedad de Alzheimer o al grupo de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer cuando el valor obtenido en la etapa (a) es significativamente menor que el valor estándar.
205. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, donde la muestra biológica aislada se selecciona de la lista que consiste en: saliva, sudor, lágrimas, orina, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero y plasma sanguíneo.
256. El método según la reivindicación 5, donde la muestra biológica aislada es líquido cefalorraquídeo.
7. El método según la reivindicación 5, donde la muestra biológica aislada  
30es sangre, suero o plasma sanguíneo.

8. El método según la reivindicación 7, donde la muestra biológica aislada es suero.
- 5 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, donde la etapa (a) se lleva a cabo mediante PCR, PCR cuantitativa, PCR digital en gotas o *Southern Blot*.
- 10 10. El método según la reivindicación 9, donde la etapa (a) se lleva a cabo mediante PCR cuantitativa o PCR digital en gotas.
- 11 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, donde la etapa (a) se lleva a cabo mediante PCR digital en gotas.
- 15 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, donde el ADN mitocondrial es extracelular.
- 13 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, donde el sujeto es un humano.
- 20 14. Un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprende al menos uno de los siguientes conjuntos de cebadores o sondas:
- 25 a) SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4,  
b) SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y opcionalmente SEQ ID NO: 8,  
c) SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4,  
d) SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 y opcionalmente SEQ ID NO: 5, o  
e) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.
- 30 15. El kit según la reivindicación 14 que comprende los cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

16. Uso de un kit que comprende cebadores y/o sondas específicos para el ADN mitocondrial, para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer.
- 5      17. Uso según la reivindicación 16, donde el kit es el kit según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15.

FIG. 1

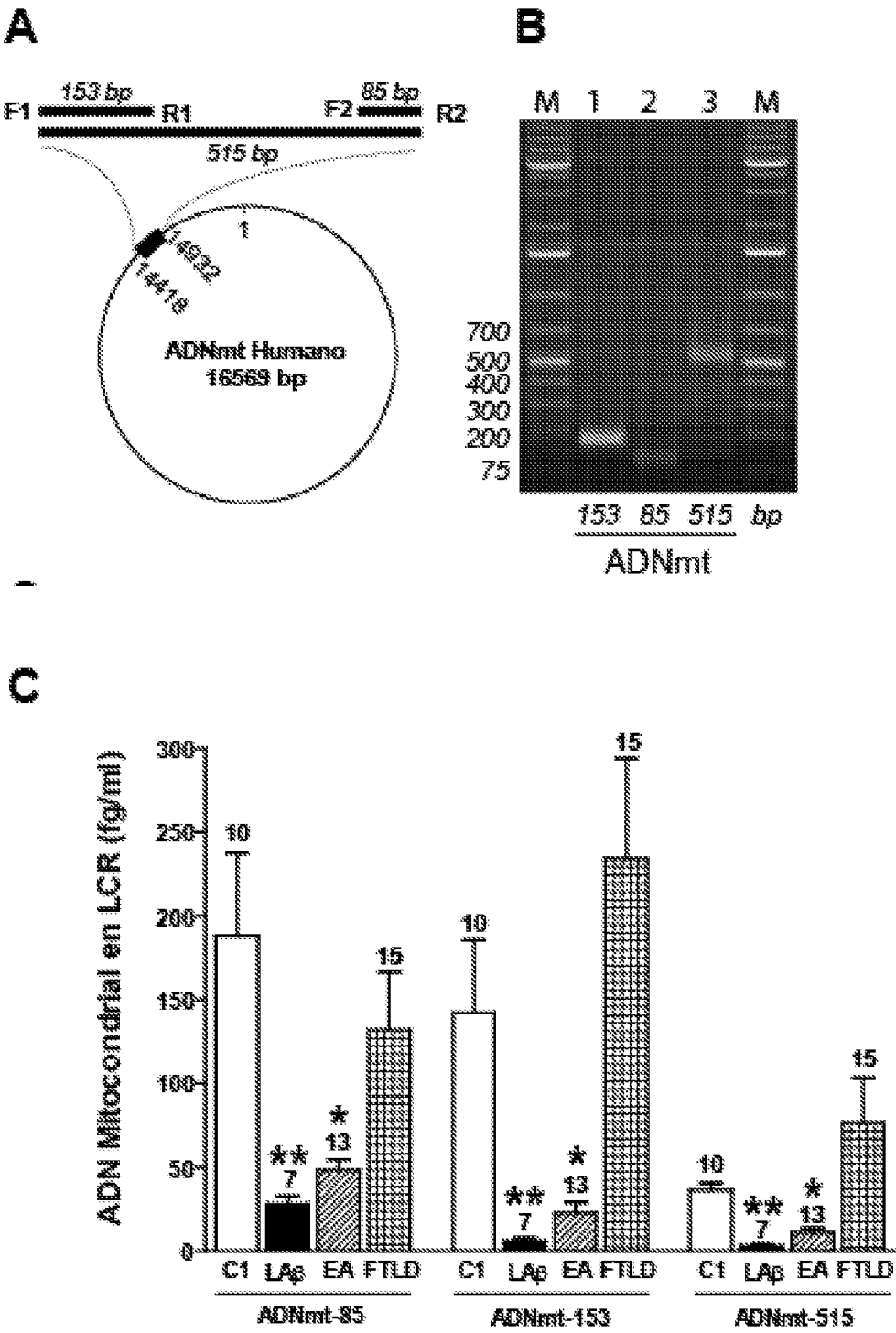


FIG. 1 (Cont.)

D

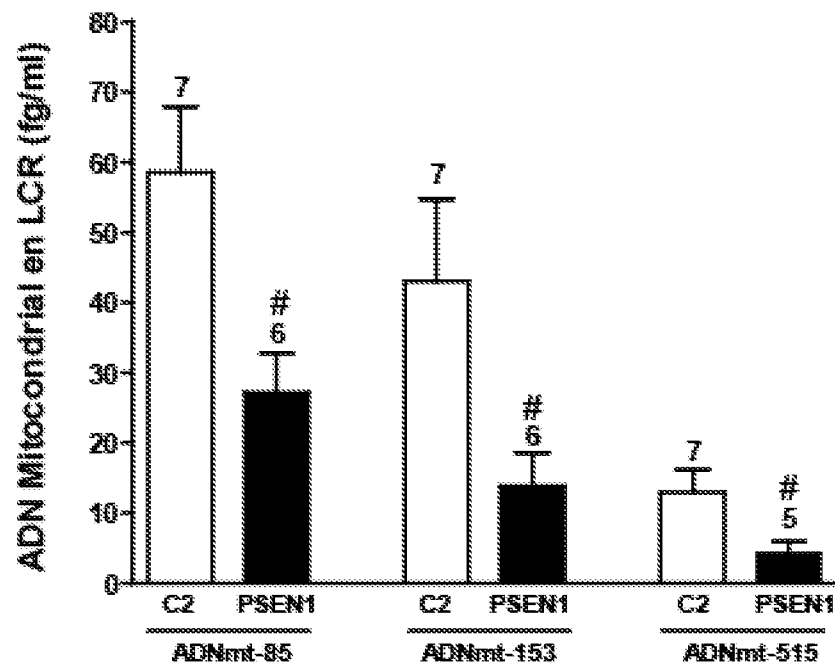


FIG. 2

A

C1-EA

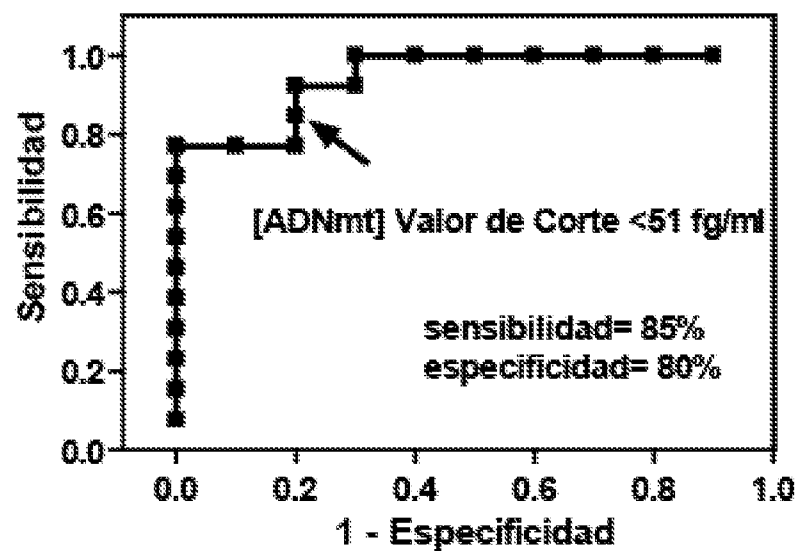


FIG. 2 (Cont.)

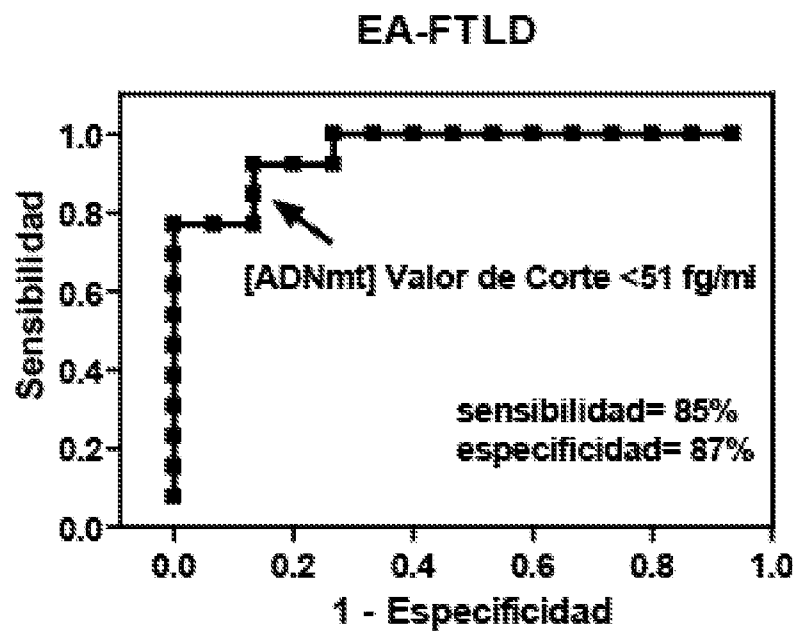
**B**

FIG. 3

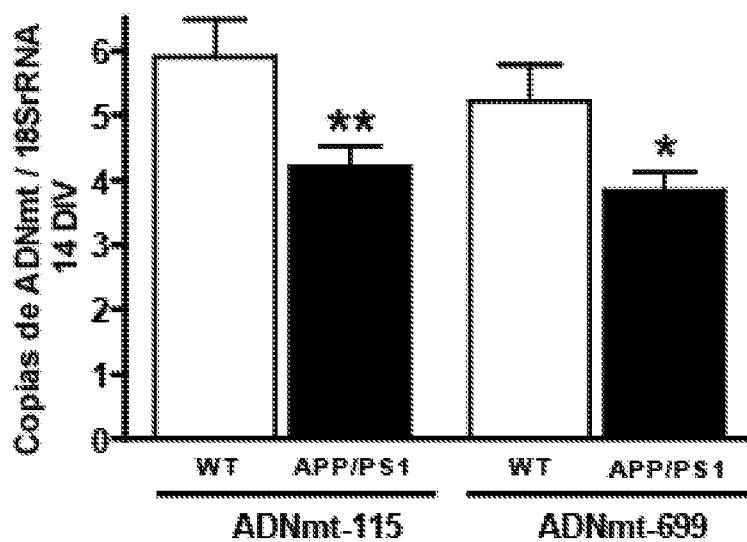
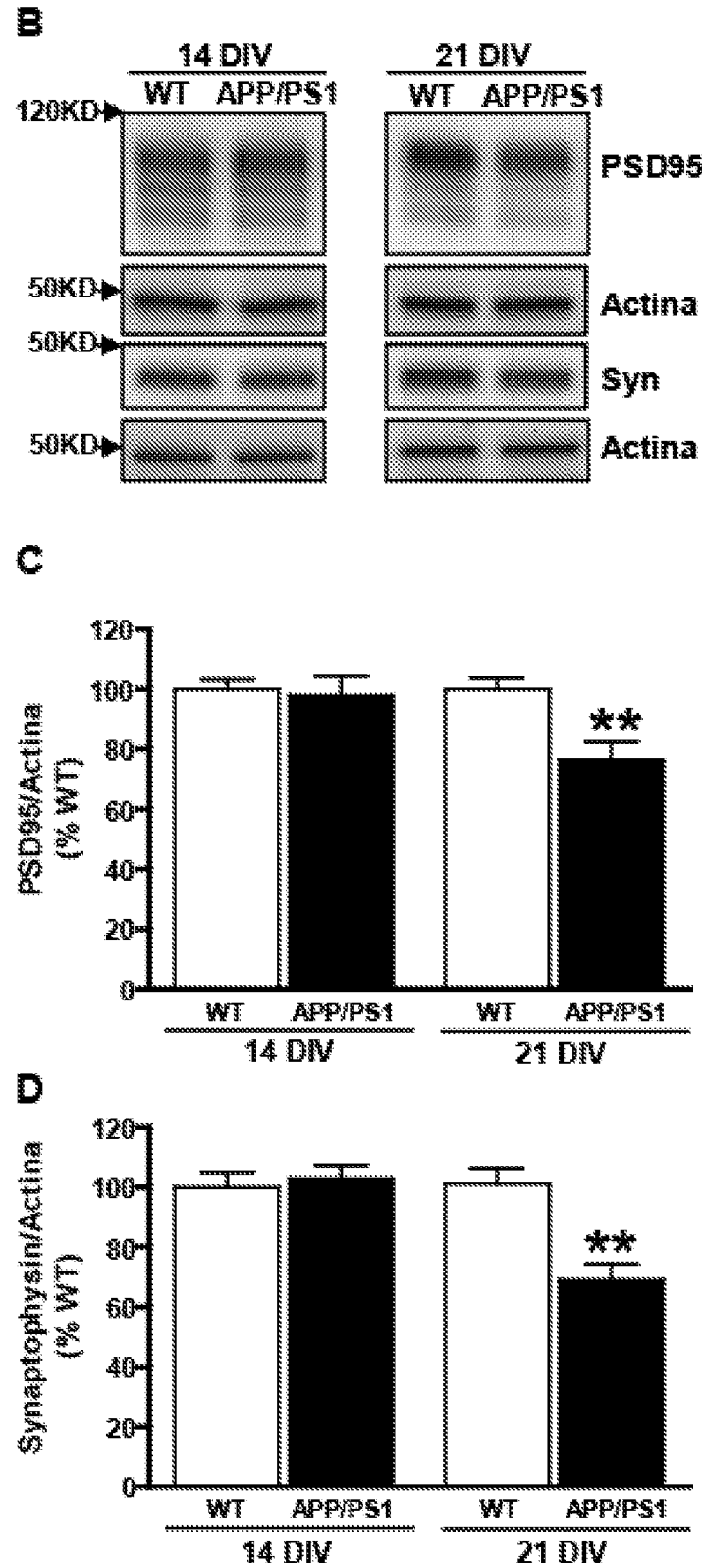
**A**

FIG. 3 (Cont.)



A

ADNmt-85

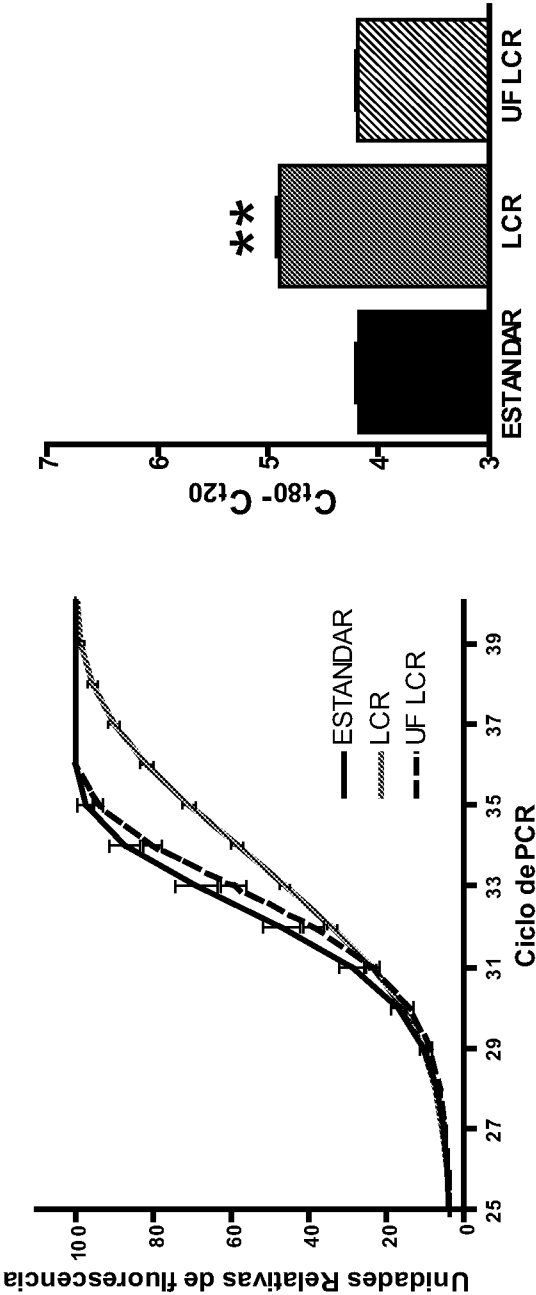


FIG. 4



FIG. 4 (Cont.)

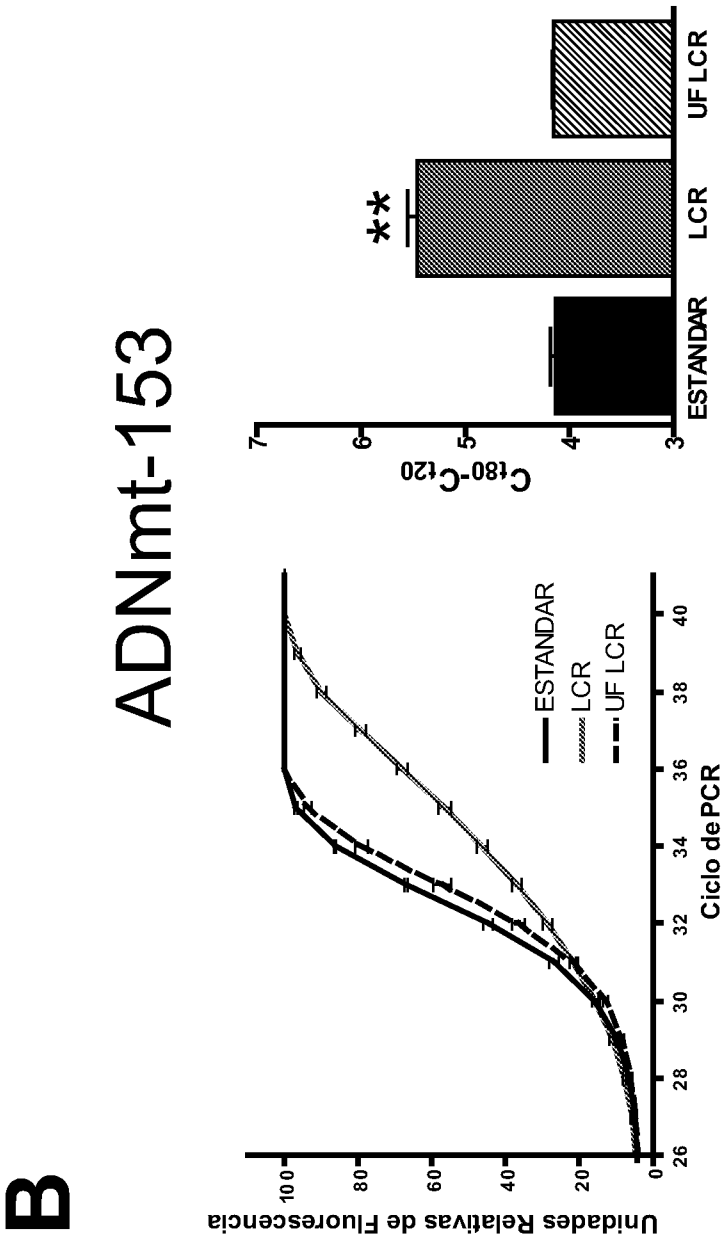


FIG. 4 (Cont.)

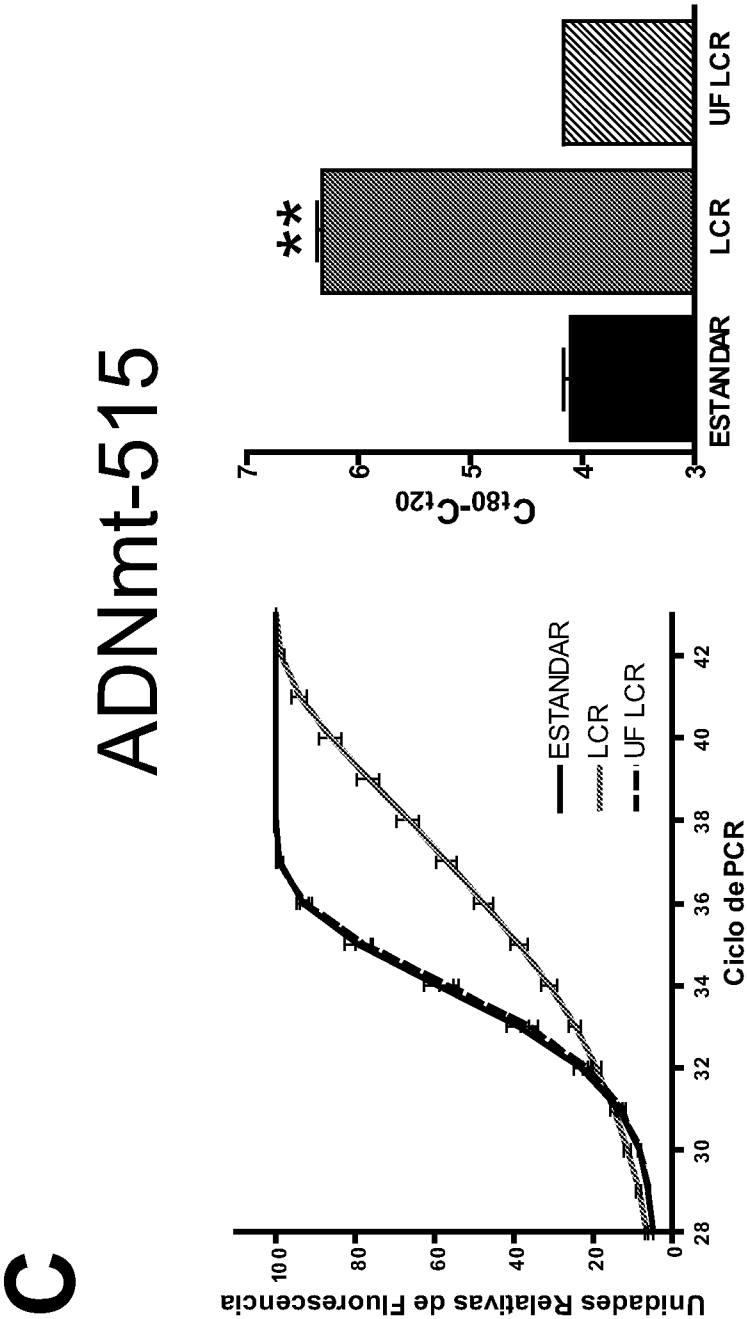
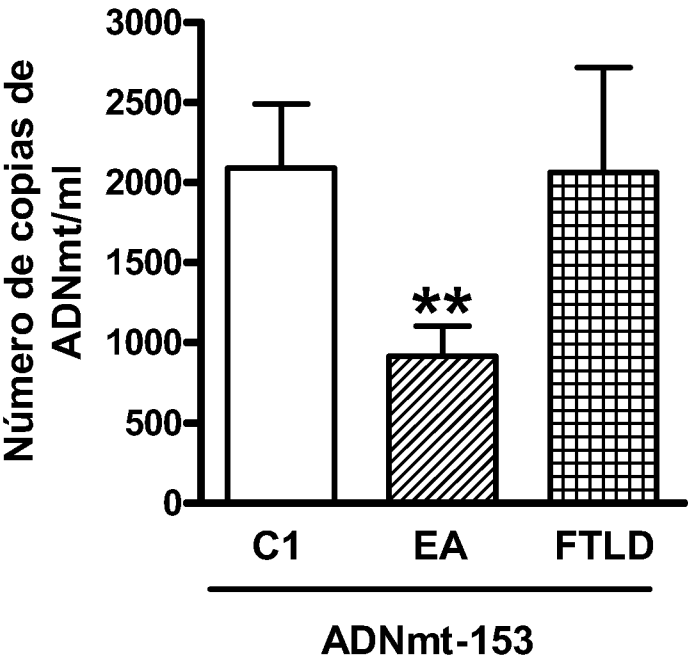


FIG. 5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070713

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12Q1/68** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**C12Q**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007011322 A2 (UNIV. CALIFORNIA) 25/01/2007, the whole document.	1-17
A	WO 0063441 A2 (MITOKOR) 26/10/2000, the whole document.	1-17
A	WO 9409162 A1 (UNIV. EMORY SCHOOL MEDICINE) 28/04/1994, the whole document.	1-17
A	FAHY, E. et al., 'Multiplex fluorescence-based primer extension method for quantitative mutation analysis of mitochondrial DNA and its diagnostic application for Alzheimer's disease', NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 1997, Vol. 25, No. 15, pages 3102-3109, ISSN: 0305-1048 (Print), the whole document.	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
**28/01/2014**

Date of mailing of the international search report  
**(24/02/2014)**

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
J. Vizán Arroyo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498573

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2013/070713

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	PODLESNIY, P. et al., 'Low cerebrospinal fluid concentration of mitochondrial DNA in preclinical Alzheimer disease', ANNALS OF NEUROLOGY, 2013 Nov, Vol. 74, No. 5, pages 655-668, ISSN: 0364-5134(print), ISSN: 1531-8249(electronic), Epub: 04-09-2013, the whole document.	1-17

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2013/070713

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2007011322 A2	25.01.2007	US2009111093 A1 JP2008500058 A EP1769089 A2 EP1769089 A4 AU2005330065 A1 AU2005330065 A8	30.04.2009 10.01.2008 04.04.2007 15.04.2009 09.11.2006 07.08.2008
----- WO0063441 A2	----- 26.10.2000	----- JP2003521879 A EP1208225 A2 CA2370884 A1 AU4368300 A	----- 22.07.2003 29.05.2002 26.10.2000 02.11.2000
----- WO9409162 A1	----- 28.04.1994	----- US5494794 A	----- 27.02.1996
-----	-----	-----	-----

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070713

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q1/68** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 2007011322 A2 (UNIV. CALIFORNIA) 25/01/2007, todo el documento.	1-17
A	WO 0063441 A2 (MITOKOR) 26/10/2000, todo el documento.	1-17
A	WO 9409162 A1 (UNIV. EMORY SCHOOL MEDICINE) 28/04/1994, todo el documento.	1-17
A	FAHY, E. et al., 'Multiplex fluorescence-based primer extension method for quantitative mutation analysis of mitochondrial DNA and its diagnostic application for Alzheimer's disease', NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 1997, Vol. 25, No. 15, páginas 3102-3109, ISSN: 0305-1048 (Print), todo el documento.	1-17

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
**28/01/2014**

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**24 de febrero de 2014 (24/02/2014)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
J. Vizán Arroyo  
Nº de teléfono 91 3498573

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2013/070713

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
P,X	PODLESNIY, P. et al., 'Low cerebrospinal fluid concentration of mitochondrial DNA in preclinical Alzheimer disease', ANNALS OF NEUROLOGY, 2013 Nov, Vol. 74, No. 5, páginas 655-668, ISSN: 0364-5134(print), ISSN: 1531-8249(electronic), Epub: 04-09-2013, todo el documento.	1-17



# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2013/070713

## Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

- 1 En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:
- a. Medios
- ☒ en papel
- ☒ en formato electrónico
- b. Cuando
- ☒ en la solicitud internacional tal y como se presentó
- ☐ junto con la solicitud internacional en formato electrónico
- ☐ posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070713

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2007011322 A2	25.01.2007	US2009111093 A1 JP2008500058 A EP1769089 A2 EP1769089 A4 AU2005330065 A1 AU2005330065 A8	30.04.2009 10.01.2008 04.04.2007 15.04.2009 09.11.2006 07.08.2008
----- WO0063441 A2	----- 26.10.2000	----- JP2003521879 A EP1208225 A2 CA2370884 A1 AU4368300 A	----- 22.07.2003 29.05.2002 26.10.2000 02.11.2000
----- WO9409162 A1	----- 28.04.1994	----- US5494794 A	----- 27.02.1996
-----	-----	-----	-----