

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 965 473**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/6883 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2018 PCT/US2018/036377**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2018 WO18236589**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2018 E 18742857 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023 EP 3642366**

(54) Título: **Biomarcadores de microARN en suero circulante y métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer**

(30) Prioridad:

19.06.2017 US 201762521768 P

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

15.04.2024

(73) Titular/es:

**ST. JOHN'S UNIVERSITY (100.0%)
8000 Utopia Parkway
Queens, NY 11439, US**

(72) Inventor/es:

**MOLLER, SIMON, GEIR;
PATIL, KETAN y
ALVES, GUIDO, WERNER**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 965 473 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores de microARN en suero circulante y métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general a microARN basados en suero y a métodos para diferenciar pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer, así como a ayudar a los médicos a determinar protocolos de tratamiento para dichos pacientes.

2. Breve descripción de la técnica anterior

15 La enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad neurodegenerativa más común, se caracteriza por la pérdida de memoria y otras capacidades cognitivas de un individuo con tratamiento disponible únicamente para el alivio sintomático. El Alzheimer es una enfermedad progresiva, que avanza con síntomas cada vez más graves que incluyen cambios de humor y de conducta; dificultad para hablar, tragar y caminar; desorientación y pérdida de memoria más grave. Las combinaciones de fármacos que se utilizan son sólo paliativos pero no pueden revertir el proceso de muerte de las células neuronales. No existen pruebas objetivas ni biomarcadores establecidos para el diagnóstico de la EA. Además, la heterogeneidad, los subtipos y la progresión de la enfermedad hacen que sea incluso complejo desarrollar candidatos terapéuticos específicos. Por tanto, es imperativo diagnosticar la enfermedad en una etapa temprana para aumentar la eficacia de los agentes terapéuticos.

25 La EA y la demencia relacionada con la EA afectan actualmente a aproximadamente 44 millones de personas en todo el mundo. El tratamiento eficaz de un paciente con EA es posible en los primeros años de tratamiento, después de lo cual se producen una serie de complicaciones a menudo debilitantes. El tratamiento actual para la EA incluye un régimen de múltiples fármacos que incluyen inhibidores de la colinesterasa, antidepresivos, ansiolíticos, antipsicóticos y sedantes para tratar un síntoma específico. Se están desarrollando muchos medicamentos nuevos que pueden alterar el proceso de la enfermedad en sí al atacar las proteínas y procesos relacionados con la EA, incluidos el beta-amiloide, la beta-secretasa, la proteína Tau, la inflamación y el receptor 5HT6, entre otros.

35 En el cerebro, las neuronas se conectan y comunican en las sinapsis, donde pequeñas ráfagas de sustancias químicas llamadas neurotransmisores transportan información de una célula a otra. Las neuronas son las principales células destruidas por la enfermedad de Alzheimer. De acuerdo con lo anterior, la enfermedad de Alzheimer destruye las sinapsis y mata las neuronas, dañando y eventualmente destruyendo la red de comunicación del cerebro.

40 Los medicamentos actuales para el Alzheimer aprobados por la FDA apoyan este proceso de comunicación a través de dos mecanismos diferentes:

45 1) Los inhibidores de colinesterasa actúan ralentizando el proceso que descompone un neurotransmisor clave. Específicamente, los inhibidores de la colinesterasa aumentan los niveles de comunicación entre células al proporcionar el neurotransmisor acetilcolina que se agota en el cerebro debido a la enfermedad de Alzheimer. Donepezil, galantamina y rivastigmina son inhibidores de la colinesterasa.

50 2) La memantina es un antagonista receptor de NMDA (N-metil-D-aspartato) y funciona al regular la actividad del glutamato, un neurotransmisor en el cerebro. La unión del glutamato a los receptores de NMDA de la superficie celular permite que el calcio ingrese a la célula. Este proceso es importante para la señalización celular, así como para el aprendizaje y la memoria. En la enfermedad de Alzheimer, las células dañadas pueden liberar un exceso de glutamato, lo que lleva a una sobreexposición crónica al calcio, lo que puede acelerar el daño celular. La memantina ayuda a prevenir esta cadena destructiva de eventos al bloquear parcialmente los receptores de NMDA.

55 Aunque la eficacia de los inhibidores de la colinesterasa y la memantina varía ampliamente entre la población, es imperativo diagnosticar a los individuos con EA en una etapa temprana para aumentar la eficacia de los agentes terapéuticos. Sin embargo, no existen pruebas objetivas ni biomarcadores establecidos para diagnosticar la EA. Además, la heterogeneidad, los subtipos y la progresión de la enfermedad dificultan el desarrollo de candidatos terapéuticos específicos.

60 Los microARN ("ARNmi") son una clase de ARN no codificantes que desempeñan funciones clave en la regulación de la expresión génica. Los ARNmi actúan a nivel postranscripcional y afinan la expresión de hasta 30 % de todas los genes que codifican las proteínas de los mamíferos. Los ARNmi maduros son moléculas cortas de ARN de cadena sencilla de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. Los ARNmi pueden estar codificados por múltiples lugares y pueden organizarse en grupos cotranscritos en tándem. Los genes de ARNmi se transcriben mediante la ARN polimerasa II como grandes transcritos primarios. (pri-microRNA) que son procesados por un complejo proteico que contiene la enzima RNase III Drosha, DGCR8 y otros cofactores, para formar un microRNA precursor de aproximadamente 70 nucleótidos (pre-ARNmi) (Cathew RW, cell, 2009; Kim VN, Nat Rev Mol Cel Biol, 2009; Siomi H,

Mol cel, 2010; Bartel DP, cell, 2004; Lee Y, Nature 2003; Han J, Genes Dev, 2004.) El pre-ARNmi se transporta al citoplasma mediante Exportin-5, donde es procesado por DICER, una segunda enzima RNasa III, junto con TRBP, PACT y Ago2 en el Complejo Silenciador Inducido por ARN, lo que da como resultado dúplex de ARNmi (Kim VN, Nat Rev Mol Cel Biol, 2009; Gregory RI, Nature 2004; MacRae IJ, PNAS, 2008). Las hebras guía de los dúplex de ARNmi 5 se separan y se asocian con Ago 2 para su incorporación a una partícula ribonuclear para formar el complejo silenciador RISC inducido por ARN que media el silenciamiento de genes. Los mecanismos de los ARNmi varían desde la degradación directa o el silenciamiento del ARNm y la represión de la traducción hasta las regulaciones positivas postranscripcionales. (MacRae IJ, PNAS, 2008.)

10 Se ha informado de la presencia de ARNmi en fluidos corporales que incluyen sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma, suero y saliva en niveles detectables. La especificidad tisular de los ARNmi sugiere su papel vital e integral en diversos procesos fisiológicos. El enriquecimiento de tejido promete un papel nuevo pero menos explorado como biomarcador de diagnóstico y posible objetivo terapéutico. Se entiende que los ARNmi circulantes se originan a partir de una fuga pasiva del tejido dañado como resultado de la lisis o apoptosis celular, del transporte activo desde las 15 células a través de microvesículas, como los exosomas, o unidos dentro de complejos proteicos RISC. (Etheridge et al, 2011). La entrega de pequeñas moléculas de ARN al cerebro y al SNC, mediada por exosomas y bombas osmóticas, respectivamente, proporciona una solución para superar las limitaciones de las terapias basadas en ARNmi (Alvarez-Erviti et al. 2011; Koval et al, 2013, Hum. Mol. Gen). Se ha demostrado que el ARNmi es excepcionalmente estable y, por lo tanto, se presenta como candidatos poderosos para ser biomarcadores potenciales (Chen et al, 2008; 20 Grasso, 2014; Geekiyanage et al., 2012; Subodh et al., 2016; Lugli et al, 2015; WO-2013/003350 A2, WO 2013/022953 A2, WO 2009/009457 A1; US 2012/108650 A1; WO 2013/024469 A1; WO 2015/179909 A1).

Resumen de la invención

25 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un objeto de la presente invención es proporcionar métodos para determinar pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer.

30 Estos objetivos y otros se logran mediante la presente invención, que proporciona biomarcadores de ARNmi que pueden usarse solos, en pares o en combinación para determinar pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 muestra el cambio de expresión medio de tres PARKmiARN entre pacientes con EA y controles sanos;

La Figura 2 muestra el cambio de expresión medio de tres combinaciones de PARKmiARN entre pacientes con EA y controles sanos;

40 Descripción detallada de la invención

Realizamos análisis de micromatrices (fase de descubrimiento del estudio noruego ParkWest), confirmación mediante qRT-PCR (mismas muestras de la fase de descubrimiento), verificación mediante qRT-PCR (cohorte del estudio noruego Parkwest) y validación mediante qRT- PCR (cohorte independiente del estudio sueco NYPUM) en muestras 45 de suero de control y de EP al inicio del estudio, como se describe en la patente de diagnóstico de EP. Todos estos datos se generaron y analizaron en la solicitud estadounidense No. 62/291,619 presentada el 5 de febrero de 2016 y la solicitud internacional No. PCT/US2017/016412 presentada el 3 de febrero de 2017, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento como referencia.

50 Durante la recopilación de datos para el proyecto de diagnóstico de ARNmi de EP, también probamos la especificidad de los ARNmi candidatos (PARKmiR) utilizando 45 muestras de suero de pacientes con EA recién diagnosticados del estudio DemVest que representan la misma región de Noruega que para la población de EP en el estudio Parkwest. Los inventores esperaban que los PARKmiR mostraran los mismos niveles de abundancia que en las muestras de suero de control, lo que verificaría la especificidad de los PARKmiR para la EP. Inesperadamente, los PARKmiR 55 mostraron una disminución significativa en los niveles en las muestras de suero de AD en comparación con las muestras de suero de control. Para garantizar que las muestras de suero de AD y las técnicas utilizadas fueran válidas, probamos si miR-445-3p y el ARN pequeño de control (U6) cambiaron en abundancia. En el suero de control, el suero de PD y el suero de AD, ambos ARNmi permanecieron sin cambios en abundancia, lo que valida nuestros hallazgos.

60 Métodos

Manipulación y clasificación de muestras de suero

Todos los pacientes y controles participaron en el estudio noruego ParkWest y en el estudio de demencia del oeste de 65 Noruega (estudio DemVest), que son estudios de cohortes longitudinales prospectivos basados en la población en curso que investigan la incidencia, la neurobiología y el pronóstico de la EP y la demencia/EA, respectivamente. El

estudio noruego ParkWest es un estudio prospectivo longitudinal multicéntrico de pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) incidente del Sur y Occidente de Noruega. Entre el 1 de noviembre de 2004 y el 31 de agosto de 2006 se intentó reclutar todos los nuevos casos de enfermedad de Parkinson dentro del área de estudio. Desde el inicio del estudio 212 de 265 (80 %) de estos pacientes y su grupo de control han sido seguidos. Puede encontrar más

5 información sobre este proyecto en <http://www.parkvest.no>. El estudio de demencia del occidente de Noruega es un estudio de cohorte longitudinal multicéntrico prospectivo de pacientes con un diagnóstico de demencia por primera vez (puntuación > 15 en el Mini Examen del Estado Mental (MMSE)). El reclutamiento de pacientes comenzó en 2005 y se realizó un seguimiento anual de los pacientes. Se excluyeron del estudio los pacientes con delirio agudo o confusión, enfermedad terminal, trastorno bipolar o trastorno psicótico actual o previo, o que fueron diagnosticados 10 recientemente con una enfermedad somática importante.

Se realizaron todos los esfuerzos posibles para establecer una cohorte de pacientes con EA no seleccionada y representativa de la población. Los pacientes se incluyeron si habían proporcionado suero al ingresar al estudio y cumplían con los criterios de diagnóstico de EA según los criterios del Instituto Nacional de Enfermedades 15 Neurológicas y Comunicativas y Accidentes Cerebrovasculares/Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados (NINCDS/ARDRA) en el último seguimiento. Los sujetos de control se reclutaron de múltiples fuentes, incluidos amigos, cónyuges y organizaciones públicas para personas mayores, y se incluyeron en este estudio si habían proporcionado suero. En este estudio de posibles biomarcadores de EA aplicamos un procedimiento de dos etapas. Para la primera fase de descubrimiento se seleccionó al azar suero de 16 pacientes y 8 controles. Los 45 20 pacientes restantes con EA y 182 controles que eran elegibles para este estudio fueron seleccionados con fines de verificación. Las muestras de suero se recolectaron el mismo día de los exámenes clínicos y luego se almacenaron congeladas a -70 grados Celsius hasta su transporte a las instalaciones de Nueva York en hielo seco.

Ejemplo 1: Análisis de ARNmi humano expresado diferencialmente mediante qPCR Aislamiento de ARN a partir de 25 muestras de suero y control de calidad

Después de descongelar en hielo, veinticuatro muestras de suero (ocho de control, diecisésis muestras de PD) se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 x g para eliminar los residuos. El sobrenadante se utilizó para realizar un aislamiento de ARN pequeño utilizando el kit de aislamiento de ARN miRCURY - Biofluids (Exiqon, MA). Antes del 30 aislamiento de ARN, se añadió al tampón de lisis 0.267 fmol/ul de control de adición cel-miR-39-3p (Qiagen, CA). La parte restante del aislamiento de ARN se realizó siguiendo el protocolo del fabricante y el ARN aislado se cuantificó en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, MA). El ARN se utilizó para ejecutar chips de micromatrices de microARN Affymetrix v4 y para la posterior síntesis de ADNc y qPCR. El ARN de 256 muestras de suero (190 de control, 16 PD 35 del proyecto ParkWest, 45 AD del proyecto DemVest) se aisló como se describe anteriormente, no fueron cuantificados por Nanodrop, pero los datos de qPCR resultantes de estas muestras se normalizaron mediante un pequeño ARN scaRNA17 de referencia.

Micromatrices de ARNmi y análisis de datos

40 El ARN aislado de veinticuatro muestras de suero de pacientes se cuantificó y se sometió a Affymetrix GeneChip® ARNmi 4.0 Array por el Centro de Análisis del Genoma de Yale (<http://medicine.yale.edu/keck/yoga/index.aspx>). Los archivos .CEL normalizados obtenidos del software Affymetrix Expression Console se importaron a Partek Genomics Suite versión 6.6 Copyright © 2012 (Partek, MO) para su análisis. Se empleó el 'Flujo de trabajo de Expresión de microARN' para detectar ARNmi expresados diferencialmente empleando ANOVA, lo que dio como resultado listas de 45 ARNmi expresados significativamente ($p<0.05$) entre cohortes de control versus cohortes de EP. Los ARNmi detectados se utilizaron para una verificación adicional de qPCR.

Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

50 Se sintetizó ADNc para qPCR específica de ARNmi usando el kit de síntesis de ADNc de microARN qScript™ (Quanta Biosciences, MD) siguiendo el protocolo del fabricante y las qPCR posteriores se realizaron usando cebadores directos específicos de ARNmi (Tabla #) y cebador de PCR Universal PerfeCTa® (Quanta Biosciences, MD). Se utilizaron scaRNA17 y U6 como ARN pequeños de referencia para normalizar los valores de qPCR Cq, mientras que se utilizó cel-miR-39-3p como control de aumento. Se utilizó PerfeCTa® SYBR® GREEN SuperMix para IQ™ (Quanta 55 Biosciences, MD) para todas las qPCR en un sistema de detección de PCR en tiempo real de un solo color MyIQ™ (Bio-Rad, CA). La curva estándar para cel-miR-39-3p se analizó en MS Excel con $R^2 = 0.97882$ y eficiencia de PCR 92.96 %. No se implicó ningún control de plantilla (NTC) cuando fue necesario.

Análisis de datos basado en el modelo PD

60 La capacidad discriminativa de los ARNmi con respecto al diagnóstico de EP se evaluó a partir del análisis ROC utilizando IBM SPSS Statistics, versión 21; para combinaciones de ARNmi, la variable de prueba fue la probabilidad prevista a partir de la regresión logística con diagnóstico de EP (sí/no) como resultado. Para minimizar la influencia de los valores atípicos en el ajuste, se realizó una regresión logística con valores de ARNmi transformados logarítmicamente.

Se determinaron ARNmi humanos expresados diferencialmente en muestras de suero de pacientes con EP del estudio noruego ParkWest empleando micromatriz de ARNmi. A continuación se proporcionan los ARNmi con > 1.2 veces de expresión diferencial.

- 5 85 ARNmi humanos pre y maduros expresados diferencialmente con un cambio de expresión > 1.2 veces
 hsa-miR-548ac, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-548x-3p, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-548ae, hsa-miR-3910-1,
 hsa-miR-4708-3p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-603, hsa-miR-3613-3p, hsa-miR-4797-5p, hsa-miR-548aj-3p, hsa-miR-
 10 450b-5p, hsa-miR-548ap-3p, hsa-miR-1184, hsa-miR-2277-5p, hsa-miR-1323, hsa-miR-548aa, hsa-miR-548t-3p, hsa-
 miR-221-5p, hsa-miR-190a-3p, hsa-miR-6873-5p, hsa-miR-155-3p, hsa-miR-510-5p, hsa-miR-4313, hsa-miR-3616,
 hsa-miR-8075, hsa-miR-4306, hsa-miR-6776, hsa-miR-6075, hsa-miR-8052, hsa-miR-532, hsa-miR-4791, hsa-miR-
 320b-1, hsa-miR-548y, hsa-miR-7973, hsa-miR-3136-5p, hsa-miR-606, hsa-miR-500a-3p, hsa-miR-4788, hsa-miR-
 15 4769-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-4431, hsa-miR-6749-5p, hsa-miR-138-2-3p, hsa-miR-1289-2, hsa-miR-548au,
 hsa-miR-6850, hsa-miR-561, hsa-miR-34b-5p, hsa-miR-3934-5p, hsa-miR-6739-5p, hsa-miR-4325, hsa-miR-4672,
 20 hsa-miR-215-5p, hsa-miR-4685-5p, hsa-miR-3160-1, hsa-miR-3 160-2, hsa-miR-6793-5p, hsa-miR-8089, hsa-miR-
 6081, hsa-miR-892b, hsa-miR-936, hsa-miR-548ag, hsa-miR-345, hsa-miR-548k, hsa-miR-3188, hsa-miR-181b-5p,
 25 hsa-let-7e, hsa-miR-4487, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-3689a-3p, hsa-miR-4771, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-3150b,
 hsa-miR-6782-5p, hsa-miR-937-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-6865-3p, hsa-miR-4749-5p, hsa-miR-378b, hsa-miR-
 30 7706, hsa-miR-4445 y hsa-miR-2355-5p.
 20 57 ARNmi maduros expresados diferencialmente con un cambio de expresión > 1,2 veces hsa-miR-548ac, hsa-miR-
 335-5p, hsa-miR-548x-3p, hsa-miR-548ae, hsa-miR-4708-3p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-603, hsa-miR-3613-3p,
 hsa-miR-4797-5p, hsa-miR-548aj-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-548ap -3p, hsa-miR-1184, hsa-miR-2277-5p,
 25 hsa-miR-1323, hsa-miR-548aa, hsa-miR-548t-3p, hsa-miR-2215p, hsa-miR-190a-3p, hsa-miR-6873-5p, hsa-miR-155-3p,
 hsa-miR-510-5p, hsa-miR-4313, hsa-miR-4306, hsa-miR-8052, hsa-miR-4791, hsa-miR-7973, hsa-miR-3136-5p, hsa-
 miR-606, hsa-miR-500a-3p, hsa-miR-4769-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-6749-5p, hsa-miR-138-2-3p, hsa-miR-34b-
 30 5p, hsa-miR-39345p, hsa-miR-6739-5p, hsa-miR-4325, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-4685-5p, hsa-miR-6793-5p, hsa-
 miR-936, hsa-miR-548ag, hsa-miR-548k, hsa-miR-181b-5p, hsa-let-7e, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-3689a-3p, hsa-
 miR-4771, hsa-miR-520a5p, hsa-miR-6782-5p, hsa-miR-937-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-6865-3p, hsa-miR-4749-
 5p, hsa-miR-378b y hsa-miR-2355-5p.
 30 28 ARNmi prematuros expresados diferencialmente con un cambio de expresión de > 1.2 veces hsa-miR-520g, hsa-
 miR-520h, hsa-miR-3910-1, hsa-miR-3616, hsa-miR-8075, hsa-miR-6776, hsa-miR-6075, hsa-miR-532, hsa-miR-
 320b-1, hsa-miR-548y, hsa-miR-4788, hsa-miR-4431, hsa-miR-1289-2, hsa-miR-548au, hsa-miR-6850 hsa-miR-561,
 35 hsa-miR-4672, hsa-miR-3160-1, hsa-miR-3160-2, hsa-miR-8089, hsa-miR-6081, hsa-miR-892b, hsa-miR-345, hsa-
 miR-3188, hsa-miR-4487, hsa-miR-3150b, hsa-miR-7706 y hsa-miR-4445.
- 40 Estas secuencias de ARNmi expresadas diferencialmente se ilustran a continuación en la Tabla 1, junto con los ARN
 pequeños de referencia/conservadores cel-miR-39-3p, U6 y ScaRNA17 utilizados como controles. Cel-miR-39-3p es
 un control de adición que demuestra la estabilidad de las muestras de ARN. U6 y ScaRNA17 se utilizan como controles
 internos para normalizar las lecturas del resto de ARNmi o ARNmi candidatos.

ES 2 965 473 T3

Tabla 1
Secuencia de microARN

Nombre del microARN/ARN pequeño	
cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAAGCUUG (SEQ ID NO:1)
hsa-let-7e	CCCGGOCUGAGGUAGGAGGUUAUAGUUGAGGAGGACACCC AAGGAGAGAUACAUUAACGCCCUCCUAGCUUUCCCCAGG (SEQ ID NO:2)
hsa-miR-1184	CCUGCAGCCACUUGAUGGCUUCC (SEQ ID NO:3)
hsa-miR-1289-2	CCACGGGUCCUAGUUAAAAAGGCACAUUCCUAGACCCUGCCUC AGAACUACUGAACAGAGUCACUGGGUGUGGGAGUCCAGGAAUC UGCAUUUUUACCCUAUCGCCCGCC (SEQ ID NO:4)
hsa-miR-1323	UCAAAACUGAGGGGCAUUUUCU (SEQ ID NO:5)
hsa-miR-138-2-3p	GCUAUUUCACGACACCAGGGUU (SEQ ID NO:6)
hsa-miR-155-3p	CUCCUACAUUUAGCAUUAACA (SEQ ID NO:7)
hsa-miR-16-2-3p	CCAAUAAUACUGUGCUQCUUUA (SEQ ID NO:8)
hsa-miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUQCGGUGGGU (SEQ ID NO:9)
hsa-miR-190a-3p	CUAUAUAUCAAACAUAUCCU (SEQ ID NO:10)
hsa-miR-215-5p	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC (SEQ ID NO:11)
hsa-miR-221-5p	ACCUUGCAUACAAUGUAGAUUU (SEQ ID NO:12)
hsa-miR-2277-5p	AGCGCGGGCUCAGGCCUGCCAGUC (SEQ ID NO:13)
hsa-miR-2355-5p	AUCCCCAGAUACAAUUGGACAA (SEQ ID NO:14)
hsa-miR-299-5p	UGGUUUACCCUCCCACAUACAU (SEQ ID NO:15)
hsa-miR-3136-5p	CUGACUGAAUAGGUAGGGUCAUU (SEQ ID NO:16)
hsa-miR-3150b	GAGGGAAAGCAGGCCAACCUUCGAGGAUCUCCCCAGCCUUGGC GUUCAGGUGGCUGAGGGAGACUUCGUCCAGGUUGGCCUGCUUCCCC UC (SEQ ID NO:17)
hsa-miR-3160-1	GGACCUUCCCCUUGGGCUUUCUAGUCUCAGCUCUCCUCCAGCUC AGCUGGUUCAGGAGAGCUGAGACUAGAAAGCCCAGGGCAGGUU C (SEQ ID NO:18)
hsa-miR-3160-2	ACCUGCCCUUGGGCUUUCUAGUCUCAGCUCUCCUAGGACAGCUG AGCUGGAGAGAGCUGAGACUAGAAAGCCCAGGGCAGGU (SEQ ID NO:19)
hsa-miR-3188	GGGCCCUCCUGCUCUGCUGUGCCCGCAOGGCCUCCCCUAGGCC GCCUUCUGGAGAGGCCUUUGUGCGGAUACGGGGCUGGAGGCCU (SEQ ID NO:20)
hsa-miR-320b-1	AAUUAUCCUCUCUUUCUAGUUCUUCUAGAUGAGGAAA GCUUGGUUGAGAGGGCAAACAAAUUAACUAAUUAUU (SEQ ID NO:21)

ES 2 965 473 T3

hsa-miR-335-5p	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUQU (SEQ ID NO:22)
hsa-miR-345	ACCCAAACCCUAGGUUCUGCUGACUCCUAGUCCAGGGCUCGUG AUGGCUGGUCCCCUGAACGAGGGUCUGGAGGCCUGGGUU UGAAUAUCGACAGC (SEQ ID NO:23)
hsa-miR-34b-5p	UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG (SEQ ID NO:24)
hsa-miR-3613-3p	ACAAAAAAAAGCCCAACCCUUC (SEQ ID NO:25)
hsa-miR-3616	UGUCACUCCGCCAGCAUCAUGAAGUGCACCUAUGAUAUQUUU GCCCAUCAGCGUGUCACGAGGGCAUUUCAUGAUGCAGGCCG GGUUGGCA (SEQ ID NO:26)
hsa-miR-3689a-3p	CUGOGAGGUGUGAUALCGUGGU (SEQ ID NO:27)
hsa-miR-378b	ACUUGGACUUGGAGGCAGAA (SEQ ID NO:28)
hsa-miR-3910-1	CUUUUGCUGUCAGUUUUUCUGUUGCUUGCUUUGGUUUUAUGC CUUUUAUAUCAAGGCACAUAAAAGGCAUAAAACCAAGACAAG CAACAAAAAAAGGAUUGAUCACAGAAG (SEQ ID NO:29)
hsa-miR-3934-5p	UCAGGUGUGGAAACUGAGGCAG (SEQ ID NO:30)
hsa-miR-4306	UGGAGAGAAAGGCAGUA (SEQ ID NO:31)
hsa-miR-4313	AGCCCCCUGGCCCCAAACCC (SEQ ID NO:32)
hsa-miR-4325	UUGCACUUGUCUCAGUGA (SEQ ID NO:33)
hsa-miR-4431	UGGUUUGCGACUCUGAAAACUAGAAGGUUUUAUGACUGGGCA UUUCUCACCCAUGCCAAUAIUGAACUUUCUAGUUGUCAGA GUCAUUAACCC (SEQ ID NO:34)
hsa-miR-4445	UUCCUGCAGAUUGUUUCUUUUGCCUGCAAGUUUAAGUUUU GCACGGCAAAAGAAACAAUCCAGAGGGU (SEQ ID NO:35)
hsa-miR-4487	ACUGUCCUUCAGCCAGACUGGCUGAAGGGCAGAAGGGAACU GUCCUUCAGCCAGACUGGCUGAAGGGCAGA (SEQ ID NO:36)
hsa-miR-450b-5p	UUUUGCAAUAUGUUCCUGAAUA (SEQ ID NO:37)
hsa-miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUAUACAC (SEQ ID NO:38)
hsa-miR-4672	GCGUGCUUCUCGCCUCUGUCCAGCUGUGUGGCCUUGGACAAG CCUCULGGUUACACAGCUGGACAGAGGCACGAAACAGCC (SEQ ID NO:39)
hsa-miR-4685-5p	CCCAGGGCUUUGGAGUGGGGGCAAGGUU (SEQ ID NO:40)
hsa-miR-4708-3p	AGCAAGGCCGCAUCUCUCUGAU (SEQ ID NO:41)
hsa-miR-4749-5p	UGCOGGGACAGGCCAOGGGCAUC (SEQ ID NO:42)
hsa-miR-4769-3p	UCUGCCAUCCUCCCCUCCCUAC (SEQ ID NO:43)
hsa-miR-4771	AGCAGACUUGACCUACAAUUA (SEQ ID NO:44)
hsa-miR-4788	AAUGAAGGAAUACGGACCAGCUAAGGGAGGCAUUAGGAUCCU UAUUCUUGCCUCCCUUAGUUGGUCCUAUCCUUCGUU (SEQ ID NO:45)

ES 2 965 473 T3

hsa-miR-4791	UGGAUAUGAUGACUGAAA (SEQ ID NO:46)
hsa-miR-4797-5p	GACAGAGUGGCCACUUACUGAA (SEQ ID NO:47)
hsa-miR-500a-3p	AUGCACCUGGGCAAGGAUUCUG (SEQ ID NO:48)
hsa-miR-509-3p	UGAUUGGUACGUCUGUGGGUAG (SEQ ID NO:49)
hsa-miR-510-5p	UACUCAGGAGAGUGGCAAUCAC (SEQ ID NO:50)
hsa-miR-520a-5p	CUCCAGAGGAAAGUACUUUCU (SEQ ID NO:51)
hsa-miR-520g	UCCC AUGCUGUGACCCUCUAGAGGAAGCACUUUCUGUUUGUU GUCUGAGAAAAAACAAAGUGCUUCCUUUAGAGUAGUACCGU UUGGGA (SEQ ID NO:52)
hsa-miR-520h	UCCC AUGCUGUGACCCUCUAGAGGAAGCACUUUCUGUUUGUU GUCUGAGAAAAAACAAAGUGCUUCCUUUAGAGUAGUACGUUU GGGA (SEQ ID NO:53)
hsa-miR-532	CGACUUGCUUUCUCUCCUCUAGCCUUGAGUGUAGGACCGUU GGCAUCUUAAAUACCCUCCCACACCCAAGGCUUGCAGAAGAG CGAGCCU (SEQ ID NO:54)
hsa-miR-548aa	AAAAACCACAAUUACUUUUGCACCA (SEQ ID NO:55)
hsa-miR-548ac	CAAAAACCGCAAAUACULUUUG (SEQ ID NO:56)
hsa-miR-548ae	CAAAAACUGCAAAUACUUUCA (SEQ ID NO:57)
hsa-miR-548ag	AAAGGUAAUUGUGGUUUCUGC (SEQ ID NO:58)
hsa-miR-548aj-3p	AAAAAAACUGCAAAUACUUUUA (SEQ ID NO:59)
hsa-miR-548ap-3p	AAAAACCACAAUUACUUUU (SEQ ID NO:60)
hsa-miR-548au	AAAAGUAAUUGCGGUUUUUGCUALUGGUUUUAUOGGCAGUU ACUUUUGCACCAAG (SEQ ID NO:61)
hsa-miR-548k	AAAAGUACUUOCGGAUUUUGC (SEQ ID NO:62)
hsa-miR-548t-3p	AAAAACCACAAUUACUUUUGCACCA (SEQ ID NO:63)
hsa-miR-548x-3p	AAAAAAACUGCAAAUACUUUC (SEQ ID NO:64)
hsa-miR-548y	GCCUAAACUAAUAGGUUGGUQCAAAGUAUAUCACUGUUUUU GCCAUUACUCUCAGUGGCAAAACCGUGAUUACUUUUGCACC AACCUAGUAACACCUUCACUGUGGGGG (SEQ ID NO:65)
hsa-miR-561	CUUCAUCCACCAGUCCUCCAGGAACAUCAGGAUCUAAACU UUGCCAGAGCUACAAAGGCAAAGUUUAAGAUCCUUGAAGUUC CUGGGGAACCAU (SEQ ID NO:66)
hsa-miR-603	CACACACUGCAAAUACUUUGC (SEQ ID NO:67)
hsa-miR-606	AAACUACUGAAAUAAGAU (SEQ ID NO:68)
hsa-miR-6075	GACACCACAUGCUCCUCCAGGCCUGCCUGCCCCUCCAGGUCAU GUUCCAGUGUCCCACAGAUGCAGCACCACGGCCCAGGCGGCA UUGGUGUCACC (SEQ ID NO:69)

ES 2 965 473 T3

hsa-miR-6081	CCACCA CGGU UGUG CUGOC ACCAG OGCCU CUGCCCCGU AAGGACAC CGAGGC UUAUGAAUAGGAGCAGUGCCGGCAAGG GCGGGCA CCAUCU UGGUGAU (SEQ ID NO:70)
hsa-miR-6739-5p	UGGGAAAGAGAAAAGAACAAAGUA (SEQ ID NO:71)
hsa-miR-6749-5p	UCGGGCCUGGGGUUGGGGGAGC (SEQ ID NO:72)
hsa-miR-6776	CGGGCUCUGGGUQCAGUGGGGUUCCCACGCCQCGGCAACCA CCACU GUCUCU CCCCCAG (SEQ ID NO:73)
hsa-miR-6782-5p	UAGGGGUUGGGGGAAUUCAGGGGUGU (SEQ ID NO:74)
hsa-miR-6793-5p	UCCCCAACCCCUUGCCCGCAG (SEQ ID NO:75)
hsa-miR-6850	GUGCGGAACGCUGGCCGGGGAGGGAGGGACGCCCGG CCGGAACGCCGCACUCACG (SEQ ID NO:76)
hsa-miR-6865-3p	ACACCCUCUUUCCCUACCGCC (SEQ ID NO:77)
hsa-miR-6873-5p	CAGAGGGAAUACAGAGGGCAAU (SEQ ID NO:78)
hsa-miR-7706	UGGAGCUQUGUQCAGGGCCAGCCCGGAGCCCGAGCAGCCGCG GUGAAGCGCCUGUGCUCUGCCGAGA (SEQ ID NO:79)
hsa-miR-7973	UGUGACCCUAGAAUAAUAC (SEQ ID NO:80)
hsa-miR-8032	CGGGACUQUAGAGGGCAUGAGC (SEQ ID NO:81)
hsa-miR-8075	CCUUCUGCAUGGCAGAUGUCGGGUCUGCCUCGCUUAUACGUG CCCUUGCUGAUGGCAGAUGUCGGGUCUGCCUCGCUUAU (SEQ ID NO:82)
hsa-miR-8089	AAGGAGCACUCACUCCA AUUUCCCUGGACUGGGGGCAGGCUG CCACCUCCUGGGACAGGGAUUUGGGCAAGGAUGUUCCAG (SEQ ID NO:83)
hsa-miR-892b	UGCAAUGCCUACUCAGAAAGGUGCCAUUAUGUAGAUUUUA UGUCACUGGCUCCUUUCUGGUAGAGCAAGGCUCU (SEQ ID NO:84)
hsa-miR-936	ACAGUAGAGGGAGGAUCGCAG (SEQ ID NO:85)
hsa-miR-937-5p	GUGAGUCAGGGUGGGGCUGG (SEQ ID NO:86)
scaRNA17	AGAGGC UUUGGGCCCGGAGCUGGACCCGGACC GGU UUGGGU ACUGU ACUGGGGGCAGGGCAGAGAGGG (SEQ ID NO:87)
U6	GUGCUCGC UUUCGGCAGCACAUUAUACUAAA UUGGAACGAUAC AGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUO CGCAAGGAUGACACGCAA UUCGUGAAGCQUUCCAUAUUUU (SEQ ID NO:88)

Ejemplo 1: Expresión de ARNmi maduros humanos mediante qPCR en una cohorte de muestra de 45 pacientes con EA y 182 controles.

5 El cambio de expresión logarítmico medio para hsa-miR-335-5p, hsa-miR-3613-3p y hsa-miR-6865-3p. Los PARKmiR entre pacientes con EA y controles sanos se ilustran en la Figura 1.

Ejemplo 2: Análisis de combinaciones de PARKmiR, hsa-miR-335-5p/hsa-miR-3613-3p, hsa-miR-3613-3p/hsa-miR-6865-3p y hsa-miR-3355p/hsa-miR-6865-3p en una cohorte de muestra de 45 pacientes con EA y 182 controles. Se usó la técnica qPCR del Ejemplo 1 para identificar posibles biomarcadores de diagnóstico. Se determinó que las combinaciones de PARKmiR muestran una alta previsibilidad para el diagnóstico de EA. Los resultados del modelo con hsa-miR-3355p/hsa-miR-6865-3p, hsa-miR-335-5p/hsa-miR-3613-3p y hsa-miR-6865-3p/hsa-miR-3613-3p entre pacientes con EA y controles sanos se ilustran en la Figura 2.

10 15 Ejemplo 3: Se evidencia que cualquier combinación de tres o más microARN de la lista de 85 ARNmi identificados se puede utilizar para diagnosticar la aparición de EA en pacientes.

Ejemplo 4: La medición de los niveles de una combinación de dos o más ARNmi en suero de pacientes puede ayudar a diferenciar claramente entre un paciente potencial con EA y un individuo sano. Se obtiene una muestra de suero de la sangre extraída de pacientes con sospecha de EA. El suero se utiliza para el aislamiento y enriquecimiento total de 20 microARN. Este ARN luego se probaría usando qPCR para medir los niveles de dos o más de los 85 ARNmi mencionados en el Ejemplo 1, o uno cualquiera de los tres ARNmi mencionados en los Ejemplos 5-7. Los niveles detectables de dos o más de los 85 ARNmi o uno cualquiera de los tres ARNmi confirman que el paciente tiene EA. Si se desea, se pueden utilizar otros fluidos de muestra, incluido plasma, sangre venosa o arterial, o muestras de LCR extraídas mediante punción lumbar. Dichas muestras de plasma, sangre o LCR se procesan como se analizó anteriormente con respecto al suero, por ejemplo, para proporcionar una muestra para procesamiento y evaluación 25 fuera del cuerpo humano o animal. Se entenderá que la medición de más de dos ARNmi en combinación o un conjunto de combinaciones utilizadas en una matriz de prueba puede aumentar deseablemente la precisión del diagnóstico de AD. Tras el diagnóstico, el resultado se comunica al paciente.

30 Ejemplo 5: Dado que se puede usar una combinación de ARNmi para el diagnóstico, puede ser aconsejable probar todos los candidatos para eliminar cualquier variación basada en cohortes. Se entiende que cualquier cantidad detectable de ARNmi relevante indicará patología de EA. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocen que puede ser clínicamente útil utilizar valores de 45 frente a 182 muestras para establecer un umbral artificial para el diagnóstico. Los niveles diferenciales de ARNmi se pueden utilizar para desarrollar kits de biomarcadores de diagnóstico que los 35 médicos puedan utilizar tanto en el diagnóstico como en los ensayos clínicos. En este estudio, la presencia y cuantificación de ARNmi del suero se determinó mediante qRT-PCR, que amplifica y cuantifica el ARN en cuestión.

Se pueden utilizar alternativamente otras técnicas adecuadas conocidas por los expertos en la presente, incluido el uso de secuencias antisentido marcadas y anticuerpos marcados. Los anticuerpos adecuados son preferentemente selectivos, refiriéndose a una reacción de unión entre dos moléculas que normalmente es más de 10 a 100 veces las 40 asociaciones moleculares de fondo en condiciones de medición. Por tanto, en las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una secuencia de ARNmi particular, identificando así su presencia. La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones requiere un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para un ARNmi particular. Por ejemplo, los anticuerpos generados contra un ARNmi particular se pueden seleccionar eliminando los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con otras moléculas. Se puede usar una 45 variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con un ARNmi particular, incluidos inmunoensayos ELISA en fase sólida (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) para obtener una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica). En el mismo se divulan métodos para determinar si dos moléculas interactúan específicamente, y los métodos para determinar la afinidad y especificidad de unión son bien conocidos 50 en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Friefelder, "Physical Biochemistry: Applications to biochemistry and molecular biology" (W.H. Freeman and Co. 1976)). El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, abarca anticuerpos de origen natural así como anticuerpos de origen no natural, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos químicos, bifuncionales y humanizados, así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, Fab', 55 F(ab')2, Fab, Fv y rlgG). Véase también Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Véase también, por ejemplo, Kuby, J., *Immunology*, 3^a Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1998). Dichos anticuerpos no naturales se pueden construir usando síntesis de péptidos en fase sólida, se pueden producir de forma recombinante o se pueden obtener, por ejemplo, seleccionando bibliotecas combinatorias que consisten en cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables como describen Huse et al., *Science*, vol. 246 (1989) 1275-81. Estos y 60 otros métodos para preparar, por ejemplo, anticuerpos químicos, humanizados, injertados con CDR, de cadena sencilla y bifuncionales son bien conocidos por los expertos en la técnica (Winter and Harris, *Immunol. Today*, Vol. 14 (1993) 243-46; Ward et al., *Nature*, Vol. 341 (1989) 544-46; Harlow y Lane, supra, 1988; Hilyard et al., *Protein Engineering: A Practical Approach* (IRL Press 1992); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2^a ed. (Oxford University Press 1995) 65 Los métodos para producir anticuerpos tanto monoclonales como policlonales a partir de secuencias de ARN identificadas son bien conocidos en la técnica.

Ejemplo 6

Muchas enfermedades neurodegenerativas están estrechamente relacionadas entre sí en cuanto a síntomas y marcadores patológicos. Los marcadores de diagnóstico circulantes de una enfermedad neurodegenerativa pueden ser útiles para el diagnóstico de otra enfermedad. También se puede desarrollar un método para diagnosticar otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la atrofia sistémica múltiple (MSA), la degeneración corticobasal (CBD) y la Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP) también se puede desarrollar utilizando mediciones de miARN similares a las de los candidatos mencionados anteriormente. Se pueden desarrollar kits específicos de enfermedades similares al mencionado anteriormente con varias combinaciones de ARNmi enumerados en el párrafo 0019.

Ejemplo 7

Los ARNmi detectados en una o más combinaciones pueden regular varias proteínas en las células. Se pueden descubrir nuevos objetivos proteicos para la EA utilizando estos microARN y sus combinaciones. La participación de estas proteínas en la etiología de la EA se puede establecer aún más para abordarlas como objetivo terapéutico.

Ejemplo 8

Hemos confirmado experimentalmente la regulación predicha de LRRK2 por hsamiR-335-5p y SNCA por hsa-miR-3613-3p en estirpes celulares neuronales dopaminérgicas. La intervención terapéutica para regular los nuevos objetivos mencionados se puede lograr mediante tecnologías de interferencia de ARN.

Ejemplo 9

Se diseñarán pequeñas moléculas de ácido nucleico derivadas de los ARNmi mencionados anteriormente para intervenir terapéuticamente dirigiéndose específicamente a genes en cerebros con EA para lograr un remedio completo o parcial. Los efectos discutidos anteriormente se lograrán para apuntar con precisión a las células cerebrales.

30

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la enfermedad de Alzheimer en un paciente humano, que comprende las etapas de:
 - 5 determinar, en una muestra de dicho paciente humano, un nivel diferencial de al menos un ARNmi dentro de dicha muestra, en el que al menos un ARNmi es de SEQ ID NO: 77, y en el que la presencia de un nivel diferencial de al menos un El ARNmi comparado con el nivel de al menos un ARNmi en un sujeto de control sano es indicativo de la presencia de la enfermedad de Alzheimer en el paciente humano.
 - 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende determinar un nivel diferencial de al menos dos ARNmi seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 15, 21, 22, 24, 25, 52, 54, 55 y 77 dentro de dicha muestra, en el que al menos un ARNmi es de SEQ ID NO: 77.
 - 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dichos al menos dos ARNmi comprenden las SEQ ID NOS: 22 y 77.
 - 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dichos al menos dos ARNmi comprenden SEQ ID NOS: 25 y 77.
 - 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende determinar un nivel diferencial de cada una de las SEQ ID NOS: 22, 25 y 77 dentro de dicha muestra.
 - 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dichos al menos dos ARNmi comprenden:
 - (a) SEQ ID NOS 15 y 77;
 - (b) SEQ ID NOS 21 y 77;
 - (c) SEQ ID NOS: 24 y 77;
 - (d) SEQ ID NOS 52 y 77; o
 - (e) SEQ ID NOS: 54 y 77.
 - 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dichos al menos dos ARNmi comprenden las SEQ ID NOS: 55 y 77.
 - 40 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha muestra es suero, plasma o sangre completa.
 - 45 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el nivel diferencial de 5 de dichos ARNmi se determina usando qRT-PCR.
 - 50 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el nivel diferencial de dichos ARNmi se determina usando secuencias de nucleótidos antisentido marcadas.
 - 55 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el nivel diferencial de dichos ARNmi se determina utilizando perfiles de micromatrices.
 - 60 12. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el nivel diferencial de dichos ARNmi se determina usando secuenciación NGS de alto rendimiento.
 13. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el nivel diferencial de dichos ARNmi se determina usando anticuerpos marcados.
 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la presencia de un nivel diferencial de al menos 1,2 veces de al menos un ARNmi en comparación con el nivel de al menos un ARNmi en un sujeto de control sano es indicativo de la presencia de la enfermedad de Alzheimer en el paciente humano.
 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3-5, en el que la presencia de un nivel diferencial de al menos un ARNmi de al menos 1,2 veces por debajo del nivel de al menos un ARNmi en un sujeto de control sano es indicativo de la presencia de la enfermedad de Alzheimer en el paciente humano.

Patente de Diagnóstico (EA)

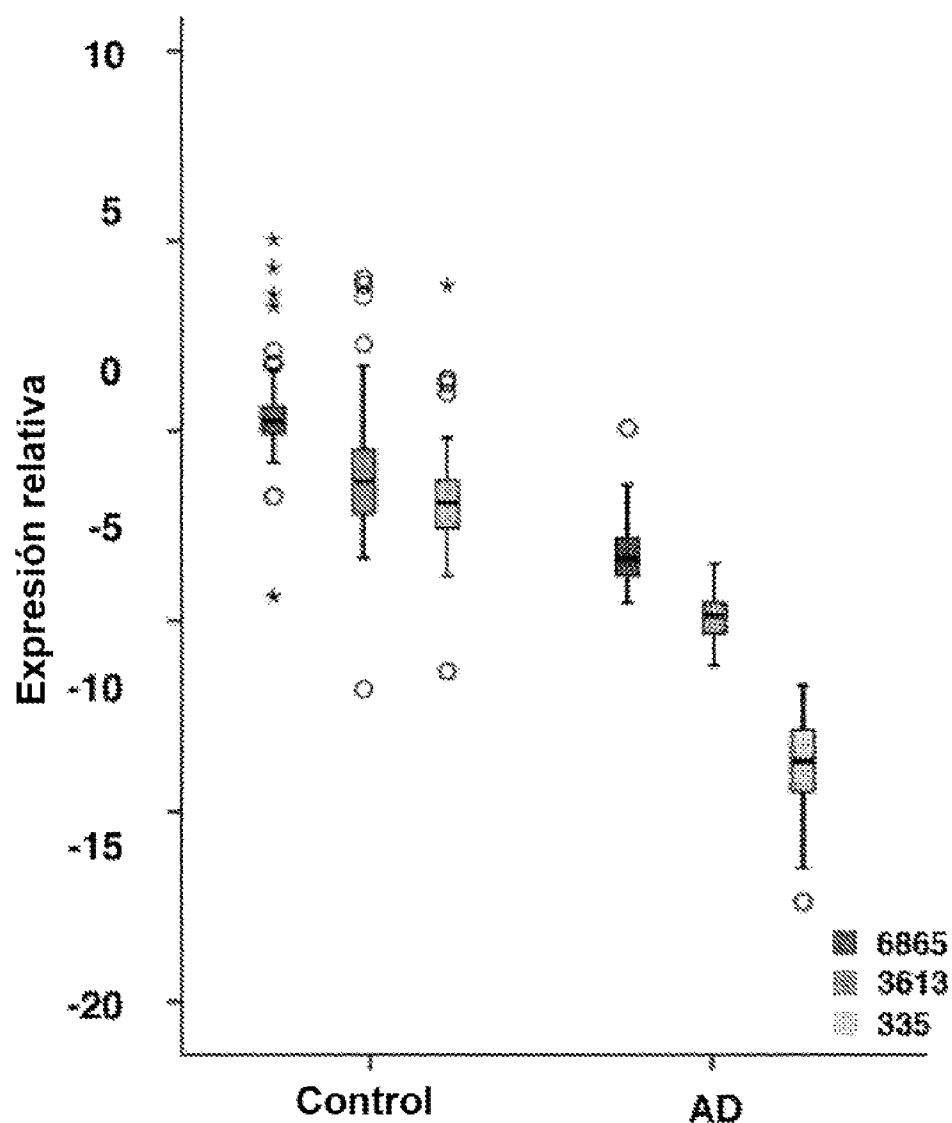


Figura 1: Especificidad de PARKmiR. Representación gráfica de los datos de qRT-PCR que muestran patrones de expresión distintos (logarítmicos) observados para PARKmiR en 50 muestras de suero de pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con 182 muestras de suero de controles.

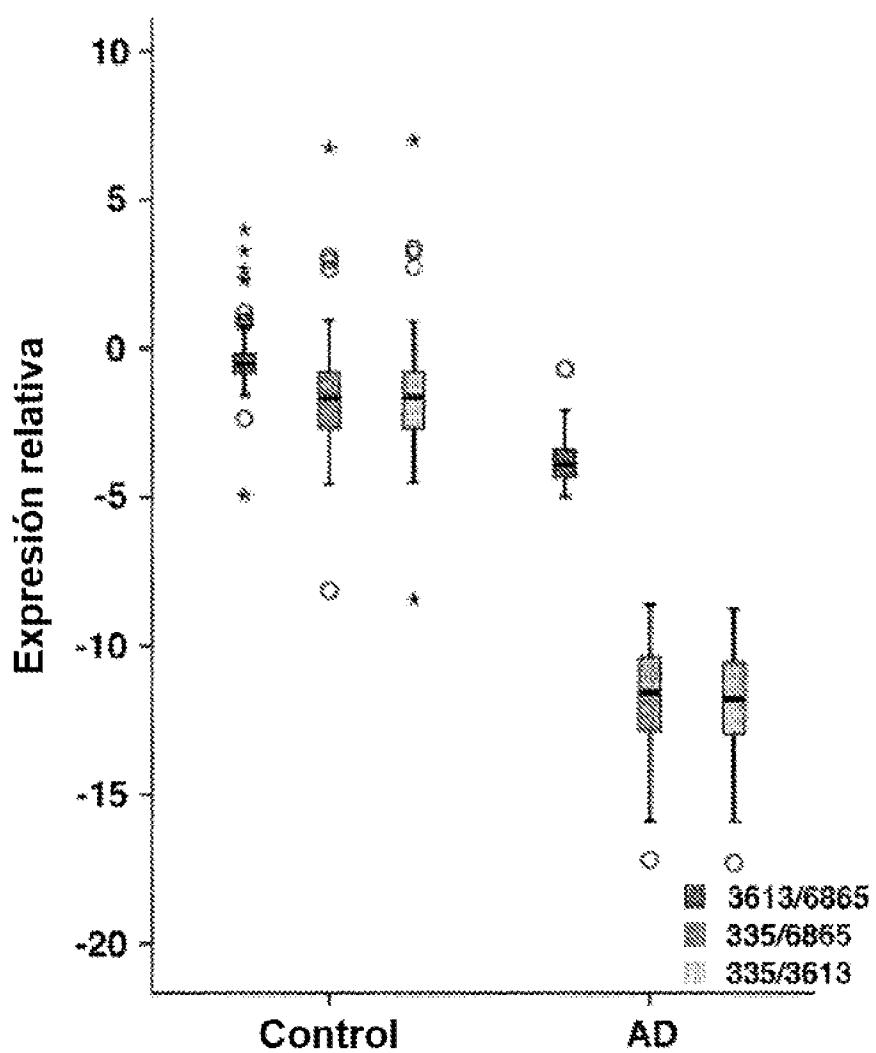


Figura 2: Especificidad de combinaciones de PARKmiR. Representación gráfica de los datos de qRT-PCR que muestra patrones de expresión distintos (retardo) observados en las combinaciones de PARKmiR en 50 muestras de suero de pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con 182 muestras de suero de controles.