

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 890 949**

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/US2018/036380**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2018 WO18236590**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2018 E 18737451 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.09.2021 EP 3642365**

54 Título: **Biomarcadores de microARN séricos circulantes y métodos para determinar la velocidad de progresión de la enfermedad de Parkinson**

30 Prioridad:

19.06.2017 US 201762521797 P

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

25.01.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MOLLER, SIMON GEIR;
BASAK, INDRANIL;
PATIL, KETAN;
LARSEN, JAN PETTER y
ALVES, GUIDO WERNER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 890 949 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 séricos circulantes y métodos para determinar la velocidad de progresión de la enfermedad de Parkinson

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general a microARN séricos y a métodos para diferenciar pacientes que sufren de enfermedad de Parkinson basándose en la velocidad de progresión de la enfermedad, así como de ayuda al clínico en la fijación de protocolos de tratamiento para dichos pacientes.

Breve descripción de los antecedentes de la técnica

La enfermedad de Parkinson (EP) es una degeneración altamente específica de las células que contienen dopamina de la sustancia negra del mesencéfalo, que causa deficiencia de dopamina en el cuerpo estriado. La EP actualmente afecta a aproximadamente 10 millones de personas en todo el mundo. La gestión eficaz de un paciente con EP resulta posible en los primeros 5 a 7 años de tratamiento, transcurrido el cual se produce una serie de complicaciones con frecuencia debilitantes conjuntamente denominadas fluctuaciones motoras tardías (FMT). Se cree que el tratamiento con levodopa (ácido (-)-L-α-amino-beta-(3,4-dihidroxibenceno)propanoico), o L-dopa, el fármaco antiparinsoniano más eficaz, puede facilitar o incluso estimular la aparición de FMT. Se utilizan agonistas de la dopamina como un tratamiento alternativo, aunque no ofrecen el mismo grado de alivio sintomático a los pacientes que la L-dopa.

Las terapias sintomáticas mejoran los signos y síntomas sin afectar al estado subyacente de la enfermedad. La levodopa incrementa la concentración de dopamina en el cuerpo estriado, especialmente en el caso de que su metabolismo periférico resulte inhibido por un inhibidor periférico de descarboxilasa (IPD). La terapia de levodopa/IPD se utiliza ampliamente para la terapia sintomática de la enfermedad de Parkinson, tal como combinaciones de levodopa con carbidopa (monohidrato de ácido (-)-L-α-hidrazino-α-metil-beta-(3,4-dihidroxibenceno)propanoico), levodopa y carbidopa de liberación controlada, levodopa y benserazida, o levodopa más benserazida (N'-(2,3,4-trihidroxi-bencil)-hidrazida de ácido 2-amino-3-hidroxi-propiónico) de liberación controlada.

Los inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) potencia el tratamiento de levodopa ya que inhiben el metabolismo de la levodopa, potenciando su biodisponibilidad y haciendo de esta manera que más del fármaco se encuentre disponible en la hendidura sináptica durante un periodo de tiempo más prolongado. Entre los ejemplos de inhibidores de la COMT se incluyen tolcapona (3,4-dihidroxi-4'-metil-5-nitrobenzofenona) y entacapona ((E)-2-ciano-3-(3,4-dihidroxi-5-nitrofenil)-N,N-dietil-2-propanamida).

Los agonistas de dopamina proporcionan un beneficio sintomático mediante la estimulación directa de los receptores postsinápticos de la dopamina estriatal. Entre los ejemplos se incluyen bromocriptina ((5α)-2-bromo-12'-hidroxi-2'-(1-metiletil)-5'-(2-metilpropil)ergotamán-3',6',18-triona), pergolida (8B-[(metiltio)metil]-6-propilergolina), ropinirol (4-[2-(dipropilamino)etil]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona), pramipexol ((S)-4,5,6,7-tetrahidro-N⁶-propil-2,6-benzotiazoldiamina), lisurida (N'-[(8α)-9,10-dihidro-6-metilergolín-8-il]-N,N-dietil-urea), cabergolina ((8β)-N-[3-(dimetilamino)propil]-N-[(etilamino)carbonil]-6-(2-propenil)ergolín-8-carboxamida), apomorfina ((6aR)-5,6,6a,7-tetrahidro-6-metil-4H-dibenzo[de,g]quinolín-10,11-diol), sumanirol (5-(metilamino)-5,6-dihidro-4H-imidazo {4,5,1-ij}quinolín-2(1H)-ona), rotigotina ((-)(S)-5,6,7,8-tetrahidro-6-[propil[2-(2-tienil)etil]amino]-1-naftol-), talipexol (5,6,7,8-tetrahidro-6-(2-propenil)-4H-tiazolo[4,5-d]azepín-2-amina) y dihidroergocriptina (ergotamán-3',6',18-triona, 9,10-dihidro-12'-hidroxi-2'-metil-5'-(fenilmetilo) (5' cc)). Los agonistas de dopamina resultan eficaces como monoterapia precozmente en el curso de la enfermedad de Parkinson y como complemento a la levodopa en estadios más avanzados. Al contrario que la levodopa, los agonistas de la dopamina estimulan directamente los receptores postsinápticos de la dopamina. No experimentan metabolismo oxidativo y se cree que no aceleran el proceso patológico.

La amantidina (1-aminotriciclo(3,3,1,1^{3,7})decano) es un agente antivírico en el que serendipitosamente se encontró que presentaba actividad antiparinsoniana. No se ha determinado cuál es el mecanismo de acción en la EP, aunque se cree que funciona mediante el incremento de la liberación de la dopamina. Los pacientes que reciben amantidina como monoterapia o en combinación con levodopa muestran una mejora de la aquinesia, la rigidez y los temblores.

Entre otras medicaciones utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson se incluyen los inhibidores de MAO-B. La inhibición del metabolismo de la L-dopa mediante inactivación de la monoaminoxidasa de tipo B (MAO-B) es un medio eficaz para potenciar la eficacia tanto de la dopamina endógena residual como de la obtenida exógenamente a partir de su precursor, la L-dopa. La selegilina (metil-(1-metil-2-fenil-etil)-prop-2-inil-amina) es un inhibidor de MAO-B. Hay pruebas de que el tratamiento con selegilina podría enlentecer la progresión de la enfermedad en la EP mediante el bloqueo de la formación de radicales libres derivados del metabolismo oxidativo de la dopamina. Entre otros ejemplos de inhibidores de MAO B se incluyen lazabemida (N-(2-aminoetil)-5-cloro-2-piridín-carboxamida), rasagilina (N-propargil-1-(R)-aminoindano y caroxazona (2-oxo-2H-1,3-benzoxazín-3(4H)-acetamida).

Es imperativo diagnosticar los individuos con EP en un estadio precoz y también resulta importante determinar el pronóstico de la enfermedad a fin de incrementar la eficacia de los agentes terapéuticos. Sin embargo, no existe ningún test objetivo ni biomarcadores establecidos para el diagnóstico de la EP. Además, la heterogeneidad, subtipos y progresión de la enfermedad dificultan el desarrollo de candidatos terapéuticos específicos.

Los microARN ("ARNmi") son una clase de ARN no codificantes que desempeñan funciones clave en la regulación de la expresión génica. Los ARNmi actúan después de la transcripción y realizan un ajuste fino de la expresión de hasta 30% de todos los genes codificantes de proteínas de los mamíferos. Los miARN maduros son moléculas cortas de ARN monocatenario, de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. Los miARN pueden estar codificados por múltiples loci y pueden estar organizados en agregados que se cotranscriben en tándem. Los genes de miARN son transcritos por la ARN polimerasa II en forma de transcritos primarios grandes (pri-microARN) que resultan procesados por un complejo proteico que contiene el enzima ARNasa III Drosha, DGCR8 y otros cofactores, formando un microARN precursor de aproximadamente 70 nucleótidos (pre-miARN). (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-miARN es transportado hasta el citoplasma por la exportina-5, en donde resulta procesada por DICER, un segundo enzima ARNasa III, junto con TRBP, PACT y Ago2 en el complejo de silenciamiento inducido por ARN, dando como resultado moléculas dúplex de miARN (Kim VN, Nat. Rev. Mol. Cel. Biol., 2009; Gregory RI, Nature 2004; MacRae IJ, PNAS, 2008). Las cadenas guía de los dúplex de miARN se separan y se asocian con Ago 2 para la incorporación en una partícula ribonuclear, formando el complejo de silenciamiento inducido por ARN, RISC, que media en el silenciamiento génico. Los mecanismos de los miARN van desde la degradación directa o silenciamiento del ARNm y la represión de la traducción hasta las regulaciones postranscripcionales positivas. (MacRae IJ, PNAS, 2008.)

Se ha informado de la presencia de miARN en líquidos corporales, entre ellos la sangre, el líquido cefalorraquídeo (LCR), el plasma, el suero y la saliva, a niveles detectables. La especificidad de tejido de los miARN sugiere un papel vital e integral en diversos procesos fisiológicos. El enriquecimiento en tejidos es prometedora de una nueva, aunque menos explorada función como biomarcador diagnóstico y como potencial diana terapéutica. Se cree que los miARN circulantes se originan en fugas pasivas a partir de tejido dañado como resultado de la lisis celular o apoptosis, el transporte activo a partir de las células mediante microvesículas, tales como exosomas, o unidos dentro de complejos proteicos RISC (Etheridge et al., 2011). La administración mediada por exosomas y bombas osmóticas de pequeñas moléculas de ARN en el cerebro y SNC, respectivamente, proporciona una solución para superar las limitaciones de las terapias a base de miARN (Alvarez-Erviti et al., 2011; Koval et al, 2013, Hum. Mol. Gen). El miARN ha demostrado ser excepcionalmente estable y de esta manera se presenta como un potente candidato a biomarcador potencial (Chen et al, 2008; Grasso, 2014). Khoo, S.K. (2012, 2014) ha confirmado que dos miARN pueden diferenciar los pacientes de EP con progresión lenta vs. rápida y un miARN puede diferenciar la línea base del punto final.

Descripción resumida de la invención

Es un objetivo de la presente invención la identificación de los miARN relevantes a los pacientes que sufren de enfermedad de Parkinson.

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar métodos para determinar la velocidad de progresión de la enfermedad en pacientes que sufren de enfermedad de Parkinson.

Es un objetivo adicional de la presente invención la determinación de métodos para identificar opciones de tratamiento basándose en la velocidad de la enfermedad en pacientes que sufren de enfermedad de Parkinson.

Dichos objetivos y otros se consiguen mediante la presente invención, que proporciona biomarcadores de miARN que pueden utilizarse individualmente, en parejas o en combinación para determinar los pacientes que sufren de enfermedad de Parkinson.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el factor promedio de cambio de cinco miARN pronósticos entre pacientes de EP de progresión rápida y lenta.

Descripción detallada de la invención

Métodos

Manipulación y clasificación de muestras de suero.

Todos los pacientes y controles participaron en el proyecto noruego ParkWest, que es un estudio de cohorte longitudinal prospectivo de base poblacional en curso que investiga la incidencia, neurobiología y pronóstico de la EP. El estudio ParkWest noruego es un estudio multicéntrico prospectivo de cohorte longitudinal de pacientes con

enfermedad de Parkinson (EP) incidente en Noruega occidental y meridional. Entre el 1 de noviembre de 2004 y el 31 de agosto de 2006 se proyectó incluir todos los casos nuevos de enfermedad de Parkinson en la zona de estudio. Desde el inicio del estudio, se realizó un seguimiento de 212 de un total de 265 (80%) de estos pacientes y su grupo de control de edad/sexo correspondiente. Puede encontrarse información adicional sobre el estudio en <http://www.parkvest.no> <http://www.parkvest.no>.

Se realizaron todos los esfuerzos posibles para establecer una cohorte no seleccionada y representativa de la población de pacientes con EP. Se incluyeron los pacientes que habían proporcionado suero al inicio del estudio y que cumplieran los criterios diagnósticos de EP del National Institute of Neurological Disorders and Stroke (http://www.ninds.nih.gov/disorders/parkinsons_disease/parkinsons_disease.htm) y del UK Brain Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/GetPdf.cgi?id=phd000042>) en el último seguimiento. Los pacientes con parkinsonismo secundario al inicio del estudio fueron excluidos del mismo. Los sujetos de control se reclutaron de múltiples fuentes, incluyendo amigos, parejas y organizaciones públicas de ancianos, y se incluyeron en el presente estudio en el caso de que hubiesen proporcionado suero. Todos los pacientes y los controles eran caucásicos. Se realizó un seguimiento de los participantes del estudio durante más de ocho años para determinar la velocidad de progresión de la enfermedad.

En el presente estudio de posibles biomarcadores de la EP los presentes inventores aplicaron un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, de identificación, se seleccionó aleatoriamente el suero de 8 pacientes con progresión rápida y de 8 pacientes con progresión lenta de la EP. Los restantes 164 pacientes con EP que eran elegibles para el presente estudio fueron seleccionados con fines de verificación.

Las muestras de suero se recogieron el mismo día que los exámenes clínicos y después se almacenaron bajo congelación a -70° grados centígrados hasta el transporte a las instalaciones en Nueva York sobre hielo seco.

Ejemplo 1: análisis de qPCR de miARN humano de expresión diferencial

Aislamiento de ARN a partir de muestras de suero y control de calidad (QC)

Tras la descongelación sobre hielo, se centrifugaron veinticuatro muestras de suero (dieciséis muestras de EP) durante 5 min a 3000xg para eliminar los residuos. El sobrenadante se utilizó para llevar a cabo el aislamiento de ARN pequeño mediante la utilización del kit de aislamiento de ARN miRCURY, Biofluids (Exiqon, MA). Antes del aislamiento del ARN, al tampón de lisis se añadieron 0,267 fmoles/μl de cel-miR-39-3p de control de adición (Qiagen, CA). La parte restante del aislamiento del ARN se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante y el ARN aislado se cuantificó en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, MA). El ARN se utilizó para chips micromatrices de microARN Affymetrix v4 y para la posterior síntesis de ADNc y la qPCR. Se aisló el ARN de 180 muestras de suero (de pacientes de EP del proyecto ParkWest) tal como se ha indicado anteriormente; no se cuantificaron mediante Nanodrop, aunque los datos de qPCR que resultaron de dichas muestras se normalizaron respecto a un ARN pequeño de referencia, scaRNA17.

Micromatrices de miARN y análisis de los datos

El ARN aislado de veinticuatro muestras de suero de los pacientes se cuantificaron y se sometieron a la matriz 4.0 de miARN Affymetrix GeneChip® en el Yale Center for Genome Analysis (<http://medicine.yale.edu/keck/vcga/index.aspx>). Los archivos CEL normalizados que se obtuvieron del software Affymetrix Expression Console se importaron en Partek Genomics Suite versión 6.6 Copyright © 2012 (Partek, MO) para el análisis. Se utilizó el flujo de trabajo 'microRNA Expression Workflow' para detectar los miARN expresados diferencialmente mediante la utilización de ANOVA, dando como resultado listas de miARN expresados significativamente ($p < 0,05$) entre cohortes de EP rápidas y lentas. Los miARN detectados se utilizaron para la verificación adicional mediante qPCR.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Se sintetizó ADNc para la qPCR específica de miARN mediante la utilización del kit de síntesis de ADNc de microARN qScript™ (Quanta Biosciences, MD) siguiendo el protocolo del fabricante y se llevaron a cabo qPCR posteriores mediante la utilización de cebadores directos específicos de miARN (Tabla nº) y cebador de PCR universal PerfeCTa® (Quanta Biosciences, MD). Se utilizó scaRNA17 y U6 como ARN pequeños de referencia para normalizar los valores de Cq de qPCR, mientras que se utilizó cel-miR-39-3p como control de adición. Se utilizó PerfeCTa® SYBR® GREEN SuperMix para IQ™ (Quanta Biosciences, MD) para todas las qPCR en un sistema de detección de PCR en tiempo real de un solo color MyiQ™ (Bio-Rad, CA). Se analizó la curva patrón para cel-miR-39-3p en MS Excel con $R^2 = 0,97882$ y eficiencia de PCR de 92,96%. Se partió de la suposición de ausencia de control de molde (ACM) en caso necesario.

Se determinaron los miARN humanos expresados diferencialmente en muestras de suero de pacientes de enfermedad de Parkinson del estudio noruego ParkWest mediante la utilización de micromatrices de miARN. Posteriormente se proporcionan miARN con expresión diferencial de >1,2 veces.

52 pre-miARN y miARN maduros expresados diferencialmente con un factor de cambio >1,2: hsa-miR-6865-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-937-5p, hsa-let-7b-3p, hsa-miR-6730-3p, hsa-miR-5010-3p, hsa-miR-1825, hsa-mir-4487, hsa-miR-4783-5p, hsa-miR-2117, hsa-mir-5090, hsa-mir-4484, hsa-miR-5094, hsa-mir-611, hsa-miR-4738-3p, hsa-miR-6894-5p, hsa-mir-8072, hsa-mir-762, hsa-let-7e, hsa-miR-6768-5p, hsa-mir-3917, hsa-mir-3673, hsa-mir-4431, hsa-miR-216a-3p, hsa-miR-635, hsa-miR-490-3p, hsa-mir-601, hsa-miR-636, hsa-miR-466, hsa-miR-1271-5p, hsa-miR-548u, hsa-miR-3606-5p, hsa-miR-510-5p, hsa-miR-4306, hsa-mir-4753, hsa-mir-6128, hsa-mir-4251, hsa-miR-1306-5p, hsa-miR-8052, hsa-mir-4310, hsa-mir-3128, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-3660, hsa-miR-3156-3p, hsa-miR-548aj-3p, hsa-miR-4791, hsa-mir-532, hsa-miR-202-5p, hsa-miR-3613-3p y hsa-miR-8075.

36 miARN maduros expresados diferencialmente con un factor de cambio >1,2 veces: hsa-miR-6865-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-937-5p, hsa-let-7b-3p, hsa-miR-6730-3p, hsa-miR-5010-3p, hsa-miR-1825, hsa-miR-4783-5p, hsa-miR-2117, hsa-miR-5094, hsa-miR-4738-3p, hsa-miR-6894-5p, hsa-let-7e, hsa-miR-6768-5p, hsa-miR-216a-3p, hsa-miR-635, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-636, hsa-miR-466, hsa-miR-1271-5p, hsa-miR-548u, hsa-miR-3606-5p, hsa-miR-510-5p, hsa-miR-4306, hsa-miR-8052, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-3660, hsa-miR-3156-3p, hsa-miR-548aj-3p, hsa-miR-4791, hsa-miR-202-5p, hsa-miR-3613-3p y hsa-miR-8075

16 miARN premaduros de expresión diferencial con factor de cambio >1,2 veces: hsa-mir-4487, hsa-mir-5090, hsa-mir-4484, hsa-mir-611, hsa-mir-8072, hsa-mir-762, hsa-mir-3917, hsa-mir-3673, hsa-mir-4431, hsa-mir-601, hsa-mir-4753, hsa-mir-6128, hsa-mir-4251, hsa-mir-4310, hsa-mir-3128 y hsa-mir-532. Estas secuencias de miARN de expresión diferencial se ilustran a continuación, en la Tabla 1, junto con los ARN pequeños de referencia/de mantenimiento cel-miR-39-3p, U6 y ScaRNA17, que se utilizaron como controles. Cel-miR-39-3p es un control de adición que muestra la estabilidad de las muestras de ARN. Se utilizaron U6 y ScaRNA17 como controles internos para normalizar las lecturas del resto de los miARN o miARN candidatos.

Ejemplo 1

Tabla 1

Nombre de microARN/ARN pequeño	Secuencia de microARN
hsa-let-7b-3p	CUAUACAACCUACUGCCUUC (SEC ID nº 1)
hsa-let-7e	CCCGGGCUGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUUGAGGAGGACACCC AAGGAGAUACAUACGGCCUCCUAGCUUUC CAGG (SEC ID nº 2)
hsa-miR-1271-5p	CUUGGCACCUAGCAAGCACUCA (SEC ID nº 3)
hsa-miR-1306-5p	CCACCUC CCGUGCAAACGUCCA (SEC ID nº 4)
hsa-miR-1825	UCCAGUGCCCUCCUCUCC (SEC ID nº 5)
hsa-miR-202-5p	UUCUAUGCAUAUACUUCUUG (SEC ID nº 6)
hsa-miR-2117	UGUUCUCUUGGCAAGGACAG (SEC ID nº 7)
hsa-miR-216a-3p	UCACAGUGGUCUCUGGGAUUAU (SEC ID nº 8)
hsa-mir-3128	UUCUCUGGCAAGUAAAAACUCUCAUUUCCUAAAAAUG AGAGUUUUUACUUGCAAUAGGAA (SEC ID nº 9)
hsa-miR-3156-3p	CUCCACUCCAGAUUUUCU (SEC ID nº 10)
hsa-miR-3606-5p	UUAGUGAAGGCUAUUUUAAU (SEC ID nº 11)
hsa-miR-3613-3p	ACAAAAAAGCCCAACCCUUC (SEC ID nº 12)
hsa-miR-3660	ACUGACAGGAGCAUUUUGA (SEC ID nº 13)
hsa-mir-3673	AUAUAUAUAUAGGAAUGUAUAUACGGAAUAUAUAUAUA UGGAAUGUAUAUACGGAAUAUAUAUAUAUGGAAUGUAUU ACGGAAUAUAUAUAUAU AU (SEC ID nº 14)
hsa-mir-3917	GGCGCUUUUGUGCGCGCCCGGUCUGUUGGUGCUCAGAGUGU GGUCAGGCGGCUCGGACUGAGCAGGUGGGUGCGGGGCUCGGA GGAGGCGGC (SEC ID nº 15)

Tabla 1 (continuación)

Nombre de microARN/ARN pequeño	Secuencia de microARN
hsa-mir-4251	CACGUCCUCCAGCUUUUUUCCUUAAGUGGCCAAUUCCUGAGAA AAGGGCCAACGUGCUUCCA (SEC ID nº 16)
hsa-miR-4306	UGGAGAGAAAGGCAGUA (SEC ID nº 17)
hsa-mir-4310	UGGCGUCUGGGGCCUGAGGCUGCAGAACAUUGCAGCAUUCAU GUCCCCACCCCAACCA (SEC ID nº 18)
hsa-mir-4431	UGGUUUGCGACUCUGAAAACUAGAAGGUUAUGACUGGGCA UUUCUCACCCAAUGCCCCAAUUAUGAACUUUCUAGUUGUCAGA GUCAUUAACCC (SEC ID nº 19)
hsa-mir-4484	GGGUUUCUCUGCCUUUUUUUCCAAUGAAAAUAACGAAACCU GUUAUUUCCCAUUGAGGGGGAAAAAGGCGGGAGAAGCCCCA (SEC ID nº 20)
hsa-mir-4487	ACUGUCCUUCAGCCAGAGCUGGCUGAAGGGCAGAAGGGGAACU GUCCUUCAGCCAGAGCUGGCUGAAGGGCAGA (SEC ID nº 21)
hsa-miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUUAACAC (SEC ID nº 22)
hsa-miR-466	AUACACAUAACACGCAACACACAU (SEC ID nº 23)
hsa-miR-4738-3p	UGAAACUGGAGCGCCUGGAGGA (SEC ID nº 24)
hsa-mir-4753	AUAUCUACACAAGGCCAAAGGAAGAGAACAGAUUAUCCACA GUACACUUGGCUGUUCUCUUUCUUUAGCCUUGUGUAGAUAU (SEC ID nº 25)
hsa-miR-4783-5p	GGCGCGCCAGCUCGCCGGGCU (SEC ID nº 26)
hsa-miR-4791	UGGAUAUGAUGACUGAAA (SEC ID nº 27)
hsa-miR-490-3p	CAACCUUGGAGACUCCAUGCUG (SEC ID nº 28)
hsa-miR-5010-3p	UUUUGUGUCUCCCAUUCGCCAG (SEC ID nº 29)
hsa-mir-5090	UCUGAGGUACCCGGGGCAGAUUGGUGUAGGGUGCAAAGCCUG CCCGCCCCCUAAGCCUUCUGCCCCAACUCCAGCCUGUCAGGA (SEC ID nº 30)
hsa-miR-5094	AAUCAGUGAAUGCCUUGAACCU (SEC ID nº 31)
hsa-miR-510-5p	UACUCAGGAGAGUGGCAUUCAC (SEC ID nº 32)
hsa-mir-532	CGACUUGCUUUUCUCCUCCAUGCCUUGAGUGUAGGACCGUU GGCAUCUUAUUUACCCUCCACACCCAAGGCUUGCAGAAGAG CGAGCCU (SEC ID nº 33)
hsa-miR-548aj-3p	UAAAAACUGCAAUUACUUUA (SEC ID nº 34)
hsa-miR-548u	CAAAGACUGCAAUUACUUUUGCG (SEC ID nº 35)
hsa-mir-601	UGCAUGAGUUCGUCUUGGUCUAGGAUUGUUGGAGGAGUCAG AAAAACUACCCAGGGAUCCUGAAGUCCUUUGGGUGGA (SEC ID nº 36)
hsa-mir-611	AAAAUGGUGAGAGCGUUGAGGGGAGUCCAGACGGAGAUGC GAGGACCCCUCCGGGUCUGACCCACA (SEC ID nº 37)
hsa-mir-6128	AAGAAGCUUGUAGAUUUUUUCUCCCUUACUAUCUAGAAUUAUA GGACUUCAGUCCAUGAUUUGGAAAAAUUACUGGAAUUGGAG UCAAAAAUAAUUUGAAAAUAGGAAU (SEC ID nº 38)
hsa-miR-628-5p	AUGCUGACAUUUUACUAGAGG (SEC ID nº 39)
hsa-miR-635	ACUUGGGCACUGAAACAAUGUCC (SEC ID nº 40)
hsa-miR-636	UGUGCUUGCUCGUCCCGCCGCA (SEC ID nº 41)
hsa-miR-663a	AGGCGGGGCGCCGCGGGACCGC (SEC ID nº 42)
hsa-miR-6730-3p	CCUGACACCCCAUCUGCCCUCA (SEC ID nº 43)

Tabla 1 (continuación)

Nombre de microARN/ARN pequeño	Secuencia de microARN
hsa-miR-6768-5p	CACACAGGAAAAGCGGGGCCUG (SEC ID nº 44)
hsa-miR-6865-3p	ACACCCUCUUUCCCUACCGCC (SEC ID nº 45)
hsa-miR-6894-5p	AGGAGGAUGGAGAGCUGGGCCAGA (SEC ID nº 46)
hsa-mir-762	GGCCCCGCUCCGGGUCUCGGCCCCGUACAGUCCGGCCGGCCAU GCUGGCGGGGCUUGGGCCGGGGCCGAGCCCGCGGCGGGGCC (SEC ID nº 47)
hsa-miR-8052	CGGGACUGUAGAGGGCAUGAGC (SEC ID nº 48)
hsa-mir-8072	GCGUCAAGAUGGCGGGGAGGUAGGCAGAGCAGGACGCCG CUGCUGCCGCCGCCACCGCCGCCUCCGCUCCAGUCGCC (SEC ID nº 49)
hsa-miR-8075	UGCUGAUGGCAGAUGUCGGGUCUG (SEC ID nº 50)
hsa-miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC (SEC ID nº 51)
hsa-miR-937-5p	GUGAGUCAGGGUGGGGCGUGG (SEC ID nº 52)
cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUACGCUUG (SEC ID nº 53)
scaRNA17	AGAGGCUUGGGCCGCCGAGCUGGACCCGGACCGUUUUGGU ACUGUACUGGGGGCAGGGCAGAGAGGG (SEC ID nº 54)
U6	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUAUACUAAAAUUGGAACGAUAC AGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAUGACACGAAA UUCGUGAAGCGUCCAUUUUU (SEC ID nº 55)

Ejemplo 2: verificación de los miARN maduros humanos mediante qPCR en cohortes de muestras de 8 pacientes de progresión rápida y 8 pacientes de progresión lenta.

El factor promedio de cambio para hsa-let7b-3p, hsa-miR-3613-3p y hsa-miR-6865-3p, hsa-pre-miR-532 y hsa-miR-663a, PrognomiR entre pacientes de EP de progresión rápida y de progresión lenta se muestra a continuación, en la Tabla 2, y se ilustra en la figura 1.

Tabla 2

PrognomiR	Factor de cambio	Significancia
hsa-let7b-3p	0,17	0,02
hsa-miR-3613-3p	0,53	0,01
hsa-miR-6865-3p	0,44	0,002
hsa-pre-miR-532	0,43	0,0005
hsa-miR-663a	0,46	0,01

Ejemplo 3

La medición de los niveles de una combinación de dos o más miARN en el suero de los pacientes puede ayudar a diferenciar claramente entre un paciente de EP de progresión potencialmente rápida y uno de progresión lenta. Se obtuvo una muestra de suero de la sangre extraída de los pacientes con sospecha de EP. Se utilizó el suero para el aislamiento y enriquecimiento del microARN total. A continuación, dicho ARN se sometió a ensayo mediante la utilización de qPCR para medir los niveles de dos o más cualesquiera de los 52 miARN indicados en el Ejemplo 1, o uno cualquiera de los cinco miARN indicados en el Ejemplo 2. Los niveles detectables de uno o más de los 52 miARN anteriormente indicados con un factor de cambio >1,2, o uno o más cualesquiera de dichos cinco miARN confirma la velocidad de progresión de los pacientes con EP. Si se desea, pueden utilizarse otros líquidos de muestra, entre ellos el plasma, sangre venosa o arterial, o muestras de LCR extraídas mediante punción lumbar. Dichas muestras de plasma, sangre o LCR se procesan tal como se ha comentado anteriormente respecto al suero, p.ej., para proporcionar una muestra para el procesamiento y evaluación fuera del cuerpo humano o animal. Debe entenderse que la medición de más de dos miARN en combinación o de un conjunto de combinaciones utilizada en una matriz de ensayo puede incrementar deseablemente la precisión de la predicción de la progresión de la EP. Tras el diagnóstico, a continuación, se comunica el resultado al paciente.

Tal como se ha comentado e ilustrado anteriormente, la detección de los miARN anteriormente indicados con un factor de cambio >1,2 puede utilizarse para diferenciar entre EP de progresión potencialmente rápida y la EP de progresión

potencialmente lenta en los pacientes afectados. Sin embargo, tal como entenderá fácilmente el experto ordinario en la materia, pueden utilizarse convenientemente otros umbrales según se desee con posible variación concomitante de la precisión, incluyendo los cambios de factor >1,0, 1,1, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 y 2,0. Además, se entenderá de manera similar que dichos umbrales variables de factor de cambio pueden utilizarse más convenientemente con miARN particulares sin afectar a la precisión.

Ejemplo 4

Debido a que puede utilizarse una combinación de miARN para predecir el pronóstico, puede ser recomendable someter a ensayo todos los candidatos a fin de eliminar cualquier variación basada en las cohortes. Se entiende que cualesquiera cantidades detectables de miARN relevante indicarán patología de EP. Sin embargo, el experto ordinario en la materia reconocerá que puede resultar clínicamente útil utilizar valores de muestras 'lentas' (8) vs. 'rápidas' (8) para fijar un umbral artificial para la determinación de la velocidad de progresión de la enfermedad. Pueden utilizarse niveles diferenciales de miARN para desarrollar kits de biomarcadores pronósticos que pueden ser utilizados por el clínico para estimar el pronóstico de la enfermedad, así como para enriquecer las cohortes de pacientes en los ensayos clínicos. En el presente estudio, se determinó la presencia y cuantificación del miARN de suero mediante qRT-PCR, que amplifica y cuantifica el ARN en cuestión. Alternativamente pueden utilizarse otras técnicas adecuadas que son conocidas del experto ordinario en la materia, incluyendo la utilización de secuencias antisentido marcadas y anticuerpos marcados. Los anticuerpos adecuados son preferentemente selectivos, en referencia a una reacción de unión entre dos moléculas que es típicamente más de 10 a 100 veces la asociación molecular de fondo bajo las condiciones de medición. De esta manera, bajo las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una secuencia de miARN particular, identificando de esta manera su presencia. La unión específica a un anticuerpo bajo dichas condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona para su especificidad para un miARN particular. Por ejemplo, los anticuerpos generados contra un miARN particular pueden seleccionarse mediante la substracción de los anticuerpos que reaccionan cruzadamente con otras moléculas. Puede utilizarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar los anticuerpos que son específicamente inmunorreactivos con un miARN particular, incluyendo los inmunoensayos ELISA de fase sólida (ver, p.ej., Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988), para una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica). Los métodos para determinar si dos moléculas interactúan específicamente se dan a conocer en dicha obra, y los métodos para determinar la afinidad y especificidad de unión son bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Harlow y 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" tal como se utiliza en la presente memoria comprende los anticuerpos naturales, así como los anticuerpos no naturales, incluyendo, por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla, los anticuerpos bifuncionales y humanizados quiméricos, así como los fragmentos de unión a antígeno de los mismos (p.ej., Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rIgG). Ver también Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Ver también, p.ej., Kuby, J., *Immunology*, 3a ed., W.H. Freeman & Co., New York (1998). Dichos naturales no naturales pueden construirse mediante la utilización de la síntesis peptídica en fase sólida; pueden producirse recombinantemente o pueden obtenerse mediante, por ejemplo, el cribado de bibliotecas combinatoriales que consisten en cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables, tal como se indica en Huse et al., *Science*, Vol. 246:1275-81, 1989. Dichos métodos y otros métodos de preparación de, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, con injertación de CDR, de cadena sencilla y bifuncionales son bien conocidos por el experto en la materia (Winter y Harris, *Immunol. Today*, vol. 14:243-46, 1993; Ward et al., *Nature*, vol. 341:544-46, 1989; Harlow y Lane, *supra*, 1988; Hilyard et al., *Protein Engineering: A practical approach* (IRL Press 1992); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2a ed. (Oxford University Press 1995). Los métodos para producir anticuerpos tanto monoclonales como policlonales a partir de secuencias de ARN identificadas son bien conocidos de la técnica.

Ejemplo 5

Muchas enfermedades neurodegenerativas están estrechamente relacionadas entre sí en lo que respecta a los síntomas, así como respecto a los marcadores patológicos. Los marcadores pronósticos circulantes para una enfermedad neurodegenerativa pueden resultar útiles para el diagnóstico/pronóstico de otra enfermedad. Un método para diagnosticar/pronosticar otras enfermedades neurodegenerativas como la demencia con cuerpos de Lewy (DCL), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Alzheimer (EA), atrofia multisistémica (AMS), degeneración corticobasal (DCB), parálisis supranuclear progresiva (PSP), también puede desarrollarse mediante la utilización de mediciones de miARN similares de los candidatos indicados anteriormente. Pueden desarrollarse kits específicos de enfermedad similares al mencionado en el párrafo [0024] con diversas combinaciones de los miARN indicados en [0018]

Ejemplo 6

Los miARN detectados en una o más combinaciones pueden regular varias proteínas en las células. Pueden identificarse nuevas dianas proteínas para la EP mediante la utilización de dichos microARN y sus combinaciones. La participación de dichas proteínas en la etiología de la EP puede establecerse adicionalmente para dirigirlas a la terapia.

Ejemplo 7

Se diseñarán moléculas pequeñas de ácidos nucleicos derivadas de los miARN indicados en [0018] para intervenir terapéuticamente con diana específicamente en genes en los cerebros de EP para conseguir un remedio completo o parcial.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Moller, Simon Geir Basak, Indranil Patil, Ketan Shirish Larsen, Jan Petter Alves, Guido W.

10

<120> Biomarcadores de microARN séricos circulantes y métodos de pronóstico de la enfermedad de Parkinson

<130> 02745.003000.PC

15

<140>

<141>

<150> US 62/521,797

<151> 2017-06-19

20

<160> 88

<170> PatentIn Ver. 2.0

25

<210> 1

<211> 22

<212> ARN

<213> Homo sapiens

30

<400> 1

UCACCGGGUG UAAAUACAGCU UG 22

<210> 2

<211> 79

<212> ARN

35

<213> Homo sapiens

<400> 2

CCCGGGCUGA GGUAGGAGGU UGUUAUAGUUG AGGAGGACAC CCAAGGAGAU CACUAUACGG 60

CCUCCUAGCU UUCCCAGG 79

40

<210> 3

<211> 23

<212> ARN

<213> Homo sapiens

45

<400> 3

CCUGCAGCGA CUUGAUGGCU UCC 23

<210> 4

<211> 111

50

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 4

CCACGGUCCU AGUUAAAAAG GCACAUUCCU AGACCCUGCC UCAGAACUAC UGAACAGAGU 60

CACUGGGUGU GGAGUCCAGG AAUCUGCAUU UUUACCCCUA UGCCCCCGC C 111

55

<210> 5

<211> 22

<212> ARN

<213> Homo sapiens

60

<400> 5

UCAAACUGA GGGGCAUUUU CU 22

	<210> 6		
	<211> 22		
	<212> ARN		
5	<213> Homo sapiens		
	<400> 6		
	GCUAUUUCAC GACACCAGGG UU	22	
10	<210> 7		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
15	<400> 7		
	CUCCUACAUA UUAGCAUUA CA	22	
20	<210> 8		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 8		
	CCAAUAUUAC UGUGCUGCUU UA	22	
25	<210> 9		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
30	<400> 9		
	AACAUUCAUU GCUGUCGGUG GGU	23	
35	<210> 10		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
40	<400> 10		
	CUAUAUAUCA AACAUUUCC U	21	
45	<210> 11		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 11		
	AUGACCUAUG AAUUGACAGA C	21	
50	<210> 12		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
55	<400> 12		
	ACCUGGCAUA CAAUGUAGAU UU	22	
60	<210> 13		
	<211> 24		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 13		
	AGCGCGGGCU GAGCGCUGCC AGUC	24	
65	<210> 14		
	<211> 21		

ES 2 890 949 T3

	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 14 AUCCCCAGAU ACAAUGGACA A	21	
	<210> 15		
	<211> 22		
10	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 15 UGGUUUACCG UCCCACAUAC AU	22	
15	<210> 16		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 16 CUGACUGAAU AGGUAGGGUC AUU	23	
	<210> 17		
25	<211> 86		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 17 GAGGGAAAGC AGGCCAACCU CGAGGAUCUC CCCAGCCUUG GCGUUCAGGU GCUGAGGAGA UCGUCGAGGU UGGCCUGCUU CCCUC	60 86	
30	<210> 18		
	<211> 85		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 18 GGACCUGCCC UGGGCUUUCU AGUCUCAGCU CUCCUCCAGC UCAGCUGGUC AGGAGAGCUG AGACUAGAAA GCCCAGGGCA GGUUC	60 85	
	<210> 19		
40	<211> 81		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 19 ACCUGCCCUG GGCUUUCUAG UCUCAGCUCU CCUGACCAGC UGAGCUGGAG GAGAGCUGAG ACUAGAAAGC CCAGGGCAGG U	60 81	
	<210> 20		
	<211> 85		
	<212> ARN		
50	<213> Homo sapiens		
	<400> 20 GGCGCCUCCU GCUCUGCUGU GCCGCCAGGG CCUCCCCUAG CGCGCCUUCU GGAGAGGCUU UGUGCGGAUA CGGGGCUGGA GGCCU	60 85	
55	<210> 21		
	<211> 79		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
60	<400> 21 AAUUAUCCC UCUCUUUCUA GUUCUCCUA GAGUGAGGAA AAGCUGGGUU GAGAGGGCAA ACAAAUUAAAC UAAUUAUU	60 79	

ES 2 890 949 T3

5	<210> 22 <211> 23 <212> ARN <213> Homo sapiens		
	<400> 22 UCAAGAGCAA UAACGAAAAA UGU	23	
10	<210> 23 <211> 98 <212> ARN <213> Homo sapiens		
15	<400> 23 ACCCAAACCC UAGGUCUGCU GACUCCUAGU CCAGGGCUCG UGAUGGCUGG UGGGCCCCUGA ACGAGGGGUC UGGAGGCCUG GGUUUGAAUA UCGACAGC	60 98	
20	<210> 24 <211> 23 <212> ARN <213> Homo sapiens		
25	<400> 24 UAGGCAGUGU CAUUAGCUGA UUG	23	
30	<210> 25 <211> 24 <212> ARN <213> Homo sapiens		
	<400> 25 ACAAAAAAAAA AAGCCCAACC CUUC	24	
35	<210> 26 <211> 92 <212> ARN <213> Homo sapiens		
40	<400> 26 UGUCACUCCG CCAGCAUCAU GAAGUGCACU CAUGAUAUGU UUGCCCCAUC AGCGUGUCAC GAGGGCAUUU CAUGAUGCAG GCGGGGUUGG CA	60 92	
45	<210> 27 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens		
	<400> 27 CUGGGAGGUG UGAUAUCGUG GU	22	
50	<210> 28 <211> 19 <212> ARN <213> Homo sapiens		
55	<400> 28 ACUGGACUUG GAGGCAGAA	19	
60	<210> 29 <211> 111 <212> ARN <213> Homo sapiens		

ES 2 890 949 T3

<400> 29
 CUUUUGCUGU CAGUUUUUCU GUUGCUUGUC UUGGUUUUAU GCCUUUAUA UCAAGGCACA 60
 UAAAAGGCAU AAAACCAAGA CAAGCAACAA AAAAAGGAU GAUCACAGAA G 111

5 <210> 30
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 30
 UCAGGUGUGG AACUGAGGC AG 22

15 <210> 31
 <211> 17
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 UGGAGAGAAA GGCAGUA 17

20 <210> 32
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 32
 AGCCCCUGG CCCCAAACCC 20

30 <210> 33
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

35 <400> 33
 UUGCACUUGU CUCAGUGA 18

40 <210> 34
 <211> 94
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 UGGUUUGCGA CUCUGAAAAC UAGAAGGUUU AUGACUGGGC AUUUCUCACC CAAUGCCCAA 60
 UAUUGAACUU UCUAGUUGUC AGAGUCAUUA ACCC 94

45 <210> 35
 <211> 70
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 35
 UUCUGGCAGA UUGUUUCUUU UGCCGUGCAA GUUUAAGUUU UUGCACGGCA AAAGAAACAA 60
 UCCAGAGGGU 70

55 <210> 36
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 ACUGUCCUUC AGCCAGAGCU GGCUGAAGGG CAGAAGGGAA CUGUCCUUA GCCAGAGCUG 60
 GCUGAAGGGC AGA 73

60 <210> 37
 <211> 22

	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 37 UUUUGCAAUA UGUUCCUGAA UA	22	
	<210> 38		
	<211> 21		
10	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 38 GCAGUCCAUG GGCAUAUACA C	21	
15	<210> 39		
	<211> 81		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 39 GGCUGCUUCU CGCCUCUGUC CAGCUGUGUG GCCUUGGACA AGCCUCUUGG UUACACAGCU GGACAGAGGC ACGAAACAGC C	60 81	
	<210> 40		
	<211> 26		
25	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 40 CCCAGGGCUU GGAGUGGGGC AAGGUU	26	
30	<210> 41		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 41 AGCAAGGCGG CAUCUCUCUG AU	22	
	<210> 42		
40	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 42 UGCGGGGACA GGCCAGGGCA UC	22	
	<210> 43		
	<211> 22		
	<212> ARN		
50	<213> Homo sapiens		
	<400> 43 UCUGCCAUCC UCCCUCUUUU AC	22	
55	<210> 44		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
60	<400> 44 AGCAGACUUG ACCUACAAUU A	21	
	<210> 45		
	<211> 80		

ES 2 890 949 T3

	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 45		
5	AAUGAAGGAU UACGGACCAG CUAAGGGAGG CAUUAGGAUC CUUAUUCUUG CCUCCCUUAG	60	
	UUGGUCCCUA AUCCUUCGUU	80	
	<210> 46		
	<211> 18		
10	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 46		
	UGGAUAUGAU GACUGAAA	18	
15	<210> 47		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 47		
	GACAGAGUGC CACUUACUGA A	21	
	<210> 48		
	<211> 22		
25	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 48		
30	AUGCACCUGG GCAAGGAUUC UG	22	
	<210> 49		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 49		
	UGAUUGGUAC GUCUGUGGGU AG	22	
	<210> 50		
40	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 50		
45	UACUCAGGAG AGUGGCAAUC AC	22	
	<210> 51		
	<211> 21		
	<212> ARN		
50	<213> Homo sapiens		
	<400> 51		
	CUCCAGAGGG AAGUACUUUC U	21	
55	<210> 52		
	<211> 90		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
60	<400> 52		
	UCCCAUGCUG UGACCCUCUA GAGGAAGCAC UUUCUGUUUG UUGUCUGAGA AAAAACAAAG	60	
	UGCUUCCCUU UAGAGUGUUA CCGUUUGGGA	90	
	<210> 53		
	<211> 88		

ES 2 890 949 T3

	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 53		
5	UCCCAUGCUG UGACCCUCUA GAGGAAGCAC UUUCUGUUUG UUGUCUGAGA AAAAACAAG	60	
	UGCUUCCCUU UAGAGUUACU GUUUGGGA	88	
	<210> 54		
	<211> 91		
10	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 54		
	CGACUUGCUU UCUCUCCUCC AUGCCUUGAG UGUAGGACCG UUGGCAUCUU AAUUACCCUC	60	
	CCACACCCAA GGCUUGCAGA AGAGCGAGCC U	91	
15	<210> 55		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 55		
	AAAAACCACA AUUACUUUUG CACCA	25	
	<210> 56		
25	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 56		
30	CAAAAACCGG CAAUACUUU UG	22	
	<210> 57		
	<211> 21		
	<212> ARN		
35	<213> Homo sapiens		
	<400> 57		
	CAAAAACUGC AAUACUUUC A	21	
40	<210> 58		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
45	<400> 58		
	AAAGGUAAUU GUGGUUUCUG C	21	
	<210> 59		
	<211> 21		
	<212> ARN		
50	<213> Homo sapiens		
	<400> 59		
	UAAAAACUGC AAUACUUUU A	21	
55	<210> 60		
	<211> 19		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
60	<400> 60		
	AAAAACCACA AUUACUUUU	19	
	<210> 61		
	<211> 54		

ES 2 890 949 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 61
 AAAAGUAAUU GCGGUUUUUG CUAUUGGUUU UAAUGGCAGU UACUUUUGCA CCAG 54

10 <210> 62
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 AAAAGUACUU GCGGAUUUUG CU 22

15 <210> 63
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 63
 AAAAACCACA AUUACUUUUG CACCA 25

25 <210> 64
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 64
 UAAAAACUGC AAUACUUUC 20

35 <210> 65
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 65
GCCUAAACUA UUAGGUUGGU GCAAAAGUAA UCACUGUUUU UGCCAUUACU CUCAGUGGCA 60
AAAACCGUGA UUACUUUUGC ACCAACCUGA UAACACCUUC ACUGUGGGGG 110

40 <210> 66
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

45 <400> 66
CUUCAUCCAC CAGUCCUCCA GGAACAUCAA GGAUCUAAA CUUUGCCAGA GCUACAAAGG 60
CAAAGUUUAA GAUCCUUGAA GUUCCUGGGG GAACCAU 97

50 <210> 67
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 67
 CACACACUGC AAUACUUUU GC 22

55 <210> 68
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 68
 AAACUACUGA AAUCAAAGA U 21

<210> 69
 <211> 95

ES 2 890 949 T3

	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 69		
5	GACACCACAU GCUCCUCCAG GCCUGCCUGC CCUCCAGGUC AUGUCCAGU GUCCCACAGA	60	
	UGCAGCACCA CGGCCCAGGC GGCAUUGGUG UCACC	95	
	<210> 70		
	<211> 97		
10	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 70		
	CCACCACGGU GCUGGCACCA GGGCCUCUGC CCCGUAGGAC ACCGAGGCUU AUGAAUAGGA	60	
	GCAGUGCCCG CCAAGGCGCC GGCACCAUCU UGGUGAU	97	
15	<210> 71		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 71		
	UGGGAAAGAG AAAGAACAAG UA	22	
	<210> 72		
25	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 72		
30	UCGGGCCUGG GGUUGGGGGA GC	22	
	<210> 73		
	<211> 59		
	<212> ARN		
35	<213> Homo sapiens		
	<400> 73		
	CGGGCUCUGG GUGCAGUGGG GGUUCCCACG CCGCGGCAAC CACCACUGUC UCUCCCCAG	59	
40	<210> 74		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
45	<400> 74		
	UAGGGGUGGG GGAAUUCAGG GGUGU	25	
	<210> 75		
	<211> 20		
50	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 75		
	UCCCCAACCC CUGCCCGCAG	20	
55	<210> 76		
	<211> 61		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
60	<400> 76		
	GUGCGGAACG CUGGCCGGGG CGGGAGGGGA AGGGACGCCC GGCCGGAACG CCGCACUCAC	60	
	G	61	

ES 2 890 949 T3

<210> 77
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 77
 ACACCCUCUU UCCCUACCGC C 21
 <210> 78
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 78
 CAGAGGGAAU ACAGAGGGCA AU 22
 <210> 79
 <211> 67
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 79
 UGGAGCUGUG UGCAGGGCCA GCGCGGAGCC CGAGCAGCCG CGGUGAAGCG CCUGUGCUCU 60
 GCCGAGA 67
 <210> 80
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 80
 UGUGACCCUA GAAUAAUUAC 20
 <210> 81
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 81
 CGGGACUGUA GAGGGCAUGA GC 22
 <210> 82
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 82
 CCUUGCUGAU GGCAGAUGUC GGAUCUGCCU CGCUUAUACG UGCCCUGCU GAUGGCAGAU 60
 GUCGGGUCUG CCUCGCUUUAU 80
 <210> 83
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 83
 AAGGAGCACU CACUCCAAUU UCCCUGGACU GGGGGCAGGC UGCCACCUCC UGGGGACAGG 60
 GGAUUGGGGC AGGAUGUUC AG 82
 <210> 84
 <211> 77
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 45
 50
 55
 60

ES 2 890 949 T3

<400> 84
 UGCAAUGCCC UACUCAGAAA GGUGCCAUUU AUGUAGAUUU UAUGUCACUG GCUCCUUUCU 60
 GGGUAGAGCA AGGCUCA 77

5 <210> 85
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 85
 ACAGUAGAGG GAGGAAUCGC AG 22

15 <210> 86
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 86
 GUGAGUCAGG GUGGGGCUGG 20

25 <210> 87
 <211> 69
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 87
 AGAGGCUUGG GCCGCCGAGC UGGACCCGGA CCGGUUUUGG GUACUGUACU GGGGGCAGGG 60
 CAGAGAGGG 69

35 <210> 88
 <211> 106
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 88
 GUGCUCGCUU CGGCAGCACA UAUACUAAAA UUGGAACGAU ACAGAGAAGA UUAGCAUGGC 60
 CCCUGCGCAA GGAUGACACG CAAAUUCGUG AAGCGUCCA UAUUUU 106

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación de la velocidad de progresión de la enfermedad de Parkinson en un paciente humano, que comprende las etapas de:

en una muestra que ha sido obtenida de dicho paciente humano, determinar el nivel de expresión de un miARN según la SEC ID nº 1 dentro de dicha muestra, y correlacionar el nivel de expresión del miARN determinado a fin de determinar la velocidad de progresión de la enfermedad de Parkinson en el paciente.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es suero, plasma o sangre completa.

3. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión de dicho miARN se determina mediante la utilización de qRT-PCR.

4. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión de dicho miARN se determina mediante la utilización de secuencias de nucleótidos antisentido.

5. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión de dicho miARN se determina mediante la utilización de anticuerpos marcados.

6. Método según la reivindicación 5, en el que los anticuerpos marcados son monoclonales.

7. Método según la reivindicación 1, en el que se determina la expresión relativa de dichos miARN mediante la utilización del perfilado de micromatrices.

8. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión relativa de dichos miARN se determina mediante la utilización de secuenciación NGS de alto rendimiento.

9. Método según la reivindicación 1, en el que se determina la expresión relativa de dichos miARN según por lo menos las SEC ID nº 1 y nº 12.

10. Método según la reivindicación 1, en el que se determina la expresión relativa de dichos miARN según por lo menos las SEC ID nº 1 y nº 33.

11. Método según la reivindicación 1, en el que se determina la expresión relativa de dichos miARN según por lo menos las SEC ID nº 1 y nº 42.

12. Método según la reivindicación 1, en el que se determina la expresión relativa de dichos miARN según por lo menos las SEC ID nº 1 y nº 45.

13. Método según la reivindicación 1, en el que se determina la expresión relativa de miARN según:

- (a) por lo menos las SEC ID nº 1, nº 12 y nº 33;
- (b) por lo menos las SEC ID nº 1, nº 12 y nº 42;
- (c) por lo menos las SEC ID nº 1, nº 12 y nº 45;
- (d) por lo menos las SEC ID nº 1, nº 33 y nº 42;
- (e) por lo menos las SEC ID nº 1, nº 33 y nº 45, o
- (f) por lo menos las SEC ID nº 1, nº 42 y nº 45.

14. Método según la reivindicación 1, en el que se determina la expresión relativa de miARN según:

- (a) por lo menos las SEC ID nº 1, nº 12, nº 33 y nº 42;
- (b) por lo menos las SEC ID nº 1, nº 12, nº 33 y nº 45;
- (c) por lo menos las SEC ID nº 1, nº 12, nº 42 y nº 45, o
- (d) por lo menos las SEC ID nº 1, nº 33, nº 42 y nº 45.

15. Método según la reivindicación 1, en el que se determina la expresión relativa de dichos miARN según por lo menos las SEC ID nº 1, nº 12, nº 33, nº 42 y nº 45.

Patente pronóstica (EP)

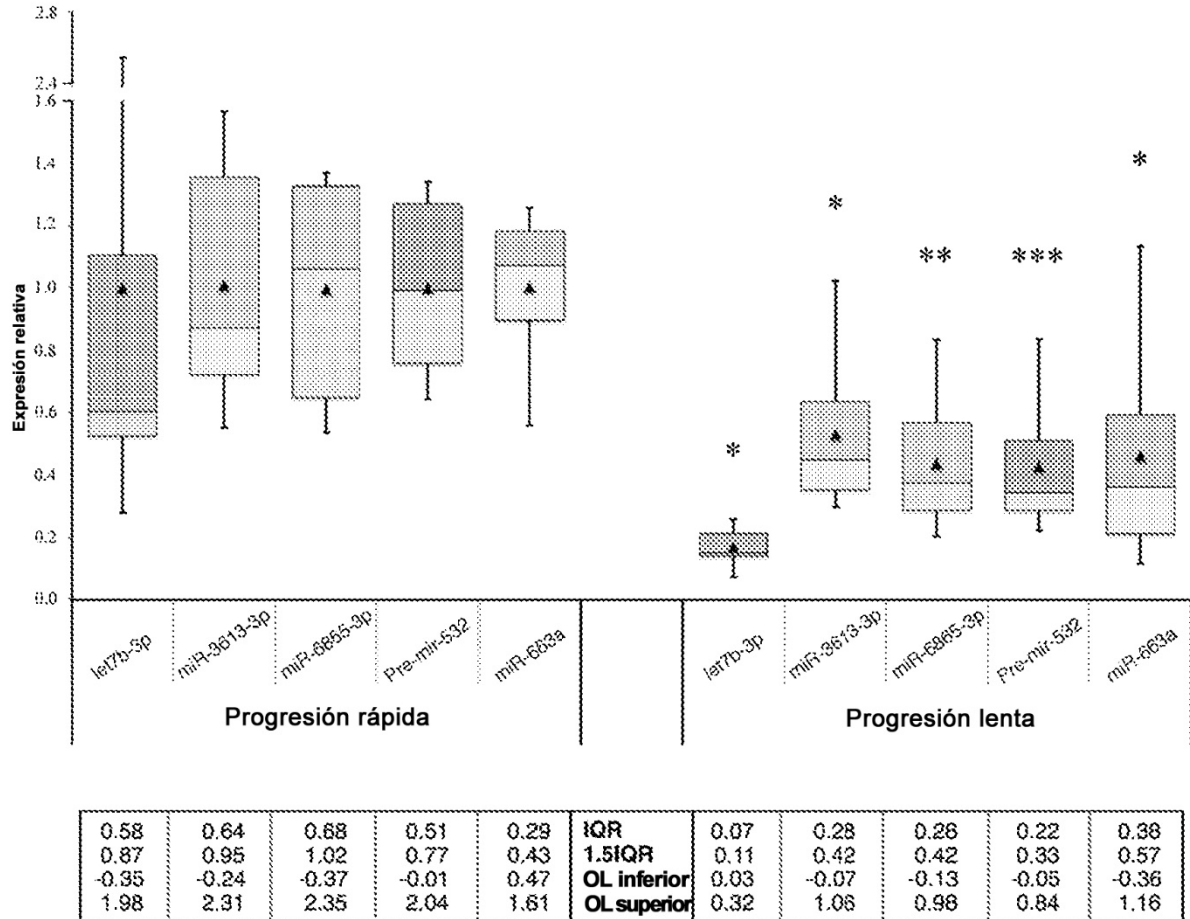


Figura 1. Los valores de la mediana para la expresión relativa de let7b-3p, miR-3613-ep, miR-6865-3p, pre-mir-532 y miR663a se representan gráficamente como líneas, en donde cada caja muestra los cuartiles internos como medida de la distribución, con bigotes. Los resultados que se muestran son de verificación derivada mediante qRT-PCR realizada en 8 pacientes con EP de progresión rápida y 8 pacientes de EP de progresión lenta. Se muestran barras de color diferente para let7b-3p (azul), miR-3613-3p (naranja), miR-6865-3p (verde), pre-mir-532 (violeta) y miR663a (turquesa). Las medias de cada grupo se denotan como triángulos en el gráfico. La significancia se indica como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.