

(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
20 de agosto de 2020 (20.08.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/165484 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

G01N 33/48 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2020/070107

(22) Fecha de presentación internacional:

15 de febrero de 2020 (15.02.2020)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201930123 15 de febrero de 2019 (15.02.2019) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA** [ES/ES]; Avda. Medina Azahara, 5, 14005 Córdoba (ES). **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **LÓPEZ PEDRERA, Rosario**; Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **COLLANTES ESTÉVEZ, Eduardo**; Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **ORTEGA CASTRO, Rafaela**; Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **LUQUE HUERTAS, Raúl Miguel**; Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **PÉREZ SÁNCHEZ, Carlos**; Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **CASTAÑO FUENTES, Justo P.**; Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **IBAÑEZ COSTA, Alejandro**; Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **PEDRAZA ARÉVALO, Sergio**; Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **DEL RIO MORENO, Mercedes**; Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **BARBARROJA PUERTO, Nuria**; Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (ES). **JIMÉNEZ GÓMEZ, Yolanda**; Edificio IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, 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))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING DATA USEFUL FOR THE DIAGNOSIS, STRATIFICATION AND/OR FOLLOW-UP OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

(54) Título: MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO, ESTRATIFICACIÓN Y/O SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining data useful for the diagnosis, stratification and/or follow-up of patients with rheumatoid arthritis. Kit or device and uses thereof.

(57) Resumen: Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, estratificación y/o seguimiento de pacientes con artritis reumatoide. Kit o dispositivo y usos.



WO 2020/165484 A1

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, estratificación y/o seguimiento de pacientes con artritis reumatoide.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina de precisión, y se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, estratificación y/o seguimiento de pacientes con artritis reumatoide.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y sistémica de etiología desconocida, que se caracteriza por la inflamación crónica de múltiples articulaciones y vainas tendinosas de la membrana sinovial, provocando un deterioro progresivo. Aunque la sinovial es el foco principal de la lesión, en la AR se producen además cambios sistémicos responsables de manifestaciones extra-articulares tales como vasculitis, glomerulonefritis, pericarditis, pleuritis y escleritis. Asimismo, los pacientes que padecen AR pueden sufrir comorbilidades (enfermedad cardiovascular, infecciones, neoplasias, osteoporosis y enfermedad gastrointestinal) con mayor frecuencia que la población general, lo que conduce a un acortamiento de la esperanza de vida de entre 5 y 10 años. En España se estima que afecta al 0.5% de la población mayor de 20 años, siendo más frecuente en mujeres y con un pico de incidencia entre los 40 y los 60 años.

La AR se considera una enfermedad genética compleja, en la que diversos genes y factores ambientales, étnicos, geográficos y nutricionales interaccionan para causar los eventos patológicos. El inicio de la enfermedad parece ser desencadenado por factores ambientales, en base a una predisposición genética combinada con la activación repetida del sistema inmune innato y adaptativo, que conducen a la pérdida de la tolerancia inmunológica, la presentación aberrante de auto-antígenos y la activación de linfocitos B y T, monocitos y células dendríticas, los cuales promueven una respuesta inflamatoria que culmina en un proceso de hiperplasia sinovial, destrucción ósea y afectación multisistémica.

La mayoría de los pacientes presentan en el suero auto-anticuerpos como el factor reumatoide (FR) y los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP), lo que le confiere carácter autoinmune. Aunque el FR también puede encontrarse en otras enfermedades autoinmunes y condiciones inmunológicas, así como en diversos estados inflamatorios, la presencia de anticuerpos anti-CCP es altamente específica, evidencia de que la autoinmunidad frente a proteínas citrulinadas es un factor clave en la patogénesis de la AR. Sin embargo,

aproximadamente un 20% de los pacientes no presentan auto-anticuerpos, lo que sugiere una heterogeneidad etiológica de la enfermedad.

Los progresos desarrollados en las técnicas de Biología Molecular han identificado nuevas rutas,
5 independientes de la expresión alterada de citoquinas inflamatorias, que también contribuyen a la patogenia de la AR y para las que las estrategias terapéuticas anti-inflamatorias o inmunosupresoras disponibles no son efectivas. El análisis genómico (estudios de microarrays) ha permitido identificar firmas específicas de genes en diferentes enfermedades autoinmunes y obtener información sobre los mecanismos subyacentes al desarrollo de comorbilidades
10 asociadas. Así, se han identificado los perfiles génicos de células mononucleadas de sangre periférica y linfocitos T y B de pacientes AR y analizado su relevancia como predictores de la evolución clínica y respuesta terapéutica. A pesar de estos descubrimientos, la información generada por los estudios de expresión génica es incompleta y presenta ciertas limitaciones, ligadas a la falta de linealidad entre la abundancia de expresión del genoma y su traducción en
15 niveles reales de expresión proteica. Durante la transcripción génica, el proceso de eliminación de secuencias sin sentido (intrones) y de empalme de las secuencias codificantes (exones) recibe el nombre de *splicing*. Para llevar a cabo este proceso, existe en el núcleo celular una maquinaria molecular muy compleja: el espliceosoma. El *splicing* puede originar distintos mensajes genéticos (ARNm) a partir de una única secuencia genómica (ADN) en un proceso
20 denominado *splicing* alternativo (AS, del inglés *alternative splicing*), el cual afecta al control cuantitativo de la expresión génica y la diversificación funcional de las proteínas. Su presencia e influencia en la evolución clínica y la respuesta terapéutica se ha demostrado en patologías tumorales e inflamatorias, aunque no se ha caracterizado en el ámbito de la AR.

25 La búsqueda de biomarcadores pronósticos que puedan predecir el curso de la enfermedad y proporcionen información sobre la posible respuesta a tratamiento es un reto importante, dado que pueden ayudar al clínico a predecir la evolución de artritis indiferenciadas a AR, o a pronosticar la severidad de la AR, la cual presenta gran variabilidad. Podría asimismo ayudar a identificar subgrupos de pacientes con mayor riesgo de complicaciones, evolución más rápida o
30 peor respuesta al tratamiento, lo cual permitiría realizar intervenciones más precoces, tratamiento más intensivo o identificar grupos de pacientes que pueden responder mejor a una terapia que otra. Todo ello representaría un paso esencial en el manejo de los pacientes con AR, sobre todo en pacientes de reciente inicio, permitiendo crear un modelo de medicina personalizada orientada a un mejor manejo del enfermo junto a una mejora en los costes y el análisis del riesgo-
35 beneficio de los fármacos, consiguiendo la más alta tasa de respuesta con la mínima toxicidad.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Niveles de expresión de 8 elementos del *splicing* con alteración específica común y diferencialmente expresados en los 3 subtipos de leucocitos estudiados: monocitos, linfocitos y neutrófilos, de pacientes AR (AR, n=74; en naranja) en relación con donantes sanos (DS, n=29; en blanco). La expresión se analizó mediante un array de qPCR. Los datos representan la mediana $\pm$ rango intercuartílico de los niveles de expresión ajustado por un factor de normalización. Las diferencias se han evaluado mediante la prueba U de Mann-Whitney (* $p < 0,05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$)

Figura 2. Modelos logísticos para diagnóstico de pacientes AR. **A.** Valores de especificidad, sensibilidad y punto de corte de las curvas ROC; **B.** Curvas ROC, indicando área bajo la curva (AUC) y significación estadística (p value); **C.** Valores de β para cada valor de x_i , y valor de la constante β_0 en los 3 subtipos de leucocitos estudiados; **D.** Fórmula del modelo logístico propuesto.

Figura 3. Modelos logísticos para la identificación de pacientes AR con alta actividad de la enfermedad. **A.** Valores de especificidad, sensibilidad y punto de corte de las curvas ROC; **B.** Curvas ROC, indicando área bajo la curva (AUC) y significación estadística (p value); **C.** Valores de β para cada valor de x_i , y valor de la constante β_0 en los 3 subtipos de leucocitos estudiados; **D.** Fórmula del modelo logístico propuesto.

Figura 4. Modelos logísticos para la identificación de pacientes AR con placas de ateroma. **A.** Valores de especificidad, sensibilidad y punto de corte de las curvas ROC; **B.** Curvas ROC, indicando área bajo la curva (AUC) y significación estadística (p value); **C.** Valores de β para cada valor de x_i , y valor de la constante β_0 en los 3 subtipos de leucocitos estudiados; **D.** Fórmula del modelo logístico propuesto.

Figura 5. Modelos logísticos para la identificación de pacientes AR con afectación radiológica. **A.** Valores de especificidad, sensibilidad y punto de corte de las curvas ROC; **B.** Curvas ROC, indicando área bajo la curva (AUC) y significación estadística (p value); **C.** Valores de β para cada valor de x_i , y valor de la constante β_0 en los 3 subtipos de leucocitos estudiados; **D.** Fórmula del modelo logístico propuesto.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención supone un complemento al **diagnóstico, estratificación y/o seguimiento** de pacientes con AR. La creación de los modelos de evaluación de los biomarcadores aquí propuestos permite: 1) **discriminar entre individuos sanos y pacientes** AR con elevada sensibilidad y especificidad, 2) **estratificar clínicamente los pacientes** en base a la actividad de la enfermedad, daño radiológico y comorbilidades asociadas como la enfermedad cardiovascular; y 3) **facilitar el seguimiento clínico de estos pacientes**, contribuyendo al desarrollo de una medicina personalizada.

La presente invención propone la **evaluación estandarizada de un panel de biomarcadores**, en este caso relacionados con la maquinaria de *splicing*, en leucocitos de pacientes con AR. Esta información permitiría, por ejemplo, el desarrollo de un chip o array para la estratificación de pacientes en diversos grupos de riesgo y la definición de sus necesidades específicas de seguimiento clínico y manejo terapéutico.

La desregulación del proceso de corte y empalme de moléculas de ARN mensajeros, o *splicing*, está emergiendo como un sello distintivo en diversas patologías. En la presente invención se realiza el análisis de la maquinaria de *splicing*, o espliceosoma, y los factores de *splicing* asociados en enfermedades autoinmunes y reumatológicas.

El objetivo de la presente invención ha sido la identificación en distintos subtipos de leucocitos (monocitos, linfocitos y neutrófilos) de pacientes AR, de las alteraciones presentes en el espliceosoma y los factores responsables del *splicing*, así como su influencia en la actividad de la enfermedad y sus perfiles inflamatorio y aterotrombótico.

Los autores de la presente invención han evaluado, utilizando un qPCR-array microfluídico, un conjunto de 45 elementos constituyentes del sistema de *splicing*, seleccionados en base a su papel -previamente demostrado- en la fisiopatología de numerosas enfermedades tumorales e inflamatorias. Los análisis se han llevado a cabo en ARN total purificado a partir de monocitos, linfocitos y neutrófilos procedentes de 74 pacientes con AR y 29 donantes sanos, obtenidos utilizando un sistema de selección inmunomagnética positiva. Se llevó a cabo, de forma paralela, un análisis extensivo de marcadores clínicos y serológicos de la enfermedad (Tabla 1).

Los resultados del estudio han demostrado la presencia de una alteración específica y significativa en varios componentes del espliceosoma en los distintos subtipos leucocitarios analizados en pacientes AR en relación a los donantes sanos. Específicamente, se encontraron significativamente alterados en pacientes AR los niveles de expresión de los siguientes componentes del espliceosoma:

Monocitos.- *TCERG1, ESRP1, RBM17, RBM3, RBM45, KHDRS1, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF9, SRSF10, TIA1, TRA2A, SNRNP70, RNU12, U2AF1, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200, RNU6-1.*

5 Linfocitos.- *TCERG1, ESRP2, NOVA1, PRPF8, PTBP1, RBM17, RBM3, KHDRS1, SF3Btv1, SRSF4, SRSF6, SRSF10, TIA1, SNRNP70, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200.*

Neutrófilos.- *CELF1, FBP11, NOVA1, PRPF8, PTBP1, RAVR1, RBM17, RBM22, RBM3, KHDRS1, SF3BTV1, SF3BTV2, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF9, SRSF10, TIA1,*
 10 *TRA2A, TRA2B, SNRNP70, RNU11, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200, RNU6-1.*

Sorprendentemente, se ha observado una disminución generalizada en dichos componentes del espliceosoma y los factores de *splicing* estudiados, salvo un incremento puntual de algunos elementos de la maquinaria, específicamente relacionados con la regulación de la inducción de
 15 un *splicing* alternativo (U4atac). Se ha identificado asimismo una firma de 8 elementos integrantes de la maquinaria de *splicing* con idéntico patrón de alteración en los tres subtipos leucocitarios analizados (*RBM17, RBM3, KHDRS1, SRSF10, SNRNP70, UA2F2, RNU4ATAC* y/o *SNRNP200*) (Figura 1).

Dichas alteraciones se han encontrado asociadas con diversos aspectos fisiopatológicos de la
 20 enfermedad. Más específicamente, la firma de 8 elementos integrantes de la maquinaria de *splicing* con idéntico patrón de alteración en los tres subtipos leucocitarios analizados, nos ha permitido crear un modelo para discriminar entre individuos sanos y pacientes AR (Figura 2), identificar pacientes con alta actividad de la enfermedad (analizada utilizando el score DAS28) (Figura 3), presencia de placas de ateroma (como marcador de aterosclerosis) (Figura 4) y
 25 afectación radiológica (Figura 5). Mediante dichos modelos hemos observado, en análisis utilizando curvas ROC (*receiver operator characteristics*), un área bajo la curva en todos los casos superior al 70%, con alta especificidad y sensibilidad.

La alteración observada de distintos componentes del sistema de *splicing* en células circulantes
 30 del sistema inmune de estos pacientes podría asociarse a la generación de diferentes isoformas proteicas de carácter patológico que podrían contribuir al desarrollo y la progresión de la AR.

La evaluación de estos componentes supone la identificación de biomarcadores novedosos para la tipificación de la enfermedad con un potencial de explotación industrial, de modo que, mediante
 35 el análisis en sangre total de estos factores, sería posible identificar pacientes AR con los citados criterios de clasificación clínica sin necesidad de realizar pruebas ecográficas o radiológicas complementarias.

Además, la regulación de la expresión o función de estos factores representa una nueva diana terapéutica específica para la administración de nuevos tratamientos y/o fármacos ya existentes, usados en spliceopatías, que ejercen su acción sobre el spliceosoma y representan por lo tanto un potencial tratamiento alternativo o complementario en esta patología.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de los niveles de expresión de *TCERG1*, *ESRP1*, *RBM17*, *RBM3*, *RBM45*, *KHDRS1*, *SRSF3*, *SRSF4*, *SRSF5*, *SRSF6*, *SRSF9*, *SRSF10*, *TIA1*, *TRA2A*, *SNRNP70*, *RNU12*, *U2AF1*, *U2AF2*, *RNU4ATAC*, *SNRNP200*, *RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones en monocitos, de *TCERG1*, *ESRP2*, *NOVA1*, *PRPF8*, *PTBP1*, *RBM17*, *RBM3*, *KHDRS1*, *SF3B1*, *SRSF4*, *SRSF6*, *SRSF10*, *TIA1*, *SNRNP70*, *U2AF2*, *RNU4ATAC*, *SNRNP200*, o cualquiera de sus combinaciones en linfocitos, y de *CELF1*, *FBP11*, *NOVA1*, *PRPF8*, *PTBP1*, *RAVER1*, *RBM17*, *RBM22*, *RBM3*, *KHDRS1*, *SF3B1*, *SF3B2*, *SRSF2*, *SRSF3*, *SRSF4*, *SRSF5*, *SRSF9*, *SRSF10*, *TIA1*, *TRA2A*, *TRA2B*, *SNRNP70*, *RNU11*, *U2AF2*, *RNU4ATAC*, *SNRNP200*, *RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones, en neutrófilos, para la detección, diagnóstico, pronóstico, clasificación y seguimiento de pacientes que padecen una enfermedad autoinmune, preferiblemente donde la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide.

El uso de dichos genes y/o proteínas puede ser simultáneo o puede elegirse cualquiera de los genes y/o proteínas o cualquiera de sus combinaciones. La determinación de los niveles de expresión de combinaciones de varios biomarcadores puede permitir mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico, pronóstico, clasificación y seguimiento de pacientes que padecen una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis reumatoide.

Descripción de los biomarcadores de la invención

A continuación, en la Tabla 2, se describen las características de los biomarcadores empleados en la invención. Se numera la secuencia del amplicón, no de los primers.

SEQ ID N°	Gen (alias)	Nombre	Secuencia de primer Sentido (Forward, Fw)	Secuencia de primer Antisentido (Reverse, Rv)	Tamaño	GenBank n°	Posición
1	TCERG1 (CA150)	Transcript Elongation Regulator 1	GAGGAGCCCAAA GAAGAGGA	CACCAAGTCCAAACGAC ACAC	112	NM_006706.3 NM_001040006.1	Fw 1550; Rv 1661 Fw 1487; Rv 1598
		Secuencia amplificada / amplicón GAGGAGCCCAAAGAAGAGGAGATGACTGAAGAAGAAAAGGCTGCCAGAAAGGCCAGTTGCTACTGCTCTATTCTGTGTAATCCATGGTGTGTCGTTTGGACTGGTG					
2	CELF4 (BRUNOL4)	CUGBP Elav-Like Family Member 4	CCCCAGCAGCAGA GAGAA	GAAGCCGAAAGGGAG GAA	108	NM_020180.3 NM_001025087.1 NM_001025088.1	Fw 1627; Rv 1734 Fw 1624; Rv 1731 Fw 1621; Rv 1728

	CCCCAGCAGCAGAGAGAAGGGCCCGAGGGCTGTAACCTGTTTCATCTACCATCTGCCCCAGGAGTTTGGGGACGCTGAGCTGATGCAGATGTTCTCCTCCCTTCGGCTTC						
3	CELF1 (CUGBP, BRUNOL2)	CUGBP Elav-Like Family Member 1	AACAGAAGAGAA TGGCCACG	TGCTGAAGGAGTGCTA AATACTG	121	NM_006560.3 NM_198700.2	Fw 837; Rv 957 Fw 779; Rv 899
		AACAGAAGAGAATGGCCAGCAGCTCCAGCAGCAGATGCAGCAAATCAGCGCAGCATCTGTGTGGGGAAACCTTGCTGGTCTAAATACTCTTGACCCCAAGTATTTAGCACTCCTTCAGCA					
4	ESRP1 (RBM35A)	Epithelial Splicing Regulator y Protein 1	TTTTGGGATCACT GCTGGGG	TGTCACCTCTTGTGTT GGC	108	NM_017697.3 NM_001034915 .2 NM_001122826 .1 NM_001122825 .1 NM_001122827 .1	Fw 216; Rv 323 Fw 216; Rv 323 Fw 216; Rv 323 Fw 215; Rv 322 Fw 216; Rv 323
	TTTTGGGATCACTGCTGGGGCCACGGGGCCAAGCTAGGCTCGGATGAGAAGGAGTTGATCCTGCTGTTCTGGAAAGTCGTGGATCTGGCCAACAAGAAGGTGGGACA						
5	ESRP2 (RBM35 B)	Epithelial Splicing Regulator y Protein 2	AGAGCCCAGCAGT CAATTGTT	GTCTCACTGTCCACCAC ATCAG	96	NM_024939.3	Fw 833; Rv 928
		AGAGCCCAGCAGTCAATTGTTTTCGAAGCCCGAGGTGATAAAGCAGAAATACGAGACGGGGCCTTGACAGCAAGGCTGATGTGGTGACAGTGAGAC					
6	PRPF40A (FBP11)	Pre-MRNA Processing Factor 40 Homolog A	GCTCGGAAGATGA AACGAAA	TGTCCTCAAATGCTGG CTCT	130	NM_017892.4	Fw 2459; Rv 2288
		GCTCGGAAGATGAAACGAAAAGAATCTGCATTTAAGAGTATGTTAAAACAAGCTGCTCCTCCGATAGAATTGGATGCTGTCTGGGAAGATATCCGTGAGAGATTTGTAAAAGAGCCAGCATTTGAGGACA					
7	MAGOH	Mago Homolog, Exon Junction Complex Subunit	GCCAAACACAGCA ATTACAAGA	TTATTCTCTTCAGTTCC TCCATCAC	88	NM_002370.3	Fw 265; Rv 352
		GCCAAACACAGCAATTACAAGAATGATGTCATGATCAGAAAAGAGGCTTATGTACATAAAAGCGTGATGGAGGAACTGAAGAGAATAA					
8	NOVA1	NOVA Alternative Splicing Regulator 1	TACCCAGGTACTA CTGAGCGAG	CTGGTTCTGTCTTGGC CACAT	124	NM_002515.2 NM_006489.2 NM_006491.2	Fw 592; Rv 715
		TACCCAGGTACTACTGAGCGAGTGTGCTTGATCCAGGGAACGGTTGAAGCACTGAATGCAGTTCATGGATTCATTGCAGAAAAAATTCGAGAAATGCCCCAAATGTGCCAAGACAGAACCCAG					
9	SRRM4 (nSR100)	Serine/Arginine Repetitive Matrix 4	CCTTCACCACCTCC TCAC	TTCGGCACATTCCAGAC CA	113	NM_194286.3	Fw 1386; Rv 1498
		CCTTCACCACCTCCTCACCCAGAACAGGGGGCCATGTTGGAGAATCTCTCCCCACCAGCAGGGGCAGAGAGTCAAGGGGAATTCAGTCCCGTGTCTGGAATGTGCCGAA					

10	PRPF8 (Prp8)	Pre-MRNA Processing Factor 8	TGCCCACTACAAC CGAGAA	AGGCCCGTCCTTCAGG TA	139	NM_006445.3	Fw 2373; Rv 2511
			TGCCCACTACAACCGAGAACGATCCGCCGAGGGGCCACTGTGGACAAGACTGTTGTAAAAAGAAATCTGGGCCGCCTCACCC GGCTCTATCTGAAGGCAGAACAGGAGCGGCAGCACAACTACCTGAAGGACGGGCT				
11	SFPQ (PSF)	Splicing Factor Proline And Glutamin e Rich	TGGTAGGGGGTG AAAGTG	TTAAAAACAAGAAATG GGGAAATG	125	NM_005066.2	Fw 2873; Rv 2997
			TGGTAGGGGGTGAAAGTGGGTTTGATTAAATGGATCTTTATGGCCCTATGATCTATCCTTTACTTGAAAGCTTTTGAAAAGTG GAAAGGTCATTTTGTTCATTTCCCATTTCTGTTTTTAA				
12	PTBP1 (PTB, HNRNP1)	Polypyrim idine Tract Binding Protein 1	TGGGTCGGTTCCT GCTATT	CAGATCCCCGCTTTGT AC	111	NM_002819.4 NM_031990.3 NM_031991.3	Fw 45; Rv 155
			TGGGTCGGTTCCTGCTATTCCGGCGCTCCACTCCGTCGCCCGCGGGTCTGCTCTGTGTGCCATGGACGGCATTGTCCAGATAT AGCCGTTGGTACAAAGCGGGATCTG				
13	RAVER1	Ribonucle oprotein, PTB Binding 1	GTAACCGCCGCAA GATACTG	CGAAGGCTGTCCCTTT GTATT	126	NM_133452.2	Fw 298; Rv 423
			GTAACCGCCGCAAGATACTGATCCGGGGCTCCCGGGGGACGTGACCAACCAGGAAGTACATGACCTGCTCAGTGACTATGA GCTCAAATACTGTTTTGTGGACAAATACAAAGGGACAGCCTTCG				
14	RBM17 (SPF45)	RNA Binding Motif Protein 17	CAAAGAGCCAAA GGACGAAA	TACATGCGGTGGAGTG TCC	107	NM_032905.4 NM_001145547 .1	Fw 345; Rv 451 Fw 763; Rv 869
			CAAAGAGCCAAAGGACGAAACAAAGTACAGTCTCGCCCCAGTCATTGACCTGAAGCGAGGTGGCTCCTCAGATGACCGGCA AATTGTGGACACTCCACCGCATGTA				
15	RBM22	RNA Binding Motif Protein 22	CTCTGGGTCCAA CACCTACA	GGCACAGATTTTGCAT TCCT	137	NM_018047.2	Fw 133; Rv 269
			CTCTGGGTCCAAACCTACAACAGGCAGAACTGGGAGGATGCGGACTTCCCCATTCTGTGCCAGACATGCTTGGAGAAAAC CCATATATCCGAATGACCAAGAAAAGTATGGGAAGGAATGCAAAATCTGTGCC				
16	RBM3	RNA Binding Motif Protein 3	AAGCTCTTCGTGG GAGGG	TTGACAACGACCACCT CAGA	98	NM_006743.4	Fw 253; Rv 350
			AAGCTCTTCGTGGGAGGGCTCAACTTTAACACCGACGAGCAGGCACTGGAAGACCACTTCAGCAGTTTCGGACCTATCTCTGA GGTGGTCGTTGTCAA				
17	RBM45	RNA Binding Motif Protein 45	CCCATCAAGGTTT TCATTGC	TTCCCGCAGATCTTCTT CTG	123	NM_152945.3	Fw 415; Rv 537
			CCCATCAAGGTTTTCATTGCTCAGTCCCGATCATCTGGAAGTCACCGAGATGTTGAAGATGAAGAACTACAAGAATCTTTGTGA TGATACCAAAGTCTACACAGAAGAAGATCTGCGGGAA				

18	KHDRBS1 (SAM68)	KH RNA Binding Domain Containin g, Signal Transduct ion Associate d 1	GAGCGAGTGCTG ATACCTGTC	CACCACTCTCTTCTGC AGTC	106	NM_006559.2 NR_073498.1 NR_073499.1	Fw 774; Rv 879
		GAGCGAGTGCTGATACCTGTCAAGCAGTATCCCAAGTTCAATTTTGTGGGAAGATTCTTGGACCACAAGGGAATACAATCAA AAGACTGCAGGAAGAGACTGGTG					
19	SRSF2 (SC35, SRp30b)	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2	TGTCCAAGAGGGA ATCCAAA	GTTTACACTGCTTGCC GATACA	113	NM_001195427 .1 NR_036608.1	Fw 835; Rv 947 Fw 835, Rv 1051
		TGTCCAAGAGGGAATCCAAATCCAGGTCGCGATCGAAGAGTCCCCCAAGTCTCTGAAGAGGAAGGAGCGGTGCTCTTAA GAAAATGATGTATCGGCAAGCAGTGTAAAC					
20	SF3B1 tv1	Splicing Factor 3b S, subunit 1	GCAGACCGGAA GATGAATA	TTTTCCCTCCATCTGCA AAA	88	NM_012433.3	Fw 431; Rv 518
		GCAGACCGGGAAGATGAATACAAAAGCATAGGCGGACCATGATAATTTCCCAGAGCGTCTTGATCCTTTGCAGATGGAGG GAAAA					
21	SF3B1 tv2	Splicing Factor 3b Subunit 1	CAGTTCGCTGTG GTGTTTCG	GCTGCCCTCTTGCCCTG A	101	NM_012433.3 NM_001005526 .2 NM_001308824 .1	Fw 65; Rv 165
		CAGTTCGCTGTGTGTTCGAGTGGACAAAATGGCGAAGATCGCCAAGACTCACGAAGATATTGAAGCACAGATTCGAGAAAT TCAAGGCAAGAAGGCAGC					
22	SNW1 (SKIP, Prp45)	SNW Domain Containin g 1	ATGCGTGCCCAAG TAGAGAG	TCCCCATCTCTTTTC CA	134	NM_001318844 .1 NM_012245.2	Fw 937; Rv 1070
		ATGCGTGCCCAAGTAGAGAGAAAAATGGCTCAGAAAGAAAAGGAAAAACATGAAGAGAACTTAGAGAAATGGCCAGAGAAA GCCAGGGAGAGAAGAGCTGGGATCAAACTCATGTGAAAAAGAGGATGGGGA					
23	SND1	Staphyloc occal Nuclease And Tudor Domain Containin g 1	ACTACGGCAACAG AGAGGTCC	GAAGGCATACTCCGTG GCT	101	NM_014390.3	Fw 2679; Rv 2779
		ACTACGGCAACAGAGAGGTCTGCTCCATCCACCCGCTGGGTACCTATCACCTGCCTTCAGCACTCGGGTGCTGCCAGCTCAAG CCACGGAGTATGCCTTC					
24	SRRM1 (SRM160)	Serine And Arginine Repetitive Matrix 1	GTAGCCCAAGAAG ACGCAAA	TGGTTCTGTGACGGGG AG	108	NM_001303448 .1 NM_005839.3 NM_001303449 .1	Fw 733; Rv 840 Fw 733; Rv 840 Fw 662; Rv 769
		GTAGCCCAAGAAGACGCAATCCAGATCTCCTTCCCCTAGAAGACGATCTTCCCCTGTGAGAGAGAGAGAAAGCGCAGTCAT TCTCGATCTCCCCGTACAGAAACCA					
25	SRSF1 (ASF, SF2, SRp30a)	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1	GCGGTCTGAAAAC AGAGTGG	TCCGTACAACTCCAC GACA	143	NM_006924.4 NM_001078166 .1	Fw 560; Rv 702

	GCGGTCTGAAAACAGAGTGGTTGTCTCTGGACTGCCTCCAAGTGGAAAGTTGGCAGGATTTAAAGGATCACATGCGTGAAGCA GGTGATGTATGTTATGCTGATGTTTACCGAGATGGCACTGGTGTCTGGAGTTTGTACGGA						
26	SRSF10 (SRp38, SRp40)	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 10	CTACACTCGCCGT CCAAGAG	CCGTCCACAAATCCAC TTTC	103	NM_006625.5 NM_054016.3 NM_001191005 .2 NM_001191006 .2 NM_001191007 .2 NM_001191009 .2 NM_001300936 .1 NM_001300937 .1	Fw 343; Rv 445
	CTACACTCGCCGTCCAAGAGGATTTGCTTATGTTCAATTTGAGGATGTTCTGTGATGCTGAAGACGCTTTACATAATTTGGACAG AAAGTGGATTGTGGACGG						
27	SRSF3 (SRp20)	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 3	TAACCCTAGATCT CGAAATGCATC	CATAGTAGCCAAAAGC CCGTT	117	NM_003017.4 NR_036610.1	Fw 155; Rv 271
	TAACCCTAGATCTCGAAATGCATCGTGATTCTGTCCATTGGACTGTAAGGTTTATGTAGGCAATCTTGAAACAATGGCAACA AGACGGAATTGGAACGGGCTTTTGGCTACTATG						
28	SRSF4 (SRp75)	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 4	GGAAGTGAAGTCA ATGGGAGAA	CTTCGAGAGCGAGACC TTGA	110	NM_005626.4	Fw 857; Rv 966
	GGAAGTGAAGTCAATGGGAGAAAAATCAGATTAGTTGAAGACAAGCCAGGTTCCAGACGACGCCGGTCTACTCCAGAAGCC GGAGTCATTCAAGGTCTCGCTCTCGAAG						
29	SRSF5 (SRp40)	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 5	GCAAAAGGCACA GTAGGTCAA	TTTGCGACTACGGGAA CG	92	NM_006925.4 NM_001320214 .1	Fw 723; Rv 814 Fw 727; Rv 818
	GCAAAAGGCACAGTAGGTCAAGAAGCAGGTCTCGATCCCGGACCAGAAGTTCCTTAGGTCTCGTAGCCGATCCCGTTCCTG AGTCGCAAA						
30	SRSF6 (SRp55)	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 6	AGACCTCAAAAAT GGGTACGG	CTTGCCGTTCACTCG TAA	82	NM_006275.5 NR_034009.1	Fw 263; Rv 344
	AGACCTCAAAAATGGGTACGGCTTCGTGGAGTTCGAGGACTCCCGCAGCGCCGACGACGCCGTTTACGAGCTGAACGGCAAG						
31	SRSF9 (SRp30c)	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 9	CCCTGCGTAAACT GGATGAC	AGCTGGTGCTTCTCTC AGGA	87	NM_003769.2	Fw 628; Rv 714
	CCCTGCGTAAACTGGATGACACCAAAATTCGCTCTCATGAGGGTGAACTTCTACATCCGAGTTTATCCTGAGAGAAGCACCA GCT						

32	TIA1	TIA1 Cytotoxic Granule Associated RNA Binding Protein	TAAATCCCGTGCA ACAGCAGA	TATGCAGGAACCTGCC AACCA	124	NM_022037.3 NM_022173.2	Fw 2806; Rv 2929
		TAAATCCCGTGCAACAGCAGAATCAAATTGGATATCCCCAACCTTATGGCCAGTGGGGCCAGTGGTATGGAATGCACAACAA ATTGGCCAGTATATGCCTAATGTTGGCAAGTTCCTGCATA					
33	TRA2A	Transfor mer 2 alpha homolog	TCAAAGGAGGCTA TGGAAAGG	TGTGTGCGCTCTCTTG GTTA	90	NM_013293.4 NM_001282757 .1 NM_001282758 .1 NM_001282759 .1	Fw 734; Rv 823
		TCAAAGGAGGCTATGGAAGGGCAAATGGAATGGAGCTGGATGGTAGAAGAATTCGGGTGGATTATCTATAACCAAGAGAG CGCACACA					
34	TRA2B (SFRS10)	Transfor mer 2 Beta Homolog	GATGATGCCAAGG AAGCTAAAG	AGGTAGGTCTCCCAT GTAAATTC	130	NM_004593.2 NM_001243879 .1	Fw 784; Rv 913
		GATGATGCCAAGGAAGCTAAAGAACGTGCCAATGGAATGGAGCTTGATGGGCGTAGGATCAGAGTTGATTCTCTATAACAAA AAGACCACATACGCCAACACCAGGAATTTACATGGGGAGACCTACCT					
35	SNRNP70 (U1RNP)	Small Nuclear Ribonucle oprotein U1 Subunit 70	TCTTCGTGGCGAG AGTGAAT	GCTTTCCTGACCGCTTA CTG	114	NM_001301069 .1	Fw 821; Rv 934
		TCTTCGTGGCGAGAGTGAATTATGACACACAGAATCCAAGCTCCGGAGAGAGTTTGAGGTGTACGGACCTATCAAAGAATA CACATGGTCTACAGTAAGCGGTCAGGAAAGC					
36	RNU11	RNA, U11 Small Nuclear	AAGGGCTTCTGTG GTGAGTG	CCAGCTGCCAAATAC CA	108	NR_004407.1	Fw 4; Rv 111
		AAGGGCTTCTGTGAGTGGCACACGTAGGGCAACTCGATTGCTCTGCGTGCAGGAATCGACATCAAGAGATTTCGGAAGCAT AATTTTTGGTATTGGGCAGCTGG					
37	RNU12	RNA, U12 Small Nuclear	ATAACGATTTCGGG GTGACG	CAGGCATCCGCAAAG TA	106	NR_029422.1	Fw 26; Rv 149
		ATAACGATTTCGGGTGACGCCGAATCCTCACTGCTAATGTGAGACGAATTTTGAGCGGGTAAAG GTCGCCCTCAAGGTGACCCGCTACTTTGCGGGATGCCTG					
38	RNU2-1	RNA, U2 small nuclear 1	CTCGGCCTTTTGG CTAAGAT	TATTCCATCTCCCTGCT CCA	116	NR_002716.3	Fw 8; Rv 123
		CTCGGCCTTTTGGCTAAGATCAAGTGTAGTATCTGTTCTTATCAGTTTAATATCTGATACGTCCTCTATCCGAGGACAATATATTA AATGGATTTTGGAGCAGGGAGATGGAATA					
39	U2AF1 (U2AF35)	U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1	GAAGTATGGGGA AGTAGAGGAGAT G	TTCAAGTCAATCACAG CCTTTTC	120	NM_006758.2 NM_001025203 .1 NM_001025204 .1	Fw 424; Rv 543

		GAAGTATGGGGAAGTAGAGGAGATGAACGTCTGTGACAACCTGGGAGACCACCTGGTGGGGAACGTGTACGTCAAGTTTCGC CTGGAGGAAGATGCGGAAAAGGCTGTGATTGACTTGAA					
40	U2AF2 (U2AF65)	U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 2	CTTTGACCAGAGG CGCTAAA	TACTGCATTGGGGTGA TGTG	130	NM_007279.2 NM_001012478 .1	Fw 1246; Rv 1375
		CTTTGACCAGAGGCGCTAAAGAGGAGCACGGTGGACTGATTCTGTTCCCCCGCCACGAGAAGAAGAAGAAGGTCCGTAAATA CTGGGACGTGCCACCCCAAGGCTTTGAGCACATCACCCAATGCAGTA					
41	RNU4-1	RNA, U4 small nuclear 1	TCGTAGCCAATGA GGTCTATCC	AAAATTGCCAGTGCCG ACTA	103	NR_003925.1	Fw 21, Rv 132
		TCGTAGCCAATGAGGTCTATCCGAGGCGCGATTATTGCTAATTGAAAACTTTTCCAATACCCCGCCG TGACGACTTGCAATATAGTCGGCACTGGCAATTTT					
42	RNU4ATAC	RNA, U4atac Small Nuclear (U12- Depende nt Splicing)	GTTGCGCTACTGT CCAATGA	CAAAAATTGCACCAAA ATAA	85	NR_023343.1	Fw 19; Rv 103
		GTTGCGCTACTGTCCAATGAGCGCATAGTGAGGGCAGTACTGCTAACGCCTGAACAACACACCCGCATCAACTAGAGCTTTG TTTATTTTGGTGCAATTTTG					
43	SNRNP200 (U5-200KD)	Small Nuclear Ribonucle oprotein U5 Subunit 200	GGTGCTGTCCCTT GTTGG	CTTTCTTCGCTTGGCTC TTCT	103	NM_014014.4	Fw 249, Rv 351
		GGTGCTGTCCCTTGTTGGGAAGCTGGAGGGCACCCGTATGGGAGACAAGGCTCAACGGACCAACCCGAGATGCAGGAGGA AAGAAGAGCCAAGCGAAGAAAG					
44	RNU6-1	RNA, U6 small nuclear 1 (RNU6-1)	CGCTTCGGCAGCA CATATA	AAAATATGGAACGCTT CACGAA	101	NR_004394.1 NR_125730.1 NR_104084.1 NR_104088.1 NR_104080.1	Fw 6, Rv 106
		CGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAACGATACAGAGAAGATTAGCATGGCCCTGCGCAAGGATGACACGCAAAATTCG TGAAGCGTTCCATATTTT					
45	RNU6ATAC	RNA, U6atac small nuclear (U12- dependen t splicing)	TGAAAGGAGAGA AGGTTAGCACTC	CGATGGTTAGATGCCA CGA	112	NR_023344.1	Fw 9, Rv 120

TGAAAGGAGAGAAGGTTAGCACTCCCTTGACAAGGATGGAAGAGGCCCTCGGGCCTGACAACACGCATACGGTTAAGGCAT TGCCACCTACTTCGTGGCATCTAACCATCG

Métodos de la invención

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método de detección, diagnóstico, pronóstico y estratificación de pacientes que padecen una enfermedad autoinmune, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

a) Cuantificar los niveles de expresión de

I) *TCERG1, ESRP1, RBM17, RBM3, RBM45, KHDRS1, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF9, SRSF10, TIA1, TRA2A, SNRNP70, RNU12, U2AF1, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200, RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones en monocitos,

II) *TCERG1, ESRP2, NOVA1, PRPF8, PTBP1, RBM17, RBM3, KHDRS1, SF3BTV1, SRSF4, SRSF6, SRSF10, TIA1, SNRNP70, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200*, o cualquiera de su combinaciones en linfocitos, y de

III) *CELF1, FBP11, NOVA1, PRPF8, PTBP1, RAVR1, RBM17, RBM22, RBM3, KHDRS1, SF3BTV1, SF3BTV2, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF9, SRSF10, TIA1, TRA2A, TRA2B, SNRNP70, RNU11, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200, RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones, en neutrófilos

b) Comparar los niveles obtenidos en el paso (a) con un valor de referencia, o con los niveles de expresión de dichos marcadores obtenidos en una muestra de referencia.

c) asignar los pacientes que presentan unos niveles de expresión obtenidos en el paso (b) diferentes y estadísticamente significativos al valor de referencia o a los niveles de la muestra de referencia, al grupo de individuos con riesgo de padecer una enfermedad autoinmune, o al grupo de individuos que padecen artritis reumatoide.

Valores diferentes y estadísticamente significativos implica que los niveles de expresión se consideran aumentados o disminuidos.

Según este método de la invención, el nivel de expresión se considera aumentado en donde la diferencia entre la muestra de ensayo y la muestra de referencia es al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más. Un descenso en la expresión con el valor de referencia se considera en donde la diferencia entre la muestra de ensayo y la muestra de

referencia de al menos 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menos.

Por tanto, en una realización preferida, método según la reivindicación anterior, comprende asignar los pacientes que presentan unos niveles de expresión obtenidos en el paso (b) menores y estadísticamente significativos al valor de referencia o a los niveles de la muestra de referencia, al grupo de individuos con riesgo de padecer artritis reumatoide.

Los autores de la presente invención han identificado asimismo una firma de 8 elementos integrantes de la maquinaria de *splicing* con idéntico patrón de alteración en los tres subtipos leucocitarios analizados (*RBM17*, *RBM3*, *KHRS1*, *SRSF10*, *SNRNP70*, *UA2F2*, *RNU4ATAC* y/o *SNRNP200*) (Figura 1).

Por tanto, en otra realización preferida, se cuantifican los niveles de expresión de *RBM17*, *RBM3*, *KHRS1*, *SRSF10*, *SNRNP70*, *UA2F2*, *RNU4ATAC* y/o *SNRNP200*, o cualquiera de sus combinaciones, y preferiblemente se cuantifican los niveles de expresión de todos estos biomarcadores simultáneamente.

El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde preferiblemente el método comprende:

a) cuantificar los niveles de expresión de *RBM17*, *RBM3*, *KHRS1*, *SRSF10*, *SNRNP70*, *UA2F2*, *RNU4ATAC* y *SNRNP200*, en una muestra biológica aislada de dicho individuo, donde la muestra preferiblemente comprende monocitos, linfocitos y/o neutrófilos, preferiblemente purificados,

a1) calcular los índices A1, A2 y A3 (donde A1 se refiere a monocitos, A2 a linfocitos y A3 a neutrófilos) según las ecuaciones:

$$A1 = 1 / [1 + e^{-[-25,015204 + [(-0,000135 * RBM17) + (0,000031 * RBM3) + (-0,000007 * KHRS1) + (0,0002 * SRSF10) + (0,000116 * SNRNP70) + (0,000062 * UA2F2) + (0,001458 * RNU4ATAC) + (-0,000675 * SNRNP200)]}]]$$

$$A2=1/[1+e^{-[0,12461+[(0,000003*RBM17)+(-0,000001*RBM3)+(-0,000002*KHDFS1)+(0,000003*SRSF10)+(0,000000*SNRNP70)+(0,000001*U2AF2)+(0,000003*1*RNU4ATAC)+(-0,000001*SNRNP200)]}]]]$$

$$A3=1/[1+e^{-[1,442807+[(0,000000*RBM17)+(-0,000002*RBM3)+(-$$

$$5 \quad 0,000001*KHDFS1)+(0,000000*SRSF10)+(0,000001*SNRNP70)+(0,000000*U2AF2)+(0,004708*RNU4ATAC)+(-0,000000*SNRNP200)]}]]]$$

a2) calcular los índices B1 y B3 (donde B1 se refiere a monocitos, y B3 a neutrófilos) según las ecuaciones:

$$B1=1/[1+e^{-[2,778512+[(0,000033*RBM17)+(-0,000053*RBM3)+(0,000047*KHDFS1)+(-$$

$$10 \quad 0,000006*SRSF10)+(0,000018*SNRNP70)+(0,000058*U2AF2)+(-0,000004*RNU4ATAC)+(-0,000225*SNRNP200)]}]]]$$

$$B3=1/[1+e^{-[1,276655+[(0,000007*RBM17)+(0,000001*RBM3)+(0,000003*KHDFS1)+(-$$

$$0,000004*SRSF10)+(-0,000003*SNRNP70)+(0,000010*U2AF2)+(0,000001*RNU4ATAC)+(-0,000001*SNRNP200)]}]]]$$

15 a3) calcular los índices C1, C2 y C3 (donde C1 se refiere a monocitos, C2 a linfocitos y C3 a neutrófilos) según las ecuaciones:

$$C1=1/[1+e^{-[0,36387+[(0,000004*RBM17)+(0,000007*RBM3)+(-0,000017*KHDFS1)+(0,000024*SRSF10)+(0,000003*SNRNP70)+(-0,000029*U2AF2)+(0,000000*RNU4ATAC)+(0,000003*SNRNP200)]}]]]$$

$$20 \quad C2=1/[1+e^{-[2,45244+[(0,000002*RBM17)+(-0,000002*RBM3)+(0,000004*KHDFS1)+(-0,000008*SRSF10)+(0,000000*SNRNP70)+(-0,000008*U2AF2)+(-0,000001*RNU4ATAC)+(0,000003*SNRNP200)]}]]]$$

$$C3=1/[1+e^{-[0,280066+[(0,000012*RBM17)+(0,000045*RBM3)+(0,000017*KHDFS1)+(-0,000010*SRSF10)+(-0,000023*SNRNP70)+(-$$

$$25 \quad 0,000060*U2AF2)+(0,000020*RNU4ATAC)+(0,000015*SNRNP200)]}]]]$$

a4) calcular los índices D1, D2 y D3 (donde D1 se refiere a monocitos, D2 a linfocitos y D3 a neutrófilos) según las ecuaciones:

$$D1=1/[1+e^{-[3,722733+[(0,000015*RBM17)+(-0,000003*RBM3)+(-0,000002*KHDFS1)+(-0,000008*SRSF10)+(0,000004*SNRNP70)+(-$$

$$30 \quad 0,000045*U2AF2)+(0,000000*RNU4ATAC)+(0,000005*SNRNP200)]}]]]$$

$$D2=1/[1+e^{-[18,183604+[(0,000037*RBM17)+(0,000029*RBM3)+(0,000006*KHDSR1)+(-0,000117*SRSF10)+(0,000011*SNRNP70)+(-0,000159*U2AF2)+(0,000025*RNU4ATAC)+(-0,000028*SNRNP200)]]}]$$

$$D3=1/[1+e^{-[0,5632+[(0,000005*RBM17)+(-$$

$$5 \quad 0,000011*RBM3)+(0,000009*KHDSR1)+(0,000004*SRSF10)+(0,000002*SNRNP70)+(-0,000001*U2AF2)+(0,000005*RNU4ATAC)+(-0,000021*SNRNP200)]]]$$

Asignando en cada ecuación los valores de los biomarcadores correspondientes obtenidos en el paso (a).

10 Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento pacientes con AR, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (e) según el primer método de la invención, y además comprende:

15 d1) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con artritis reumatoide cuando el valor del índice A1 del paso (a1) sea preferiblemente menor que 0,0000015, preferiblemente menor que 0,000015, y aún más preferiblemente menor que 0,5; cuando el valor del índice A2 del paso (a1) sea preferiblemente menor que 0,8438, preferiblemente menor que 0,9035, y aun más preferiblemente menor que 0,9271; cuando el valor del índice A3 del paso (a1) sea preferiblemente menor que 0,6872, preferiblemente menor que 0,6954 y aun más preferiblemente menor que 0,7005.

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

20 d2) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con AR con alta actividad de la enfermedad cuando el valor del índice B1 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,1717, preferiblemente menor que 0,1887, y aún más preferiblemente menor que 0,3754; cuando el valor del índice B3 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,2045, preferiblemente menor que 0,2178, y aun más preferiblemente menor que 0,227.

25 En otra realización preferida el segundo método de la invención además comprende:
d3) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con AR y placas de ateroma cuando el valor del índice C1 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,4869, preferiblemente menor que 0,4981, y aún más preferiblemente menor que 0,503; cuando el valor del índice C2 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,6625, preferiblemente menor que 0,7087, y aún más preferiblemente menor que 0,7433; cuando el valor del índice C3 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,2623, preferiblemente menor que 0,279 y aun más preferiblemente menor que 0,4028.

35 En otra realización preferida el segundo método de la invención además comprende:

d4) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con AR y afectación radiológica cuando el valor del índice D1 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,5384, preferiblemente menor que 0,6139, y aún más preferiblemente menor que 0,664; cuando el valor del índice D2 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,5; cuando el valor del índice D3 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,4021, preferiblemente menor que 0,467 y aún más preferiblemente menor que 0,5061.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un método de seguimiento de la evolución de la artritis reumatoide, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) del primer método de la invención, y además comprende:

d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

En una realización preferida, los pasos (a), (b), (c) y/o (d) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados y/o computerizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico de dispensación de líquidos en el paso (a), un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b), o la comparación computerizada en el paso (c).

La comparación descrita en el paso (c) del método de la invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una o varias muestras de referencia que puede/n ser analizada/s, por ejemplo, simultánea o consecutivamente junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la/s muestra/s de referencia puede/n ser control/es negativo/s, esto es, las cantidades detectadas por el método de la invención en muestras que provienen de individuos clínicamente bien documentados y que no padecen la enfermedad o deficiencia.

Puede presentar dicho aumento o disminución de la cantidad de producto de expresión de cualquiera de los genes respectivos, o de todos ellos simultáneamente, o en cualquier combinación.

En una realización preferida de los métodos de la invención, la muestra biológica aislada de un individuo en el paso (a) es una muestra que comprende monocitos, linfocitos y/o neutrófilos.

El término “producto de expresión”, también denominado “producto génico” se refiere al material bioquímico, ya sea ARN (por ejemplo microARN) o proteína, resultante de la expresión de un gen. Algunas veces se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen.

La cuantificación del producto de expresión de los biomarcadores, o la detección de la expresión de sus correspondientes genes, puede realizarse por cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica. Preferiblemente, la cuantificación se realiza mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una técnica que incluya la PCR, y más preferiblemente mediante PCT a tiempo real (Q-RT-PCR).

La medida de los niveles de expresión de un gen, preferiblemente de manera cuantitativa, está basada en una señal que se obtiene directamente de los transcritos de dichos genes (ARNm, microARN, etc.), y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de ARN producidas por los genes. Dicha señal – a la que también podemos referirnos como señal de intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. Por otro lado, se podría realizar mediante medida indirecta que se refiere a la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

La técnica preferiblemente utilizada es la Q-RT-PCR. Según esta técnica, utilizando oligonucleótidos, enzimas, cebadores y solución tampón, se amplifica de forma exponencial un fragmento de ADN original. Esta técnica es llevada a cabo en un aparato llamado termociclador que mantiene la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo. La detección en tiempo real se basa en la utilización de marcadores fluorescentes (sondas) que se unen a todas las secuencias de doble cadena de ADN formadas en los ciclos de la reacción de PCR. Una vez que el marcador se une al ácido nucleico de doble cadena, éste emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real (Walter *et al.*, 2002, *Science*, 296, 557-559). El ciclo al cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente supera un umbral determinado es llamado Ct. Los niveles de expresión de un microARN son calculados como 2^{-Ct} .

La expresión de un biomarcador de la invención se puede evaluar mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos por el experto en la materia para detectar la expresión de una molécula transcrita o su proteína correspondiente. Si los biomarcadores son moléculas de ácido nucleico, la expresión se puede detectar y/o cuantificar usando métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos, métodos de amplificación de ácidos nucleicos y similares.

Así, en una forma de realización preferida, la expresión de un gen marcador se evalúa preparando ARNm/ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) de una muestra, y mediante la hibridación del ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es complementario a un polinucleótido que comprende el gen marcador, y/o fragmentos del mismo. El ADNc se puede, opcionalmente, amplificar usando cualquiera de varios métodos de la reacción en cadena de la polimerasa antes de la hibridación con el polinucleótido de referencia.

Un “*método diagnóstico*” (o “*método de diagnóstico*”) se refiere a un procedimiento donde se examina o analiza a un paciente (o a una muestra obtenida del mismo) para obtener un conocimiento diferencial de una enfermedad a través de los signos y síntomas que la caracterizan. En breve, el término “*diagnóstico*” en la presente solicitud se refiere a la capacidad de discriminar entre pacientes que padecen la enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis reumatoide, y pacientes que no padecen la enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis reumatoide. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa 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 o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90 %, al menos del 95 %, al menos del 97 %, al menos del 98 % o al menos del 99 %. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0.1, de 0.05, de 0.01, de 0.005 o de 0.0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60 %, en al menos el 70 %, en al menos el 80 %, o en al menos el 90 % de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

Un “*método pronóstico*” (o “*método de pronóstico*”) se refiere a un procedimiento donde, a partir de análisis clínicos, se identifica la enfermedad o dolencia, como la enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis reumatoide, que sufre la persona y, a partir de las experiencias con otros pacientes aquejados por la misma enfermedad o dolencia, como una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis reumatoide, se predice cómo será el estado de salud del individuo en el futuro; es decir, la evolución de la enfermedad o dolencia en el tiempo. El término “*pronóstico*” en la presente invención también se refiere a la capacidad de detectar pacientes o sujetos asintomáticos que presentan una alta probabilidad de padecer una enfermedad o dolencia, como la enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis reumatoide, aun cuando en el momento del diagnóstico no presenten dichas patologías o manifestaciones evidentes de las mismas. Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a pronosticar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valores p, prueba *t* de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%, al

menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente pero sin limitarse, 0,2, 0,1, 0,05.

El término "seguimiento de la evolución", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, a la supervisión del desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo, pero sin limitarse, la evaluación de la respuesta a un determinado tratamiento de la enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis reumatoide. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el seguimiento se realiza post-tratamiento.

El término "*no simultáneo*" tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la adquisición de dos o más muestras de tejido, de sangre (que también incluye plasma y suero) o de orina donde existe un intervalo de tiempo entre la adquisición de las muestras que permite un seguimiento de la enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis reumatoide y/o pronóstico útil mediante la comparación entre las cantidades de ARNm y/o proteínas en las diferentes muestras.

Preferiblemente, el intervalo de tiempo es de entre 1 mes y 20 años, como por ejemplo de entre 1 mes y 10 años, 1 mes y 5 años o 1 mes y 1 año. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 1 mes. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 2 meses. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 3 meses. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 6 meses. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 1 año. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 1 año y medio. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 2 años. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 3 años. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre la adquisición de muestras es de aproximadamente 5 años.

El grado de identidad existente entre dos secuencias se puede determinar por métodos convencionales, por ejemplo, por medio de algoritmos estándar de alineamiento de secuencias que son conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST (Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10).

Una "muestra biológica", como se define aquí, es una pequeña parte de un sujeto, representativa del conjunto y puede estar constituido por una biopsia o una muestra de fluido corporal. Las biopsias son pequeñas piezas de tejido y pueden ser frescas, congeladas o fijadas, como fijada con formalina y embebidas en parafina (*formalin-fixed and paraffin embedded* FFPE). Muestras de fluidos corporales puede ser sangre, plasma, suero, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, leche o muestras de fluido ductal y pueden asimismo ser frescos, congelados o fijadas. Las muestras se pueden extirpar quirúrgicamente, mediante extracción es decir, por agujas hipodérmicas o de

otro tipo, por microdissección o captura láser. La muestra debe contener cualquier material biológico adecuado para detectar el biomarcador o biomarcadores deseado/s, por lo tanto, dicha muestra debe, comprender ventajosamente material de las células del sujeto.

Por lo tanto, en una realización preferida, la muestra es una muestra de fluido corporal tal como una muestra de plasma, suero y/o sangre.

Una “*muestra de plasma, suero y/o sangre*” se refiere a una muestra obtenida mediante un método no invasivo. Un ejemplo no limitante y conocido por un experto en la materia sería mediante la extracción de una muestra de sangre de un individuo usando una aguja. Si se quisiese obtener una muestra de plasma o suero, se procedería a la separación del plasma/suero de los otros componentes de la sangre mediante la centrifugación. La cantidad de biomarcadores de la invención puede ser analizada, por ejemplo, pero sin limitarse, en muestras de plasma, suero y/o sangre fresco o plasma, suero y/o sangre que ha sido congelado y después descongelado.

Una “*muestra de orina*” se refiere a una muestra obtenida mediante un método no invasivo. Un ejemplo no limitante y conocido por un experto en la materia sería mediante la colección de la orina de un individuo en un contenedor sellable. La cantidad de biomarcadores de la invención puede ser analizada, por ejemplo, pero sin limitarse, en muestras de orina fresca u orina que ha sido congelada y después descongelada.

En una realización particular, la muestra es una muestra de Los términos “*individuo*”, “*paciente*” o “*sujeto*” se usan de manera intercambiable en la presente descripción, y no pretenden ser limitativos en ningún aspecto, pudiendo ser el “*individuo*”, “*paciente*” o “*sujeto*” de cualquier edad, sexo y condición física.

Una “*muestra tisular*”, “*muestra de tejido*” o “*muestra tisular/de tejido aislada*” incluye, pero sin limitarse, células y/o tejidos de un sujeto, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. La muestra de tejido puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una biopsia o un aspirado por aguja fina. Preferiblemente, las células son células tumorales. Tal y como se ha descrito anteriormente, la muestra tisular es muestra tisular de vejiga y/o colon.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta, tal y como se ha señalado anteriormente en la presente descripción. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de los productos de expresión, basada en una señal que se obtiene directamente de los productos de expresión, y que está correlacionada con el número de moléculas de dichos productos de expresión. Dicha señal -a la que también podemos referirnos como señal de intensidad- puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos

de expresión. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

Una “*muestra de referencia*” se refiere a una muestra similar obtenida de un sujeto o individuo (paciente) control que no presente la enfermedad o dolencia, tal y como una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis reumatoide, que se pretende diagnosticar o pronosticar. La “*cantidad de referencia*” o “*nivel de referencia*” se refiere a la cantidad (o a los niveles) absoluta obtenida de la muestra de referencia. Una “*muestra de referencia*” puede también referirse a una muestra similar obtenida del mismo sujeto o individuo en un punto anterior en el tiempo.

Un “*valor de referencia*” se refiere al conjunto de valores que se emplean interpretar los resultados de las pruebas diagnósticas, pronósticas y/o de seguimiento en un sujeto o individuo (paciente). Por ejemplo, los valores de referencia para una prueba determinada se basan en los resultados de esa misma prueba en el 95% de la población sana. Los valores de referencia de una prueba pueden ser diferentes en distintos grupos de personas (por ejemplo, entre mujeres y hombres, o entre niños y adultos). También se puede denominar “*intervalo de referencia*”, “*límite de referencia*”, y “*límite normal*”.

Kits y dispositivos de la invención

Un **cuarto aspecto** de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos y/o reactivos necesarios para cuantificar los niveles del producto de expresión de los genes

I) *TCERG1, ESRP1, RBM17, RBM3, RBM45, KHDRS1, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF9, SRSF10, TIA1, TRA2A, SNRNP70, RNU12, U2AF1, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200, RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones en monocitos,

II) *TCERG1, ESRP2, NOVA1, PRPF8, PTBP1, RBM17, RBM3, KHDRS1, SF3B1, SRSF4, SRSF6, SRSF10, TIA1, SNRNP70, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200*, o cualquiera de sus combinaciones en linfocitos, y de

III) *CELF1, FBP11, NOVA1, PRPF8, PTBP1, RAV1, RBM17, RBM22, RBM3, KHDRS1, SF3B1, SF3B2, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF9, SRSF10, TIA1, TRA2A, TRA2B, SNRNP70, RNU11, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200, RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones, en neutrófilos.

Preferiblemente el kit o dispositivo de la invención comprende los elementos necesarios para cuantificar los niveles de expresión de *RBM17, RBM3, KHDRS1, SRSF10, SNRNP70, UA2F2, RNU4ATAC* y/o *SNRNP200*, o cualquiera de sus combinaciones, y preferiblemente se cuantifican dichos niveles de expresión simultáneamente.

En otra realización preferida el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión de *RBM17*, *RBM3*, *KHDRS1*, *SRSF10*, *SNRNP70*, *UA2F2*, *RNU4ATAC* y/o *SNRNP200*, y donde:

5 - los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 y/o SEQ ID NO: 43.

15 - las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 150 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más 25 preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 y/o SEQ ID NO: 43.

20 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los cebadores o sondas están modificados, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante un marcaje radiactivo o inmunológico.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los oligonucleótidos presentan modificaciones en alguno de sus nucleótidos, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, nucleótidos que tengan alguno de sus átomos con un isótopo radiactivo, normalmente ³²P o tritio, nucleótidos marcados inmunológicamente, como por ejemplo con una molécula de 25 digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo es humano, humanizado o sintético. En otra realización preferida, el anticuerpo es monoclonal y/o se encuentra marcado con un fluorocromo. Preferiblemente, el fluorocromo se selecciona de la lista 30 que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, alofococianina, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención además comprende todos aquellos elementos necesarios para llevar a cabo un procedimiento PCR.

35 El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de

proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o micro-arreglos de canal único diseñados a partir de una secuencia conocida o ARNm de los genes *RBM17*, *RBM3*, *KHDRS1*, *SRSF10*, *SNRNP70*, *UA2F2*, *RNU4ATAC* y/o *SNRNP200*, o cualquiera de sus combinaciones, y preferiblemente de todos ellos simultáneamente. Más preferiblemente las secuencias de los genes *RBM17*, *RBM3*, *KHDRS1*, *SRSF10*, *SNRNP70*, *UA2F2*, *RNU4ATAC* y/o *SNRNP200* son las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 y/o SEQ ID NO: 43, respectivamente, o secuencias aminoacídicas que presenten un grado de identidad con dichas secuencias aminoacídicas de, al menos del 85%, típicamente de, al menos del 90%, preferiblemente de, al menos del 95%, más preferiblemente de, al menos del 98%, aún más preferiblemente de, al menos del 99%

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos pueden ser construidas en la superficie un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un solo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

Así, las sondas de oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 20 nucleótidos.

La síntesis *in situ* sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse a, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: ARN mensajero, ARN total, un fragmento de PCR, etc.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray de la invención presenta oligonucleótidos modificados, como se han descrito anteriormente.

Más preferiblemente el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores y/o sondas capaces de cuantificar el producto de expresión de los biomarcadores de la invención, y donde

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 y/o SEQ ID NO: 43.

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 150 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más 25 preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 y/o SEQ ID NO: 43.

- los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a una región formada por cualquiera de las secuencias aminoácídicas SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 y/o SEQ ID NO: 43.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención, la micromatriz, o el microarray de la invención, para la obtención de datos útiles para la detección, diagnóstico, pronóstico, clasificación y seguimiento de pacientes que padecen una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis reumatoide.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro.

Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Un **décimo aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN o RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN o DNA).

Una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base modificados, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N6-metil-adenina, N6-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5- (carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5- carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6- isopenteniladenina, 1- metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5 metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-

metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-

oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina, y 5- propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

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.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

La Tabla I muestra las características clínicas / serológicas de los pacientes con Artritis Reumatoide incluidos en el desarrollo de la invención

	Artritis Reumatoide (n=74)	Donantes Sanos (n=29)	P
Parámetros clínicos			
Mujer/hombre	50/20	16/12	0360
Edad (años)	53,80±12,45	39,52±9,84	<0,001
Tiempo evolución (años)	7,54±7,27		
DAS28	3,19±1,43		
GIMc patológico (%)	41,7%	0%	
Hipertensión (%)	24,6%	0%	
Menopausia (%)	42,9%	0%	

Diabetes (%)	0%	0%	
Obesidad (%)	17,3%	11,8%	0,719
Fumador (%)	28,8%	18,8%	0,529
Parámetros Laboratorio			
Anticuerpos Anti-CCPs + (%)	85,7%	3,8%	<0,001
Factor Reumatoide + (%)	62,5%	0%	<0,001
Proteína C Reactiva, mg/dL	9,71±14,37	1,66±2,39	<0,001
Colesterol, mg/dL	201,0±35,00	191,67±23,34	0,208
HDL, mg/dL	55,65±18,63	50,63±12,58	0,138
LDL, mg/dL	142,38±31,51	123,29±19,29	0,868
Triglicéridos, mg/dL	103,35±52,17	86,66±47,73	0,156
Tratamientos			
Corticoides (%)	58,2%	0%	
Antimaláricos (%)	26,4%	0%	
Metotrexato (%)	53,4%	0%	
Leflunomida (%)	28,6%	0%	
Vitamina D (%)	23,2%	0%	
Biológicos (%)	12,2%	0%	

Tabla I. Características clínicas / serológicas de los pacientes con Artritis Reumatoide incluidos en el desarrollo de la invención

5 Obtención y procesamiento de muestras sanguíneas.

Se ha recogido sangre periférica en tubos con citrato trisódico. Las muestras fueron centrifugadas para separar la fracción plasmática de la fracción celular. Las plaquetas presentes en el plasma fueron eliminadas con una segunda centrifugación. Finalmente, el plasma y el suero se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

10 Purificación de linfocitos.

Los leucocitos se separaron utilizando el autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec) utilizando selección inmuno-magnética positiva tras marcaje con anti-CD14 (monocitos), anti-CD3/anti-CD19 (linfocitos) y CD15 (neutrófilos). La pureza se analizó mediante citometría de flujo.

Aislamiento de ácidos nucleicos.

- 5 Los subtipos de leucocitos fueron procesados para la extracción de ARN total utilizando el kit comercial AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN, Germantown, MD, EEUU). El ARN total fue tratado con ADNasa (RQ1DNase, Promega; Wisconsin, Estados Unidos); cuantificado mediante el sistema Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, EEUU); y retrotranscrito a ADN copia con 1 µg de partida de ARN total en un
10 volumen final de 20 µL con el uso del kit Revert Aid First Strand cDNA Synthesis (MRE Fermentas, Hanover, MD, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Diseño de cebadores.

- Los cebadores fueron diseñados por el equipo de trabajo utilizando el software Primer 3 con las siguientes condiciones óptimas: los parámetros óptimos utilizados para el diseño de cebadores
15 entre exones fueron los siguientes: (a) que la diferencia en la temperatura de unión entre ambos cebadores no fuera mayor de 0,2°C (60°C óptima); (b) exclusión de cebadores que tuvieran alta complementariedad y que pudieran generar dímeros de cebadores y, (c) que amplifiquen un producto de entre 100 y 180 pares de bases.

Array de qPCR.

- 20 Se utilizó la tecnología microfluídica Fluidigm (Fluidigm, Barcelona, España). Esta técnica permite realizar un análisis de expresión mediante arrays de qPCR, reduciendo al mínimo la manipulación de las muestras, eliminando así los errores. Todos los pasos realizados se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones y consejos del fabricante. El ADN copia fue preamplificado y posteriormente cargado en la placa Dynamic Array M48.48 usando el software "Prime (113x)" del
25 IFC controller MX (Fluidigm). Posteriormente, se añadió, a cada uno de los pocillos, 2,7 µL de las muestras pre-amplificadas y tratadas con Exonucleasa I y 3,3 µL de una mezcla de 2,5 µL EvaGreen Supermix with Low ROX (Bio-Rad, PN 172- 5211) y 0,25 µL DNA Binding Dye Sample Loading Reagent 20X (Fluidigm, PN 100- 3738), previamente mezcladas y homogeneizadas. Posteriormente se volvió a introducir la placa en el IFC Controller, usando esta vez el software
30 "Load Mix (113x)". Después de esto, se corrió el array de qPCR en el sistema de Biomark HD (Fluidigm).

De forma paralela se llevó a cabo una evaluación clínica y serológica exhaustiva.

Finalmente se realizaron diversos estudios estadísticos de correlación asociación, análisis multivariantes, curvas ROC, etc. para valorar la relevancia de los resultados obtenidos en estudios funcionales en relación con el perfil clínico de los pacientes.

Los resultados se muestran en las figuras de la invención.

REIVINDICACIONES

1.- El uso de los niveles de expresión de *TCERG1*, *ESRP1*, *RBM17*, *RBM3*, *RBM45*, *KHDRS1*, *SRSF3*, *SRSF4*, *SRSF5*, *SRSF6*, *SRFSF9*, *SRSF10*, *TIA1*, *TRA2A*, *SNRNP70*, *RNU12*, *U2AF1*,
 5 *UA2F2*, *RNU4ATAC*, *SNRNP200*, *RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones en monocitos, de *TCERG1*, *ESRP2*, *NOVA1*, *PRPF8*, *PTBP1*, *RBM17*, *RBM3*, *KHDRS1*, *SF3Btv1*, *SRSF4*, *SRSF6*, *SRSF10*, *TIA1*, *SNRNP70*, *UA2F2*, *RNU4ATAC*, *SNRNP200*, o cualquiera de su combinaciones en linfocitos, y de *CELF1*, *FBP11*, *NOVA1*, *PRPF8*, *PTBP1*, *RAVER1*, *RBM17*, *RBM22*, *RBM3*, *KHDRS1*, *SF3BTV1*, *SF3BTV2*, *SRSF2*, *SRSF3*, *SRSF4*, *SRSF5*, *SRFSF9*,
 10 *SRSF10*, *TIA1*, *TRA2A*, *TRA2B*, *SNRNP70*, *RNU11*, *UA2F2*, *RNU4ATAC*, *SNRNP200*, *RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones, en neutrófilos, para la detección, diagnóstico, pronóstico, clasificación y seguimiento de pacientes que padecen artritis reumatoide.

2.- Un método de detección, diagnóstico, pronóstico y estratificación de pacientes que padecen
 15 una enfermedad autoinmune, que comprende:

a) Cuantificar los niveles de expresión de

I) *TCERG1*, *ESRP1*, *RBM17*, *RBM3*, *RBM45*, *KHDRS1*, *SRSF3*, *SRSF4*, *SRSF5*, *SRSF6*, *SRFSF9*, *SRSF10*, *TIA1*, *TRA2A*, *SNRNP70*, *RNU12*, *U2AF1*, *UA2F2*, *RNU4ATAC*, *SNRNP200*, *RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones en monocitos,

20 II) *TCERG1*, *ESRP2*, *NOVA1*, *PRPF8*, *PTBP1*, *RBM17*, *RBM3*, *KHDRS1*, *SF3Btv1*, *SRSF4*, *SRSF6*, *SRSF10*, *TIA1*, *SNRNP70*, *UA2F2*, *RNU4ATAC*, *SNRNP200*, o cualquiera de su combinaciones en linfocitos, y de

25 III) *CELF1*, *FBP11*, *NOVA1*, *PRPF8*, *PTBP1*, *RAVER1*, *RBM17*, *RBM22*, *RBM3*, *KHDRS1*, *SF3BTV1*, *SF3BTV2*, *SRSF2*, *SRSF3*, *SRSF4*, *SRSF5*, *SRFSF9*, *SRSF10*, *TIA1*, *TRA2A*, *TRA2B*, *SNRNP70*, *RNU11*, *UA2F2*, *RNU4ATAC*, *SNRNP200*, *RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones, en neutrófilos

b) Comparar los niveles obtenidos en el paso (a) con un valor de referencia, o con los niveles de expresión de dichos marcadores obtenidos en una muestra de referencia.

30 c) asignar los pacientes que presentan unos niveles de expresión obtenidos en el paso (b) diferentes y estadísticamente significativos al valor de referencia o a los niveles de la muestra de referencia, al grupo de individuos con riesgo de padecer una enfermedad autoinmune, o al grupo de individuos que padecen una enfermedad autoinmune, y donde preferiblemente la enfermedad autoinmune es la artritis reumatoide.

3.- El método según la reivindicación anterior, donde preferiblemente el método comprende:

a) cuantificar los niveles de expresión de *RBM17*, *RBM3*, *KHDRS1*, *SRSF10*, *SNRNP70*, *UA2F2*, *RNU4ATAC* y *SNRNP200*, en una muestra biológica aislada de dicho individuo, donde la muestra preferiblemente comprende monocitos, linfocitos y/o neutrófilos, preferiblemente purificados,

a1) calcular los índices A1, A2 y A3 (donde A1 se refiere a monocitos, A2 a linfocitos y A3 a neutrófilos) según las ecuaciones:

$$A1 = 1/[1 + e^{-[-25,015204 + [(-0,000135 * RBM17) + (0,000031 * RBM3) + (-0,000007 * KHDRS1) + (0,0002 * SRSF10) + (0,000116 * SNRNP70) + (0,000062 * U2AF2) + (0,001458 * RNU4ATAC) + (-0,000675 * SNRNP200)]]}]$$

$$A2 = 1/[1 + e^{-[0,12461 + [(0,000003 * RBM17) + (-0,000001 * RBM3) + (-0,000002 * KHDRS1) + (0,000003 * SRSF10) + (0,000000 * SNRNP70) + (0,000001 * U2AF2) + (0,000031 * RNU4ATAC) + (-0,000001 * SNRNP200)]]}]$$

$$A3 = 1/[1 + e^{-[1,442807 + [(0,000000 * RBM17) + (-0,000002 * RBM3) + (-0,000001 * KHDRS1) + (0,000000 * SRSF10) + (0,000001 * SNRNP70) + (0,000000 * U2AF2) + (0,004708 * RNU4ATAC) + (-0,000000 * SNRNP200)]]}]$$

a2) calcular los índices B1 y B3 (donde B1 se refiere a monocitos, y B3 a neutrófilos) según las ecuaciones:

$$B1 = 1/[1 + e^{-[2,778512 + [(-0,000033 * RBM17) + (-0,000053 * RBM3) + (0,000047 * KHDRS1) + (-0,000006 * SRSF10) + (0,000018 * SNRNP70) + (0,000058 * U2AF2) + (-0,000004 * RNU4ATAC) + (-0,000225 * SNRNP200)]]}]$$

$$B3 = 1/[1 + e^{-[-1,276655 + [(-0,000007 * RBM17) + (0,000001 * RBM3) + (0,000003 * KHDRS1) + (-0,000004 * SRSF10) + (-0,000003 * SNRNP70) + (0,000010 * U2AF2) + (0,000001 * RNU4ATAC) + (-0,000001 * SNRNP200)]]}]$$

a3) calcular los índices C1, C2 y C3 (donde C1 se refiere a monocitos, C2 a linfocitos y C3 a neutrófilos) según las ecuaciones:

$$C1 = 1/[1 + e^{-[0,36387 + [(0,000004 * RBM17) + (0,000007 * RBM3) + (-0,000017 * KHDRS1) + (0,000024 * SRSF10) + (0,000003 * SNRNP70) + (-0,000029 * U2AF2) + (0,000000 * RNU4ATAC) + (0,000003 * SNRNP200)]]}]$$

$$C2 = 1/[1 + e^{-[2,45244 + [(-0,000002 * RBM17) + (-0,000002 * RBM3) + (0,000004 * KHDRS1) + (-0,000008 * SRSF10) + (0,000000 * SNRNP70) + (-0,000008 * U2AF2) + (-0,000001 * RNU4ATAC) + (0,000003 * SNRNP200)]]}]$$

$$C3=1/[1+e^{-[-0,280066+[(0,000012*RBM17)+(0,000045*RBM3)+(0,000017*KHDSR1)+(-0,000010*SRSF10)+(-0,000023*SNRNP70)+(-0,000060*U2AF2)+(0,000020*RNU4ATAC)+(0,000015*SNRNP200)]}]$$

a4) calcular los índices D1, D2 y D3 (donde D1 se refiere a monocitos, D2 a linfocitos y D3 a neutrófilos) según las ecuaciones:

$$D1=1/[1+e^{-[-3,722733+[(0,000015*RBM17)+(-0,000003*RBM3)+(-0,000002*KHDSR1)+(-0,000008*SRSF10)+(0,000004*SNRNP70)+(-0,000045*U2AF2)+(0,000000*RNU4ATAC)+(0,000005*SNRNP200)]}]$$

$$D2=1/[1+e^{-[-18,183604+[(0,000037*RBM17)+(0,000029*RBM3)+(0,000006*KHDSR1)+(-0,000117*SRSF10)+(0,000011*SNRNP70)+(-0,000159*U2AF2)+(0,000025*RNU4ATAC)+(-0,000028*SNRNP200)]}]$$

$$D3=1/[1+e^{-[-0,5632+[(0,000005*RBM17)+(-0,000011*RBM3)+(0,000009*KHDSR1)+(0,000004*SRSF10)+(0,000002*SNRNP70)+(-0,000001*U2AF2)+(0,000005*RNU4ATAC)+(-0,000021*SNRNP200)]}]$$

$$A1=1/(1+e^{-[-25,015204+[(0,000135*RBM17)+(0,000031*RBM3)+(-0,000007*KHDSR1)+(0,000200*SRSF10)+(0,000116*SNRNP70)+(0,000062*U2AF2)+(0,001458*RNU4ATAC)+(-0,000675*SNRNP200)]}]$$

$$A2=1/(1+e^{-[-0,12461+[(0,000003*RBM17)+(-0,000001*RBM3)+(-0,000002*KHDSR1)+(0,000003*SRSF10)+(0,000000*SNRNP70)+(0,000001*U2AF2)+(0,000031*RNU4ATAC)+(-0,000001*SNRNP200)]}]$$

$$A3=1/(1+e^{-[-1,442807+[(0,000000*RBM17)+(-0,000002*RBM3)+(-0,000001*KHDSR1)+(0,000000*SRSF10)+(0,000001*SNRNP70)+(0,000000*U2AF2)+(0,004708*RNU4ATAC)+(-0,000000*SNRNP200)]}]$$

a2) calcular los índices B1 y B3 (donde B1 se refiere a monocitos, y B3 a neutrófilos) según las ecuaciones:

$$B1=1/(1+e^{-[-2,778512+[(0,000033*RBM17)+(-0,000053*RBM3)+(0,000047*KHDSR1)+(-0,000006*SRSF10)+(0,000018*SNRNP70)+(0,000058*U2AF2)+(-0,000004*RNU4ATAC)+(-0,000225*SNRNP200)]}]$$

$$B3=1/(1+e^{-[-1,276655+[(0,000007*RBM17)+(0,000001*RBM3)+(0,000003*KHDSR1)+(-0,000004*SRSF10)+(-0,000003*SNRNP70)+(0,000010*U2AF2)+(0,000001*RNU4ATAC)+(-0,000001*SNRNP200)]}]$$

a3) calcular los índices C1, C2 y C3 (donde C1 se refiere a monocitos, C2 a linfocitos y C3 a neutrófilos) según las ecuaciones:

$$C1 = 1 / (1 + e^{-[0,36387 + [(0,000004 * RBM17) + (0,000007 * RBM3) + (-0,000017 * KHDRS1) + (0,000024 * SRSF10) + (0,000003 * SNRNP70) + (-0,000029 * U2AF2) + (0,000000 * RNU4ATAC) + (0,000003 * SNRNP200)]])}$$

$$C2 = 1 / (1 + e^{-[2,45244 + [(-0,000002 * RBM17) + (-0,000002 * RBM3) + (0,000004 * KHDRS1) + (-0,000008 * SRSF10) + (0,000000 * SNRNP70) + (-0,000008 * U2AF2) + (-0,000001 * RNU4ATAC) + (0,000003 * SNRNP200)]])}$$

$$C3 = 1 / (1 + e^{-[-0,280066 + [(-0,000012 * RBM17) + (0,000045 * RBM3) + (0,000017 * KHDRS1) + (-0,000010 * SRSF10) + (-0,000023 * SNRNP70) + (-0,000060 * U2AF2) + (0,000020 * RNU4ATAC) + (0,000015 * SNRNP200)]])}$$

a4) calcular los índices D1, D2 y D3 (donde D1 se refiere a monocitos, D2 a linfocitos y D3 a neutrófilos) según las ecuaciones:

$$D1 = 1 / (1 + e^{-[3,722733 + [(0,000015 * RBM17) + (-0,000003 * RBM3) + (-0,000002 * KHDRS1) + (-0,000008 * SRSF10) + (0,000004 * SNRNP70) + (-0,000045 * U2AF2) + (0,000000 * RNU4ATAC) + (0,000005 * SNRNP200)]])}$$

$$D2 = 1 / (1 + e^{-[18,183604 + [(0,000037 * RBM17) + (0,000029 * RBM3) + (0,000006 * KHDRS1) + (-0,000117 * SRSF10) + (0,000011 * SNRNP70) + (-0,000159 * U2AF2) + (0,000025 * RNU4ATAC) + (-0,000028 * SNRNP200)]])}$$

$$D3 = 1 / (1 + e^{-[0,5632 + [(0,000005 * RBM17) + (-0,000011 * RBM3) + (0,000009 * KHDRS1) + (0,000004 * SRSF10) + (0,000002 * SNRNP70) + (-0,000001 * U2AF2) + (0,000005 * RNU4ATAC) + (-0,000021 * SNRNP200)]])}$$

Asignando en cada ecuación los valores de los biomarcadores correspondientes obtenidos en el paso (a).

4.- Un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento pacientes con AR, que comprende los pasos (a) y (c) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

d1) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con artritis reumatoide cuando el valor del índice A1 del paso (a1) sea preferiblemente menor que 0,0000015, preferiblemente menor que 0,000015, y aún más preferiblemente menor que 0,5; cuando el valor del índice A2 del paso (a1) sea preferiblemente menor que 0,8438, preferiblemente menor que 0,9035, y aún más preferiblemente menor que 0,9271; cuando el valor del índice A3 del paso (a1) sea

preferiblemente menor que 0,6872, preferiblemente menor que 0,6954 y aún más preferiblemente menor que 0,7005.

5.- El método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento pacientes con AR según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, que además comprende:

5
d2) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con AR con alta actividad de la enfermedad cuando el valor del índice B1 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,1717, preferiblemente menor que 0,1887, y aún más preferiblemente menor que 0,3754; cuando el valor del índice B3 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,2045, preferiblemente menor
10 que 0,2178, y aún más preferiblemente menor que 0,227.

6.- El método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento pacientes con AR según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, que además comprende:

15 d3) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con AR y placas de ateroma cuando el valor del índice C1 del paso (a3) sea preferiblemente menor que 0,4869, preferiblemente menor que 0,4981, y aún más preferiblemente menor que 0,503; cuando el valor del índice C2 del paso (a3) sea preferiblemente menor que 0,6625, preferiblemente menor que 0,7087, y aun más preferiblemente menor que 0,7433; cuando el valor del índice C3 del paso
20 (a3) sea preferiblemente menor que 0,2623, preferiblemente menor que 0,279 y aún más preferiblemente menor que 0,4028.

7.- El método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento pacientes con AR según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, que además comprende:

25 d4) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con AR y afectación radiológica cuando el valor del índice D1 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,5384, preferiblemente menor que 0,6139, y aún más preferiblemente menor que 0,664; cuando el valor del índice D2 del paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,5; cuando el valor del índice D3 del
30 paso (a2) sea preferiblemente menor que 0,4021, preferiblemente menor que 0,467 y aún más preferiblemente menor que 0,5061.

8.- Un método de seguimiento de la evolución de una enfermedad autoinmune, preferiblemente artritis reumatoide, que comprende los pasos (a) y (c) del método según cualquiera de las
35 reivindicaciones 2-7, y además comprende:

d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-8, donde los pasos (a), (b) (c) y/o (d) pueden ser total o parcialmente automatizados y/o computerizados.

10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-7, donde la muestra biológica es sangre periférica.

5 11.- Un kit o dispositivo que comprende los elementos y/o reactivos necesarios para cuantificar los niveles del producto de expresión de los genes

I) *TCERG1, ESRP1, RBM17, RBM3, RBM45, KHDRS1, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF9, SRSF10, TIA1, TRA2A, SNRNP70, RNU12, U2AF1, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200, RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones en monocitos,

10 II) *TCERG1, ESRP2, NOVA1, PRPF8, PTBP1, RBM17, RBM3, KHDRS1, SF3BTV1, SRSF4, SRSF6, SRSF10, TIA1, SNRNP70, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200*, o cualquiera de su combinaciones en linfocitos, y de

15 III) *CELF1, FBP11, NOVA1, PRPF8, PTBP1, RAVR1, RBM17, RBM22, RBM3, KHDRS1, SF3BTV1, SF3BTV2, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF9, SRSF10, TIA1, TRA2A, TRA2B, SNRNP70, RNU11, UA2F2, RNU4ATAC, SNRNP200, RNU6-1*, o cualquiera de sus combinaciones, en neutrófilos.

12.- El kit o dispositivo según la reivindicaciones anterior, donde se cuantifican los niveles de expresión de *RBM17, RBM3, KHDRS1, SRSF10, SNRNP70, UA2F2, RNU4ATAC y/o SNRNP200*, o cualquiera de sus combinaciones, y preferiblemente se cuantifican dichos niveles de expresión simultáneamente.

13.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior que comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión de *RBM17, RBM3, KHDRS1, SRSF10, SNRNP70, UA2F2, RNU4ATAC y/o SNRNP200*, y donde:

25 - los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 y/o SEQ ID NO: 43.

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 150 y

500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más 25 preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 y/o SEQ ID NO: 43.

14.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 10-11 que comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión de todos los biomarcadores de la invención, y donde

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a las secuencias de la tabla 2.

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 150 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más 25 preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a las secuencias de la tabla 2.

15.- El uso kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 10-13 para la detección, diagnóstico, pronóstico, clasificación y seguimiento de pacientes que padecen artritis reumatoide.

Figuras

Fig. 1

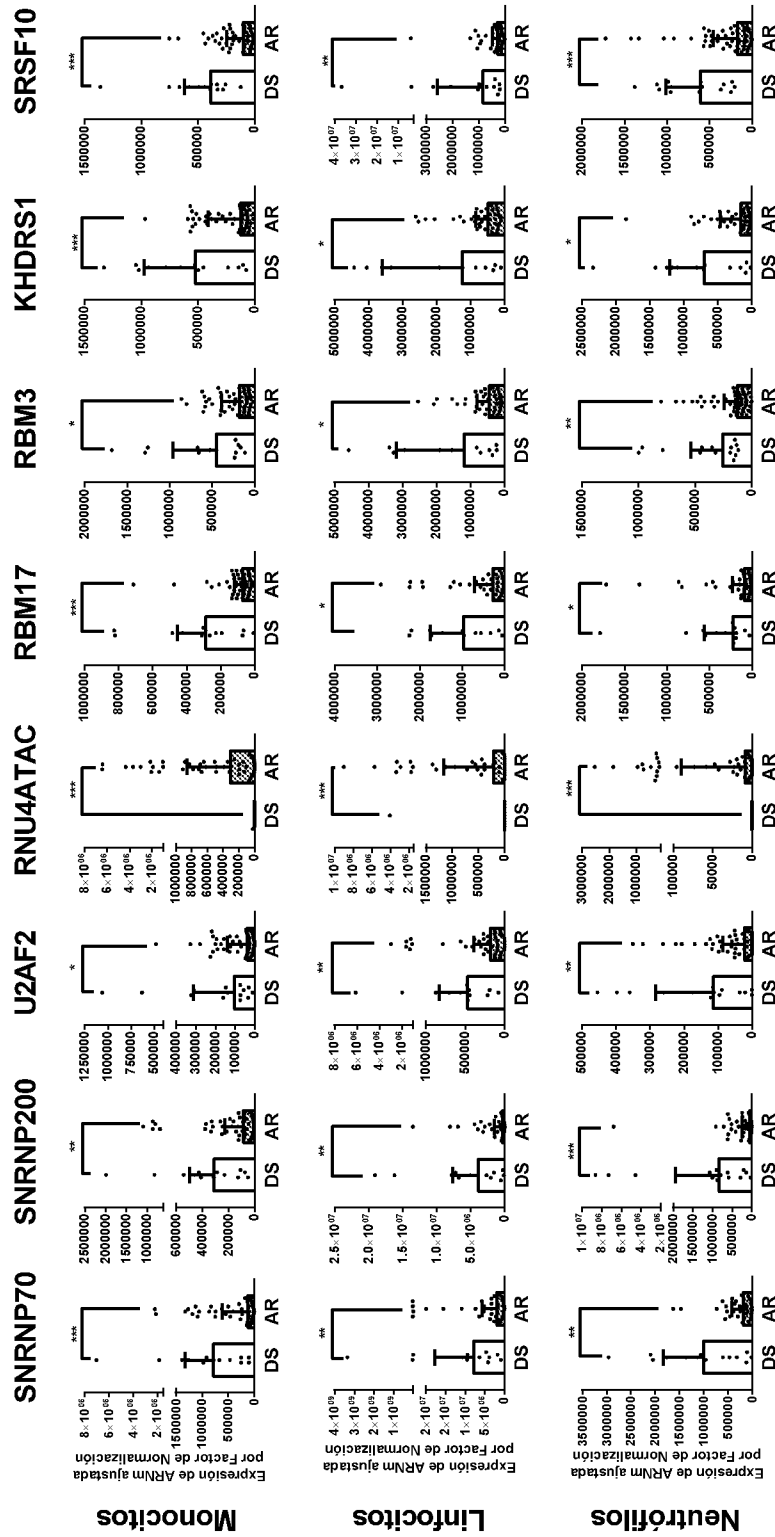


Fig. 2

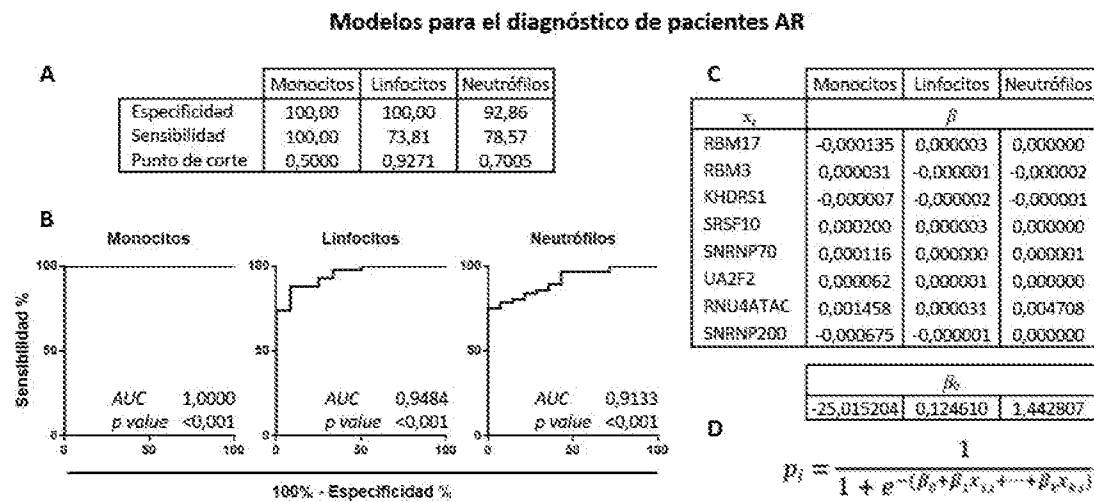


Fig. 3

Modelos para la identificación de pacientes AR con alta actividad de la enfermedad

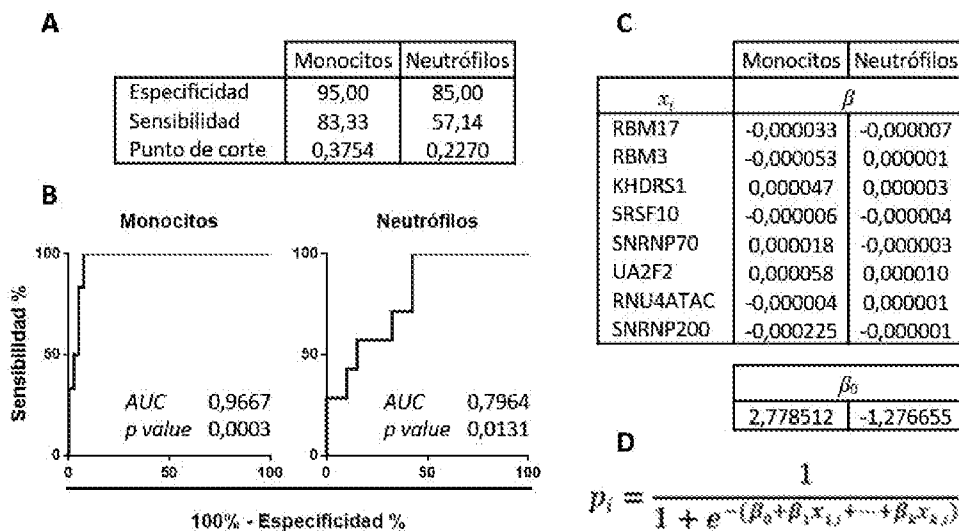


Fig. 4

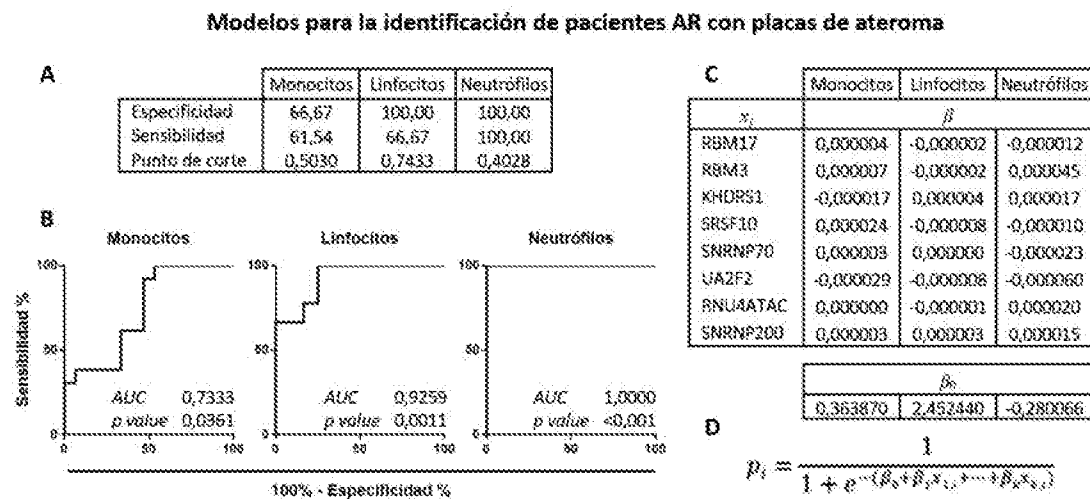
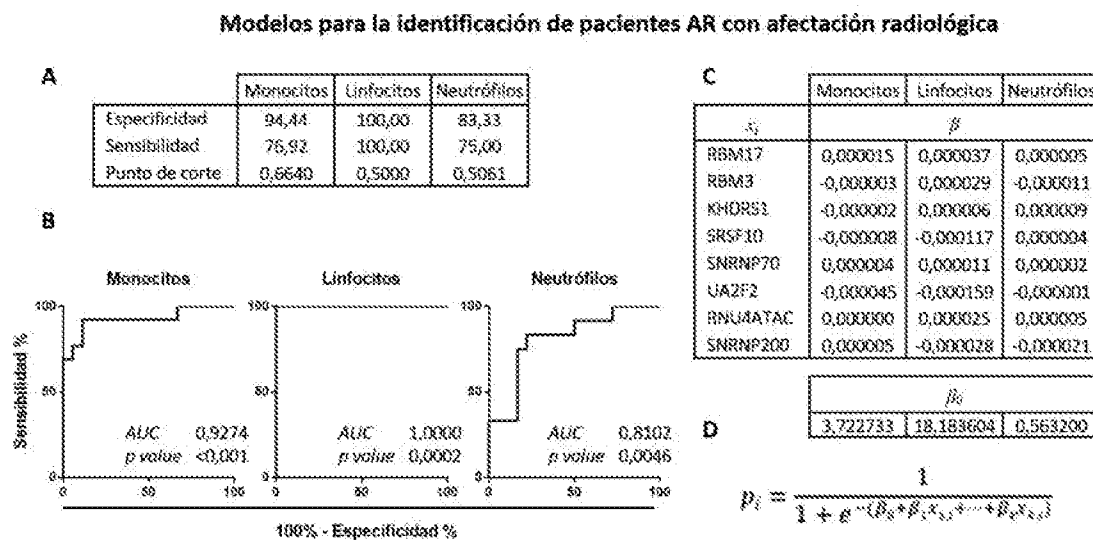


Fig. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/48 (2006.01)

C12Q1/68 (2018.01)

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)

G01N, 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, TXTE, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL ALL, STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IBÁÑES-COSTA et al.. THU0060 Alterations of splicing in leukocytes from rheumatoid arthritis patients and its influence on the autoimmune, inflammatory and atherothrombotic profile of the disease potential role of u4atac. 14/06/2018 "Results".	1-13, 15
A	RUIZ-LIMÓN P. et al.. Alterations of spliceosome components in leukocytes from patients with rheumatoid arthritis influence their autoimmune and inflammatory profile, and the development of cardiovascular disease.. 2017 The whole document.	1-13, 15
A	US 2007/0148676 A1 (KACHALSKY ET AL) 28/06/2007, The whole document.	1-13, 15.

☒ 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
20/07/2020

Date of mailing of the international search report
(21/07/2020)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. García Bueno

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

Telephone No. 91 3497000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070107

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Following the sending to the applicant of form PCT/ISA/225, relating to the sequence listing, the nucleotide and/or amino acid sequence listing disclosed in the international application has not been furnished.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070107

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims shall not, except where absolutely necessary, rely on references to the description or drawings (PCT Rule 6.2(a)).

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070107

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CLANCY, KATHLEEN W.; WEERAPANA, ERANTHIE; THOMPSON, PAUL R. Detection and identification of protein citrullination in complex biological systems.. Current Opinion In Chemical Biology, 2016, Vol. 30, pages 1-6 The whole document.	1-13, 15.
E,X	WO 2020/053467 A1 (SERVICIO ANDALUZ DE SALUD Y UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA) 19/03/2020 The whole document.	1-13, 15
P,X	IBAÑEZ-COSTA, ALEJANDRO et al.. OP0292 THE HELPFUL EIGHT: KEY SPLICING MACHINERY ELEMENTS IN LEUKOCYTE SUBSETS MAY IMPROVE THE TYPIFICATION OF THE DISEASE IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS. 14/06/2019 The whole document.	1-13, 15.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2020/070107

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2020053467 A1	19.03.2020	NONE	
-----	-----	-----	-----
US2007148676 A1	28.06.2007	WO2005118403 A2	15.12.2005
		WO2005118403 A3	23.04.2009
		EP1758792 A2	07.03.2007
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070107

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/48 (2006.01)

C12Q1/68 (2018.01)

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)

G01N, 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, TXTE, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL ALL, STN

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	IBÁÑEZ-COSTA et al.. THU0060 Alterations of splicing in leukocytes from rheumatoid arthritis patients and its influence on the autoimmune, inflammatory and atherothrombotic profile of the disease potential role of u4atac. 14/06/2018 Apartado "Resultados".	1-13, 15
A	RUIZ-LIMÓN P. et al.. Alterations of spliceosome components in leukocytes from patients with rheumatoid arthritis influence their autoimmune and inflammatory profile, and the development of cardiovascular disease. 2017 Todo el documento.	1-13, 15
A	US 2007/0148676 A1 (KACHALSKY ET AL) 28/06/2007, Todo el documento.	1-13, 15.

☒ 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.
20/07/2020

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
21 de julio de 2020 (21/07/2020)

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
M. García Bueno
Nº de teléfono 91 3497000

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2020/070107

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones n°s: 14
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
Las reivindicaciones no deben fundarse en referencias a la descripción o a los dibujos salvo que sea absolutamente necesario (Regla 6.2 a) PCT).
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070107

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	CLANCY, KATHLEEN W.; WEERAPANA, ERANTHIE; THOMPSON, PAUL R. Detection and identification of protein citrullination in complex biological systems.. Current Opinion In Chemical Biology, 2016, Vol. 30, páginas 1-6 Todo el documento.	1-13, 15.
E,X	WO 2020/053467 A1 (SERVICIO ANDALUZ DE SALUD Y UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA) 19/03/2020, Todo el documento.	1-13, 15
P,X	IBAÑEZ-COSTA, ALEJANDRO et al.. OP0292 THE HELPFUL EIGHT: KEY SPLICING MACHINERY ELEMENTS IN LEUKOCYTE SUBSETS MAY IMPROVE THE TYPIFICATION OF THE DISEASE IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS. . 14/06/2019 Todo el documento.	1-13, 15.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070107

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2020053467 A1	19.03.2020	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
US2007148676 A1	28.06.2007	WO2005118403 A2	15.12.2005
		WO2005118403 A3	23.04.2009
		EP1758792 A2	07.03.2007
-----	-----	-----	-----