

(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
06 de agosto de 2020 (06.08.2020)



(10) Número de publicación internacional
WO 2020/157357 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C12Q 1/68 (2018.01) *A61K 35/74* (2015.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2020/070059

(22) Fecha de presentación internacional:
28 de enero de 2020 (28.01.2020)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201930063 28 de enero de 2019 (28.01.2019) ES

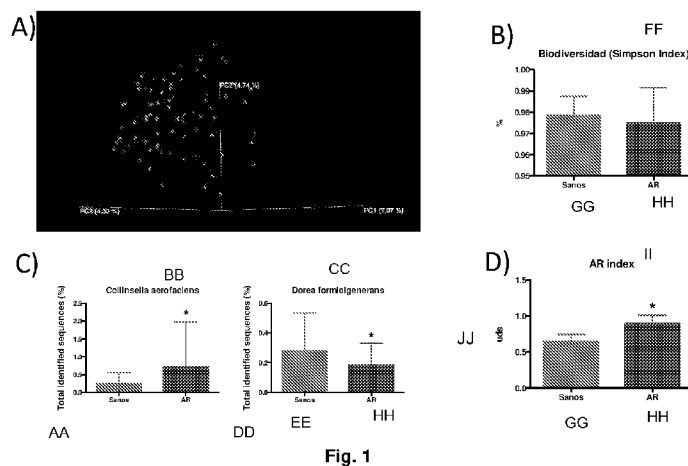
(71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 SEVILLA (ES). **UNIVERSIDAD DE MÁLAGA** [ES/ES]; Plaza de El Ejido s/n, 29013 MÁLAGA (ES). **CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED,**

M.P. [ES/ES]; Monforte de Lemos,5, Pabellón 1, 28029 MADRID (ES).

(72) Inventores: **TINAHONES MADUEÑO, Francisco José**; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Calle Dr. Miguel Díaz Recio, 28, 29010 MÁLAGA (ES). **FERNÁNDEZ NEBRO, Antonio**; UNIVERSIDAD DE MALAGA, Plaza de El Ejido s/n, 29013 MÁLAGA (ES). **MENA VÁZQUEZ, Natalia**; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Calle Dr. Miguel Díaz Recio, 28, 29010 MÁLAGA (ES). **MANRIQUE ARIJA, Sara**; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Calle Dr. Miguel Díaz Recio, 28, 29010 MÁLAGA (ES). **MORENO INDIAS, Isabel**; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Calle Dr. Miguel Díaz Recio, 28, 29010 MÁLAGA (ES). **RUIZ LIMÓN, Patricia**; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Calle Dr. Miguel Díaz Recio, 28, 29010 MÁLAGA (ES). **SÁNCHEZ ALCOHOLADO, Lidia**; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Calle Dr. Mi-

(54) Title: METHOD FOR THE PREDICTION OR PROGNOSIS OF DEVELOPING RHEUMATOID ARTHRITIS

(54) Título: MÉTODO PARA PREDECIR O PRONOSTICAR EL DESARROLLO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE



FF Biodiversity (Simpson Index)
GG, EE Healthy
HH RA
BB Collinsella Aerofaciens
AA, DD Total Identified Sequences (%)
CC Dorea Formicigenerans
II RA Index
JJ U

(57) Abstract: Method for the prediction or prognosis of developing rheumatoid arthritis; Method for predicting or prognosing the probability of an individual of suffering diseases related to the immune system, and preferably related to the development of rheumatoid arthritis; diagnostic kit or device and uses thereof.

(57) Resumen: Método para predecir o pronosticar el desarrollo de la artritis reumatoide Método para predecir o pronosticar la probabilidad de un individuo de padecer enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, y preferiblemente con el desarrollo de artritis reumatoide, kit o dispositivo de diagnóstico y usos.

[Continúa en la página siguiente]

guel Díaz Recio, 28, 29010 MÁLAGA (ES). **GUTIÉRREZ REPISO, Carolina**; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Calle Dr. Miguel Díaz Recio, 28, 29010 MÁLAGA (ES).

(74) **Mandatario: CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel** et al.; C/ Suero de Quiñones, 34-36, 28002 MADRID (ES).

(81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))

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))

**MÉTODO PARA PREDECIR O PRONOSTICAR EL DESARROLLO DE LA
ARTRITIS REUMATOIDE**

DESCRIPCIÓN

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina, la microbiología
10 y la nutrición, y específicamente se refiere a un método para predecir o pronosticar la
probabilidad de un individuo de padecer enfermedades relacionadas con el sistema
inmunitario, y preferiblemente con el desarrollo de artritis reumatoide.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria sistémica crónica de
naturaleza autoinmune que causa daño articular, discapacidad y deterioro de la
calidad de vida y una disminución de la esperanza de vida. La mayoría de las muertes
20 suceden por causas cardiovasculares, pulmonares e infecciosas. Estos graves
desenlaces se asocian con unos elevados costes sanitarios, sociales y personales.
Además, provoca elevados costes para la sociedad y se asocia con una elevada
mortalidad cardiovascular y pulmonar o por infecciones. La AR afecta a unas 240.000
personas en España y cada año se diagnostican 20.000 nuevos casos.

25

Aunque se desconoce la etiología precisa de la AR, el paradigma actual es que los
individuos genéticamente predispuestos progresan por al menos 6 fases evolutivas,
tanto preclínicas como clínicas, antes de que la AR esté plenamente establecida (1).
Se piensa que esta transición es en parte fruto de interacciones entre factores
30 genéticos y ambientales.

Se cree que primero se produce una pérdida de la tolerancia inmune local en lugares
distantes a las articulaciones, que se propaga a otros sistemas. Los lugares donde
más probablemente este proceso se inicia son las superficies mucosas donde se
35 ubican la microbiota y una gran cantidad de células inmunitarias.

La microbiota comensal y patógena, y sus metabolitos, podrían producir además cambios epigenéticos en sus comensales por muchos mecanismos poco conocidos. El presente proyecto trata de estudiar las relaciones entre microbiota intestinal y epigenética en el desarrollo de la AR. Sin embargo aún son necesarios más estudios y profundos sobre cómo la microbiota influye en la patogénesis y progresión de la AR.

La AR es una enfermedad sistémica que afecta siempre a las articulaciones, sobre todo de manos y pies. En las articulaciones, la inflamación de las membranas sinoviales da lugar al desarrollo de erosiones óseas que deterioran la funcionalidad de las articulaciones y discapacitan a los pacientes. Aproximadamente el 60-90% de los pacientes siguen un curso evolutivos destructivo con rápido deterioro físico. Hasta el 25% de los pacientes con AR tendrán erosión ósea en los primeros meses, pero los tres años posteriores al diagnóstico, presentan erosiones hasta el 70% o más de los pacientes. En los primeros 10 años posteriores al diagnóstico, cerca del 50% de los pacientes deberán dejar de trabajar, y la AR se convierte en un desafío abrumador debido a las cargas físicas, emocionales y financieras causadas por la enfermedad (Fischer, 2011).

El pronóstico de la enfermedad depende de las comorbilidades del paciente en la presentación y de la presencia de factores pronósticos. Los pacientes factores asociados a mayor discapacidad, mortalidad y falta de respuesta a los tratamientos incluyen la presencia de títulos altos de autoanticuerpos contra el factor reumatoide (RF) o péptido cíclico citrulinado (PCC), tabaquismo, número elevado de articulaciones afectadas, reactantes de fase aguda elevados, aparición precoz de erosiones articulares y discapacidad inicial (Fischer, 2011; Scott et al., 2010). En la tabla 2 se muestran otros factores. Dado que el uso de agentes biológicos previene la enfermedad ósea erosiva, es importante administrarlos tempranamente en el curso de la enfermedad, durante la llamada "ventana de oportunidad", cuando la inflamación es una característica prominente de la AR.

A pesar de los muchos avances tanto en nuestra comprensión como en el tratamiento de la AR, sigue siendo en gran medida incurable y sus causas son aún desconocidas. La enfermedad puede llevar a mortalidad prematura, discapacidad y disminución de la calidad de vida (Brooks, 2006; CDC, 2015).

La Tabla 1 presenta los criterios diagnósticos de ACR/EULAR 2010 (American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism) para la AR. Los pacientes

son diagnosticados con AR si presentan al menos cuatro de los siete criterios durante al menos 6 semanas según criterios de ACR 1987 (Arnett et al., 1988). Los nuevos criterios ACR /EULAR 2010 para el diagnóstico de artritis reumatoide presentan una mayor sensibilidad permitiendo un diagnóstico más precoz (Aletaha et al., 2010) que con los antiguos de la ACR de 1987.

Tabla 1: Criterios diagnósticos ACR 2010 para la AR

<u>Población diana:</u>	
1.Sinovitis en al menos 1 articulación	
2. Sinovitis no explicada por otra enfermedad	
Se precisa un índice $\geq 6/10$ para clasificación de AR definida:	
<u>Afectación articular</u>	Puntuación
1 articulación grande	0
2-10 articulaciones grandes	1
1-3 articulaciones pequeñas	2
4-10 articulaciones pequeñas	3
≥ 10 articulaciones	5
<u>Serología</u>	
FR y anti-CCP negativos	0
FR y anti-CCP positivo a título bajo	2
FR y anti-CCP positivo a título alto	3
<u>Reactantes de fase aguda</u>	
PCR y VSG normal	0
PCR y VSG elevado	1
<u>Duración de los síntomas</u>	
<6 semanas	0
>6 semanas	1

La artritis reumatoide puede ser difícil de diagnosticar en sus primeras etapas debido a que los primeros signos y síntomas imitan a los de muchas otras enfermedades. No hay un análisis de sangre o un hallazgo físico para confirmar el diagnóstico. Durante el

examen físico, el médico revisa las articulaciones en busca de hinchazón, enrojecimiento y calor. También puede revisar sus reflejos y la fuerza muscular.

Análisis de sangre

- 5 Las personas con artritis reumatoide a menudo tienen una tasa elevada de la velocidad de sedimentación globular (VSG o ESR, del inglés *erythrocyte sedimentation rate* -) o proteína C reactiva (PCR), que puede indicar la presencia de un proceso inflamatorio en el cuerpo. Otros análisis de sangre comunes buscan anticuerpos contra el factor reumatoide y anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (ACPAs).

10

Pruebas de imagen

Radiografías para ayudar a rastrear la progresión de la artritis reumatoide en las articulaciones con el tiempo. Las pruebas como la ecografía y la RMN pueden ayudar al diagnóstico precoz y monitorización de la enfermedad.

15

Tratamiento

No hay cura para la artritis reumatoide. Pero los descubrimientos recientes indican que la remisión de los síntomas es más probable cuando el tratamiento comienza temprano con medicamentos fuertes conocidos como medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD, por sus siglas en inglés).

20

Medicamentos

Dependerán de la gravedad de sus síntomas y de cuánto tiempo haya tenido artritis reumatoide.

25

- AINEs. Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) pueden aliviar el dolor y reducir la inflamación. Los AINE de venta libre incluyen ibuprofeno y naproxeno sódico. Los AINE más fuertes están disponibles con receta médica. Los efectos secundarios pueden incluir zumbidos en los oídos, irritación estomacal, problemas cardíacos y daño hepático y renal.

30

- Esteroides Los medicamentos corticosteroides, como la prednisona, reducen la inflamación y el dolor y retardan el daño articular. Los efectos secundarios pueden incluir adelgazamiento de los huesos, aumento de peso y diabetes. Los médicos a menudo recetan un corticosteroide para aliviar los síntomas agudos, con el objetivo de disminuir gradualmente la medicación.

35

- Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME). Estos se clasifican de acuerdo con la manera de producirlos en sintéticos (FAMEs), cuya producción es mediante síntesis química tradicional y en FAME biológicos

(FAMEb) que se producen empleando células vivas, de modo similar al de las vacunas. Los FAMEs, a su vez, se dividen en convencionales también llamados tradicionales o clásicos (FAMEsc) y dirigidos específicamente a una diana (FAMEsd). Los primeros no tienen una diana específica, su mecanismo de acción es muy heterogéneo, actuando en diferentes niveles del sistema inmune como inmunosupresores, inmunomoduladores o de otro tipo. Los FAMEsd tienen como mecanismo de acción el bloqueo de moléculas que se encargan de la señalización intracelular. Estos fármacos han demostrado ser eficaces en el control de la actividad de la enfermedad, la función física, calidad de vida y progresión radiológica de la enfermedad

- Entre los FAMEsc se incluyen metotrexato, leflunomida, hidroxicloroquina y sulfasalazina.

Los efectos secundarios varían, pero pueden incluir daño hepático, supresión de la médula ósea e infecciones pulmonares graves.

- Los FAMEb utilizados en la AR incluye abatacept, adalimumab, anakinra, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab, rituximab y tocilizumab. Entre los FAMEsd encontramos tofacitinib y baricitinib.

Estos medicamentos pueden atacar partes del sistema inmunológico que desencadenan una inflamación que causa daños en las articulaciones y los tejidos. Estos tipos de medicamentos también aumentan el riesgo de infecciones.

Los DMARDs biológicos suelen ser más efectivos cuando se combinan con un DMARDs no biológico, como el metotrexato.

Terapia física u ocupacional, mediante ejercicios para ayudar a mantener las articulaciones flexibles.

Cirugía

Si los medicamentos no previenen o retrasan el daño articular, se puede considerar una cirugía para reparar las articulaciones dañadas. También puede reducir el dolor y corregir deformidades.

La cirugía conlleva un riesgo de sangrado, infección y dolor.

En España, de acuerdo con Carbonell et al., 2008, la sospecha de artritis temprana se definió como cualquier paciente que se presente por primera vez en el último medio año con uno o más de los siguientes síntomas:

- (i) más de una articulación inflamada;

- (ii) dolor en las articulaciones meta-carpofalángeas o meta-tarsofalángeas; y
- (iii) rigidez matutina actual en las manos durante más de 30 minutos.

En el momento actual no existen métodos de diagnóstico que detecten de manera temprana la enfermedad. La detección temprana puede evitar la enfermedad ósea erosiva, por lo que es necesario el desarrollo de métodos de detección temprana de la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. A) Beta diversidad. Según análisis de similitud (ANOSIM) los pacientes con AR (azul) tienden ($P=0,07$) a diferir con los sujetos sanos(rojo) de acuerdo a su microbiota. **B)** En cuanto a la biodiversidad (medida por el índice Simpson), los pacientes AR parecen mostrar una biodiversidad menor, aunque de manera no significativa ($P>0.05$). **C)** Atendiendo a la composición microbiana, se ha encontrado un dato interesante a nivel de especie: la especie *Collinsella aerofaciens* se encuentra significativamente ($P=0,034$) incrementada en los pacientes AR, mientras que *Doreaformicigenerans* se encuentra decrecida ($P=0,041$). **D)** Se ha calculado con las especies anteriores un índice de AR atendiendo al $\log(\text{abundancia especies incrementadas AR})/\log(\text{abundancia especies disminuidas AR})$, encontrándose incrementado en los pacientes AR.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han identificado que grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal pueden emplearse para el diagnóstico temprano, y/o para predecir o pronosticar el riesgo de un individuo de padecer una enfermedad inflamatoria autoinmune, y más preferiblemente una enfermedad inflamatoria sistémica crónica como la AR.

Los resultados de los ensayos realizado mostraron un aumento significativo de la bacteria *Collinsella aerofaciens* en pacientes AR respecto a donantes sanos. Además, se observó un aumento en la acción de la arginina deiminasa, que pertenecía aproximadamente en un 90% a los genes de AR del género *Collinsella*. La importancia de la enzima arginina deiminasa es que cataliza una reacción en la que el sustrato arginina dará lugar a citrulina entre otros productos. En la AR los autoanticuerpos más

específicos son los anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (ACPAs) que se dirigen contra péptidos y proteínas citrulinados. Por tanto, la alteración de *Collinselaerofaciens* podría influir significativamente, mediante mecanismos enzimáticos, en la perpetuación de la autoinmunidad de la enfermedad.

5

Asimismo, los resultados revelaron un descenso significativo de *Dorea formicigenerans* en pacientes AR respecto a donantes sanos. Los niveles de abundancia de *Dorea formicigenerans* se correlacionaron significativamente con el grado de actividad inflamatoria articular medida por diversos índices de actividad, como el índice simplificado de la actividad de la enfermedad (SDAI) o el índice clínico de actividad de la enfermedad (CDAI), así como con el grado de deterioro de la función física mediado por Health Assessment Questionnaire (HAQ).

10

Estos microorganismos pueden actuar como biomarcadores para la enfermedad de la AR, los cuales nos permitan diferenciar la gravedad o grado de actividad de la enfermedad, y ser utilizados en la práctica clínica con el fin de predecir el pronóstico de estos pacientes e incluso mejorar el diagnóstico de los mismos, ya que actualmente los métodos de diagnóstico no son suficientes para hacer una detección precoz de la AR y evitar daños irreversibles.

20

A largo plazo estos resultados podrían sugerir nuevas dianas terapéuticas para la AR que frenaran la actividad inflamatoria de esta patología y supongan una mejora coste-efectividad para el sistema de sanidad y la población en general.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la evolución de la enfermedad autoinmune inflamatoria crónica, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica de dicho individuo, y
- b) determinar los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal en la muestra aislada del paso (a).

30

Más preferiblemente, la enfermedad inflamatoria crónica es la AR.

La determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del paso (b) se puede realizar mediante cualquier procedimiento conocido en el estado del arte.

35

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del paso (b) se realiza mediante PCR. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del paso (b) además comprende técnicas de pirosecuenciación o secuenciación masiva.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del paso (b) comprende una Electroforesis en Gel Desnaturalizante en Gradiente (DGGE).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del paso (b) se realiza mediante anticuerpos, preferiblemente fluorescentes. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del paso (b) se realiza mediante técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el paso (b) además comprende la medición de la actividad microbiana de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal. Preferiblemente, la actividad microbiana se mide, aunque sin limitarnos, mediante radioisótopos, microelectrodos e/o isótopos estables.

Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada son heces fecales o procede de heces fecales.

En esta memoria se entiende por “grupo taxonómico” al grupo de microorganismos clasificados en una determinada categoría taxonómica. Normalmente un grupo taxonómico que clasifique a unos microorganismos abarca uno o varios grupos menores, subordinados al mayor. Una categoría taxonómica constituye un grupo de clasificación. Los rangos o categorías taxonómicas normalmente usados en taxonomía son: Dominio, Reino, Filo o División, Clase, Orden, Familia, Género, Especie.

En esta memoria se entiende por “enfermedad autoinmune inflamatoria crónica” a aquellas enfermedades mediadas por el sistema inmune, incluyendo la artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmunes (Hashimoto y Graves), diabetes mellitus tipo 1 y enfermedad
5 inflamatoria intestinal.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método para predecir o pronosticar el riesgo de un individuo de padecer una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica, de ahora en adelante segundo método de la invención, que
10 comprende los pasos (a) y (b) del primer método de la invención, y además comprende:

c) clasificar al individuo del paso (a), en el grupo de individuos con una probabilidad al menos 2 veces mayor, preferiblemente 2,5 veces mayor, y más preferiblemente 3 veces mayor, de padecer una enfermedad inflamatoria crónica, si presenta un
15 porcentaje de *Collinsella*, y más preferiblemente *Collinsella aerofaciens* al menos 2 veces superior, preferiblemente 2,5 veces superior, y más preferiblemente 3 veces superior al porcentaje de referencia.

siendo el porcentaje de referencia el de un individuo (o los valores medios de un grupo de individuos) que no ha sido diagnosticado de una enfermedad inflamatoria crónica.

Preferiblemente, la muestra biológica aislada del intestino del individuo es una muestra de heces. Más preferiblemente, la enfermedad inflamatoria crónica es la AR.

La determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del
25 paso (b) se puede realizar mediante cualquier procedimiento conocido en el estado del arte.

Así, se puede realizar mediante técnicas de identificación de ácidos nucleicos, técnicas inmunológicas o técnicas que midan la actividad microbiana.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del paso (b) se realiza mediante técnicas de identificación de ácidos nucleicos, y más preferiblemente mediante técnicas de PCR. En otra realización preferida de este aspecto de la
35 invención, la determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del paso (b) además comprende técnicas de pirosecuenciación o secuenciación masiva.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del paso (b) comprende una Electroforesis en Gel Desnaturalizante en Gradiente (DGGE).

5

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del paso (b) se realiza mediante técnicas inmunológicas, y más preferiblemente mediante anticuerpos, preferiblemente fluorescentes. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal del paso (b) se realiza mediante técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

10

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el paso (b) además comprende la medición de la actividad microbiana de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal. Preferiblemente, la actividad microbiana se mide, aunque sin limitarnos, mediante radioisótopos, microelectrodos e/o isótopos estables.

15

Los pasos (b) y/o (c), del método descrito anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la presencia en el paso (b) o la clasificación computarizada en el paso (c).

20

Collinsella aerofaciens pertenece al género *Collinsella*, familia *Coriobacteriaceae*, orden *Coriobacteriales*, clase *Coriobacteriia*, Phylum *Actinobacteria*, grupo *Terrabacteria*, Superreino *Bacteria*.

25

El término “individuo”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término “individuo” en esta memoria, es sinónimo de “paciente”, y no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

30

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para identificar los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal en una muestra aislada.

35

En una realización preferida, el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de identificar los grupos taxonómicos mediante la caracterización de la región 16S del ARNr.

- 5 En una realización preferida el kit o dispositivo de la invención comprende los cebadores para amplificar regiones variables del gen del ARNr 16S. Ion-adaptadores se incluyeron en el cebador directo seguido de un identificador específico Multiplex.

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

- En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit puede contener oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida del 16S ARNr de los microorganismos de la microbiota, y/o capaces de hibridar con la secuencia de dichos genes para posterior amplificación por PCR. Preferiblemente los cebadores comprenden las secuencias SEQ ID NO: 1 (cebador AERO-F) (5'-CTTTCAGCAGGGAAGAGTCAA-3') y SEQ ID NO: 2 (cebador AERO-R) (5'-AGCCATGCACCACTGT- ATGG-3'), de acuerdo a Kageyama et al, 2000 (FEMS Microbiology Letters, 183: 43-47).
- 15
- 20

- En una realización particular el programa de PCR fue creado como sigue 95° C 10 min y 30 ciclos de 95°C 30seg, 58°C 30seg, 20 seg 72°C seguido por 72°C durante 7 minutos. Después de la electroforesis en gel de agarosa, los productos PCR fueron purificados dos veces utilizando Kit AgencourtAMPure (BeckmanCoulter, Milano, Italia) y se cuantificó utilizando el kit Qubit TM dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisherScientific) y una mezcla equimolar se obtuvo antes de la su posterior procesamiento y secuenciación en una plataforma Ion S5 de acuerdo con los protocolos del fabricante (ThermoFisherScientific, MA, USA).
- 25
- 30

- En otra realización preferida, el kit o dispositivo de la invención además comprende los elementos necesarios para realizar una secuenciación masiva. Preferiblemente, 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 digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.
- 35

El kit de la invención puede incluir controles positivos y/o negativos. El kit además puede contener, 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.

Es también posible que el(los) oligonucleótido(s) estén inmovilizados en manchas sobre una superficie (preferiblemente sólida). En una de sus realizaciones, el kit comprende una micromatriz, o micromatriz de la invención. Una micromatriz de ARN es una matriz sobre un sustrato sólido (normalmente un porta de vidrio o una celda de una película fina de silicio) que evalúa grandes cantidades de diferentes ARN que son detectables mediante sondas específicas inmovilizadas sobre manchas sobre un sustrato sólido. Cada mancha contiene una secuencia específica de ácido nucleico, normalmente una secuencia de ADN, como sondas (o indicadores). Aunque el número de manchas no está limitado de manera alguna, existe una realización preferida en la que la micromatriz se personaliza para los procedimientos de la invención. En una realización, dicha matriz personalizada comprende cincuenta manchas o menos, tal como treinta manchas o menos, incluyendo veinte manchas o menos. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una micromatriz que comprende oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm de los genes, y/o capaces de hibridar con la secuencias de los genes.

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 sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo foto lábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una foto máscara. La foto máscara 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 30 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.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención para predecir o pronosticar la evolución de una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica.

En una realización preferida, la enfermedad inflamatoria crónica es la AR.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende bacterias del género *Dorea*. Más preferiblemente la composición de la invención comprende bacterias de la especie *Dorea formicigenerans*.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición es una composición farmacéutica. Más preferiblemente la composición además comprende un transportador o carrier farmacéuticamente aceptable, un excipiente o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas que comprenden microorganismos.

En otra realización preferida de la invención, la composición además comprende otro principio activo.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o

prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

5

Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende la composición de la invención.

- 10 En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

15 En otra realización preferida de la presente invención, las composiciones y formas farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinilpirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio. Otras formas farmacéuticas pueden ser los sistemas coloidales, dentro de los cuales se incluyen nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas poliméricas.

25

Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

- 30 Las composiciones y formas farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

- 35 Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

La administración de las composiciones o formas farmacéuticas de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado y las vías oral o
5 tópica. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el
10 peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

15 Las composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

20 Otro **aspecto** de la invención se refiere a la composición de la invención para su uso como medicamento.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a
25 cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a la composición de la invención para predecir o pronosticar la evolución de una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica. En una
30 realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad inflamatoria crónica es la AR. En otra realización preferida la composición comprende bacterias de la especie *Dorea formicigenerans*.

COMPOSICIÓN ALIMENTARIA

En **otro aspecto** de la invención, la composición de la invención es una composición alimentaria tal y como una composición nutracéutica o una composición del tipo “*medical food*”, de ahora en adelante composición alimentaria de la invención.

Estas composiciones se denominan habitualmente probióticos. Los probióticos son composiciones con microorganismos vivos adicionados que permanecen activos en el intestino en cantidad suficiente como para alterar la microbiota intestinal del huésped, tanto por implantación como por colonización. Pueden tener efectos beneficiosos cuando son ingeridos en cantidades suficientes. Pueden atravesar el aparato digestivo y recuperarse vivos en los excrementos, pero también se adhieren a la mucosa intestinal.

En el año 2002, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió los probióticos como «*Microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo anfitrión*»

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidades adecuadas” o también “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos y de los pacientes, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

La composición alimentaria de la invención comprende las bacterias del género *Dorea*, y preferiblemente *Dorea formicigenerans*, en una cantidad eficaz para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad inflamatoria crónica, y preferiblemente para la prevención, alivio y tratamiento de la AR, en mamíferos, incluyendo un ser humano. Las composiciones alimentarias preferidas se seleccionan de la lista que consiste en: una bebida, leche, yogur, queso, leche fermentada, bebida de leche aromatizada, leche de soja, cereales precocinados, pan, pasteles, mantequilla, margarina, salsas, aceites para freír, aceites vegetales, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de semilla de algodón, condimentos, aderezos para ensaladas, zumos de frutas, jarabes, postres, glaseados y rellenos,

productos congelados blandos, dulces, chicles y alimentos intermedios. La composición alimentaria de la invención puede ser un suplemento nutricional o dietético. En otra realización preferida, el suplemento nutricional o dietético comprende una composición estéril que contiene las bacterias del género *Dorea*, y preferiblemente *Dorea formicigenerans*, preferentemente provisto de un revestimiento resistente a los ácidos gástricos, siendo una composición de liberación retardada. En otra realización preferida, la composición alimentaria, incluyendo las bacterias del género *Dorea*, y preferiblemente *Dorea formicigenerans* y/o el suplemento nutricional o dietético comprende "portadores" apropiados tales como diluyentes, adyuvantes, excipientes o vehículos con los que se administra el compuesto de la invención. Excipientes apropiados adecuados incluyen, pero no se limitan a almidón, glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, sulfato de calcio, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. Tales suplementos nutricionales se pueden utilizar para combatir problemas inflamatorios, y ayudan a mantener la salud o un estilo de vida saludable al mamífero, preferiblemente un ser humano.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición alimentaria de la invención para predecir o pronosticar la evolución de una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica

MEDIOS AUTOMATIZADOS DE LA INVENCION

Otro **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.

Otro **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.

Otro **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.

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'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-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 "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN ó DNA).

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.

En la presente invención se entiende por variante o fragmento biológicamente activo, aquellas variantes o fragmentos de los péptidos indicados que tienen un efecto fisiológico, metabólico o inmunológico igual, o presentan la misma utilidad que los descritos. Esto es, son funcionalmente equivalentes. Dichos efectos se pueden determinar mediante métodos convencionales.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *NucleicAcidsResearch* 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschule *et al.*, 1999. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410).

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 dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5 EJEMPLOS DE LA INVENCION

Los resultados de la invención mostraron un aumento significativo de la bacteria *Collinsella aerofaciens* en pacientes AR respecto a donantes sanos. Además, se observó un aumento en la acción de la arginina deiminasa, que pertenecía aproximadamente en un 90% a los genes de AR del género *Collinsella*. La importancia de la enzima arginina deiminasa es que cataliza una reacción en la que el sustrato arginina dará lugar a citrulina entre otros productos. En la AR los autoanticuerpos más específicos son los anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (ACPAs) que se dirigen contra péptidos y proteínas citrulinados. De hecho, *Collinsella aerofaciens* se ha asociado a pacientes AR más jóvenes y títulos altos de ACPAs. Asimismo, en la literatura se ha demostrado que los pacientes AR más jóvenes se asocian a una mayor frecuencia de ACPAs positivos y una mayor gravedad de la enfermedad. Además, *Collinsella aerofaciens* se asocia con el tabaco, el cual está involucrado en el proceso de citrunilación de proteínas,

Por tanto, la alteración de *Collinsella aerofaciens* podría influir significativamente, mediante mecanismos enzimáticos, en la perpetuación de la autoinmunidad de la enfermedad.

Asimismo, los resultados de los ejemplos de la invención revelaron un descenso significativo de *Dorea formicigenerans* en pacientes AR respecto a donantes sanos, considerando dicha bacteria protectora frente a la enfermedad.

REIVINICACIONES

- 1.- Un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la evolución de una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica, que comprende:
- a) obtener una muestra biológica de dicho individuo, y
- b) determinar los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal en la muestra aislada del paso (a).
- 2.- Un método para predecir o pronosticar la evolución de una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica que comprende los pasos (a) y (b) según la reivindicación 1, y además comprende:
- c) clasificar al individuo del paso (a), en el grupo de individuos con una probabilidad al menos 2 veces mayor, preferiblemente 2,5 veces mayor, y más preferiblemente 3 veces mayor, de padecer una enfermedad inflamatoria crónica, si presenta un porcentaje de *Collinsela*, y más preferiblemente *Collinsela aerofaciens* al menos 2 veces superior, preferiblemente 2,5 veces superior, y más preferiblemente 3 veces superior al porcentaje de referencia.
- 3.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la enfermedad autoinmune inflamatoria crónica es la AR.
- 4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la muestra biológica aislada del intestino del individuo es una muestra de heces fecales o proviene de heces fecales.
- 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la determinación de los grupos taxonómicos que componen la microbiota intestinal se realiza por una técnica de PCR, por una técnica inmunológica, o por una técnica que mida la actividad microbiana.
- 6.- Un kit o dispositivo de diagnóstico que comprende los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 1 (AERO-F) (5'-CTTTCAGCAGGGAAGAGTCAA-3') y SEQ ID NO: 2 (cebador AERO-R) (5'-AGCCATGCACCACCTGT- ATGG-3').

7.- El uso del kit o el dispositivo según la reivindicación 6, para predecir o pronosticar la evolución de la enfermedad autoinmune inflamatoria crónica que enfermedad inflamatoria crónica autoinmune, preferiblemente AR.

5 8.- Una composición que comprende bacterias del género *Dorea*, más preferiblemente de la especie *Dorea formicigenerans*

9.- La composición según la reivindicación 8 para su uso como medicamento.

10.- La composición según la reivindicación 8 para su uso en la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica, preferiblemente AR.

10 11.- Una composición alimentaria tal y como una composición nutracéutica o una composición del tipo "*medical food*" que comprende una composición según la reivindicación 8.

12.- El uso de una composición alimentaria según la reivindicación 11 para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad inflamatoria crónica, y preferiblemente para la prevención, alivio y tratamiento de la AR.

15

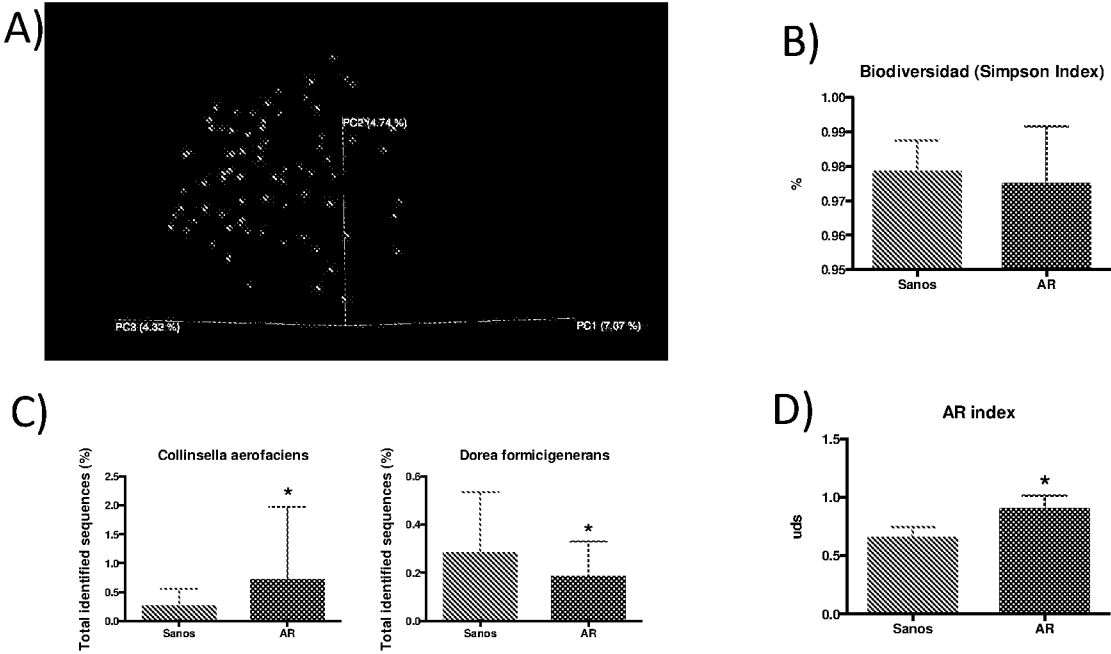


Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2018.01)

A61K35/74 (2015.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q, A61K

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

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

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, EMBL-EBI, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MENA-VAZQUEZ NATALIA et al. Analysis of Intestinal Microbiome Profile of Patients with Established Rheumatoid Arthritis and Healthy Controls. Arthritis & Rheumatology, 01/09/2018, Vol. 70, N° Suppl. 9, pages 91 - 92 [on line][retrieved the 21/04/2020]. Retrieved from <URL: https://acrabstracts.org/abstract/analysis-of-intestinal-microbiome-profile-of-patients-with-established-rheumatoid-arthritis-and-healthy-controls/ >,	1-5
Y	ISSN 2326-5191(print) ISSN 2326-5205(electronic) Abstract N°. 82	7

☒ 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
18/06/2020

Date of mailing of the international search report
(19/06/2020)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
J. Vizán Arroyo

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

Telephone No. 91 3498573

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2020/070059

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TANEJA VEENA. Arthritis susceptibility and the gut microbiome. Febs Letters, 17/11/2014, Vol. 588, N° 22, pages 4244-4249 Retrieved of <URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.034 >, ISSN 0014-5793(print) ISSN 1873-3468(electronic), <DOI: 10.1016/j.febslet.2014.05.034> Results, Conclusions	1, 3-5
X	WO 2017109059 A1 (VIB VZW ET AL.) 29/06/2017, claims	1, 3-5
X	MAEDA YUICHI et al.. Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. Arthritis & Rheumatology, 31/10/2016, Vol. 68, N° 11, pages 2646-2661, ISSN 2326-5191(print) ISSN 2326-5205(electronic), <DOI: 10.1002/art.39783> Conclusions	1, 3-5
X Y	US 2012128634 A1 (VEIGA PATRICK ET AL.) 24/05/2012, Example 1; Sequence List	6 7
X	KAGEYAMA AKIKO et al.. Rapid identification and quantification of Collinsella aerofaciens using PCR. Fems Microbiology Letters, 01/02/2000, Vol. 183, N° 1, pages 43-47, ISSN 0378-1097 Materials and Methods	6
X	WO 2012142605 A1 (SAMARITAN HEALTH SERVICES ET AL.) 18/10/2012, claims	8, 9, 11
X	US 2016317653 A1 (COOK DAVID N ET AL.) 03/11/2016, claims 17-27	8, 9, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2020/070059

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2017109059 A1	29.06.2017	EP3394289 A1	31.10.2018
-----	-----	-----	-----
US2012128634 A1	24.05.2012	US2012128633 A1	24.05.2012
		EP2424551 A1	07.03.2012
		WO2010125472 A1	04.11.2010
		EP2432484 A1	28.03.2012
		WO2010125421 A1	04.11.2010
-----	-----	-----	-----
WO2012142605 A1	18.10.2012	NONE	
-----	-----	-----	-----
US2016317653 A1	03.11.2016	US9956282 B2	01.05.2018
		EP3082431 A2	26.10.2016
		EP3082431 A4	15.11.2017
		WO2015095241 A2	25.06.2015
		WO2015095241 A3	15.10.2015
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070059

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/68 (2018.01)

A61K35/74 (2015.01)

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12Q, A61K

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

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

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, EMBL-EBI, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	MENA-VAZQUEZ NATALIA et al.. Analysis of Intestinal Microbiome Profile of Patients with Established Rheumatoid Arthritis and Healthy Controls. Arthritis & Rheumatology, 01/09/2018, Vol. 70, Nº Suppl. 9, páginas 91 - 92 [en línea] [recuperado el 21/04/2020]. Recuperado de <URL: https://acrabstracts.org/abstract/analysis-of-intestinal-microbiome-profile-of-patients-with-established-rheumatoid-arthritis-and-healthy-controls/ >.	1-5
Y	ISSN 2326-5191(print) ISSN 2326-5205(electronic) Resumen Nº. 82	7

☒ 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.
18/06/2020

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
19 de junio de 2020 (19/06/2020)

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
J. Vizán Arroyo
Nº de teléfono 91 3498573

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070059

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	TANEJA VEENA. Arthritis susceptibility and the gut microbiome. Febs Letters, 17/11/2014, Vol. 588, Nº 22, páginas 4244-4249 Recuperado de <URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.034 >, ISSN 0014-5793(print) ISSN 1873-3468(electronic), <DOI: 10.1016/j.febslet.2014.05.034> Resultados, Conclusiones	1, 3-5
X	WO 2017109059 A1 (VIB VZW ET AL.) 29/06/2017, Reivindicaciones	1, 3-5
X	MAEDA YUICHI et al.. Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. Arthritis & Rheumatology, 31/10/2016, Vol. 68, Nº 11, páginas 2646-2661, ISSN 2326-5191(print) ISSN 2326-5205(electronic), <DOI: 10.1002/art.39783> Conclusiones	1, 3-5
X Y	US 2012128634 A1 (VEIGA PATRICK ET AL.) 24/05/2012, Ejemplo 1; Lista Secuencias	6 7
X	KAGEYAMA AKIKO et al. Rapid identification and quantification of Collinsella aerofaciens using PCR. Fems Microbiology Letters, 01/02/2000, Vol. 183, Nº 1, páginas 43-47, ISSN 0378-1097 Materiales y Métodos	6
X	WO 2012142605 A1 (SAMARITAN HEALTH SERVICES ET AL.) 18/10/2012, Reivindicaciones	8, 9, 11
X	US 2016317653 A1 (COOK DAVID N ET AL.) 03/11/2016, Reivindicaciones 17-27	8, 9, 11

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2020/070059

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2017109059 A1	29.06.2017	EP3394289 A1	31.10.2018
-----	-----	-----	-----
US2012128634 A1	24.05.2012	US2012128633 A1	24.05.2012
		EP2424551 A1	07.03.2012
		WO2010125472 A1	04.11.2010
		EP2432484 A1	28.03.2012
		WO2010125421 A1	04.11.2010
-----	-----	-----	-----
WO2012142605 A1	18.10.2012	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
US2016317653 A1	03.11.2016	US9956282 B2	01.05.2018
		EP3082431 A2	26.10.2016
		EP3082431 A4	15.11.2017
		WO2015095241 A2	25.06.2015
		WO2015095241 A3	15.10.2015
-----	-----	-----	-----