

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 100**

21 Número de solicitud: 201100798

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**11.07.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**08.02.2013**

Fecha de la concesión:

**03.09.2013**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**13.09.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (50.0%)  
OTRI-Vicerrectorado de i+d+i C/ Benito Pérez  
Galdós, s/n  
11002 Cádiz (Cádiz) ES y  
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ VALDIVIA, Manuel Jesús;  
RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, Carmen;  
PÉREZ VENEGAS, José Javier;  
ASTOLA GONZÁLEZ, Antonio;  
ORTIZ SANTIESTEBAN, María Manuela;  
HAMDOUCH, Khaoula y  
RODRÍGUEZ VÁZQUEZ, Iván**

54 Título: **MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA  
ESCLERODERMIA.**

57 Resumen:

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la esclerodermia. Uso de la proteína CENPI, o de una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de dicha proteína, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de enfermedades autoinmunes, y en particular, de la esclerodermia.

ES 2 395 100 B2

DESCRIPCIÓN

**Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la esclerodermia.**

5 La presente invención se encuentra dentro de la medicina, la biología molecular y la inmunología, y se refiere al uso de la proteína CENPI, o de una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de dicha proteína, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de enfermedades autoinmunes, y en particular, de la esclerodermia. También se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la esclerodermia, 10 permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes, así como el diagnóstico precoz.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

15 La esclerodermia ("piel endurecida"), también llamada esclerosis sistémica progresiva y síndrome de CREST, es una enfermedad del tejido conectivo difuso caracterizada por cambios en la piel, vasos sanguíneos, músculos esqueléticos y órganos internos. Se desconoce(n) la(s) causa(s) de esta enfermedad, o bien; es un conjunto de enfermedades que afectan el tejido 20 conectivo del cuerpo. La esclerodermia hace que el tejido conectivo se endurezca y se ponga grueso. También puede causar hinchazón o dolor en los músculos y en las articulaciones.

El diagnóstico puede ser muy difícil, sobre todo en las primeras etapas. Muchos 25 de sus síntomas son comunes o pueden coincidir con los de otras enfermedades, especialmente las del tejido conectivo, como artritis reumatoide y lupus. Los distintos síntomas pueden desarrollarse por etapas a través de un largo período, y pocas personas con esclerodermia experimentan exactamente los mismos síntomas y efectos.

Aunque la esclerodermia puede ser detectada por sus síntomas más visibles, la existencia del padecimiento no puede comprobarse mediante una única prueba.

5 El diagnóstico lo suelen dar los médicos con amplia experiencia en el tratamiento de esta enfermedad teniendo en cuenta:

- el historial médico, incluyendo los síntomas pasados y los del presente;
  - un minucioso examen físico y pruebas realizadas en una gran
- 10 variedad de tests y otros estudios.

Al hacer el diagnóstico, es importante no sólo confirmar la presencia de la esclerodermia, sino también su alcance y gravedad, pues hay que considerar la implicación de los órganos internos.

15 La esclerodermia limitada y difusa a veces pueden determinarse por la presencia de distintos anticuerpos en la sangre, llamados anticuerpos antinucleares (ANA), que son autoanticuerpos que tienen como blanco el contenido del núcleo celular, y dentro de los que se encuentran los autoanticuerpos anticentrómero.

20

Los autoanticuerpos anticentrómero (ACA) se identificaron por vez primera en humanos en los años 80 por Moroi y colaboradores en un paciente de esclerodermia (SSc) mediante el análisis de inmunofluorescencia indirecta (Moroi *et al.*, 1980. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1627-31. Desde entonces, los

25

ACA han demostrado ser altamente específicos para SSc generalmente y más comúnmente estar presentes en pacientes con la forma cutánea limitada de la enfermedad (lcSSc). Estos autoanticuerpos (autoAb) se pueden también detectar en sueros de pacientes con el fenómeno de Raynaud sin desorden reumático definido y en otras enfermedades autoinmunes reumáticas tales

30

como síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, y artritis reumatoide (Van Venrooij & Van de Putte, 1991. *Semin Clin Immunol* 2: 27-32; Rothfield 1992. *Rheum Dis Clin North Am* 18: 483-98), entre otras.

Las proteínas principales del centrómero detectadas por el ACA son CENPA, CENPB y CENPC (Earnshaw & Rothfield 1985. *Chromos* 91: 313-21). Circunstancialmente, algunos sueros positivos humanos con ACA fueron  
5 demostrados contener autoanticuerpos dirigidos contra CENPD, CENPE, CENPF, y CENPG (Rattner *et al.*, 1993. *Cell Motil Cytoskel* 26: 214-26; Rattner *et al.*, 1996. *Arthr Rheum* 39: 1355-61). Recientemente, otra proteína localizada en el cinetocoro a través del ciclo celular, CENPH, fue descrita como nuevo autoantígeno del centrómero en pacientes con el síndrome de Sjögren (Hsu *et al.*,  
10 *et al.*, 2006. *Rheumatol* 26: 298-303). También, CENPO, un nuevo componente del cinetocoro, fue descrito como nuevo antígeno en la esclerosis sistémica (Saito *et al.*, 2009. *J. Rheumatol* 36: 781-86). Finalmente, el autoAb contra la proteína centromérica facultativa INCENP también fue detectado en un paciente con el síndrome de Graham Little Piccardi-Lassueur (Rodríguez-Bayona *et al.*, 2007. *J Autoimm Dis* 4:1).  
15

La proteína CENPI del centrómero es una proteína constitutiva del ensamblaje del cinetocoro, una estructura del centrómero de los cromosomas que desempeña un papel esencial durante la progresión de la mitosis (Okada *et al.*,  
20 2006. *Nat Cell Biol* 5: 446-57).

Hasta el momento no se ha demostrado ningún papel directo de los autoanticuerpos en la patología de la esclerodermia. Sin embargo, más del 95% de pacientes con SSc tiene anticuerpos (Ab) antinucleares (Naparstek *et al.*, 1993. *Annu Rev Immunol* 11: 79-104).  
25

Por tanto, dada la dificultad del diagnóstico, especialmente en las primeras etapas, sigue siendo fundamental encontrar un método para el diagnóstico de la esclerodermia, así como para el seguimiento del transcurso de la misma y  
30 determinar su gravedad, para eliminar o reducir al mínimo los procesos patológicos que causan efectos negativos, en los pacientes, así como el diagnóstico precoz.

## **.DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

5 La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, y preferentemente de la esclerodermia, así como para evaluar su alcance y gravedad.

Los autores de la presente invención han analizado las posibles respuestas  
10 contra la proteína CENPI del centrómero. Han encontrado, por análisis de inmunofluorescencia (IF) y de inmunoblots con una proteína centromérica recombinante de CENPI, un número significativo de pacientes de esclerodermia que contienen autoAb contra dicha proteína. Se ha observado que un número significativo de los pacientes con anticuerpos anti-CENPI  
15 presentaron a la vez autoAb característicos de la enfermedad autoinmune hepática. La presencia de autoAb anti-CENPI en pacientes con esclerodermia tiene potencial en el diagnóstico clínico.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína  
20 CENPI, de una variante o de un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPI, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de enfermedades autoinmunes. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad autoinmune es la esclerodermia. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la  
25 enfermedad autoinmune es la esclerodermia.

Más preferiblemente, la secuencia aminoacídica de la variante de la proteína CENPI presenta una identidad de, al menos, un 80%, y más preferiblemente al menos un 85%, un 90%, un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, un 95%, un 96%,  
30 un 97%, un 98%, o un 99% con el péptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. Aún más preferiblemente es la región amino-terminal de la proteína CENPI (Nt-CENPI), de secuencia SEQ ID NO: 2, una variante o un fragmento

funcionalmente equivalente. Más preferiblemente es la región carboxilo-terminal de la proteína CENPI (Ct-CENPI), de secuencia SEQ ID NO: 4, una variante o un fragmento funcionalmente equivalente.

5 El término "identidad", tal y como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

10

En esta memoria se entiende por enfermedades autoinmunes o enfermedades autoinmunitarias aquellas enfermedades causadas porque el sistema inmunitario ataca las células del propio organismo. En este caso, el sistema inmunitario se convierte en el agresor y ataca a partes del cuerpo en vez de protegerlo. Existe una respuesta inmune exagerada contra sustancias y tejidos que normalmente están presentes en el cuerpo. Las causas son un tanto desconocidas, pero está relacionada con el reconocimiento proteico entre las superficies de las membranas celulares del sistema inmunitario y las que forman el organismo. Así, cuando las glucoproteínas de reconocimiento no coinciden, el sistema inmunitario comienza a atacar al propio organismo. La causa por tanto, tiene que ver a veces con la predisposición o mutación genética que codifican proteínas diferentes bien en las células inmunitarias u orgánicas. Existen varias clasificaciones, pero en general pueden ser específicas de órgano (anemia perniciosa, atrofia gástrica, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, colitis ulcerosa, diabetes mellitus tipo 1, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmune, miastenia de Lambert-Eaton, miastenia gravis, mixedema primario, neuropatías, oftalmía simpática, pénfigo vulgar, síndrome de Goodpasture, síndrome de Miller-Fisher, tiroiditis de Hashimoto y uveítis) o multiorgánicas o sistémicas (artritis reumatoide, enfermedad de Behçet, esclerodermia, esclerosis múltiple y su variedad Enfermedad de Devic, espondiloartropatía, fiebre reumática, granulomatosis de Wegener, lupus

eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido o Síndrome de Hughes, polimiositis y Dermatomiositis, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, psoriasis, púrpura trombocitopénica inmune, sarcoidosis, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica y vitíligo, entre otras).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades autoinmunes, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- 10 a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
- b) detectar la cantidad de anticuerpos frente a la proteína CENPI, o frente a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPI, en la muestra biológica aislada de (a).

15 En una realización preferida, el primer método de la invención comprende además:

- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.

20 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, en el paso (b) se detecta la cantidad de anticuerpos frente a la región amino-terminal de CENPI (Nt-CENPI), En otra realización preferida, la región amino-terminal de CENPI (Nt-CENPI) es recombinante.

25 Los autores de la presente invención han determinado que los individuos que presentan anticuerpos anticentrómero, que además presentan anticuerpos específicos frente a la proteína CENPI, tienen mayor probabilidad de desarrollar enfermedad autoinmune hepática.

30 Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, en el paso (b) se detecta la cantidad de anticuerpos antricentrómero, y más preferentemente, frente a CENPB. En otra realización preferida, la enfermedad

autoinmune es la esclerodermia. En otra realización preferida, la enfermedad autoinmune es la enfermedad autoinmune hepática.

5 Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

10 El término "diagnóstico", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de discriminar entre individuos afectados o no por una enfermedad autoinmune, y más preferiblemente, por la esclerodermia o por la hepatopatía autoinmune.

15 También se refiere, pero sin limitarnos, a la capacidad de discriminar entre muestras procedentes de pacientes que presentan diferentes estados de una enfermedad autoinmune, preferiblemente, de la esclerodermia o de la hepatopatía autoinmune. A su vez, atendiendo al primer método de la presente invención, se podrían establecer otras sub-clasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes  
20 terapéuticos adecuados. 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 significativamente estadística puede ser establecida por un  
25 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%.  
30 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.

Una "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos  
5 y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada es un fluido biológico, como por ejemplo, pero sin limitarse, sangre, plasma o suero sanguíneo. Más preferiblemente, el fluido biológico es el suero sanguíneo. La detección de auto- anticuerpos frente a los antígeno CENPI en  
10 una muestra biológica aislada de un individuo es indicativa de una enfermedad autoinmune.

El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El  
15 término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

Un antígeno o inmunógeno es una sustancia capaz de producir una respuesta del sistema inmune adaptativo mediante la activación de linfocitos. Los  
20 antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos. Los lípidos y ácidos nucleicos son antigénicos únicamente cuando se combinan con proteínas y polisacáridos.

El antígeno CENPI, o "*centromere protein 1*", es una proteína involucrada en la  
25 respuesta de los tejidos gonadales a la hormona folículo-estimulante. Este gen es también un candidato potencial para los desordenes del desarrollo gonadal y gametogénesis unidos al cromosoma X en humanos. Se encuentra en el cromosoma X (Xq22.1). Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_006724.2; y/o en la SEQ ID NO: 1).

30

En el contexto de la presente invención, CENPI se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia

codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,
- 5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que  
10 comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína CENPI.

15 La región amino-terminal de CENPI (Nt-CENPI) se encuentra recogida en la SEQ ID NO: 2.

En el contexto de la presente invención, Nt-CENPI se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia  
20 codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con  
25 la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que  
30 comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la región amino-terminal de CENPI (Nt-CENPI).

El CENPB, o "*major centromere autoantigen B*", es una proteína que facilita la formación del centrómero. Se deriva de las transposasas de la familia del transposón pogo. El dominio de unión al DNA reconoce y se une a una  
5 secuencia de 17 pb (CENPB-box) en DNA del satélite alfa un importante papel en el ensamblaje de estructuras específicas centroméricas en la interfase y en los cromosomas mitóticos. También se considera el mayor autoantígeno centromerico reconocido por el suero en pacientes con anticuerpos anti-centrómicos.

10

En el contexto de la presente invención, CENPB se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 3, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

15

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 3,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

20

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

25

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 3, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína CENPB.

La región carboxilo-terminal de CENPI (Ct-CENPI) se encuentra recogida en la SEQ ID NO: 4.

30

En el contexto de la presente invención, Ct-CENPI se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 4, y que comprendería

diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4,

5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%,  
10 un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 4, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la región carboxilo-terminal de CENPI (Ct-CENPI).

15 La detección de los anticuerpos frente al antígeno CENPI, o frente a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPI, puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Los autores de la presente invención han demostrado que la detección de la cantidad o la concentración de estos anticuerpos de manera semi-cuantitativa o  
20 cuantitativa permiten diferenciar entre los diferentes estadios de la enfermedad. De esta manera, se puede establecer un diagnóstico diferencial en individuos afectados por enfermedades autoinmunes, y preferiblemente afectados por esclerodermia o hepatopatía autoinmune que permite sub-clasificarlos.

25 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. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de los anticuerpos, basada en una señal que se obtiene directamente de los anticuerpos, y que está correlacionada directamente con el  
30 número de moléculas de anticuerpos presente en la muestra. 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 anticuerpos. 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, o productos de reacción enzimática).

5 El término "cantidad", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los anticuerpos, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades  
10 físicas o químicas de los anticuerpos obtenidos mediante medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

15 El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de anticuerpos frente al antígeno CENPI, o frente a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPI, de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de anticuerpos frente al antígeno CENPI  
20 o frente a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPI, de una o varias muestras de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (c) del método de  
25 la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término "cantidad de referencia", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad absoluta o relativa de anticuerpos frente al antígeno CENPI  
30 que permite discriminar un determinado estadio de una enfermedad autoinmune, y particularmente de la esclerodermia o de la hepatopatía autoinmune, de otros estadios. Las cantidades de referencia adecuadas

pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la muestra de referencia pueden ser los controles  
5 negativos, esto es, las cantidades detectadas por el método de la invención en muestras de individuos sanos. Además, en el caso del seguimiento de la evolución de las enfermedades autoinmunes, y más preferentemente, esclerodermia y/o hepatopatía autoinmune la cantidad de referencia podría ser, pero sin limitarnos, la cantidad de estos anticuerpos detectados en una muestra  
10 biológica del mismo individuo obtenida con anterioridad. Así, podría ser simplemente la detección de la presencia o ausencia de anticuerpos frente a la proteína CENPI, o frente a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPI, siendo la ausencia de anticuerpos la cantidad de referencia.

15

Así pues, la muestra o muestras de referencia pueden ser, por ejemplo, obtenidas a partir del suero de un paciente con enfermedades autoinmunes, y más preferentemente, esclerodermia y/o hepatopatía autoinmune en una determinada fase clínica. En otra realización preferida de este aspecto de la  
20 presente invención, la cantidad de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia. La cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras obtenidas de una población de pacientes con enfermedades autoinmunes, y más preferentemente, esclerodermia y/o hepatopatía autoinmune en distintas  
25 fases, mediante técnicas estadísticas bien conocidas.

El término “anticuerpo” tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de  
30 fijación de antígeno que se une específicamente (inmunoreacciona) con la proteína (antígeno) CENPI, o con una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPI.

Los anticuerpos que reconocen la proteína CENPI pueden ser empleados para llevar a cabo los métodos de la presente invención, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante *immunoblot*, ELISA o inmunohistoquímica. En una realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA.

El término "anticuerpo anti-CENPI" se refiere a un anticuerpo capaz de reaccionar con la proteína CENPI, con una variante de la proteína CENPI o con un fragmento de la misma, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término anticuerpo frente al antígeno CENPI se refiere a una inmunoglobulina G (IgG).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteína CENPI, al fragmento amino-terminal, o al fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, o a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a la proteína CENPI, al fragmento amino-terminal, o al fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 respectivamente; es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias homologas a la proteína CENPI, al fragmento

amino-terminal, o al fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

- 5 La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que las proteínas o el/los fragmento/s de la/s proteína/s en cuestión mantiene/n esencialmente las propiedades biológicas o inmunológicas descritas en este documento. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales tales como los descritos en los ejemplos que acompañan a  
10 esta descripción.

En otra realización preferida, la detección de la cantidad de los anticuerpos frente al antígeno CENPI, al fragmento amino-terminal, o al fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, o a una variante o un fragmento  
15 funcionalmente equivalente de los mismos, se realiza mediante un inmunoensayo. El término "inmunoensayo", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de una anticuerpo con un antígeno.

20 Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o *chips* de proteína.

25 En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que  
30 puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich.



El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad de anticuerpos frente al antígeno CENPI. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$  o  $^{35}\text{S}$ , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

Los autores de la presente invención han visto que el nivel de reconocimiento del antígeno CENPI, al fragmento amino-terminal, o al fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, o a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos, por los paciente con enfermedades autoinmunes, y más preferentemente, esclerodermia y/o hepatopatía autoinmune es muy superior comparado con los individuos sanos, con diferencias estadísticamente significativas. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico de enfermedades autoinmunes, y más preferentemente, esclerodermia y/o hepatopatía autoinmune de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) – (c) del primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedades autoinmunes, y más preferentemente, esclerodermia y/o hepatopatía autoinmune cuando presenta una cantidad de anticuerpos frente al antígeno CENPI, al fragmento amino-terminal, o al fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, o a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos detectados en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa a la cantidad de referencia de (c), siendo la cantidad de referencia uno o varios controles negativos. En una realización

preferida, la presencia de anticuerpos frente a CENPI, al fragmento amino-terminal, al fragmento central o al fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, o a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos en la muestra biológica aislada de (a), es indicativa de la enfermedad.

- 5 En otra realización preferida, la enfermedad autoinmune, es la esclerodermia. En otra realización preferida, se asigna al individuo al grupo de individuos con hepatopatía autoinmune cuando en la muestra se detectan anticuerpos anticentrómero, y adicionalmente, anticuerpos frente a la proteína CENPI, al fragmento amino-terminal, al fragmento central o al fragmento carboxilo-
- 10 terminal de la proteína CENPI, o a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos.

En una realización preferida, la detección de la cantidad de anticuerpos se realiza mediante un inmunoensayo. En otra realización preferida, el

15 inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), y en otra realización aún más preferida, el ELISA es un ELISA indirecto. En otra realización más preferida, el inmunoensayo es un Western blot o inmunoblot.

- 20 En una realización más preferida de este aspecto, el segundo método de la invención además comprende asignar a un individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedades autoinmunes, y más preferentemente, esclerodermia y/o hepatopatía autoinmune cuando presenta una cantidad de anticuerpos frente al antígeno CENPI, al fragmento amino-terminal, o al
- 25 fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, o a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos detectados en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia, siendo la cantidad de referencia la cantidad detectada de estos anticuerpos en individuos sanos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los elementos necesarios para analizar la cantidad de anticuerpos frente a la proteína CENPI y/o al fragmento amino-terminal, o al fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, o a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos, en una muestra problema. Preferiblemente comprende la proteína CENPI, y/o el fragmento amino-terminal, o al fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, o una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos. Más preferiblemente, comprende los péptidos de secuencia que se selecciona de entre la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, o cualquiera de sus combinaciones.

Más preferiblemente comprende los medios necesarios para comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Aún más preferiblemente, el kit de la presente invención comprende los elementos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la presente invención.

Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar la cantidad de anticuerpos frente a la proteína CENPI y/o al fragmento amino-terminal, o al fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, o a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos, por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento como, por ejemplo, pero sin limitarse, a las proteínas CENPI y/o al fragmento amino-terminal, o al fragmento carboxilo-terminal de la proteína CENPI, o a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos purificados, anticuerpos capaces de reconocer específicamente a los anticuerpos frente a los antígenos CENPI y/o la región amino-terminal de la proteína CENPI (Nt-CENPI), o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede

incluir todos los materiales (soportes, recipientes, etc.) necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención. En una realización preferida, el kit comprende al menos un péptido que se  
5 selecciona de entre la proteína CENPI de secuencia SEQ ID NO: 1, la región amino-terminal de la proteína CENPI (Nt-CENPI), de secuencia SEQ ID NO: 2, la región carboxilo-terminal de la proteína CENPI (Ct-CENPI), de secuencia SEQ ID NO: 4, o una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos. En otra realización preferida, dichos péptidos, variantes o  
10 fragmentos funcionalmente equivalentes son recombinantes.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades autoinmunes. y preferentemente en el diagnóstico de esclerodermia y/o de la hepatopatía autoinmune.

15 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).

20 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.

25 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  
30 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.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1. Inmunoblots de sueros humanos autoinmunes contra los antígenos centroméricos CENPB y CENPI.** A. Los antígenos Nt-CENPB y Nt-CENPI se expresaron en *E.coli* y se aislaron como cuerpos de inclusión. Se muestra la electroforesis de un gel teñido con azul de Coomassie en la línea 1 la proteína expresada Nt-CENPB y en la línea 2 la proteína Nt-CENPI. Ambos antígenos contienen una cola de 6 histidinas introducidas para la expresión y reaccionan por inmunoblots con un anticuerpo anti-histidina (panel C1). El empleo de anticuerpos anti-CENPB (panel C2) y anti-CENPI (panel C3) en inmunoblots sirven para demostrar la reacción específica con los respectivos antígenos. B. Análisis por western de sueros autoinmunes humanos. La reactividad contra los antígenos Nt-CENPB y Nt-CENPI se muestran a la izquierda y derecha respectivamente en cada blot. Los sueros de los pacientes se identifican con la letra P y un número en cada inmunoblot. Los blots de pacientes con esclerodermia positivos para anti-CENPI corresponden a P1, P2, P5, P7, P14, P30, P31, y P69. Los pacientes con enfermedad lupus representativos de controles negativos para autoantígenos centroméricos corresponden a P11, P62, y P67. Los pacientes con esclerodermia con anticuerpos anti-CENPB pero sin anticuerpos anti-CENPI se señalan como P13, P16, P52, P53 y P58.

**Fig. 2. Reactividad de sueros humanos autoinmunes contra diferentes epitopos en la proteína centromérica CENPI.** A. Electroforesis en gel teñido con azul de Coomassie para las regiones amino terminal (Nt-CENPI), central (M-CENPI) y carboxilo terminal (Ct-CENPI) de CENPI (1). En la figura 1 de izquierda a derecha se muestran los pesos moleculares, y los antígenos Nt-CENPI, M-CENPI y Ct-CENPI respectivamente. En 2 se muestra el análisis por inmunoblot de la reactividad de los tres dominios de CENPI con un anticuerpo anti-histidina. En 3 se muestra la reactividad específica con un suero anti-péptido CENPI (aminoácidos 1-17) con la región del Nt-CENPI y no con M-

CENPI y Ct-CENPI. **B.** Reactividad de distintos sueros humanos autoinmunes frente a los tres dominios del autoantígeno CENPI. Los sueros de los pacientes se identifican con la letra P y un número en cada inmunoblot. Los blots de pacientes con esclerodermia positivos para Nt-CENPI corresponden a P1, P2, P5, P7, P14, P30, P31, y P69. Los pacientes P7 y P69 presentan autoanticuerpos contra Nt-CENPI y M-CENPI. Los pacientes P7 y P14 presentan anticuerpos contra Nt-CENPI y Ct-CENPI. Un suero de un paciente con lupus eritematoso se muestra como representativo de un control negativo en P11.

10

## **EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de enfermedades autoinmunes (esclerodermia e hepatopatía autoinmune), y para el diagnóstico y el seguimiento de dicha enfermedad.

15

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **20 Sujetos del estudio**

Durante un período de dos años se recogieron y analizaron sueros de pacientes con diversas enfermedades reumáticas (69 mujeres y 3 hombres; de edad media  $53.3 \pm 14.2$  años, con gama de edad 27-81). Se realizaron diagnóstico clínico en los Servicios de Reumatología e Inmunología de los Hospitales Puerta del Mar de Cádiz y Hospital General de Jerez, Cádiz, España. Entre los pacientes del estudio, 31 fueron diagnosticados tener lupus eritematosos sistémico (SLE), 24 tenían esclerodermia limitada SSc (lcSSc), 5 tenían forma difusa de SSc (dcSSc), 8 fueron diagnosticados de síndrome de Sjögren, 2 estaban diagnosticados de síndrome de solapamiento y 2 fueron diagnosticados de enfermedad indiferenciada del tejido conectivo (UCTD). Los pacientes fueron informados del objetivo del estudio y dieron su consentimiento

25  
30

al análisis. El estudio fue aprobado por el comité examinador institucional, y realizado de acuerdo con el código de ética para los experimentos que implican muestras humanas.

#### 5 **Detección de autoanticuerpos en el laboratorio clínico**

Durante los estudios clínicos rutinarios, varias pruebas disponibles para autoAb humanos fueron utilizadas. Así, la presencia de Ab antinucleares fue determinada usando inmunofluorescencia indirecta sobre células HEP-2. Los Ab anti-DNAs fueron medidos por ELISA (dsDNA G, DIAGNÓSTICOS de Aeskulisa de Aesku. Wendelsheim, Alemania). El perfil de autoinmunidad se determinó por una técnica de inmunoblot. Varios autoantígenos nucleares incluyendo la topoisomerasa-I, U1-RNP, SM, Ro/SSA (52 y 60 proteínas del kDa), La/SSB, Scl-70, las proteínas-P Ribosomal y CENP-B fueron detectadas mediante inmunoblot. La presencia de Ab anti-mitocondriales fue determinada mediante inmunofluorescencia indirecta sobre cortes de tejido de rata. En algunos pacientes, los Ab contra los miembros del complejo de la deshidrogenasa de 2 oxoacid, AMA M2, sp100, gp210, PML, SLA, LC-1 y LKM-1, fueron determinados por inmunodot.

#### 20 **Expresión del autoantígeno CENPI y generación de anticuerpos anti-CENPI.**

La región del amino-terminal de CENPI (Nt-CENPI) 1-249 fue clonada en el vector pENTR3C [12]. La cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* fue utilizada como huésped bacteriano para expresar el antígeno recombinante. Se emplearon 400 ml de células en cultivo crecidas a 37° C. Cuando el OD600 del cultivo alcanzó una absorbancia de 0.8, la expresión de la proteína fue inducida por la adición de 1mM IPTG e incubada por 4 horas en 30° C. Las bacterias fueron recogidas por centrifugación a 3000 RPM durante 10 minutos y resuspendidas de nuevo en PBS frío que contenía el coctel de los inhibidores de proteasa (Roche). La suspensión de las células fue sonicada (Misomix) y centrifugada a 10000 RPM durante 20 minutos a 4° C. El pellet o sedimento se

lavó a 4° C durante varias horas con PBS que contenía 2% Tritón, y a posteriori se disolvió en 10 ml de tampón fosfato de sodio pH 7.5 que contenía 8M urea e inhibidores de proteasa. La muestra fue diluida posteriormente hasta 4M urea para su análisis por electroforesis en geles SDS-PAGE seguido de análisis por inmunoblots.

Dos conejos blancos de la estirpe Nueva Zelanda fueron inmunizados subcutáneamente con 1 mg de la proteína recombinante Nt-CENPI aisladas de los geles de SDS y emulsionadas en el coadyuvante completo de Freund. Los conejos fueron inmunizados seis veces en intervalos de dos semanas con 1mg de la proteína emulsionada en el coadyuvante incompleto de Freund. Un suero monoespecífico contra un péptido sintético conteniendo los aminoácidos 1-17 de la proteína humana de CENPI fue generado (Eurogentec, Bélgica). Todos los sueros se probaron por IF en células humanas HeLa.

15

### **Inmunofluorescencia e inmunoblots**

Sueros humanos ACA positivos y sueros anti-CENPB y anti-CENPI específicos se analizaron en células HeLa fijadas en metanol. Los cubres se procesaron por técnicas standard de inmunofluorescencia. Cada suero fue utilizado a diluciones 1:200 a 1:1000 hechas en PBS. Las muestras fueron procesadas con el segundo anticuerpo específico marcado con FITC a una dilución 1:100 en PBS. Los cubres se montan en PBS: glicerol y observadas en un microscopio de epifluorescencia de Zeiss equipado de una cámara de CDD (Diagnostic Instruments Inc.). Los sueros ACA se consideraron positivos basados en la tinción típica de puntos centroméricos asociados en los núcleos interfásicos y su asociación característica a puntos con los cromosomas condensados durante la mitosis.

30 El análisis de los sueros específicos anti-Nt-CENPB y anti-Nt-CENPI empleados como controles y los sueros ACA positivos humanos estudiados se realizaron igualmente por inmunoblots usando el Nt-CENPB y Nt-CENPI



expresadas como proteínas recombinantes. Todos los sueros fueron probados a diluciones entre 1:200 y 1:1000 en PBS durante 1h a 37°C seguido por varios lavados con PBS-Tween 20 al 0.5% (Sigma Aldrich). Luego se incubaron con segundo anticuerpo marcado con peroxidasa empleado a una dilución 1:15000 durante 45 minutos a 37° C en PBS y lavados en PBS. Finalmente se reveló con ECL siguiendo las instrucciones del fabricante.

## RESULTADOS

### 10 **Análisis de los anticuerpos CENPI en sueros humanos**

Es bien sabido que los Ab ACA son marcadores diagnósticos de SSc Inicialmente como prueba clínica rutinaria, determinamos la presencia en 72 sueros de pacientes diagnosticados de varias enfermedades reumatológicas la presencia se ACA mediante IF empleando las células Hep2 (datos no demostrados). En nuestro análisis, encontramos 26 sueros sueros ACA positivos correspondiendo a los pacientes que padecían de SSc cutáneo limitado (21 pacientes), de UCTD (2 pacientes), de la forma difusa de SSc (un paciente), del síndrome de Sjögren (un paciente), y del síndrome de solapamiento (un paciente). Estos resultados de ACA-positivos fueron corroborados por inmunoblots empleando el autoantígeno de referencia o marcador del centrómero CENPB mediante un kit comercial (datos no mostrados). La reactividad contra CENPB fue observada en todos los sueros ACA positivos por ambos métodos, el kit comercial para CENPB y nuestro inmunoblot Nt-CENPB, según lo esperado. Ocho sueros, a diluciones entre 1:200 y 1:1000, dieron a su vez reactividad positiva frente al antígeno recombinante Nt-CENPI en la técnica del inmunoblot. Siete de esos ocho sueros CENPI-positivos eran también ACA positivos por inmunofluorescencia en las células Hep-2 y reactividad demostrada contra Nt-CENPB. Solo en un caso no se encontró reactividad ACA ni anti-CENPB pero sí frente a CENPI. Por otra parte, ninguno de los 31 sueros analizados de pacientes con SLE que

eran ACA y CENPB negativos reaccionaron contra CENPI, aunque este grupo de pacientes tienen otros tipos de autoanticuerpos.

5 El estudio detallado de las características de las pruebas de laboratorio de los pacientes con autoanticuerpos anti-CENPI (tabla I) nos lleva como resumen a varias conclusiones de interés. De los 8 pacientes identificados con anticuerpos anti-CENPI, 7 de ellos presentan también anticuerpos anti-CENPB característicos de prueba centromérica. El único paciente anti-CENPI positivo pero a la vez anti-CENPB negativo se diagnosticó como esclerodermia difusa  
10 sin tinción centromérica clara. De los 8 anti-CENPI positivos, 6 presentaron anticuerpos relacionados con enfermedad autoinmune hepática, 4 de ellos con anticuerpos anti-mitocondria y 2 diagnosticados de cirrosis biliar primaria (PBC). Estos datos son de potencial interés clínico para ser estudiados al  
15 amparo de recientes observaciones sobre la interrelación entre la esclerodermia y la PBC (Prince *et al.*, 2004. *Gut* 53: 865–70; Assassi *et al.*, 2009. *J Rheumatol* 36: 2250-6).

## REIVINDICACIONES

1. Uso de la proteína CENPI, de una variante o de un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPI, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de enfermedades autoinmunes.  
5
2. Uso de la proteína CENPI, de una variante o de un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPI según la reivindicación anterior, donde la enfermedad autoinmune es la esclerodermia.  
10
3. Uso de la proteína CENPI, una variante o de un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPI según la reivindicación anterior, donde la enfermedad autoinmune es la hepatopatía autoinmune.  
15
4. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, que comprende:
  - a. obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
  - b. detectar la cantidad de anticuerpos frente a la proteína CENPI, o frente a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPI en la muestra biológica aislada de (a);  
20
5. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes según la reivindicación anterior, que además comprende:
  - c. comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.  
25
6. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde en el paso (b) se detecta la cantidad de anticuerpos frente a la región amino-terminal de la proteína CENPI (Nt-CENPI), o frente a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma.  
30

7. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde la región amino-terminal de CENPI (Nt-CENPI) es recombinante.
- 5
8. Método de diagnóstico de enfermedades autoinmunes, que comprende los pasos (a) – (c) según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde en el paso (b) se detecta, además, la cantidad de anticuerpos frente a la proteína CENPB, frente a una variante o frente a un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPB,
- 10
9. Método de diagnóstico de enfermedades autoinmunes, que comprende los pasos (a) – (c) según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, y además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos con enfermedad autoinmune, cuando presenta una cantidad de anticuerpos frente a la proteína CENPI, frente a la región amino-terminal de CENPI (Nt-CENPI), o frente a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos detectados en el paso (b), mayor y estadísticamente significativa a la cantidad de referencia de (c).
- 15
- 20
10. Método de diagnóstico de enfermedades autoinmunes según la reivindicación anterior, donde la cantidad de referencia es uno o varios controles negativos presentes en pacientes con otras enfermedades autoinmunes.
- 25
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-10, donde la enfermedad autoinmune es la esclerodermia.
- 30
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-10, donde la enfermedad autoinmune es una hepatopatía autoinmune.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-12, donde la detección de la cantidad de anticuerpos frente a la proteína CENPI, CENPB y/o la región amino-terminal de la proteína CENPI (Nt-CENPI), o frente a una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de los mismos del paso (b), en la muestra biológica de (a), se realiza mediante un inmunoensayo.
- 5
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-13, donde la detección de la cantidad de anticuerpos frente a la proteína CENPI y/o la región amino-terminal de la proteína CENPI (Nt-CENPI) del paso (b), en la muestra biológica de (a), se realiza mediante un Western blot.
- 10
15. Un Kit o dispositivo que comprende la proteína CENPI, la región amino-terminal de la proteína CENPI (Nt-CENPI), o una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de las mismas.
- 15
16. El Kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que además comprende la proteína CENPB, una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de la proteína CENPB.
- 20
17. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 15-16, en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades autoinmunes.
18. Uso de un kit según la reivindicación 17, donde la enfermedad autoinmune es la esclerodermia y/o una hepatopatía autoinmune

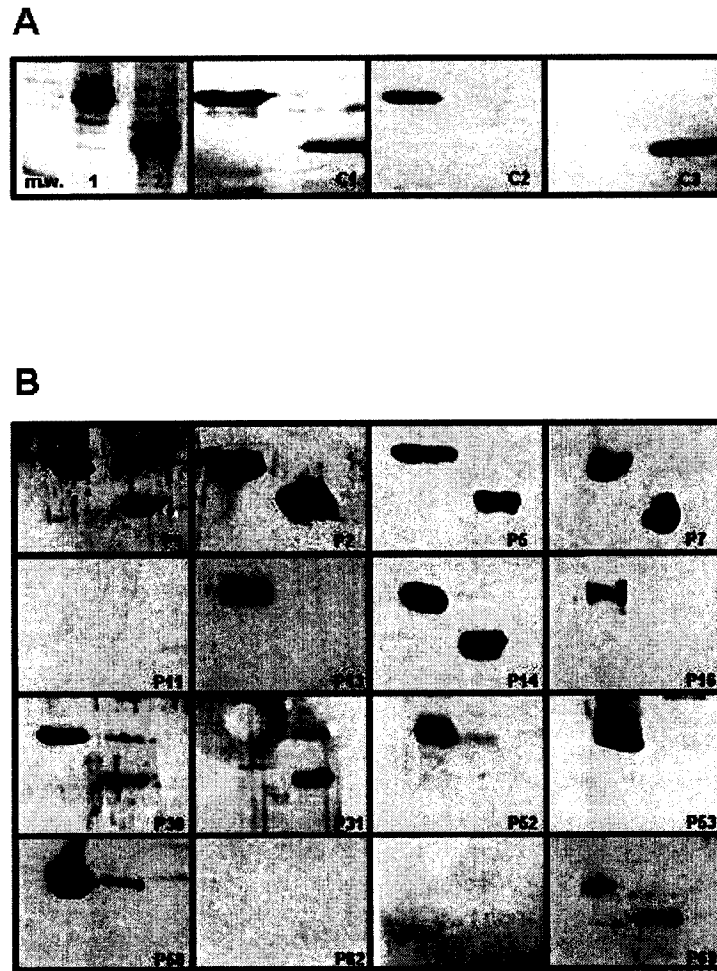
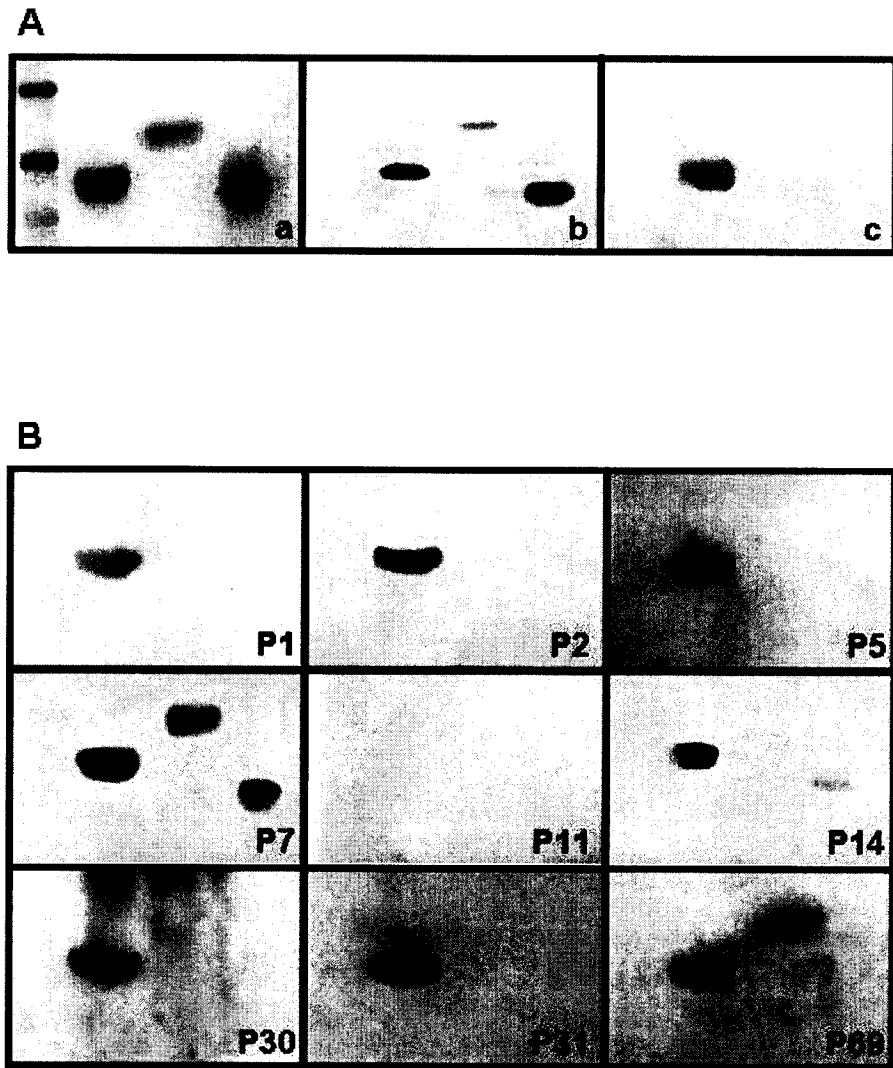


Fig. 1



**Fig. 2**

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Cádiz  
Servicio Andaluz de Salud

<120> Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la la esclerodermia.

<130> FCAD-43

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 756

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Pro Gln Lys Arg Val Lys Asn Val Gln Ala Gln Asn Arg Thr  
1 5 10 15

Ser Gln Gly Ser Ser Ser Phe Gln Thr Thr Leu Ser Ala Trp Lys Val  
20 25 30

Lys Gln Asp Pro Ser Asn Ser Lys Asn Ile Ser Lys His Gly Gln Asn  
35 40 45

Asn Pro Val Gly Asp Tyr Glu His Ala Asp Asp Gln Ala Glu Glu Asp  
50 55 60

Ala Leu Gln Met Ala Val Gly Tyr Phe Glu Lys Gly Pro Ile Lys Ala  
65 70 75 80

Ser Gln Asn Lys Asp Lys Thr Leu Glu Lys His Leu Lys Thr Val Glu  
85 90 95

Asn Val Ala Trp Lys Asn Gly Leu Ala Ser Glu Glu Ile Asp Ile Leu  
100 105 110

Leu Asn Ile Ala Leu Ser Gly Lys Phe Gly Asn Ala Val Asn Thr Arg  
115 120 125

Ile Leu Lys Cys Met Ile Pro Ala Thr Val Ile Ser Glu Asp Ser Val  
130 135 140

Val Lys Ala Val Ser Trp Leu Cys Val Gly Lys Cys Ser Gly Ser Thr  
145 150 155 160

Lys Val Leu Phe Tyr Arg Trp Leu Val Ala Met Phe Asp Phe Ile Asp  
165 170 175

Arg Lys Glu Gln Ile Asn Leu Leu Tyr Gly Phe Phe Phe Ala Ser Leu  
180 185 190



ES 2 395 100 B2

Gln Asp Asp Ala Leu Cys Pro Tyr Val Cys His Leu Leu Tyr Leu Leu  
 195 200 205  
 Thr Lys Lys Glu Asn Val Lys Pro Phe Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp  
 210 215 220  
 Leu Gln Ala Lys Met Gly Met Gln Pro His Leu Gln Ala Leu Leu Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Tyr Lys Phe Phe Ala Pro Ala Leu Ile Ser Val Ser Leu Pro Val  
 245 250 255  
 Arg Lys Lys Ile Tyr Phe Lys Asn Ser Glu Asn Leu Trp Lys Thr Ala  
 260 265 270  
 Leu Leu Ala Val Lys Gln Arg Asn Arg Gly Pro Ser Pro Glu Pro Leu  
 275 280 285  
 Lys Leu Met Leu Gly Pro Ala Asn Val Arg Pro Leu Lys Arg Lys Trp  
 290 295 300  
 Asn Ser Leu Ser Val Ile Pro Val Leu Asn Ser Ser Ser Tyr Thr Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Cys Gly Lys Lys Glu Met Ser Leu Ser Asp Cys Leu Asn Arg Ser  
 325 330 335  
 Gly Ser Phe Pro Leu Glu Gln Leu Gln Ser Phe Pro Gln Leu Leu Gln  
 340 345 350  
 Asn Ile His Cys Leu Glu Leu Pro Ser Gln Met Gly Ser Val Leu Asn  
 355 360 365  
 Asn Ser Leu Leu Leu His Tyr Ile Asn Cys Val Arg Asp Glu Pro Val  
 370 375 380  
 Leu Leu Arg Phe Tyr Tyr Trp Leu Ser Gln Thr Leu Gln Glu Glu Cys  
 385 390 395 400  
 Ile Trp Tyr Lys Val Asn Asn Tyr Glu His Gly Lys Glu Phe Thr Asn  
 405 410 415  
 Phe Leu Asp Thr Ile Ile Arg Ala Glu Cys Phe Leu Gln Glu Gly Phe  
 420 425 430  
 Tyr Ser Cys Glu Ala Phe Leu Tyr Lys Ser Leu Pro Leu Trp Asp Gly  
 435 440 445  
 Leu Cys Cys Arg Ser Gln Phe Leu Gln Leu Val Ser Trp Ile Pro Phe  
 450 455 460

ES 2 395 100 B2

Ser Ser Phe Ser Glu Val Lys Pro Leu Leu Phe Asp His Leu Ala Gln  
465 470 475 480

Leu Phe Phe Thr Ser Thr Ile Tyr Phe Lys Cys Ser Val Leu Gln Ser  
485 490 495

Leu Lys Glu Leu Leu Gln Asn Trp Leu Leu Trp Leu Ser Met Asp Ile  
500 505 510

His Met Lys Pro Val Thr Asn Ser Pro Leu Glu Thr Thr Leu Gly Gly  
515 520 525

Ser Met Asn Ser Val Ser Lys Leu Ile His Tyr Val Gly Trp Leu Ser  
530 535 540

Thr Thr Ala Met Arg Leu Glu Ser Asn Asn Thr Phe Leu Leu His Phe  
545 550 555 560

Ile Leu Asp Phe Tyr Glu Lys Val Cys Asp Ile Tyr Ile Asn Tyr Asn  
565 570 575

Leu Pro Leu Val Val Leu Phe Pro Pro Gly Ile Phe Tyr Ser Ala Leu  
580 585 590

Leu Ser Leu Asp Thr Ser Ile Leu Asn Gln Leu Cys Phe Ile Met His  
595 600 605

Arg Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Ala Ala Lys Lys Asn Glu Leu Val Gln  
610 615 620

Lys Thr Lys Ser Glu Phe Asn Phe Ser Ser Lys Thr Tyr Gln Glu Phe  
625 630 635 640

Asn His Tyr Leu Thr Ser Met Val Gly Cys Leu Trp Thr Ser Lys Pro  
645 650 655

Phe Gly Lys Gly Ile Tyr Ile Asp Pro Glu Ile Leu Glu Lys Thr Gly  
660 665 670

Val Ala Glu Tyr Lys Asn Ser Leu Asn Val Val His His Pro Ser Phe  
675 680 685

Leu Ser Tyr Ala Val Ser Phe Leu Leu Gln Glu Ser Pro Glu Glu Arg  
690 695 700

Thr Val Asn Val Ser Ser Ile Arg Gly Lys Lys Trp Ser Trp Tyr Leu  
705 710 715 720

Asp Tyr Leu Phe Ser Gln Gly Leu Gln Gly Leu Lys Leu Phe Ile Arg  
725 730 735

ES 2 395 100 B2

Ser Ser Val His His Ser Ser Ile Pro Arg Ala Glu Gly Ile Asn Cys  
 740 745 750

Asn Asn Gln Tyr  
 755

<210> 2  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> región amino-terminal de CENPI (Nt-CENPI)  
 <222> (1)..(249)

<400> 2

Met Ser Pro Gln Lys Arg Val Lys Asn Val Gln Ala Gln Asn Arg Thr  
 1 5 10 15

Ser Gln Gly Ser Ser Ser Phe Gln Thr Thr Leu Ser Ala Trp Lys Val  
 20 25 30

Lys Gln Asp Pro Ser Asn Ser Lys Asn Ile Ser Lys His Gly Gln Asn  
 35 40 45

Asn Pro Val Gly Asp Tyr Glu His Ala Asp Asp Gln Ala Glu Glu Asp  
 50 55 60

Ala Leu Gln Met Ala Val Gly Tyr Phe Glu Lys Gly Pro Ile Lys Ala  
 65 70 75 80

Ser Gln Asn Lys Asp Lys Thr Leu Glu Lys His Leu Lys Thr Val Glu  
 85 90 95

Asn Val Ala Trp Lys Asn Gly Leu Ala Ser Glu Glu Ile Asp Ile Leu  
 100 105 110

Leu Asn Ile Ala Leu Ser Gly Lys Phe Gly Asn Ala Val Asn Thr Arg  
 115 120 125

Ile Leu Lys Cys Met Ile Pro Ala Thr Val Ile Ser Glu Asp Ser Val  
 130 135 140

Val Lys Ala Val Ser Trp Leu Cys Val Gly Lys Cys Ser Gly Ser Thr  
 145 150 155 160

Lys Val Leu Phe Tyr Arg Trp Leu Val Ala Met Phe Asp Phe Ile Asp  
 165 170 175

Arg Lys Glu Gln Ile Asn Leu Leu Tyr Gly Phe Phe Phe Ala Ser Leu  
 180 185 190

ES 2 395 100 B2

Gln Asp Asp Ala Leu Cys Pro Tyr Val Cys His Leu Leu Tyr Leu Leu  
 195 200 205

Thr Lys Lys Glu Asn Val Lys Pro Phe Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp  
 210 215 220

Leu Gln Ala Lys Met Gly Met Gln Pro His Leu Gln Ala Leu Leu Ser  
 225 230 235 240

Leu Tyr Lys Phe Phe Ala Pro Ala Leu  
 245

<210> 3  
 <211> 599  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CEMPB (major centromere autoantigen B)  
 <222> (1)..(599)

<400> 3

Met Gly Pro Lys Arg Arg Gln Leu Thr Phe Arg Glu Lys Ser Arg Ile  
 1 5 10 15

Ile Gln Glu Val Glu Glu Asn Pro Asp Leu Arg Lys Gly Glu Ile Ala  
 20 25 30

Arg Arg Phe Asn Ile Pro Pro Ser Thr Leu Ser Thr Ile Leu Lys Asn  
 35 40 45

Lys Arg Ala Ile Leu Ala Ser Glu Arg Lys Tyr Gly Val Ala Ser Thr  
 50 55 60

Cys Arg Lys Thr Asn Lys Leu Ser Pro Tyr Asp Lys Leu Glu Gly Leu  
 65 70 75 80

Leu Ile Ala Trp Phe Gln Gln Ile Arg Ala Ala Gly Leu Pro Val Lys  
 85 90 95

Gly Ile Ile Leu Lys Glu Lys Ala Leu Arg Ile Ala Glu Glu Leu Gly  
 100 105 110

Met Asp Asp Phe Thr Ala Ser Asn Gly Trp Leu Asp Arg Phe Arg Arg  
 115 120 125

Arg His Gly Val Val Ser Cys Ser Gly Val Ala Arg Ala Arg Ala Arg  
 130 135 140

Asn Ala Ala Pro Arg Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Val  
 145 150 155 160

ES 2 395 100 B2

Pro Ser Glu Gly Ser Gly Gly Ser Thr Thr Gly Trp Arg Ala Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Pro Pro Ser Val Ala Glu Gly Tyr Ala Ser Gln Asp Val Phe  
 180 185 190

Ser Ala Thr Glu Thr Ser Leu Trp Tyr Asp Phe Leu Pro Asp Gln Ala  
 195 200 205

Ala Gly Leu Cys Gly Gly Asp Gly Arg Pro Arg Gln Ala Thr Gln Arg  
 210 215 220

Leu Ser Val Leu Leu Cys Ala Asn Ala Asp Gly Ser Glu Lys Leu Pro  
 225 230 235 240

Pro Leu Val Ala Gly Lys Ser Ala Lys Pro Arg Ala Gly Gln Ala Gly  
 245 250 255

Leu Pro Cys Asp Tyr Thr Ala Asn Ser Lys Gly Gly Val Thr Thr Gln  
 260 265 270

Ala Leu Ala Lys Tyr Leu Lys Ala Leu Asp Thr Arg Met Ala Ala Glu  
 275 280 285

Ser Arg Arg Val Leu Leu Leu Ala Gly Arg Leu Ala Ala Gln Ser Leu  
 290 295 300

Asp Thr Ser Gly Leu Arg His Val Gln Leu Ala Phe Phe Pro Pro Gly  
 305 310 315 320

Thr Val His Pro Leu Glu Arg Gly Val Val Gln Gln Val Lys Gly His  
 325 330 335

Tyr Arg Gln Ala Met Leu Leu Lys Ala Met Ala Ala Leu Glu Gly Gln  
 340 345 350

Asp Pro Ser Gly Leu Gln Leu Gly Leu Thr Glu Ala Leu His Phe Val  
 355 360 365

Ala Ala Ala Trp Gln Ala Val Glu Pro Ser Asp Ile Ala Ala Cys Phe  
 370 375 380

Arg Glu Ala Gly Phe Gly Gly Gly Pro Asn Ala Thr Ile Thr Thr Ser  
 385 390 395 400

Leu Lys Ser Glu Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
 405 410 415

Glu Glu Glu Gly Glu Gly Glu Glu Glu Glu Glu Gly Glu Glu Glu  
 420 425 430

Glu Glu Glu Gly Gly Glu Gly Glu Glu Leu Gly Glu Glu Glu Val  
 435 440 445

Glu Glu Glu Gly Asp Val Asp Ser Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu  
 450 455 460

Glu Ser Ser Ser Glu Gly Leu Glu Ala Glu Asp Trp Ala Gln Gly Val  
 465 470 475 480

Val Glu Ala Gly Gly Ser Phe Gly Ala Tyr Gly Ala Gln Glu Glu Ala  
 485 490 495

Gln Cys Pro Thr Leu His Phe Leu Glu Gly Gly Glu Asp Ser Asp Ser  
 500 505 510

Asp Ser Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Glu Asp Asp Glu Asp Glu Asp  
 515 520 525

Asp Asp Asp Asp Glu Glu Asp Gly Asp Glu Val Pro Val Pro Ser Phe  
 530 535 540

Gly Glu Ala Met Ala Tyr Phe Ala Met Val Lys Arg Tyr Leu Thr Ser  
 545 550 555 560

Phe Pro Ile Asp Asp Arg Val Gln Ser His Ile Leu His Leu Glu His  
 565 570 575

Asp Leu Val His Val Thr Arg Lys Asn His Ala Arg Gln Ala Gly Val  
 580 585 590

Arg Gly Leu Gly His Gln Ser  
 595

- <210> 4
- <211> 207
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> región carboxilo-terminal de la proteína CENPI (Ct-CENPI)
- <222> (1)..(207)

<400> 4

Leu Glu Ser Asn Asn Thr Phe Leu Leu His Phe Ile Leu Asp Phe Tyr  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Cys Asp Ile Tyr Ile Asn Tyr Asp Leu Pro Leu Val Val  
 20 25 30

Leu Phe Pro Pro Gly Ile Phe Tyr Ser Ala Leu Leu Ser Leu Asp Thr  
 35 40 45

ES 2 395 100 B2

Ser Ile Leu Asn Gln Leu Cys Phe Ile Met His Arg Tyr Arg Lys Asn  
 50 55 60  
 Leu Thr Ala Ala Lys Lys Asn Glu Leu Val Gln Lys Thr Lys Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Phe Asn Phe Ser Ser Lys Thr Tyr Gln Glu Phe Asn Tyr Tyr Leu Thr  
 85 90 95  
 Ser Met Val Gly Cys Leu Trp Thr Ser Lys Pro Phe Ala Lys Gly Ile  
 100 105 110  
 Tyr Ile Asp Pro Glu Ile Leu Glu Lys Thr Gly Val Ala Glu Tyr Lys  
 115 120 125  
 Asn Ser Leu Asn Val Val His His Pro Ser Phe Leu Ser Tyr Ala Val  
 130 135 140  
 Ser Phe Leu Leu Gln Glu Ser Pro Glu Glu Arg Thr Val Asn Val Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Ile Arg Gly Lys Lys Trp Ser Trp Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Ser  
 165 170 175  
 Gln Gly Leu Gln Gly Leu Lys Leu Phe Ile Arg Ser Ser Val His His  
 180 185 190  
 Ser Ser Ile Pro Arg Ala Glu Gly Ile Asn Cys Asn Asn Gln Tyr  
 195 200 205



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201100798

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.07.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/564** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	AKBARALI Y. et al. Fine specificity mapping of autoantigens targeted by anti-centromere autoantibodies. Journal of Autoimmunity. 2006. Vol. 27, páginas: 272-280, página 272, resumen; páginas 277-280.	1-18
A	EP 0552829 A1 (AKZO N.V.) 12.01.1993, página 2, columnas 1-2; reivindicaciones 1-7.	1-18
A	BRIASOULIS E. et al. CENP-B specific anti-centromere autoantibodies heralding small-cell lung cancer. A case study and review of the literature. Lung Cancer. 2008. Vol. 60, páginas: 302-306, página 303, columna 2 – página 305, columna 1.	1-18
A	ES 2167590 T3 (KIM THINK YOU) 16.05.2002, página 2, columna 1; reivindicación 1.	1-18
A	WO 2008023234 A1 (UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE "AMEDEO AVOGADRO" [IT/IT]) 28.02.2008, página 2, línea 21 – página 4, línea 16; reivindicaciones 1-20.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
26.09.2012

Examinador  
M. D. García Grávalos

Página  
1/4



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

G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE ACADEMICO, EBI.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.09.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	AKBARALI Y. et al. Journal of Autoimmunity. 2006. Vol. 27, páginas: 272-280.	2006
D02	EP 0552829 A1	12.01.1993
D03	BRIASOULIS E. et al. Lung Cancer. 2008. Vol. 60, páginas: 302-306.	2008
D04	ES 2167590 T3	16.05.2002
D05	WO 2008023234 A1	28.02.2008

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga el uso de la proteína del centrómero CENPI en un método para obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de enfermedades autoinmunes, preferentemente esclerodermia (reivindicaciones 1-14). Se refiere también a un kit para llevar a cabo dicho método (reivindicaciones 15-18).

El documento D01 divulga un estudio, basado en la presencia de autoanticuerpos anticentrómero en muestras de suero de pacientes con esclerodermia u otras enfermedades reumáticas. En dichas muchas, se detectó reactividad frente a las proteínas CENP-A y CENP-B y se identificaron cuatro epítomos diferentes de CENP-A que constituyen dianas específicas en sueros de pacientes con esclerodermia para dichos autoanticuerpos anticentrómero (ver página 272, resumen; páginas 277-280).

El documento D02 divulga un péptido que reacciona inmunoquímicamente con anticuerpos anticentrómero (ACA), así como un método de detección de los autoanticuerpos anticentrómero, o de un antígeno del centrómero, como la proteína CENP-B). Se refiere también a un kit para llevar a cabo dicho método (ver página 2, columnas 1-2; reivindicaciones 1-7).

El documento D03 divulga el uso de la proteína CENP-B para diagnóstico precoz de cáncer de pulmón de células pequeñas (ver página 303, columna 2 - página 305, columna 1).

El documento D04 divulga un método de diagnóstico de enfermedades autoinmunes mediante la detección de anticuerpos de centros organizadores de microtúbulos (ver página 2, columna 1; reivindicación 1).

El documento D05 divulga el uso de la proteína interferón-inducible humana 16 (IFI16) en un método para diagnosis de la esclerodermia cutánea y a un kit para llevar a cabo dicho (ver página 2, línea 21 - página 4, línea 16; reivindicaciones 1-20).

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**

La presente solicitud divulga el uso de la proteína del centrómero CENPI en un método para obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de enfermedades autoinmunes, preferentemente esclerodermia.

**1.1. REIVINDICACIONES 1-18**

La presencia de autoanticuerpos anticentrómero en muestras de suero de pacientes con esclerodermia u otras enfermedades autoinmunes es conocida en el estado de la técnica. De hecho los documentos D01-D03 hacen referencia a ello. La diferencia entre estos documentos y la presente invención radica en el uso específico de la proteína del centrómero CENP-I, que no se ha encontrado en estos documentos.

Aunque a la vista de los documentos D01-D03, que anticipan la presencia de autoanticuerpos anticentrómero en muestras de suero de pacientes con esclerodermia u otras enfermedades autoinmunes y siendo CENP-I otra proteína centromérica, podría resultar evidente, de acuerdo a la información disponible para el experto en la materia, la presencia de autoanticuerpos anti CENP-I en casos de esclerodermia. Sin embargo, al tratarse del uso de otra proteína diferente a las divulgadas, para diagnóstico y tratamiento de la esclerodermia, se considera que la presente invención proporciona unas composiciones para diagnóstico, prevención y tratamiento de esta enfermedad distintas a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01-D03, las reivindicaciones 1-18 cumplen con el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Los documentos D04 - D05 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.