

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 792**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07861152 .2**  
96 Fecha de presentación: **20.12.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2223121**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2010**

54 Título: **Método para la diferenciación de EII y SII y la distinción adicional entre tipos patológicos de EII**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.11.2012**

73 Titular/es:  
**INDEX DIAGNOSTICS AB (PUBL) (100.0%)  
SCHEELES VAG 2  
171 77 STOCKHOLM, SE**

72 Inventor/es:  
**VON STEIN, PETRA;  
KOUZNETSOV, NIKOLAI;  
VON STEIN, OLIVER y  
GIELEN, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:  
**No consta**

ES 2 391 792 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la diferenciación de EII y SII y la distinción adicional entre tipos patológicos de EII

La presente invención se refiere a un método para su uso en el diagnóstico de enfermedad inflamatoria del intestino usando un enfoque multigénico. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para su uso en el diagnóstico y/o la diferenciación de enfermedad inflamatoria del intestino (EII) de síndrome del intestino inflamatorio (SII) determinando la expresión de al menos un gen o genes marcadores específicos, por ejemplo usando oligonucleótidos que amplifican específicamente dichos genes marcadores, o determinando la expresión de las correspondientes proteínas, por ejemplo usando anticuerpos que reconocen específicamente las proteínas codificadas por dicho gen o genes marcadores específicos. El método de diagnóstico puede usarse ventajosamente en el diagnóstico y la diferenciación tempranos de estas enfermedades debido a la precisión y reproducibilidad mejoradas.

Antecedentes de la invención

La enfermedad inflamatoria del intestino (EII) describe un estado de inflamación intestinal con recaída crónica. La comprensión actual de la patogenia de la enfermedad sugiere una interacción compleja de múltiples factores ambientales y genéticos. Provoca una morbilidad significativa en poblaciones de origen europeo, teniendo las dos formas principales (enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU)) una prevalencia combinada de 150-250/10.000. Ambas formas de EII tienen una incidencia máxima al comienzo de la vida adulta pero puede desarrollarse en cualquier etapa. Afectan a ambos sexos en una extensión aproximadamente igual. Los factores de riesgo ambientales para el desarrollo de EII están escasamente definidos. El factor mejor caracterizado es el tabaquismo, que aumenta claramente el riesgo de desarrollar la enfermedad de Crohn pero protege frente a la colitis ulcerosa, por motivos que no están claros.

El tratamiento de la enfermedad es un compromiso a largo plazo tanto para el paciente como para el médico, puesto que actualmente no hay ninguna cura para ningún estado. Aproximadamente el 30% de los pacientes con EII se someten a cirugía durante su vida y los pacientes con EII de larga evolución corren un riesgo considerable de desarrollar cáncer colorrectal. Tres de cada diez pacientes con EII no responden a la principal terapia médica disponible hoy en día, incluso cuando se usan dosis altas, provocando efectos secundarios considerables.

La colitis ulcerosa provoca normalmente síntomas de diarrea hemorrágica y urgencia fecal. La inflamación implica al recto, y puede extenderse de manera continua a partes de, o todo el colon proximal. El examen histológico revela un infiltrado de células inflamatorias crónicas, que se limitan a las capas superficiales de la mucosa colónica. Los granulomas no son una característica. La enfermedad de Crohn es bastante más pleomórfica. Se caracteriza patológicamente por segmentos discontinuos de inflamación transmural, que pueden afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano, pero que implican de la manera más común la región ileocecal. Los granulomas son un distintivo histológico pero las características clínicas son bastante variables dependiendo del sitio de afectación del intestino. Si el colon está inflamado, los síntomas pueden imitar exactamente a los de la colitis ulcerosa.

Es obvio que una posibilidad de distinguir que clínicamente CU de EC colónica en un estadio temprano proporcionaría enormes beneficios tanto al paciente como al médico. Permitiría el diseño de regímenes de tratamiento precisos, impediría el uso de medicamentos innecesarios y reduciría los costes de tratamiento.

El síndrome del intestino irritable, o SII, también es un trastorno gastrointestinal en el que los músculos lisos de la pared intestinal se vuelven hipersensibles a desencadenantes tales como estrés o incluso café y provocan meteorismo, náuseas, vómitos y estreñimiento o diarrea. Desafortunadamente, como muchos de los síntomas son similares a los de EII, SII a menudo se diagnostica mal.

Existen unos cinco millones de casos de SII en los EE.UU. sólo. Permitir que se distinga SII de los casos de EII más graves reduciría el número de visitas innecesarias al médico por parte de los pacientes con SII que se sospecha que tienen EII. También ayudaría al médico a elegir el tipo de tratamiento más apropiado.

La bibliografía de patentes indica que los métodos disponibles para distinguir entre diferentes formas de EII, y en particular la diferenciación entre CU y EC, aparte de los ejemplos facilitados anteriormente de diferentes procedimientos de examen, se han centrado en métodos basados en anticuerpos.

Por ejemplo, el documento WO 03/036262 describe un método y kit que se proporcionan para la diferenciación de EC de otras dolencias gastrointestinales, tales como CU y SII, usando la presencia de anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* fecales (ASCA) como marcador para la enfermedad de Crohn. El kit incluye un inmunoensayo ligado a enzimas y otro inmunoensayo que utiliza anticuerpos específicos para inmunoglobulinas humanas para la medición de ASCA endógenos totales en una muestra fecal humana.

El documento WO01/58927 describe métodos de diagnóstico para detectar enfermedades asociadas con una respuesta de autoantígeno frente a hTM en tejido afectado, y en particular CU.

Otro enfoque de anticuerpos estudiado intensamente (véanse las patentes estadounidenses 5.691.151; 5.830.675; y 6.033.864) son los autoanticuerpos frente a neutrófilos (anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos perinucleares atípicos) P-ANCA. Se encuentran principalmente en CU (50-67%) pero también en EC (6-15%). Se pensó que la combina-

ción de ANCA y ASCA sería muy útil en pacientes con colitis indeterminada. Pero un hallazgo notable fue que aproximadamente el 50% de los pacientes con colitis indeterminada son pacientes seronegativos. Esto significa que no desarrollan anticuerpos para ASCA y ANCA y, por tanto, no pueden diagnosticarse durante, en promedio, casi 10 años (Bossuyt X., Clin Chem 2006, 52:2, 171-181)

- 5 El documento WO 2004/001073 describe los siete genes referidos en la presente invención como marcadores de diagnóstico para CU. La expresión de estos marcadores a nivel de ARN se determina en biopsias de mucosa del colon.

Sumario de la invención

10 Sigue existiendo una necesidad de métodos mejorados para la selección precisa, rápida y fiable de pacientes que notifican problemas gastrointestinales, y para distinguir entre pacientes con EII y sin EII, por ejemplo pacientes que padecen SII. Sería particularmente deseable, tanto desde una perspectiva de un paciente como de un hospital, si pudiera realizarse una primera selección antes de que el paciente se remita a un examen ileocolonosκόpico.

También existe una necesidad de diagnóstico de colitis ulcerosa, en particular en el contexto de la distinción entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn en pacientes con EII.

15 Un objetivo de la presente invención es poner a disposición métodos según se reivindica para estos fines. Un objetivo particular es poner a disposición un método que hace posible alcanzar un diagnóstico fiable en un estadio temprano de la enfermedad. Otro objetivo es poner a disposición un método para un método fiable y aún simplificado y menos invasivo para seguir la respuesta al tratamiento y que confirme la mejora en un paciente que se somete a tratamiento.

20 Otro objetivo es hacer posible realizar una primera selección usando técnicas de toma de muestras no invasivas o mínimamente invasivas, en contraposición a las biopsias o el examen ileocolonosκόpico usados normalmente. También el examen con enema de bario debe clasificarse como procedimiento invasivo, debido a las considerables molestias y tensión que se ejercen sobre el paciente. También es un objetivo poner a disposición métodos según se exponen en las reivindicaciones para distinguir entre EII y SII, y EC y CU también en casos difíciles, en los que el cuadro clínico puede ser muy similar.

25 Objetivos adicionales subyacentes a la invención, así como las soluciones ofrecidas por la invención y las ventajas asociadas resultarán evidentes para un experto tras el estudio de la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones.

30 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que una diferenciación entre EII y SII, y en el caso de haber determinado que el paciente padece EII, una distinción adicional entre CU y EC, se hace posible mediante un enfoque multigénico en el que se estudian los perfiles de expresión génica en una muestra tomada del cuerpo humano, preferiblemente tomada de heces o sangre de un paciente, o una muestra de biopsia obtenida de una zona inflamada en los intestinos.

La presente invención se basa en la identificación de posibles genes marcadores que o bien colectivamente o bien en subgrupos, forman la base para una distinción entre EII y SII.

35 Una realización de la invención, confirmada experimentalmente, es que la cuantificación de los niveles de expresión de varios genes específicos y las correspondientes proteínas pueden utilizarse en la determinación de manera precisa y sencilla, usando muestras de heces o sangre, si el paciente padece EII, y en un análisis de seguimiento usando una biopsia, determinar si el paciente está afectado de CU o EC

40 Más específicamente, se proporcionan métodos que permiten la detección de siete (7) marcadores distintos, individualmente o en subgrupos de los mismos, usando oligonucleótidos específicos de genes o anticuerpos para la cuantificación de los niveles de expresión de dichos marcadores. Los oligonucleótidos o anticuerpos están diseñados para reconocer específicamente la correspondiente secuencia génica o proteína marcadora. Se da a conocer un ensayo y kit para la detección y monitorización del estado de expresión de dichos siete genes marcadores o subconjuntos de los mismos en una muestra biológica. Los genes marcadores son (números de registro entre paréntesis): SLC6A14 (NM\_007231); SLC26A2 (NM\_000112); GRO-1 (NM\_001511); MMP-7 (BC003635); MAP-17 (NM\_005764); RegIV (BC017089) también conocido como GISP, y vanina 1 (NM\_004666).

45 Los resultados obtenidos por los inventores indican que vanina 1 es un gen marcador preferido cuando se analiza el ARN en una muestra de sangre. También los marcadores SLC26A2, MAP-17 muestran utilidad en sangre.

El ensayo es preferiblemente un método y kit para la cuantificación de ARN basado en métodos de PCR.

Alternativamente, el ensayo es un ensayo basado en anticuerpos, sin cultivo para la detección de dichas proteínas marcadoras.

50 Otra realización de la presente invención es, por tanto, un método para detectar eficazmente CU o EC en un estadio temprano usando anticuerpos que se unen específicamente a proteínas expresadas por los genes humanos SLC6A14, SLC26A2, GRO-1, MMP-7, MAP-17, Reg IV y vanina 1 en una muestra tomada del cuerpo humano. Los resultados obtenidos por los inventores indican que GRO-1 y RegIV son las proteínas marcadoras preferidas cuando la fuente de la muestra son heces humanas, y vanina 1, GRO-1 y MMP-7 cuando la muestra es sangre.

Otra realización de la presente invención es un método para diagnosticar CU y EC midiendo el nivel de expresión de las proteínas SLC6A14, SLC26A2, GRO-1, MMP-7, MAP-17, Reg IV y vanina 1 en una muestra mediante una reacción de unión antígeno-anticuerpo usando un anticuerpo que se une específicamente a una proteína expresada a partir de genes humanos que codifican para SLC6A14, SLC26A2, GRO-1, MMP-7, MAP-17, Reg IV y vanina 1.

- 5 Realizaciones adicionales de la invención son métodos para la determinación de la respuesta de un paciente a un tratamiento, la tasa de mejora durante el tratamiento y para estimar el pronóstico para la recuperación.

Breve descripción de los dibujos

La invención se dará a conocer en detalle en la siguiente descripción, los ejemplos y los dibujos, en los que

- 10 La figura 1 muestra los perfiles de expresión de 10 casos de SII y 10 de EII derivados de análisis en tiempo real de muestra de heces. Se representan gráficamente los siete marcadores diferentes en el eje x, y se representan gráficamente los correspondientes valores de delta Ct del análisis PCR en el eje y (1 = SLC6A14; 2 = SLC26A2; 3 = GRO1; 4 = MMP-7; 5 = MAP17; 6 = GISP; 7 = vanina 1).

- 15 La figura 2 muestra los perfiles de expresión en muestras de heces y biopsia derivados de análisis de PCR en tiempo real. Se representan gráficamente los siete marcadores diferentes en el eje x, y se representan gráficamente los correspondientes valores de delta Ct del análisis PCR en el eje y (1 = SLC6A14; 2 = SLC26A2; 3 = GRO1; 4 = MMP-7; 5 = MAP17; 6 = GISP; 7 = vanina 1). [db = derivado de biopsia; dh = derivado de heces]

- 20 La figura 3 muestra los perfiles de expresión en muestras de biopsia derivados de análisis en tiempo real. Se representan gráficamente los siete marcadores diferentes en el eje x, y se representan gráficamente los correspondientes valores de delta Ct del análisis PCR en el eje y (1 = SLC6A14; 2 = SLC26A2; 3 = GRO1; 4 = MMP-7; 5 = MAP17; 6 = GISP; 7 = vanina 1).

La figura 4 muestra un gráfico ROC como resultado del análisis en tiempo real de 18 pacientes sin EII y 63 con EII con los siete marcadores seguido por un análisis con un algoritmo de clasificación. El área bajo la curva ROC (AUC) de 0,903 ilustra el alto potencial discriminatorio de todos los marcadores en conjunto.

- 25 La figura 5 muestra un gráfico ROC como resultado del análisis en tiempo real de 18 pacientes sin EII y 63 con EII con sólo dos marcadores (GRO-1 y Reg IV) seguido por un análisis con un algoritmo de clasificación. El área bajo la curva ROC (AUC) de 0,892 ilustra el alto potencial discriminatorio de estos marcadores solos.

Descripción detallada

- 30 Antes de que se describa y se dé a conocer la presente invención, ha de entenderse que un experto en la técnica apreciará inmediatamente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y las ventajas mencionados, así como aquellos objetos, fines y ventajas inherentes en el presente documento. Los presentes ejemplos, junto con los métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas y compuestos específicos descritos en el presente documento son representativos actualmente de realizaciones preferidas, son a modo de ejemplo y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención.

- 35 También ha de entenderse que la terminología usada en el presente documento es para los fines de describir realizaciones particulares sólo, y no pretende ser limitativa. Debe observarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un/o”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una secuencia” incluye más de una de tales secuencias y similares.

- 40 En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a varios términos que deben definirse para tener los siguientes significados:

Tal como se usa en el presente documento, el término “cebador de ADN complementario” significa un oligonucleótido, que se aparea con el molde de ARN en una orientación particular para permitir la síntesis de una hebra de ADN naciente en presencia de transcriptasa inversa en la muestra biológica en las condiciones descritas en el presente documento.

- 45 También tal como se usa en el presente documento, las “condiciones” en las que se sintetiza una hebra de ADN incluyen la presencia de nucleótidos, cationes y agentes de tamponamiento apropiados en cantidades y a temperaturas tales que el molde de ARN y el cebador de ADN se aparearán y se incorporarán oligonucleótidos en una hebra de ADN sintetizada si no se inhibe la transcriptasa inversa por el fármaco inhibidor de transcriptasa inversa. Se exponen condiciones a modo de ejemplo en los ejemplos a continuación. Se han optimizado las condiciones descritas a partir de otros protocolos de síntesis de RT/ADNc. Se sabe generalmente que pueden establecerse otras condiciones para la optimización de una reacción de transcriptasa inversa particular basándose en protocolos bien conocidos por un experto habitual en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “par de cebadores” se refiere a dos cebadores, teniendo uno una designación directa y teniendo el otro una designación inversa con relación a sus orientaciones respectivas en una molécula de ADN bicatenario que consiste en una secuencia sentido y una antisentido, de manera que en las condicio-

nes de amplificación descritas en el presente documento, el cebador directo se aparea con y ceba la amplificación de la secuencia sentido y el cebador inverso se aparea con y ceba la amplificación de la secuencia antisentido. Pueden seleccionarse cebadores para su uso en la reacción de amplificación basándose en, tener una mínima complementariedad con otros cebadores en la reacción (para minimizar la formación de dímeros de cebadores) y tener valores de T<sub>m</sub> con el intervalo de temperaturas de reacción apropiado para el método de amplificación, preferiblemente PCR. Además, pueden seleccionarse cebadores para aparearse con regiones específicas del molde de ARN de manera que el producto de amplificación de ADN resultante oscila en tamaño entre 100 y 500 pares de bases de longitud y lo más preferiblemente de aproximadamente 300 pares de bases de longitud.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “detectar” o “detección” del ADN amplificado se refieren a determinar cualitativa o cuantitativamente la presencia de la hebra de ADN amplificada, que sólo se sintetiza si la transcriptasa inversa es resistente al fármaco inhibidor de transcriptasa inversa añadido a la mezcla de ensayo. La amplificación del ADN sintetizado puede detectarse mediante cualquier método para la detección de ADN conocido en la técnica. Por ejemplo, la detección del ADN amplificado puede ser mediante ensayo de hibridación por transferencia de tipo Southern, mediante visualización de los productos de amplificación de ADN de peso molecular específico sobre geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, mediante medición de la incorporación de nucleótidos radiomarcados en la hebra de ADN sintetizada mediante autorradiografía o medición de centelleo.

En el método de la presente invención, la amplificación por PCR se consigue preincubando todos los reactivos de la PCR y una muestra que contiene un ácido nucleico diana en presencia de cebadores específicos de genes apropiados y una enzima polimerasa termoestable. La mezcla de reacción resultante se calienta de forma cíclica en condiciones que permiten la formación y amplificación de productos de extensión de cebadores.

Los reactivos requeridos para la PCR los conocen los expertos en la técnica, y generalmente incluyen al menos dos cebadores de oligonucleótido que son suficientemente complementarios a regiones conservadas del ácido nucleico diana para hibridarse con las mismas, cuatro nucleósidos trifosfato diferentes, un agente de polimerización termoestable y cualquier cofactor requerido para el agente de polimerización. Nucleósidos trifosfato preferidos son los desoxirribonucleósidos trifosfato dATP, dCTP, dGTP y dTTP o dUTP, denominados colectivamente dNTP. Los nucleósidos trifosfato están disponibles comercialmente.

Los cebadores incluyen oligonucleótidos que se producen de manera natural o producidos de manera sintética que pueden aparearse con el ácido nucleico diana y que actúan como punto de inicio de la síntesis de ácido nucleico en condiciones apropiadas, es decir, en presencia de nucleósidos trifosfato, un agente de polimerización, temperatura, pH y tampón adecuados. Los cebadores tienen secuencias suficientemente complementarias al ácido nucleico diana para hibridarse con el mismo, y son de suficiente longitud, normalmente de desde 10-60 nucleótidos, para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia de un agente de polimerización. También pueden producirse cebadores de manera sintética mediante síntesis automática, mediante métodos bien conocidos por un experto habitual en la técnica.

Se conocen bien las consideraciones de diseño para cebadores en la técnica. Se seleccionan cebadores para que sean sustancialmente complementarios a las secuencias de las hebras del ácido nucleico específico que va a amplificarse, de manera que el producto de extensión sintetizado a partir de un cebador, cuando se separa de su complemento, puede servir como molde para el producto de extensión del otro cebador. Preferiblemente, los cebadores son exactamente complementarios con la región diana. Se subraya que los pares de cebadores facilitados en la presente memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones pueden sustituirse por cebadores funcionalmente equivalentes, que presentan especificidad frente a los genes marcadores, sin apartarse del alcance de la invención.

Los presentes inventores recogieron muestras de heces (muestras de materia fecal) de 33 pacientes con CU y 24 con EC para el análisis con PCR en tiempo real para determinar si podrían discriminar entre CU y EC tal como se describe para material de biopsia. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que los perfiles de expresión de estos marcadores eran sustancialmente iguales para CU y EC en la muestra de heces. Como muestras de control, se usaron algunos casos de SII. Éstos mostraron un patrón de expresión diferente para los genes como las dos formas principales de EII. Los inventores analizaron en total 18 casos de SII frente a los 63 casos de EII. Los resultados en la figura 1 muestran una clara diferencia en el perfil de expresión entre SII y EII para 10 casos de SII y 10 de EII.

Otro hecho sorprendente fue que los genes que están regulados por incremento para CU en biopsias estaban ahora regulados por disminución en muestras de heces (el marcador 6 y también en cierta medida el marcador 5). También el marcador 2 (SLC26A2) estaba originariamente regulado por disminución en CU pero se encontró que ahora estaba regulado por incremento en comparación con el marcador 1 (SLC14A6). En la figura 2, se muestran los perfiles de expresión de muestras de heces y biopsia de 3 pacientes con SII, 3 con CU y 3 con EC.

En el caso de los pacientes con SII, el perfil de expresión de los genes no cambia entre las diferentes muestras. Sin embargo, cuando se comparan los perfiles en los casos de CU, puede observarse una tendencia opuesta de las dos curvas, especialmente en cuanto a la expresión contraria de los marcadores 2, 5 y 6. También para EC, el patrón de expresión cambia en las biopsias (véase la figura 3).

Las proteínas transportadoras de solutos (SLC, *solute carrier proteins*) comprenden una familia muy grande de moléculas de transporte dependientes de energía y tienen papeles fisiológicos críticos en el transporte de nutrientes y pueden

utilizarse como mecanismo para aumentar la absorción de fármacos. Sin embargo, existe una comprensión limitada de estas proteínas a nivel molecular debido a la ausencia de estructuras cristalinas de alta resolución.

En total, el 1-2% de los adultos y el 6-8% de los niños que padecen de cálculos renales tienen cistinuria, un defecto en el transporte de aminoácidos, que conduce a altas concentraciones de cistina en la orina. Se han implicado dos genes, el miembro 1, transportador de aminoácidos básicos y neutros, cisteína, de la familia de transportadores de solutos 3 (SLC3A1) que codifica para la proteína relacionada con el sistema de transportador de aminoácidos, y el miembro 9 de la familia de transportadores de solutos 7 (SLC7A9). Se cree que estos dos transportadores de solutos están implicados en la formación de cálculos que pueden conducir en última instancia a infección de las vías urinarias, y eventualmente, a insuficiencia renal.

10 Los inventores han identificado ahora dos transportadores de solutos (SLC6A14 y SLC26A2) conocidos cuya expresión se altera significativamente en EII.

La quimiocina CXC, oncogén alfa relacionado con el crecimiento (Gro-alfa también conocido como GRO 1) es tal como se describe una citocina y como tal puede alterar las respuestas migratorias de numerosos tipos celulares en zonas locales de inflamación. Se ha descrito que se sobreexpresa en córneas inflamadas humanas (Spandau *et al.*, 2003) y además, también se ha mostrado que ratas inducidas químicamente para que presenten inflamación del intestino, muestran niveles regulados por incremento de GRO 1 (Hirata *et al.*, 2001). Usando un enfoque de microalineamiento de ADNc, Heller *et al.*, 1997 describen la participación novedosa de la quimiocina Gro-alfa en artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria del intestino. Keiichi *et al.*, 2006 notificaron un aumento de las concentraciones circulantes del oncogén relacionado con el crecimiento (GRO)- $\alpha$  en pacientes con EII. Aunque se describe en Isaacs *et al.*, 1992, que la expresión de GRO1 en CU es mayor que la observada en EC, en el presente documento se ha demostrado que existe una correlación inversa de CU frente a EC con respecto a los niveles de expresión de GRO 1. En último lugar, Lawrence *et al.*, 2001 describen la identificación de GRO 1 como que está regulado por incremento en CU, pero el diseño del estudio fue tal que las muestras de biopsia se combinaron antes del análisis, por tanto no fue posible saber si GRO 1 estaba regulado por incremento en más de 1 paciente.

25 Se descubrió por primera vez la matrilisina o (metaloproteinasa de la matriz 7) en el útero de rata en involución; también se ha conocido como metaloproteinasa uterina, supuesta metaloproteinasa (Pump-1) y metaloproteinasa de la matriz 7 (MMP-7). Es el miembro más pequeño (28 kDa) de una familia de 15 MMP que en conjunto pueden degradar la mayor parte de las macromoléculas de la matriz extracelular. Esta familia se revisa brevemente; todos los miembros son metaloproteinasas de zinc que se producen en forma zimógena con el zinc del sitio activo bloqueado por cistina. La matrilisina puede degradar una amplia gama de gelatinas, proteoglicanos y glicoproteínas de la matriz y puede activar otras varias MMP incluyendo colagenasa (revisado en Woessner, 1996).

35 La matrilisina se expresa frecuentemente en diversos tipos de cáncer incluyendo cánceres de colon, estómago, próstata y cerebro. Estudios previos han sugerido que la matrilisina desempeña papeles importantes en la progresión y metástasis del cáncer de colon. Recientemente, se ha descrito por Newell *et al.*, 2002 que existe un aumento de la expresión de matrilisina en diferentes estadios de neoplasia asociada a CU. Este trabajo, sin embargo, no determina si tal expresión aumentada es un resultado de CU o se debe más bien a la presencia de neoplasia.

40 La proteína asociada a membrana 17 (MAP-17) o conocida si no como DD96 se identificó originariamente como regulada por incremento en carcinomas con un posible papel en la modulación de la replicación celular y el crecimiento tumoral. Nuevos hallazgos mostraron que también desempeña un papel en la expresión en superficie de receptores escoba (*scavenger receptors*) de clase B tipo I en hígado regulando PDZK1, lo que da como resultado un nuevo nombre SPAP para la proteína asociada a PDZK1 pequeña (Identification of small PDZK1-associated protein, DD96/MAP-17, as regulator of PDZK1 and plasma high density lipoprotein levels; Silver *et al.* J Biol Chem 2003, 278 (31), págs. 28528-32).

45 Reg IV es una proteína secretada y miembro de la familia multigénica Reg que se ha implicado funcionalmente en la regeneración, proliferación y diferenciación del páncreas, el hígado y la mucosa gastrointestinal. Reg IV en particular está regulado por incremento en tumores malignos del tracto gastrointestinal y está asociado con la diferenciación intestinal y neuroendocrina de carcinomas de estómago y gástricos (carcinoma colorrectal, adenocarcinomas de colon); (RegIV activates the epidermal growth factor receptor/Akt/Ap-1 signaling pathway in colon adenocarcinomas; Bishnupuri *et al.*, Gastroenterology 2006 130 (1), págs. 137-49).

50 La panteteinasa (EC 3.5.1.) es una enzima ubicua que se ha mostrado *in vitro* que recircula el ácido pantoténico (vitamina B5) y produce cisteamina, un potente antioxidante. La enzima está codificada por el gen de la vanina 1 y se expresa ampliamente en tejidos de ratón. La vanina 1 es una panteteinasa anclada a GPI, y por consiguiente una ectoenzima. Se ha sugerido que vanina/panteteinasa podrían estar implicadas en la regulación de algunas funciones inmunitarias quizá en el contexto de la respuesta al estrés oxidativo (Pitari *et al.*, 2000).

55 Se describen métodos para analizar la calidad y la cantidad del ARNm transcrito en varios manuales de laboratorio (por ejemplo, en Sambrook y Russell, 2001) y se conocen bien por un experto en la técnica. Estos métodos comprenden la protección de ribonucleasas, extensión de cebadores, transferencia de tipo Northern, hibridación por inmunotransferencia puntual y PCR convencional o en tiempo real.

Tradicionalmente, se ha medido la cantidad de un ARNm particular producido, y por tanto el estado de activación de un gen mediante transferencia de tipo Northern. Se separa el ARN total aislado de una muestra mediante electroforesis en gel de agarosa, y se trata con sonda con una sonda de ADN complementario específica para el gel de interés. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, se somete a transcripción inversa el ARN total aislado de la célula o el tejido que va a analizarse para dar un ADNc de primera hebra (RT-PCR), que se usa entonces como molde para amplificar un amplicón bicatenario con cebadores de oligonucleótidos específicos diana. En ambas técnicas, la detección se basa en marcadores detectables, tales como colorantes fluorescentes o isótopos radiactivos. También las técnicas desarrolladas recientemente conocidas como microalineamientos o chips de ADN se basan en hibridar el ADN diana con cebadores específicos diana complementarios, lavar el ADN no unido y cuantificar el ADN diana unido. Las sondas y los cebadores usados en las reacciones de hibridación pueden diseñarse basándose en la secuencia de nucleótidos del gen marcador o la secuencia de aminoácidos de la proteína traducida, correspondiente al gen marcador. Se describe un método de hibridación cuantitativa conveniente para determinar variaciones en las cantidades de ARN expresado en la solicitud de patente internacional WO 2002/055734.

Preferiblemente, la "expresión génica de marcadores" puede cuantificarse con PCR en tiempo real, también denominada PCR cuantitativa en tiempo real. El método sigue el patrón general de la reacción en cadena de la polimerasa, pero la región amplificada del ADN diana se cuantifica tras cada tanda de amplificación usando colorantes fluorescentes, tales como verde SYBR que se intercalan con sondas de oligonucleótidos de ADN modificado o ADN bicatenario que fluorescen cuando se hibridan con un ADN complementario. Frecuentemente, la PCR en tiempo real se combina con transcripción inversa para cuantificar ARNm de baja abundancia. Pueden analizarse los datos mediante software informático, tal como sistemas rápidos de PCR en tiempo real de Applied Biosystems 7500 o 7500, para calcular la expresión génica relativa entre varias muestras, o el número de copias de ARNm basándose en una curva patrón. La cuantificación relativa (CR) se usa comúnmente para comparar los niveles de expresión de alelos de tipo natural con mutados o los niveles de expresión de un gen en diferentes tejidos. La CR determina el cambio en la expresión de un gen diana en una muestra de prueba con relación a la misma secuencia en una muestra basal o de calibrador (una muestra usada como base para resultados comparativos). La muestra de calibrador puede ser un control no tratado o una muestra a tiempo cero en un estudio de transcurso temporal. Usando un control endógeno o intrínseco, es posible normalizar la cuantificación de una diana de ADNc para las diferencias en la cantidad de ADNc añadido a cada reacción. Normalmente, se usan genes de mantenimiento tales como  $\beta$ -actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y ARN ribosómico (ARNr) como controles endógenos, porque sus niveles de expresión son relativamente estables. Se necesitan reacciones duplicadas por muestra y un control endógeno para garantizar la significación estadística.

Los anticuerpos específicos de proteínas se purifican preferiblemente a partir de antisuero obtenido inmunizando proteína antigénica en un animal. Más preferiblemente, los anticuerpos específicos de proteínas son anticuerpos policlonales purificados a partir del suero obtenido inmunizando proteína antigénica en un conejo.

Para sintetizar un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína, en primer lugar se adquiere la proteína. La proteína puede sintetizarse usando secuencias de aminoácidos conocidas o producirse en tipos de proteínas recombinantes mediante métodos de ingeniería genética. Por ejemplo, puede prepararse proteína recombinante mediante un método que comprende preparar un vector de expresión que expresa la proteína en forma de una proteína recombinante usando la secuencia de bases del gen expuesto en la base de datos GenBank del programa NIH; obtener un transformante mediante la transformación del vector de expresión en *E. coli* para producir proteína recombinante; y cultivar el transformante para aislar/purificar la proteína recombinante humana.

Puede realizarse el diagnóstico EII (por ejemplo, CU y EC) mediante una reacción de unión antígeno-anticuerpo usando los anticuerpos específicos para las proteínas adjuntas en esta invención, determinando la expresión de estas proteínas en una muestra. El nivel de expresión puede detectarse mediante una técnica conocida en la técnica, incluyendo ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo de tipo sándwich y análisis por inmunotransferencia de tipo Western o inmunotransferencia sobre un gel de poliacrilamida así como ensayos inmunohistoquímicos.

Como muestra (especimen), se usan preferiblemente tejidos, líquidos corporales, o más preferiblemente sangre y heces.

Una realización de la invención es un método para su uso en la diferenciación entre enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y síndrome del intestino irritable (SII) en un paciente, en el que se determinan los niveles de expresión de al menos dos marcadores en una muestra tomada de dicho paciente, eligiéndose dichos marcadores del grupo que comprende los siguientes genes y sus correspondientes proteínas (tabla 1):

Tabla 1.

Gen:	SEQ.ID.NO.	N.º DE REG. DE PROTEÍNA
SLC6A14	NM_007231	NP_009162
SLC26A2	NM_000112	NP_000103
GRO-1	NM_001511	NP_001502

MMP-7	BC003635	NP_002414
MAP-17	NM_005764	NP_005755
RegIV	BC017089	NP_114433
vanina 1	NM_004666	NP_004657

- 5 Otra realización de la invención es un método en el que, en caso de que esté indicada enfermedad inflamatoria del intestino, se realiza una diferenciación entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn determinando los niveles de expresión de al menos dos marcadores en una muestra tomada de dicho paciente, eligiéndose dichos marcadores del grupo presentado en la tabla 1 anteriormente.
- Además, según una realización de la invención se monitoriza la actividad patológica, y se realiza una distinción entre una fase activa y pasiva de colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, basándose en el patrón de expresión de dicho al menos un marcador; un gen o correspondiente proteína de fragmentos de los mismos. Preferiblemente, se usan SLC6A14 y GRO-1, o alternativamente o en combinación de los mismos con Reg IV y vanina 1.
- En los métodos anteriores, dicha muestra es preferiblemente una de una muestra de materia fecal, sangre, plasma, suero y muestras de biopsia, lo más preferiblemente una muestra de materia fecal o una muestra de sangre.
- 15 Preferiblemente, la determinación se realiza en primer lugar en una muestra de materia fecal, con el fin de discriminar entre SII y EII. Si está indicada EII, se realiza un análisis adicional con una muestra de biopsia, con el fin de discriminar entre CU y EC. El análisis de las muestras tanto de materia fecal como de biopsia puede repetirse con el fin de monitorizar la progresión de la enfermedad o la recuperación del paciente.
- Según una realización de la invención, se determinan los niveles de expresión usando al menos dos anticuerpos que pueden identificar dichas al menos dos proteínas o un fragmento de las mismas, poniendo en contacto al menos una parte de dicha muestra con dichos al menos dos anticuerpos; y monitorización de la extensión de la reacción entre la muestra y los anticuerpos puestos en contacto.
- 20 Según una realización de la invención, las etapas de puesta en contacto y monitorización se llevan a cabo mediante la extracción de las proteínas de la muestra y la realización de un ensayo para determinar la cantidad de al menos dos de las proteínas enumeradas en la misma.
- 25 Preferiblemente, la reacción de unión antígeno-anticuerpo se detecta mediante una técnica cualquiera seleccionada del grupo que consiste en ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo de tipo sándwich, inmunotransferencia de tipo Western, análisis por inmunotransferencia o un método inmunohistoquímico.
- Alternativamente, las etapas de puesta en contacto y monitorización se llevan a cabo mediante la reacción inmunohistoquímica de la muestra del paciente y los anticuerpos y luego mediante la detección de las reacciones en la muestra.
- 30 Según la invención, los anticuerpos son policlonales o monoclonales.
- También se da a conocer un kit adecuado para su uso en la diferenciación entre enfermedad inflamatoria del intestino y síndrome del intestino irritable en un paciente, comprendiendo dicho kit al menos dos anticuerpos que pueden identificar al menos dos proteínas o fragmentos de proteína elegidos del grupo que comprende las proteínas presentadas en la tabla 1 anteriormente, y medios para detectar la extensión de la reacción de los anticuerpos con una muestra.
- 35 Además, se da a conocer un kit adecuado para la diferenciación entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, comprendiendo preferiblemente dicho kit al menos dos anticuerpos que pueden identificar al menos dos proteínas o fragmentos de proteína elegidos del grupo que comprende las proteínas presentadas en la tabla 1 anteriormente, detectando la extensión de la reacción de los anticuerpos con las proteínas directamente en líquidos corporales en los que los anticuerpos se acoplan a una matriz sólida, y conteniendo además instrucciones para su uso.
- 40 En un kit tal como se da a conocer en el presente documento, se compara el patrón de expresión de dichas al menos dos proteínas con un patrón convencional con el fin de determinar si un paciente que padece colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn padece dicha enfermedad en su forma activa o pasiva.
- Además, el kit incluye la proteína, fragmento de proteína o péptido proporcionado como control en una cantidad conocida.
- 45 El kit es adecuado para su uso en un inmunoensayo competitivo, y comprende además una fase sólida, y la proteína, fragmento de proteína o fragmento de péptido se une a la fase sólida. Dicha fase sólida comprende preferiblemente uno o más de nitrocelulosa, celulosa, vidrio, plástico, placas de microtitulación y pocillos, tales como pocillos de microtitulación.
- 50 Preferiblemente, se lleva a cabo la técnica de ELISA que usa anticuerpos específicos de las proteínas SLC6A14, SLC26A2, GRO-1, MMP-7, MAP-17, Reg IV y vanina 1 a través de las siguientes etapas:



1) colocar un anticuerpo específico en un reactor recubierto con una muestra y un grupo de control para inducir una reacción antígeno-anticuerpo;

2) detectar un producto de la reacción antígeno-anticuerpo usando un conjugado de anticuerpo secundario-marcador y una disolución de sustrato de revelado de color de una sustancia de marcaje; y

5 3) comparar el resultado de detección de la muestra con el del grupo de control.

Puede analizarse una gran cantidad de la muestra usando una técnica conocida tal como ELISA, microchip biológico o sistema de microalineamiento automático. El microchip biológico puede detectar un antígeno para la proteína de anticuerpo específico fijando la proteína de anticuerpo específico en un microchip biológico, provocando una reacción entre el mismo y una muestra recogida de un individuo.

10 También, se da a conocer un kit para diagnosticar CU y EC que comprende la combinación de al menos dos de estos genes usando anticuerpos que reaccionan específicamente con los al menos dos genes elegidos.

15 El kit de diagnóstico comprende un portador o fase sólida, tal como una membrana de efecto mecha. Los ejemplos de materiales adecuados para una membrana de efecto mecha de este tipo incluyen, pero no se limitan a nailon, poliéster, celulosa, polisulfona, poli(difluoruro de vinilideno), acetato de celulosa, poliuretano, fibra de vidrio, nitrocelulosa o similares. La fase sólida también puede estar en forma de un microportador, partículas, membranas, tiras, papel, películas, perlas o placas, tales como placas de microtitulación.

20 El kit de diagnóstico puede diagnosticar CU y EC analizando cuantitativa y cualitativamente un antígeno de la proteína de anticuerpo mediante la reacción de unión antígeno-anticuerpo. La reacción de unión antígeno-anticuerpo puede detectarse mediante una técnica conocida generalmente en la técnica, incluyendo ELISA, RIA, ensayo de tipo sándwich, inmunotransferencia de tipo Western sobre un gel de poli-acrilamida y análisis por inmunotransferencia. Por ejemplo, el kit de diagnóstico puede proporcionarse para usarse para ELISA usando una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con proteína de anticuerpo monoclonal recombinante. Otro ejemplo sería el uso de tiras reactivas de diagnóstico para muestras de heces o sangre.

Los controles contenidos en el kit de diagnóstico incluyen controles positivos y controles negativos.

25 Los anticuerpos usados en el diagnóstico de las diferentes muestras pueden ser policlonales o monoclonales, y pueden prepararse mediante métodos ahora bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos policlonales producidos frente al extracto del ejemplo 2 ó 3 inmunizando un animal tal como un conejo y luego purificando los anticuerpos según prácticas convencionales, mientras que pueden prepararse anticuerpos monoclonales frente a dichos extractos, por ejemplo, según el método de Kohler y Milstein (Nature (1975) 256:495) inmunizando un animal tal como un ratón, extrayendo los esplenocitos del bazo del mismo, fusionándolos con células de mieloma de ratón para preparar hibridomas, y seleccionando y subclonando los hibridomas, según prácticas bien conocidas.

35 En una realización preferida, el inmunoensayo usado en el método de la presente invención es del tipo de ELISA de tipo sándwich. En una más realización preferida, el inmunoensayo de ELISA de tipo sándwich implica el pretratamiento de la muestra con un tampón específico (tampón de clarificación) que contiene una colesterol esterasa pancreática para disminuir la interferencia de los lípidos circulantes de la muestra en la cuantificación de proteínas. En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western (especialmente preferido con un control interno).

40 Como la sustancia de marcaje de anticuerpo secundario, se usan preferiblemente sustancias de marcaje conocidas que inducen un desarrollo de color, y los ejemplos de la sustancia de marcaje útil en la presente invención incluyen peroxidasa del rábano (HRP), fosfatasa alcalina, oro coloidal, fluoresceína tal como isotiocianato de poli-L-lisina-fluoresceína (FITC) o isotiocianato de rodamina B (RITC), y un colorante. En la presente invención, se usa conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo-HRP (conjugado IgG-HRP), por ejemplo.

45 Preferiblemente, el cromógeno usado varía según la sustancia de marcaje que implica el desarrollo de color, y ejemplos que pueden utilizarse del mismo incluyen 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB), 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y o-fenilendiamina (OPD).

Más preferiblemente, se proporciona el cromógeno en un estado en el que está disuelto en una disolución tampón (NaAc 0,1 M, pH 5,5). El cromógeno tal como TMB se descompone por la HRP usada como sustancia de marcaje del conjugado de anticuerpo secundario para producir un precipitado que desarrolla color. Se observa a simple vista el nivel de precipitación del precipitado que desarrolla color, determinando de ese modo la presencia de un antígeno de proteína.

50 La disolución de lavado incluye preferiblemente una disolución de tampón fosfato, NaCl y Tween 20, más preferiblemente una disolución tampón que contiene disolución de tampón fosfato 0,02 M, NaCl 0,13 M y Tween 20 al 0,05%. Tras la reacción de un ión antígeno-anticuerpo, se suministra una cantidad apropiada de la disolución de lavado al reactor que ha experimentado la reacción entre el anticuerpo secundario y el conjugado antígeno-anticuerpo. Se realiza repetidamente un lavado con la disolución de lavado de 3 a 6 veces. Se usa preferiblemente un tampón fosfato que contiene

BSA al 0,01% como disolución de bloqueo y se usa preferiblemente una disolución de ácido sulfúrico 2 N como disolución de detención de la reacción enzimática.

Se describirá a continuación el método de diagnóstico de CU y EC en un estadio temprano mediante la detección de antígenos de SLC6A14, SLC26A2, GRO-1, MMP-7, MAP-17, Reg IV y vanina 1 en una muestra usando el kit de diagnóstico. Se hacen reaccionar anticuerpos y muestras en los grupos de control positivo y negativo, respectivamente, y se lavan con la disolución de lavado. Entonces, el conjugado de anticuerpo secundario marcado con una sustancia de marcaje que produce un color mediante la reacción con el sustrato, se añade al producto resultante y se lava de nuevo con la disolución de lavado. Entonces, se añade la disolución que contiene el sustrato a la producción resultante para inducir un desarrollo de color. Entonces, se mide la absorbancia a 450 nm. En este caso, la absorbancia promedio de la disolución de antígeno patrón A debe ser mayor que o igual a 0,000 y menor que o igual a 0,200. La absorbancia promedio de la disolución de antígeno patrón F debe ser mayor que o igual a 1,200 y menor que o igual a 3,000. El valor medio entre los valores de absorbancia de las disoluciones de antígeno patrón A y F se fija como un valor de punto de corte para usarse entonces para determinar muestras como muestras positivas o negativas. Cuando la absorbancia de una muestra es mayor que la de la disolución de antígeno patrón F, se diluye la muestra y entonces se mide de nuevo la absorbancia de la misma. La muestra que tiene una absorbancia mayor que el valor de punto de corte se identifica como positiva, y la muestra que tiene una absorbancia menor que el valor de punto de corte se identifica como negativa.

Se confirmó que el kit de diagnóstico de CU/EC que contiene los anticuerpos específicos humanos para SLC6A14, SLC26A2, GRO-1, MMP-7, MAP-17, Reg IV y vanina 1, que es una nueva herramienta de diagnóstico inmunológica que usa la sangre o heces del paciente (biopsia), tenía mayor precisión y reproducibilidad. De manera convencional, se usa una combinación entre endoscopia, histología, historial de enfermedades y anticuerpos P-ANCA para el diagnóstico de EII lo que no es, sin embargo, de precisión muy elevada (Bossuyt, X., Clin Chem 52 2006). Sin embargo, la prueba para el diagnóstico temprano de CU y EC según la presente invención mostró una precisión de diagnóstico de aproximadamente el 95 al 97%, que es mayor de manera estadísticamente significativa que las pruebas convencionales. Por tanto, el método de diagnóstico según la presente invención puede usarse de manera muy ventajosa para el diagnóstico temprano de CU y EC y el diagnóstico de SII debido a que tienen alta precisión y reproducibilidad.

### **Ejemplos**

La presente invención se ilustrará a continuación en detalle mediante los siguientes ejemplos, sin estar limitada en modo alguno en alcance a las realizaciones específicas descritas en el presente documento.

#### **Ejemplo 1. Recogida y almacenamiento de tejidos**

Se tomaron biopsias de tejido de colon, heces y muestras de sangre de pacientes que padecían CU, EC o SII y de voluntarios sanos.

##### **1.1 Para el trabajo con ARN:**

Se tomaron muestras de heces de pacientes que padecían CU, EC o SII (de 5 a 10 pacientes cada uno). Se mezclaron las muestras de heces en una razón 1:1 con disolución RNeasy® (Ambion Inc./Applied Biosystems) y se mantuvieron a t.a. hasta su uso.

##### **1.2 Para el trabajo con proteína:**

Se tomaron muestras de heces de pacientes que padecían CU, EC o SII. Se congelaron directamente las muestras de heces a -20°C hasta su uso. Alternativamente, se mezclan las muestras con un tampón apropiado en una razón 1:1.

#### **Ejemplo 2. Extracción de ARN de muestras de heces para el análisis de PCR en tiempo real**

##### **2.1 Aislamiento de ARN:**

Se aisló el ARN total de todas las muestras de heces de pacientes homogeneizando en primer lugar las biopsias usando un homogeneizador de motor Pellet Pestle según el protocolo del fabricante (Kimble / Kontes, Kimble Glass Inc.). A partir del homogeneizado, se aisló el ARN total usando el kit RNeasy® de Qiagen según las directrices del fabricante (Qiagen Nordic AB).

##### **2.2 Síntesis de ADNc:**

Se usaron dos microgramos de cada muestra de ARN para una síntesis de ADNc de primera hebra usando 10 pM del cebador oligo-dT VN-T20 (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT N V-3'). Se suministraron el tampón, los desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la enzima transcriptasa inversa (Superscript II) por Invitrogen y se realizaron las reacciones según las directrices del fabricante. Se preincubó la mezcla de reacción para la síntesis de primera hebra excluyendo la enzima durante 10 min. a 65°C en una máquina de PCR (PCR sprint de Hybaid), se enfrió bruscamente en hielo, y entonces se añadió la enzima Superscript II y se incubó durante 1,5 horas a 42°C en una máquina de PCR.

2.3 Análisis por PCR en tiempo real de ADNc derivado de muestras de heces:

Se realizó el análisis por PCR en tiempo real en una máquina de PCR de Applied Biosystems 7500 usando material de ADNc de 1ª hebra diluido 1:10 derivado de cada muestra de heces y la mezcla madre de verde SYBR de Applied Biosystems según las recomendaciones del fabricante. Se diseñaron cebadores para amplificar los siete genes marcadores y el control interno, dando como resultado fragmentos que oscilaban entre 106-160 pb de tamaño. (Son necesarios fragmentos pequeños ya que los fragmentos de más de 400 pb tienden a no proporcionar señales fiables). Usando software proporcionado para su uso con el análisis de PCR en tiempo real (SDS 4.0; ensayo de cuantificación relativa), se obtuvieron los denominados valores de “delta Ct” para todos los marcadores para cada muestra de heces analizada.

5

Para este tipo de análisis, se usaron cebadores especiales para PCR en tiempo real que proporcionaron el tamaño de fragmento indicado:

10 Tabla 2.

1.	$\gamma$ -actina	150 pb	5.	MMP7	140 pb
2.	SLC6A14	145 pb	6.	MAP17	143 pb
3.	SLC26A2	106 pb	7.	GISP	160 pb
4.	GRO1	125 pb	8.	vanina 7	144 pb

Entonces se determinó el perfil de expresión representando gráficamente los valores de delta Ct para cada marcador frente a cada marcador y analizando el gráfico (véanse los resultados).

15 Los cebadores, directos e inversos, usados en los experimentos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3.

Gen	cebador directo	cebador inverso
SLC6A14	5'-GAG CAA AGA GGT GGA TAT TCT GGC-3'	5'-CTC CCC AGT CAG GGT ATG GAA TTG-3'
SLC26A2	5'-CAC CTA AAG CT A TTA TGC AGG AGG-3'	5'-CTC CTC AAT TCA TGA CCT GTG GGC-3'
GRO-1	5'-GAG CAA AGA GGT GGA TAT TCT GGC-3'	5'-CAA CAT GAG AAA TGT TGA CCA CAC-3'
MMP-7	5'-GCC AAT GAG A TC ATT GTG AAG GCA-3'	5'-GAC ATC TAC CCA CTG CAA GTA TAG-3'
MAP17	5'-CAC T GT TCT TCC ACT CCA TTT AGC-3'	5'-CCA TCG AAG AGT ACC TTC CAT CTG-3'
Reg IV	5'-GAG CAA AGA GGT GGA TAT TCT GGC-3'	5'-CTT TAA ACT CAG GAT AGA TGC CAG-3'
Vanina 1	5'-GTT C CT GGT C CT C GT TGC A AT CGC-3'	5'-GGC ATA GAT CAC TAC TGC AAG TGC-3'
$\gamma$ -actina	5'-GGT GA T ATC A TC A TG AGA CCC AGC-3'	5'-CCA ACT CAA AGC AAG TAA CAG CCC ACG G-3'
	5'-CCA ACT GAC TGA TAG AC T C TG AGC-3'	
	5'-GTG CAG GGT A TT AA C GTG TCA GGG-3'	

Los datos de ARN muestran que GRO-1 y Reg IV son una buena combinación para la discriminación de EII y SII a nivel de ARN en heces (véase por ejemplo la figura 5). Además, los datos de ARN de muestras de sangre muestran que vanina 1 tiene un buen potencial discriminatorio. Los marcadores SLC26A2, MAP-17 y vanina 1 pueden detectarse bien en sangre a nivel de ARN. Los marcadores GRO-1, MMP-7 y RegIV. SLC14A6 pudieron detectarse, pero a un nivel menor, cuando se expresan en sangre a nivel de ARN.

20

A partir del hecho de que MMP-7, RegIV y GRO-1 son proteínas secretoras, los inventores concluyen que la expresión a nivel de proteína sería más fácil de detectar, y esto podría usarse para confirmar el desempeño de los datos de ARN en sangre.

5 Respecto al ARN en sangre, debe observarse que la discriminación de EII y SII ya era fiable usando sólo un marcador, vanina 1. La AUC era de 0,867.

Ejemplo 3. Extracción de proteínas

3.1 Extracción de proteínas a partir de muestras de biopsia

10 Las muestras de biopsia fijadas obtenidas han de centrifugarse, eliminarse el fijador y lavarse con PBS. Entonces se añadió el tampón de extracción (fosfato de potasio 100 mM, pH 7,8; DTT 1 mM; PMSF 0,5 mM) y se homogeneizó la muestra usando un homogeneizador Pellet Pestel según el protocolo del fabricante. Entonces se añadió el 0,1-0,2% de Triton-X-100 y se incubó la mezcla durante 5 min. a 4°C para lisar las células. Tras la centrifugación de 5 min. a 4°C, se transfirió el sobrenadante (= extracto) a un tubo nuevo y se almacenó el extracto tras congelación rápida a -80°C hasta su utilización.

3.2 Extracción de proteínas a partir de muestras de heces

15 Se añadieron tampón de extracción (fosfato de potasio 100 mM, pH 7,8; DTT 1 mM; PMSF 0,5 mM) y perlas de vidrio a las muestras de heces y se agitaron meticulosamente en vórtex. Entonces se añadió el 0,1-0,2% de Triton-X-100 y se incubó durante 5 min. a 4°C para lisar las células. Tras la centrifugación durante 5 min. a 4°C, se transfirió el sobrenadante (= extracto) a un tubo nuevo y se almacenó el extracto a -80°C hasta su uso

3.3 Extracción de proteínas a partir de sangre

20 Al suero congelado, se le añadió la misma cantidad de tampón de extracción 2x (fosfato de potasio 200 mM, pH 7,8; DTT 2 mM; PMSF 1 mM) más el 0,2-0,4% de Triton-X-100 y se incubó la mezcla durante 5 min. a 4°C para lisar las células. Tras centrifugación durante 5 min. a 4°C, se transfirió el sobrenadante (= extracto) a un tubo nuevo y se congeló rápidamente el extracto y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

25 En lugar de extraer las proteínas a partir de la sangre o el suero, puede usarse directamente el suero para recubrir las placas de ELISA.

Ejemplo 4. Análisis por inmunotransferencia de tipo Western de las muestras con anticuerpos policlonales

30 Para cada paciente y muestra, se separó el extracto de proteína (normalizado a 10 µg de proteína total/carril) ocho veces mediante SDS-PAGE desnaturalizante al 12 o el 15% y se transfirió a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (Hybond-P; 0,8 mA/cm<sup>2</sup> durante 60 min.; Amersham Pharmacia Biotech) mediante transferencia semiseca usando un aparato de electrotransferencia (Bio-Rad). Entonces se diseccionó la membrana en ocho bandas para la reacción con anticuerpos específicos para las proteínas de PROT ID 1-7 y beta-tubulina. Se diluyeron los anticuerpos en un tampón de bloqueo. Posteriormente se lavaron las membranas, se incubaron con reactivo de detección ECL-Plus y se expusieron a película Hyperfilm ECL (ambos de Amersham Pharmacia Biotech). Se obtuvieron anticuerpos primarios dirigidos contra Reg IV y MMP-7 de Abcam, GRO-1 de RDS y SLC6A14, SLC26A2, MAP-17 y vanina 1 se sintetizaron por proveedores comerciales. Se normalizaron los contenidos de proteína mediante hibridación paralela con un anticuerpo contra alfa-tubulina. Se expusieron todas las inmunotransferencias de tipo Western a la película durante periodos de tiempo variables, y sólo se seleccionaron las películas que generaron niveles de intensidad inferiores a la saturación para la evaluación densitométrica y estadística. Se garantizó la linealidad en experimentos independientes usando diferentes cantidades de material y múltiples exposiciones a la película (datos no mostrados).

40 Como control positivo, también se analizaron las proteínas recombinantes de PROT ID 1-7 (obtenidas de la misma fuente que los anticuerpos) de la misma manera.

Ejemplo 5: Análisis de ELISA usando anticuerpos policlonales producidos contra las proteínas marcadoras

45 En primer lugar, se recubrieron pocillos con la muestra. En segundo lugar, se recubrieron pocillos de placas de ELISA con los anticuerpos policlonales específicos frente a las siete proteínas, PROT ID NO 1-7. La tercera etapa fue la detección de la presencia de unión antígeno-anticuerpo específica en las muestras.

5.1 Recubrimiento con muestra en los pocillos

50 Se usaron los extractos de proteína obtenido a partir de muestras de biopsias de colon, heces y sangre como muestras. Para obtener una curva patrón para la medición de valores de punto de corte, se prepararon disoluciones de antígeno patrón 1 a 7 con las diluciones A, B, C, D, E, F y G a diversas concentraciones de 0 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml, 80 ng/ml, 160 ng/ml, 320 ng/ml y 640 ng/ml, respectivamente.

Se distribuyeron 100 µl de las muestras de proteína respectivas a una placa de fondo plano de ELISA de 96 pocillos respetada y se hicieron reaccionar a 37°C durante 4 horas, seguido por el lavado 4 veces con una disolución de tampón de lavado (PBS que incluía Tween 20 al 0,05%, pH 7,4). En este caso, se usaron las disoluciones de antígeno patrón preparadas anteriormente como grupos de control positivo y se usaron sueros de conejos normales como grupos de control negativo.

### 5.2 Adición de los anticuerpos policlonales

Se pusieron anticuerpos policlonales específicos frente a las proteínas de PROT. ID 1-7 en cada pocillo recubierto con las muestras, se cubrieron con una tapa y se permitió que estuvieran en reposo a 4°C durante de 16 a 18 horas. Se diluyeron los anticuerpos policlonales en tampón carbonato 0,5 M (pH 9,6) a una concentración de 5 µg/ml y se añadieron 100 µl de la disolución diluida a cada pocillo. Como grupo de control, se diluyó 500 veces el suero de conejo normal que no se infectó con las proteínas, en una disolución de tampón carbonato y se distribuyó a cada pocillo (100 pl/ pocillo).

Entonces, se lavaron los pocillos de la placa 4 veces con una disolución de tampón de lavado. Con el fin de bloquear los sitios de unión a proteína no específica, se distribuyó una disolución de bloqueo (disolución de tampón PBS (pH 7,4) que contenía un 2% de BSA) a cada pocillo (300 pl/ pocillo) y se permitió que estuviera en reposo a 37°C a las 2 horas.

### 5.3 Detección del complejo antígeno-anticuerpo

Se añadieron 100 µl de una dilución de 10.000 veces de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa del rábano a cada pocillo, y se permitió que la placa estuviera en reposo a 37°C durante 1 hora, seguido por el lavado 4 veces con una disolución de tampón de lavado. Posteriormente, se disolvió 1 mg de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma Co., EE.UU.) como sustrato en 10 ml de una disolución de tampón citrato (pH 5,0) y se añadieron al mismo 2 µl de peróxido de hidrógeno al 35%, preparando de ese modo una disolución de sustrato. Se distribuyeron 100 µl de la disolución de sustrato preparada a cada pocillo y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos sin exposición a la luz. Posteriormente, se añadieron 50 µl de una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N para detener la reacción y se midió la absorbancia a 450 nm.

Para cada muestra sometida a prueba con una de las proteínas de PROT. ID 1-7, se dedujo la absorbancia por el antígeno como el resto obtenido restando la absorbancia de los pocillos recubiertos sólo con la proteína como grupo de control positivo y PBS como grupo de control negativo de la absorbancia de la muestra.

De la misma manera, tras calcularse los valores de absorbancia de las disoluciones patrón, se fijó el valor medio entre los valores de absorbancia de las disoluciones de antígeno patrón A y F para cada proteína como un valor de punto de corte. Se identificó la muestra que tenía una absorbancia mayor que el valor de punto de corte como positiva, y se identificó la muestra que tenía una absorbancia menor que el valor de punto de corte como negativa.

Basándose en el valor de punto de corte, se compararon los valores de absorbancia de las muestras respectivas para determinar si son positivas o negativas.

### Bibliografía

KS Bishnupuri LQ, N Murmu, C W Houchen, S Anant, B K Dieckgraefe. Reg IV activates the epidermal growth factor receptor/Akt/AP-1 signaling pathway in colon adenocarcinomas. *Gastroenterology* 2006;130:137-49.

Bossuyt X. Serologic Markers in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Chem.* 2006; 52:171-181

Heller *et al.*, Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays, *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Mar 18;94(6):2150-5.

Hirata I, Murano M, Nitta M, Sasaki S, Toshina K, Maemura K, Katsu K (2001). Estimation of mucosal inflammatory mediators in rat DSS-induced colitis. Possible role of PGE(2) in protection against mucosal damage. *Digestion.* 63 S suppl 1:73-80

Isaacs KL, Sartor RB, Haskill S (1992). Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology.* 103:1587-95

Keiichi Mitsuyama OT, Nobuo Tomiyasu, Koseku Takaki, Asuka Suzuki, Junya Masuds Hiroshi Yamasaki, Atsushi Toyonaga, Michio Sata. Increased Circulating Concentrations of Growth-Related Oncogene (GRO)-α in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences* 2006;51:173-77

Kohler y Milstein (*Nature* (1975) 256:495)

Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S (2001). Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet.* 10:445-56.

Newell KJ *et al.*, Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) expression in ulcerative colitis-related tumorigenesis, *Mol Carcinog.* 2002 Jun;34(2):59-63.

Pitari G *et al.*, Pantetheinase activity of membrane-bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice, *FEBS Lett.* 2000 Oct 20;483(2-3):149-54

Silver DL, Wang N, Vogel S. Identification of Small PDZK1-associated Protein, DD96/MAP17, as a Regulator of PDZK1 and Plasma High Density Lipoprotein Levels. *The Journal of Biological Chemistry* 2003;278:28528-532.

- 5 Spandau *et al.*, High expression of chemokines Gro-alpha (CXCL-1), IL-8 (CXCL-8), and MCP-1 (CCL-2) in inflamed human corneas in vivo, *Ophthalmol.* 2003 Jun;121(6):825-31.

Woessner JF Jr, Regulation of matrix metalloproteinases in the rat uterus, *Biochem Cell Biol.* 1996;74(6):777-84.

**REIVINDICACIONES**

5 1. Método *in vitro* para la determinación de perfiles de expresión génica en una muestra tomada de un cuerpo humano en un método para la diferenciación entre enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y síndrome del intestino irritable (SII) en un paciente, en el que al menos dos genes marcadores se eligen de los siguientes genes y sus correspondientes proteínas:

Gen:	SEQ.ID.NO.	N.º DE REG. DE PROTEÍNA
SLC6A14	NM_007231	NP_009162
SLC26A2	NM_000112	NP_000103
GRO-1	NM_001511	NP_001502
10 MMP-7	BC003635	NP_002414
MAP-17	NM_005764	NP_005755
RegIV	BC017089	NP_114433
vanina 1	NM_004666	NP_004657

15 y en el que se determinan los niveles de expresión de dichos al menos dos genes y sus correspondientes proteínas para obtener un perfil de expresión y en el que el perfil de expresión se compara con los perfiles de expresión de muestras de pacientes con EII y SII conocidos.

2. Método según la reivindicación 1, en el que se determina el nivel de expresión de los siete marcadores.

3. Método según la reivindicación 1, en el que uno de dichos al menos dos marcadores es SLC26A2 y en el que SLC26A2 se expresa a un nivel menor en EII en comparación con en SII.

20 4. Método según la reivindicación 1, en el que uno de dichos al menos dos marcadores es GRO-1 y en el que GRO-1 se expresa a un nivel mayor en EII en comparación con en SII.

5. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una de una muestra de heces, sangre, plasma, suero y una muestra de biopsia.

25 6. Método según la reivindicación 5, en el que la muestra es una muestra de heces y uno de dichos al menos dos marcadores es MAP-17 y en el que MAP-17 se expresa a un nivel menor en EII en comparación con en SII.

7. Método según la reivindicación 5, en el que la muestra es una muestra de heces y uno de dichos al menos dos marcadores es RegIV y en el que RegIV se expresa a un nivel menor en EII en comparación con en SII.

30 8. Método según la reivindicación 5, en el que dicha muestra es una muestra de heces y dichos al menos dos marcadores son SLC6A14 y GRO-1 y en el que SLC6A14 se expresa a un nivel menor que GRO-1 en EII y a un nivel mayor que GRO-1 en SII.

9. Método según la reivindicación 5, en el que dicha muestra es una muestra de heces y dichos al menos dos marcadores son GRO-1 y MAP-17 y en el que GRO-1 se expresa a un nivel mayor que MAP-17 en EII y a un nivel menor que MAP-17 en SII.

35 10. Método según la reivindicación 5, en el que dicha muestra es una muestra de heces y dichos al menos dos marcadores son GRO-1 y RegIV y en el que GRO-1 se expresa a un nivel mayor que RegIV en EII y a un nivel menor que RegIV en SII.

11. Método según la reivindicación 5, en el que la muestra es una muestra de sangre y uno de dichos al menos dos marcadores es vanina 1.

40 12. Método según la reivindicación 1, en el que, en un caso en el que se indica EII, se determina el perfil de expresión de al menos dos de los genes marcadores en una muestra de biopsia y se usa para la diferenciación entre colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC) y en el que

SLC6A14 se expresa a un nivel mayor en CU en comparación con EC;

SLC26A2 se expresa a un nivel menor en CU en comparación con EC;

GRO-1 se expresa a un nivel mayor en CU en comparación con EC;

45 MMP-7 se expresa a un nivel mayor en CU en comparación con EC;

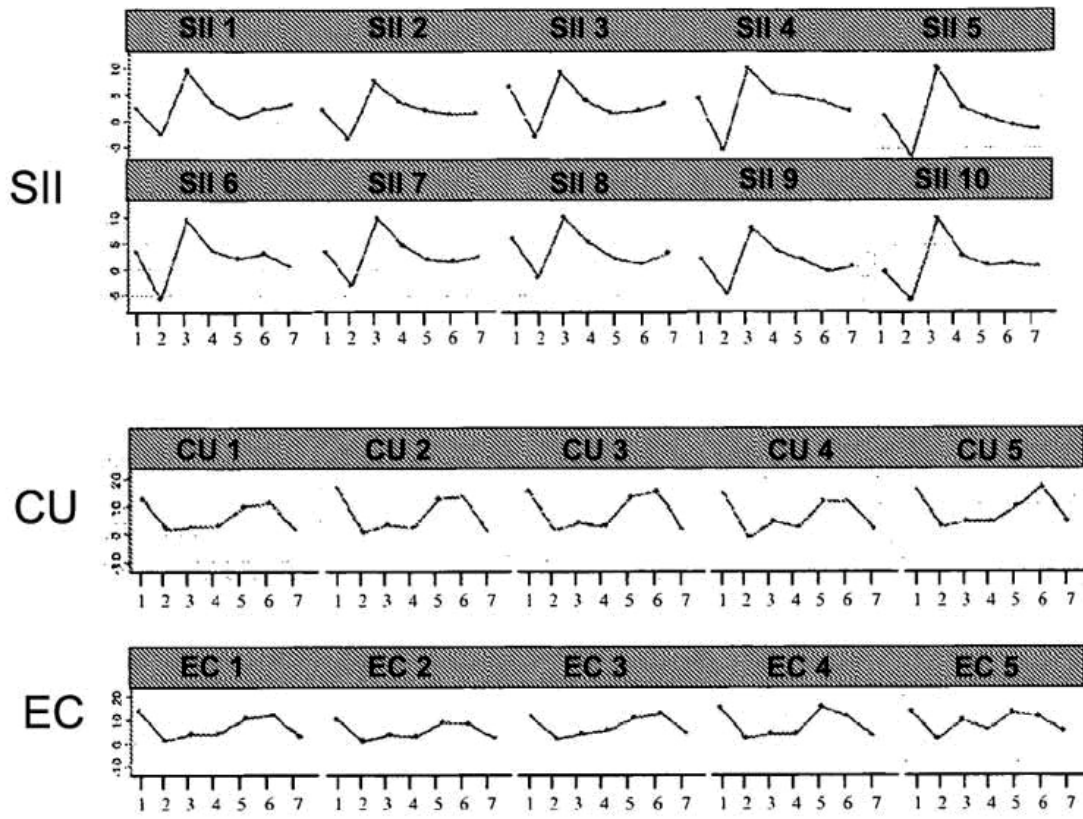
MAP-17 se expresa a un nivel mayor en CU en comparación con EC;

RegIV se expresa a un nivel mayor en CU en comparación con EC; y

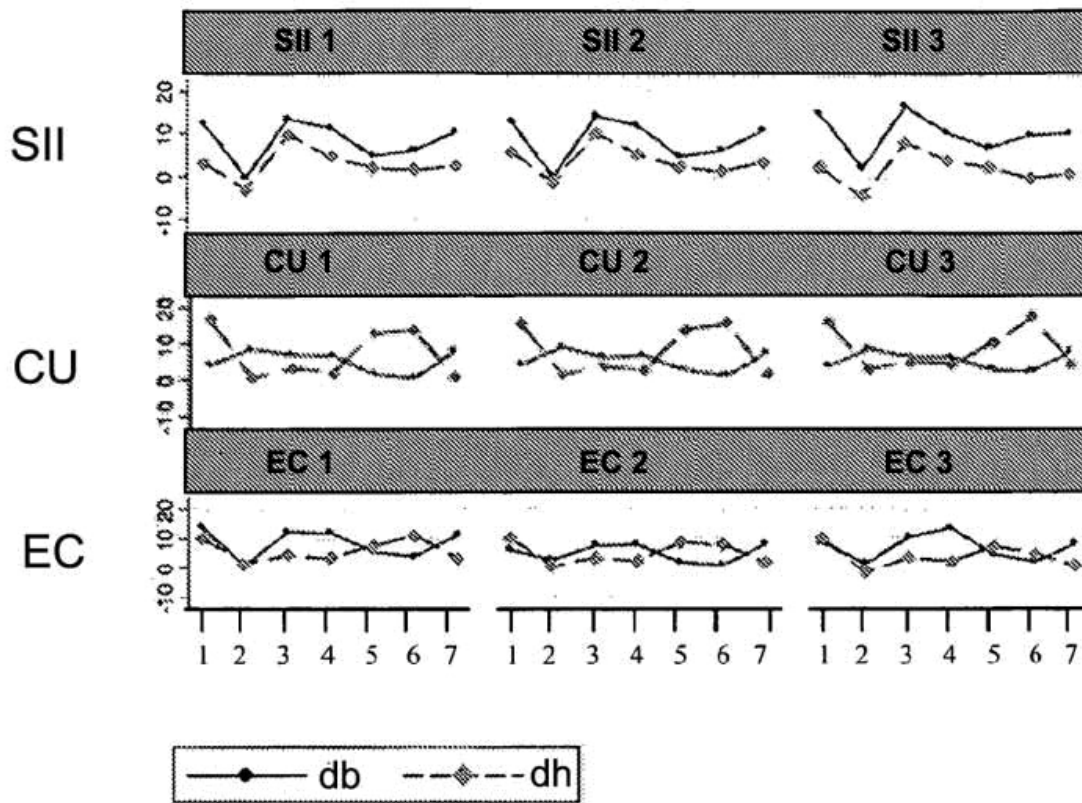
vanina 1 se expresa a un nivel mayor en CU en comparación con EC

- 5
13. Método según la reivindicación 12, en el que se usa el perfil de expresión génica de al menos dos marcadores para una distinción entre una fase activa y pasiva de colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
  14. Método según la reivindicación 13, en el que dichos al menos dos marcadores son SLC6A14 y GRO-1.
  15. Método según la reivindicación 13, en el que dichos al menos dos marcadores son RegIV y vanina 1.

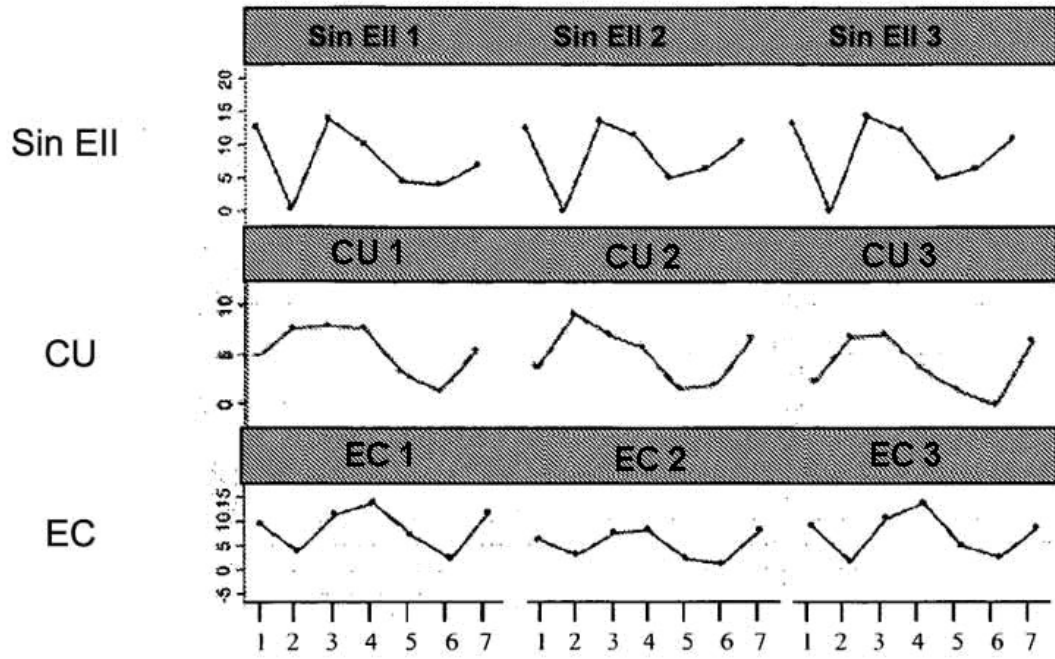




**Fig. 1**

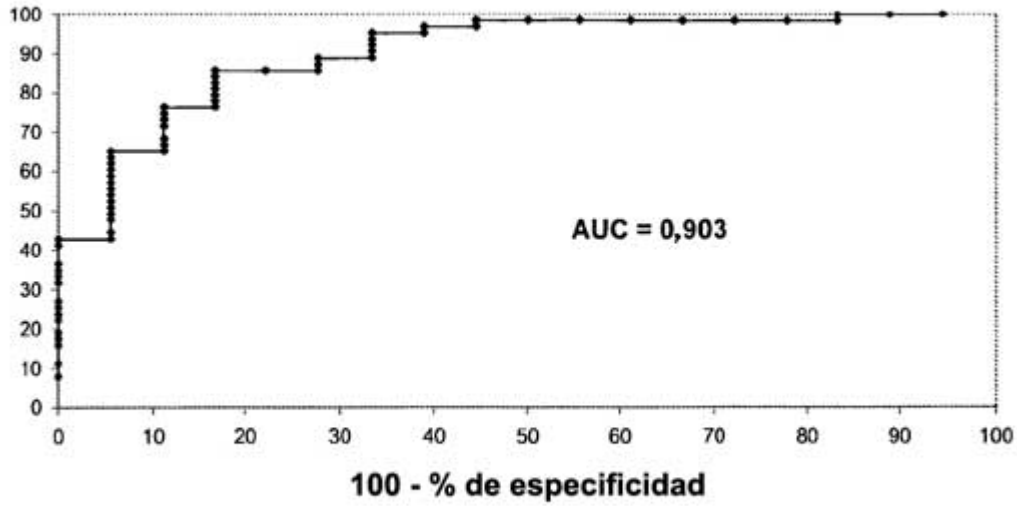


**Fig. 2**



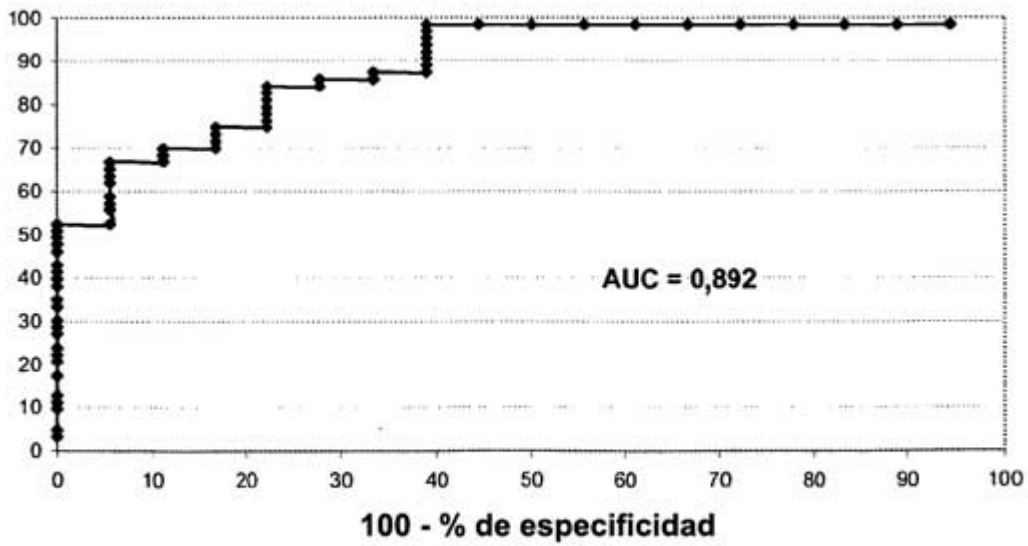
**Fig. 3**

### El frente a SII en heces



**Fig. 4**

### El frente a SII (dos marcadores en heces)



**Fig. 5**