

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 413 255**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2009 E 09425136 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2239580**

54 Título: **Determinación de la eficacia de 5-ASA en la prevención y/o el tratamiento de CRC mediante el análisis de la expresión génica**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.07.2013**

73 Titular/es:

**LGA BIOTECNOLOGIE SRL (100.0%)  
Via Firenze 40  
20060 Trezzano Rosa (MI), IT**

72 Inventor/es:

**GRANDE, ALEXIS;  
PARENTI, SANDRA y  
FERRARINI, FABRIZIO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 413 255 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

Determinación de la eficacia de 5-ASA en la prevención y/o el tratamiento de CRC mediante el análisis de la expresión génica

5 La presente invención está dirigida a un método para la determinación de la eficacia de 5-ASA en la prevención y/o el tratamiento de CRC en un mamífero, que comprende el análisis de la inhibición del mecanismo de  $\beta$ -catenina y la activación de genes onco-supresores independientes en presencia de 5-ASA. Más detalladamente, está dirigida a un método para la determinación de la eficacia de 5-ASA en la prevención y/o el tratamiento de CRC en un mamífero que comprende medir la expresión de al menos un gen implicado en la regulación del mecanismo de señalización de  $\beta$ -catenina y de otros genes onco-supresores.

10 **Antecedentes de la técnica**

Los fármacos anti-inflamatorios no esteroides (NSAIDs, del inglés "non steroidal anti-inflammatory drugs") se caracterizan por una actividad quimiopreventiva bien reconocida contra el cáncer colorrectal (CRC, del inglés "colorectal cancer")<sup>1,2</sup>. Dicha actividad ha sido observada en la población general, así como en pacientes que exhiben un riesgo aumentado de desarrollar la mencionada enfermedad. Desafortunadamente, la toxicidad sistémica y gastrointestinal de los NSAIDs limita drásticamente su administración en el contexto de los protocolos clínicos que requieren un tratamiento a largo plazo de los pacientes implicados. Tanto los efectos terapéuticos como los efectos tóxicos provocados por estos compuestos dependen enormemente de la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2 que, a su vez, es responsable de una síntesis reducida de prostaglandinas (PG) que normalmente median en una serie de funciones biológicas. Por lo tanto, es posible establecer que las propiedades farmacológicas de los NSAIDs residen sustancialmente en su capacidad para interferir con dichas funciones. Varios informes indican que la mesalacina (ácido 5-aminosalicílico ó 5-ASA) puede ser una alternativa prometedora para alcanzar una actividad quimiopreventiva anti-CRC comparable, evitando al mismo tiempo los efectos secundarios inducidos por los NSAIDs<sup>3-5</sup>. De hecho, a pesar de la similitud química con la aspirina, esto es un NSAID paradigmático, el 5-ASA se caracteriza por una débil actividad inhibidora de COX, una característica que es claramente importante para la seguridad clínica de dicho agente terapéutico. Mecanismos no sorprendentemente distintos parecen mediar en el efecto anti-inflamatorio del 5-ASA y, entre ellos, un papel importante es probablemente desempeñado por la inhibición de factores de transcripción que promueve la respuesta inmune tal como NF $\kappa$ B y PPARs<sup>6</sup>. Se ha señalado que la eficacia quimiopreventiva del 5-ASA ha sido demostrada exclusivamente, hasta la fecha, en pacientes afectados por Enfermedades Inflamatorias del Intestino (IBD, del inglés "Inflammatory Bowel Diseases") (Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerativa), que se caracterizan por un riesgo incrementado por desarrollar CRC, y aún debe confirmarse en otras categorías individuales tales como gente sana o pacientes que presenten síndromes tumorales genéticos. Aunque esto se puede determinar unívocamente a través de ensayos clínicos diseñados específicamente que podrían ayudar a clarificar la posibilidad de quimiopreención anti-CRC con 5-ASA, una caracterización adecuada de los efectos anti-tumorales que este compuesto ejerce a nivel celular y molecular podría proporcionar una contribución fundamental a dichos estudios. Los resultados de esta investigación, de hecho, podrían corroborar la racionalidad biológica de protocolos clínicos que analizan la eficacia quimiopreventiva del 5-ASA y que permiten la identificación de marcadores biológicos capaces de monitorizar la respuesta farmacológica al tratamiento considerado. A este respecto, una cantidad creciente de evidencias indica que la estimulación con 5-ASA determina una serie de efectos biológicos sobre células de cáncer de colon tales como la inhibición de la proliferación, la inducción de apoptosis y el potenciamiento de los puntos clave del ciclo celular y los procesos de reparación de ADN<sup>7-10</sup>. De forma interesante, se ha demostrado recientemente que el 5-ASA interfiere con el mecanismo de señalización de  $\beta$ -catenina inhibiendo la traslocalización nuclear de  $\beta$ -catenina, necesaria para permitir la actividad de transcripción de esta proteína<sup>11</sup>. Esta observación podría, en principio, explicar virtualmente todos los efectos que el 5-ASA induce sobre células de cáncer de colon, ya que la  $\beta$ -catenina ha sido implicada en el control molecular de las transiciones de ciclo celular G1/S<sup>12,13</sup> y G2/M<sup>14,15</sup> e indirectamente también de apoptosis. En esta patente presentamos los resultados de un conjunto de experimentos llevados a cabo sobre la línea celular de CRC CaCo2 y dirigidos a caracterizar mejor los mecanismos moleculares por los cuales el 5-ASA inhibe el mecanismo de señalización de  $\beta$ -catenina. Los resultados obtenidos demuestran claramente que este efecto está mediado, al menos en parte, por la inducción de una proteína llamada  $\mu$ -protocaderina que pertenece a la superfamilia caderina y que es capaz de secuestrar  $\beta$ -catenina sobre la membrana plasmática de células de CRC tratadas con 5-ASA.

**Efecto de la invención**

55 Por lo tanto, el objetivo de la presente invención está representado por un método *in vitro* o *ex vivo* para la determinación de la eficacia del 5-ASA en la prevención y/o el tratamiento de CRC en un mamífero, preferiblemente un humano, posiblemente afectado por CRC, método que comprende medir la inhibición del mecanismo de  $\beta$ -catenina y la activación de genes onco-supresores independientes en presencia del 5-ASA.

Más detalladamente, está representado por un método para la determinación de la eficacia del 5-ASA en la prevención y/o el tratamiento de CRC en un mamífero midiendo la expresión de al menos un gen implicado en la regulación del mecanismo de señalización de  $\beta$ -catenina y la expresión de otros genes onco-supresores.

Según una realización, el método comprende aislar dicho al menos un gen a partir de dicho mamífero y medir su expresión tanto en presencia como en ausencia de 5-ASA: si la expresión del gen es superior en presencia de 5-ASA que en ausencia del mismo, el 5-ASA será por tanto efectivo en la prevención y/o el tratamiento de CRC en dicho mamífero.

5 El gen que se usa para el método según la presente invención es  $\mu$ -protocaderina.

La expresión génica puede medirse de acuerdo a los métodos disponibles habitualmente en la técnica, tales como QRT-PCR e inmunohistoquímica.

## Resultados

10 **Análisis RT-PCR cuantitativo en tiempo real de genes que regulan el mecanismo de señalización de  $\beta$ -catenina en células de adenocarcinoma de colon CaCo2 expuestas a tratamiento con 5-ASA.** Experimentos preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio confirmaron que el tratamiento con 5-ASA inhibe la actividad de proliferación de células CaCo2. Para investigar los mecanismos moleculares que subyacen bajo este efecto, llevamos a cabo un análisis de microsistemas, usando la metodología Affimetrix, con el objetivo de determinar los cambios de transcriptoma determinados sobre células CaCo2 mediante tratamiento con 5-ASA 20 mM durante 96 h.

15 Los resultados obtenidos revelaron una expresión regulada al alza de una serie de genes onco-supresores, explicando potencialmente el efecto anti-proliferativo provocado por el 5-ASA, entre los cuales el más importante vino representado por  $\mu$ -protocaderina. Este gen codifica para un miembro de la superfamilia caderina y, en base a informes previos de otros autores, aparece como un inhibidor putativo del mecanismo de señalización de  $\beta$ -catenina, es decir un mecanismo de proliferación celular mediado por la actividad del factor de transcripción de  $\beta$ -catenina<sup>16,17</sup>.

20 La relevancia de este descubrimiento reside en la observación de que el mecanismo de señalización de la  $\beta$ -catenina está activado constitutivamente en las CRC. Otros genes onco-supresores regulados al alza por el tratamiento con 5-ASA de las células analizadas estaban representados por los factores de transcripción KLF4 y CEBP $\alpha$ , implicados previamente en la inhibición de la proliferación de células tumorales epiteliales en general y de células CRC en particular<sup>18-20</sup>. Para validar estos datos, se analizaron los niveles de ARNm de los genes mencionados mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR), en células CaCo2 tratadas con 5-ASA 20 mM durante 48 y 96 h. Adicionalmente, para caracterizar mejor el efecto funcional ejercido por el tratamiento investigado sobre el mecanismo de señalización de la  $\beta$ -catenina, también incluimos en este análisis otros genes que codifican para las siguientes proteínas: la propia  $\beta$ -catenina, es decir el componente principal del mecanismo; la E-caderina, por su capacidad para secuestrar  $\beta$ -catenina sobre las membranas plasmáticas de las células; la Axina 1, debido a su capacidad para promover la actividad del complejo de degradación de  $\beta$ -catenina; ICAT, responsable de la inhibición de la transcripción de  $\beta$ -catenina en el compartimento nuclear; p21<sup>waf-1</sup>, implicado previamente en procesos de arresto de crecimiento y que también ha demostrado ser una diana negativa de la  $\beta$ -catenina. La regulación al alza de la expresión de ARNm resultó ser 12 veces la correspondiente a la  $\mu$ -protocaderina, 16 veces la de p21<sup>waf-1</sup>, entre 4 y 6 veces la de KLF4 y CEBP $\alpha$  y entre 2 y 3 veces la de Axina 1 e ICAT. En consecuencia, las variaciones más destacadas de la expresión se observaron para los genes de  $\mu$ -protocaderina y p21<sup>waf-1</sup>, lo que sugiere que el mecanismo de la  $\beta$ -catenina fue realmente inhibido en las condiciones experimentales adoptadas. La regulación al alza de estos genes resultó más pronunciada al final de la estimulación (96 h). Inversamente, la expresión de ARNm de la E-caderina y la  $\beta$ -catenina no se vio afectada (Figura 1).

40 **Análisis Western blot de la expresión de proteína  $\mu$ -protocaderina en células CaCo2 tratadas con 5-ASA.** Para confirmar la inducción de  $\mu$ -protocaderina llevamos a cabo un análisis Western blot de transcurso de tiempo con células CaCo2 sometidas a exposición a 5-ASA 20 mM durante 96 h. Los resultados de este conjunto de experimentos evidenciaron que la proteína  $\mu$ -protocaderina fue inducida gradualmente, aunque destacadamente, en el extracto citoplasmático de las células analizadas (Figura 2).

45 **Efecto del tratamiento con 5-ASA en niveles endocelulares de  $\beta$ -catenina en células CaCo2.** Debido a los mecanismos de regulación particulares que controlan el mecanismo de señalización de  $\beta$ -catenina, los niveles de proteína  $\beta$ -catenina observados en los diferentes compartimentos subcelulares representan indicadores fiables de la extensión de su activación. En base a esta premisa, llevamos a cabo un ensayo de inmunofluorescencia para determinar la distribución subcelular de la proteína  $\beta$ -catenina en células CaCo2 sometidas a tratamiento con 5-ASA 20 mM. Los resultados obtenidos, presentados en la Figura 3, proporcionaron una clara demostración de que, tras 50 96 h de cultivo, la señal de  $\beta$ -catenina se localizó en el núcleo y, en menor medida, en el citoplasma de las células no tratadas, mientras que en las células tratadas con 5-ASA se localizó casi exclusivamente en la membrana plasmática. Por consiguiente, este conjunto de experimentos sugirió que el tratamiento con 5-ASA de células CaCo2 interfiere con la traslocalización celular de la  $\beta$ -catenina a través del secuestro de dicha proteína en la membrana plasmática de las células tratadas.

55 **Análisis de co-inmunoprecipitación de la interacción proteica de  $\mu$ -protocaderina /  $\beta$ -catenina.** La hipótesis que surge de nuestros datos implicaría directamente que la  $\mu$ -protocaderina, como otras proteínas que pertenecen a la superfamilia caderina, es capaz de unirse a  $\beta$ -catenina en la membrana plasmática. Para verificar esta interacción llevamos a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación en los que se inmunoprecipitó  $\beta$ -catenina de lisatos de células CaCo2 tratadas con 5-ASA 20 mM durante 96 h usando un anticuerpo específico y el inmunoprecipitado se

analizado posteriormente mediante Western blot llevado a cabo con un anticuerpo distinto capaz de detectar  $\mu$ -protocaderina. Usando este procedimiento fuimos capaces de demostrar la presencia de dos bandas de  $\mu$ -protocaderina inmunorreactiva, de 93 y 110 kDa respectivamente, interaccionando con la  $\beta$ -catenina en las células CaCo2 tratadas con 5-ASA (Figura 4). De forma interesante, la forma de 110 kDa adscrita previamente a una versión glicosilada de la proteína natural de 93 kDa por otros autores, fue observada de forma exclusiva en el inmunoprecipitado de  $\beta$ -catenina, mientras que resultó indetectable en las muestras de control (Figura 4). Este descubrimiento sugirió que la forma de 110 kDa de la  $\mu$ -protocaderina podría ser una versión modificada post-traduccionally de la proteína natural que se caracteriza por una actividad de unión preferencial a la  $\beta$ -catenina.

**Análisis de efectos biológicos promovidos por el tratamiento con 5-ASA de la línea de células de adenocarcinoma de colon HT29.** Estos descubrimientos también fueron confirmados en otra línea de células de adenocarcinoma, denominada HT29, en las mismas condiciones experimentales. Como se muestra en la Figura 5, un tratamiento de 96 h de células HT29 con 5-ASA 20 mM dio como resultado, respectivamente, una inducción x3 y x5 de expresión de ARNm de  $\mu$ -protocaderina y p21<sup>waf-1</sup> mediante QRT-PCR. Por consiguiente, estos experimentos indicaron que, aunque con variaciones menos pronunciadas de los efectos detectados, las células HT29 exhiben una respuesta a 5-ASA que es sustancialmente comparable a la observada en células CaCo2.

### Breve descripción de las figuras

**Figura 1.** Análisis QRT-PCR de genes que pertenecen al mecanismo de señalización de la  $\beta$ -catenina en células CaCo2 tratadas con 5-ASA. Las células en las condiciones experimentales descritas en Resultados fueron analizadas mediante QRT-PCR para estimar la expresión de ARNm de genes que pertenecen al mecanismo de señalización de la  $\beta$ -catenina, todos estimados en el eje y. También se muestra el efecto determinado por el tratamiento con 5-ASA sobre la expresión de ARNm de genes onco-supresores KLF4 y CEBTP $\alpha$ .

**Figura 2.** Resultados de un análisis Western blot de transcurso de tiempo que evalúa la expresión de la proteína  $\mu$ -protocaderina en células CaCo2 tratadas con 5-ASA. Este análisis se llevó a cabo sobre extractos citoplasmáticos de células estudiadas, a intervalos de 24 h después del tratamiento con 5-ASA. Las muestras celulares analizadas se indican en la parte superior. Se consiguió la normalización de la cantidad de proteína cargada en cada banda usando un anticuerpo de pan-actina capaz de detectar actina citoplasmática o nuclear.

**Figura 3.** Análisis de inmunofluorescencia de proteína de  $\beta$ -catenina sobre células CaCo2 expuestas a tratamiento de 5-ASA. Se estimularon células con 5-ASA tal como se explica en los Resultados y posteriormente se tiñeron con un anticuerpo primario anti- $\beta$ -catenina y un anticuerpo secundario conjugado FITC (fluorescencia verde). También se analizaron células de control no tratadas (CONT.). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (fluorescencia azul). También se muestran imágenes fusionadas de las dos señales de fluorescencia analizadas.

**Figura 4.** Análisis de co-inmunoprecipitación de la interacción proteica de  $\mu$ -protocaderina /  $\beta$ -catenina. Esta figura muestra los resultados del análisis de co-inmunoprecipitación que demuestra la existencia de un complejo proteico de  $\mu$ -protocaderina /  $\beta$ -catenina en células CaCo2 tratadas con 5-ASA. Se llevó a cabo el análisis Western blot de la expresión de  $\mu$ -protocaderina en lisatos celulares de células CaCo2 de control, no tratadas, y de células CaCo2 tratadas con 5-ASA (Entrada, panel izquierdo), inmunoprecipitados obtenidos de las mismas células usando IgG de control normal (panel del medio) e inmunoprecipitados obtenidos de las mismas células usando un anticuerpo anti- $\beta$ -catenina (panel derecho). IP, inmunoprecipitación; WB, Western blot; Ab, anticuerpo.

**Figura 5.** Efectos biológicos determinados mediante tratamiento con 5-ASA sobre la línea celular de adenocarcinoma de colon HT29. Se analizaron las variaciones de expresión de ARNm de gen que pertenece al mecanismo de señalización de la  $\beta$ -catenina en células HT29 usando la reacción QRT-PCR en las condiciones experimentales descritas en los Resultados y en la Figura 1.

### Ejemplo 1.

#### Análisis de la expresión génica mediante PCR Cuantitativa en Tiempo Real (QRT-PCR).

Se extrajo el ARN total de suspensiones celulares y tejidos congelados mediante el kit de purificación de ARN total de Qiagen según recomienda el fabricante (Qiagen, Valencia, CA). La integridad y la concentración se verificaron usando la técnica de Bio-Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA). Se transcribieron a la inversa 100 ng de ARN total usando el kit de High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una QRT-PCR con un sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) para cuantificar los niveles relativos de ARNm en las muestras. Los cebadores y las sondas para amplificación de ARNm de  $\mu$ -protocaderina, E-caderina,  $\beta$ -catenina, Axina-1, Inhibidor de  $\beta$ -Catenina y TCF-4 (ICAT), p21<sup>waf-1</sup>, KLF4, CEBP $\alpha$  y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fueron diseñados por Applied Biosystems. Cada muestra de ADNc se analizó por triplicado en un volumen de reacción de 50  $\mu$ L usando Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Se comenzó con el termociclado con una desnaturalización inicial a 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos térmicos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. La evaluación de señales de QRT-PCR se llevó a cabo usando el método de cuantificación relativa  $\Delta\Delta C_t$ . Este procedimiento calcula los cambios relativos en la expresión génica del gen diana normalizada respecto al

control endógeno (GAPDH) y comparada con una muestra de calibración. Los valores obtenidos se expresaron en términos de cantidad relativa (RQ, del inglés "relative quantity") de variación de nivel de ARNm.

## Ejemplo 2.

### Análisis de expresión de $\mu$ -protocaderina mediante ensayo inmunohistoquímico.

- 5 Se cortaron secciones de muestra (4  $\mu$ m) de bloques de parafina y se desparafinaron usando métodos estándares. Resumidamente, la desparafinación se llevó a cabo con xilol; a continuación las secciones fueron rehidratadas usando etanol graduado hasta agua y se trataron con una disolución de metanol-peróxido de hidrógeno (6%) durante 15 minutos. Entonces se lavaron las secciones tres veces con PBS (tampón de fosfato) y se incubaron con un anticuerpo primario anti- $\mu$ -protocaderina (anti-mucdhl de conejo, Sigma Prestige HPA009173) a temperatura ambiente. El anticuerpo se detectó añadiendo un anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado, un complejo de estreptavidina-peroxidasa y 3,3'-diaminobenzidina usada como cromógeno. A continuación las láminas fueron contrateñidas con hematoxilina.

### Referencias

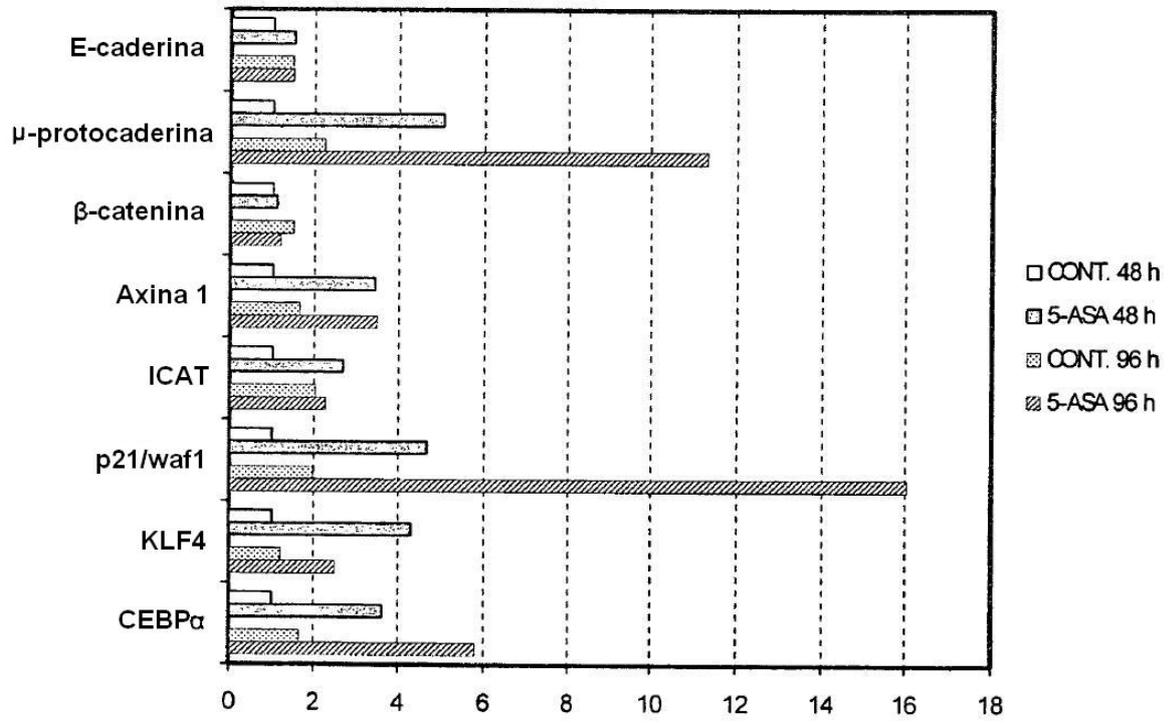
1. Janne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 1960-8.
- 15 2. Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 883-90.
3. Stolfi C, Pellegrini R, Franze E, Pallone F, Monteleone G. Molecular basis of the potential of mesalazine to prevent colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2008; 14: 4434-9.
- 20 4. Cheng Y, Desreumaux P. 5-aminosalicylic acid is an attractive candidate agent for chemoprevention of colon cancer in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 309-14.
5. Allgayer H. Review article: mechanisms of action of mesalazine in preventing colorectal carcinoma in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 Supl. 2: 10-4.
- 25 6. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, Metzger D, Wahli W, Desvergne B, Naccari GC, Chavatte P, Farce A, Bulois P, Cortot A, Colombel JF, Desreumaux P. Intestinal anti-inflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med* 2005; 201: 1205-15.
7. Reinacher-Schick A, Schoeneck A, Graeven U, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W. Mesalazine causes a mitotic arrest and induces caspase-dependent apoptosis in colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2003; 24: 443-7.
- 30 8. Gasche C, Goel A, Natarajan L, Boland CR. Mesalazine improves replication fidelity in cultured colorectal cells. *Cancer Res* 2005; 65: 3993-7.
9. Chu EC, Chai J, Ahluwalia A, Tarnawski AS. Mesalazine downregulates c-Myc in human colon cancer cells. A key to its chemopreventive action? *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 1443-9.
- 35 10. Luciani MG, Campregher C, Fortune JM, Kunkel TA, Gasche C. 5-ASA affects cell cycle progression in colorectal cells by reversibly activating a replication checkpoint. *Gastroenterology* 2007; 132: 221-35.
11. Bos CL, Diks SH, Hardwick JC, Walburg KV, Peppelenbosch MP, Richel DJ. Protein phosphatase 2A is required for mesalazine-dependent inhibition of Wnt/beta-catenin pathway activity. *Carcinogenesis* 2006; 27: 2371-82.
- 40 12. Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002; 111: 241-50.
13. Fevr T, Robine S, Louvard D, Huelsken J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 7551-9.
- 45 14. Olmeda D, Castel S, Vilaro S, Cano A. Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 2844-60.
15. Aoki K, Aoki M, Sugai M, Harada N, Miyoshi H, Tsukamoto T, Mizoshita T, Tatematsu M, Seno H, Chiba T, Oshima M, Hsieh CL, Taketo MM. Chromosomal instability by beta-catenin/TCF transcription in APC or beta-catenin mutant cells. *Oncogene* 2007; 26: 3511-20
16. Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros

- AG, Lafarga M, Munoz A. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 2001; 154: 369-87.
17. Hou R, Liu L, Anees S, Hiroyasu S, Sibinga NE. The Fat1 cadherin integrates vascular smooth muscle cell growth and migration signals. *J Cell Biol* 2006; 173: 417-29.
- 5 18. Evans PM, Liu C. Roles of Krüpel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. Julio 2008; 40(7): 554-64. Revisión.
19. Zhang W, Chen X, Kato Y, Evans PM, Yuan S, Yang J, Rychahou PG, Yang VW, He X, Evers BM, Liu C. Novel cross talk of Kruppel-like factor 4 and beta-catenin regulates normal intestinal homeostasis and tumor repression. *Mol Cell Biol*. Marzo 2006; 26(6): 2055-64.
- 10 20. Schuster MB, Porse BT. C/EBPalpha: a tumour suppressor in multiple tissues? *Biochim Biophys Acta*. Agosto 2006; 1766(1): 88-103. Epub marzo 2006, 24. Revisión. PMID: 16616425 [PubMed – indexado para MEDLINE].

**REIVINDICACIONES**

- 5
- 1.- Un método *in vitro* o *ex vivo* para la determinación de la eficacia de ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal en un mamífero, que comprende medir la inhibición del mecanismo de la  $\beta$ -catenina en presencia de 5-ASA, que se caracteriza por que comprende la medición de la expresión de  $\mu$ -protocaderina.
- 2.- El método según la reivindicación 1, que además comprende medir la expresión de los genes KLF4 y CEBP $\alpha$ .
- 3.- El método según la reivindicación 1, que comprende aislar  $\mu$ -protocaderina a partir de dicho mamífero y medir su expresión tanto en presencia como en ausencia de 5-ASA.
- 10
- 4.- El método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que la expresión de  $\mu$ -protocaderina se mide mediante QRT-PCR e inmunohistoquímica.
- 5.- El método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que dicho mamífero es un humano.
- 6.- El método según la reivindicación 1, que se caracteriza por que dicho mamífero padece cáncer colorrectal.

Figura 1



**Figura 2**

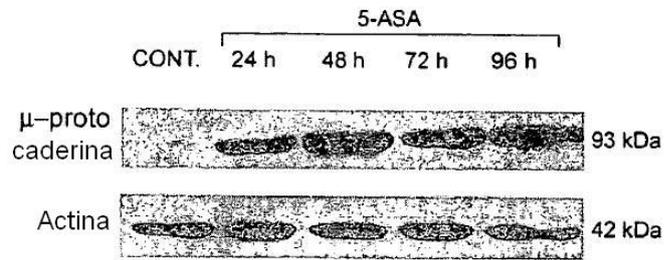


Figura 3

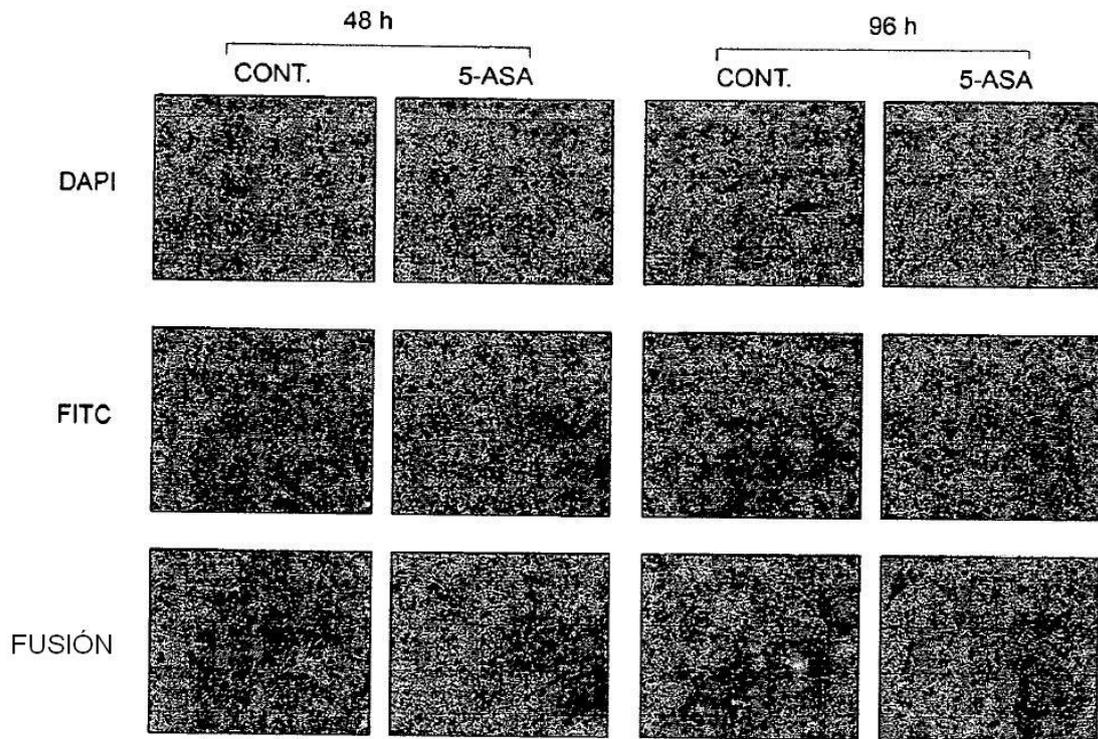


Figura 4

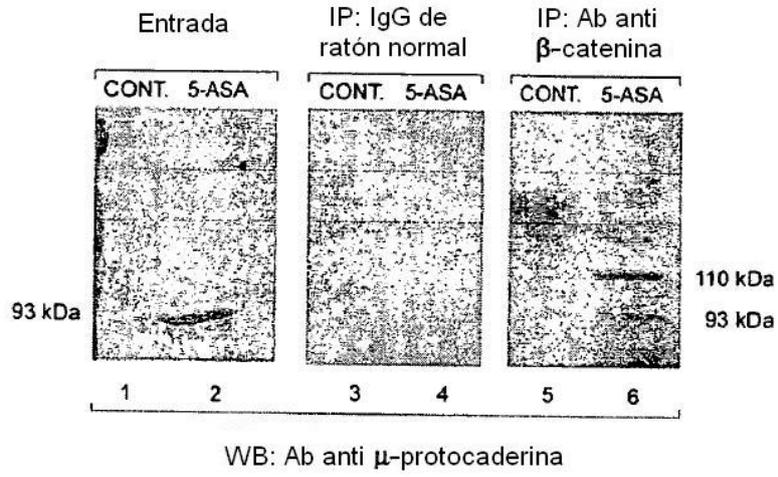


Figura 5

