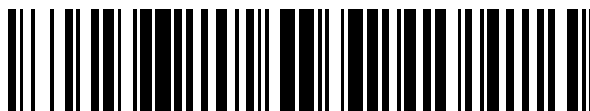


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 973**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2016 PCT/EP2016/051989**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16120475**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2016 E 16702120 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3250710**

54 Título: **ADN hospedador como un biomarcador de la enfermedad de Crohn**

30 Prioridad:

30.01.2015 EP 15305142

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

17.12.2018

73 Titular/es:

**ENTEROME (100.0%)
94-96 avenue Ledru Rollin
75011 Paris, FR**

72 Inventor/es:

CERVINO, ALESSANDRA

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 693 973 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

ADN hospedador como un biomarcador de la enfermedad de Crohn.

5 Campo técnico de la invención

La invención se refiere a un nuevo método para diagnosticar pacientes con enfermedad de Crohn, y/o para diagnosticar el estado de la enfermedad en pacientes que sufren la enfermedad de Crohn.

10 Antecedentes de la invención

La enfermedad de Crohn (CD) es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica (IBD) que puede afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano. La edad de inicio es generalmente entre 15 a 30 años y es igualmente prevalente en mujeres y hombres. La mayor prevalencia se encuentra en Europa y América del Norte con poco más de 300 por 100000 personas (Molodecky *et al.*, 2012). La CD generalmente conduce a dolor abdominal, diarrea severa y trastornos de peso. La enfermedad es de etiología desconocida y multifactorial: se ha demostrado que los factores ambientales, la genética del hospedador y el microbioma intestinal presentan un impacto en el riesgo de enfermedad y su gravedad (Cho, J.H., & Brant, S. R. (2011)).

El diagnóstico clínico de la CD está apoyado por hallazgos serológicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos. Actualmente, no existen pruebas desarrolladas en laboratorio independientes que permitan el diagnóstico de la CD. Entre las pruebas de laboratorio disponibles, la CRP sérica, la calprotectina fecal y la lactoferrina son los marcadores más utilizados, pero no son específicos para la CD. La actividad de la enfermedad se puede medir mediante el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CAI), una puntuación resultante de la combinación de múltiples parámetros o el índice de Harvey-Bradshaw (HBI) que únicamente está compuesto por parámetros clínicos (Laas *et al.*, 2014).

Además, en los pacientes diagnosticados con CD, el seguimiento de los síntomas clínicos por sí solos no es lo suficientemente fiable para evaluar la actividad de la enfermedad. Los pacientes que autoinforman de la baja actividad de la enfermedad a menudo presentan lesiones intestinales durante un examen endoscópico. Los marcadores biológicos, como la calprotectina fecal, son útiles, pero inespecíficos y su aumento se asocia con inflamación sistémica/mucosa en el inicio tardío del brote. La endoscopia permite detectar la cicatrización de la mucosa, que es considerada como el signo más sólido y fiable de la remisión de la enfermedad; sin embargo, la monitorización endoscópica repetida rutinaria no es factible, debido a la preparación intestinal requerida y anestesia general. Se ha demostrado que las nuevas herramientas de formación de imágenes, como la MRI, son eficaces, pero costosas, requieren mucho tiempo y el acceso limitado impide el uso rutinario. La enterografía por MR, presentada como el enfoque más prometedor, implica también la preparación intestinal y la colonoscopia invasiva.

El control estricto de la CD, a través de una vigilancia precisa y el ajuste del tratamiento, es por lo tanto una clave en la gestión de estos pacientes, debido a la naturaleza recurrente y remitente de estos trastornos. Sin embargo, ninguno de los métodos diagnósticos actuales es satisfactorio, por las razones mencionadas anteriormente.

Por lo tanto, los pacientes y los proveedores de servicios de salud están buscando activamente herramientas no invasivas que permitan evaluar la actividad de la enfermedad y supervisar el cuidado de los pacientes.

Más precisamente, sigue existiendo la necesidad de identificar un biomarcador de la CD que permita diagnosticar la enfermedad en un paciente de manera no invasiva, simple y precisa. Es precisamente el objeto de la presente invención.

Asimismo, existe la necesidad de identificar un biomarcador que pueda ayudar a distinguir entre pacientes que sufren de una CD activa contra una etapa inactiva de dicha enfermedad. De hecho, esta información podría ayudar a los médicos a diagnosticar la etapa de la CD, previniendo la ocurrencia de dichos cambios, con el fin de seleccionar entre las diferentes opciones de tratamiento (intensivo o convencional), sin tener que realizar un análisis endoscópico. Esta necesidad se satisface mediante la presente invención.

En el estado de la técnica se ha observado un aumento del ADN hospedador en muestras de heces de pacientes que padecen enfermedades conocidas por inducir un estado inflamatorio de la mucosa intestinal.

En una cohorte prospectiva de 599 pacientes hospitalizados, se obtuvo un solo hisopo rectal de cada paciente en los 7 días posteriores a su ingreso en el hospital. Las proporciones de ADN hospedador correlacionaron negativamente con la diversidad de microbiota intestinal. *Enterococcus* y *Escherichia* se enriquecieron en pacientes que excretan grandes cantidades de ADN humano, mientras que se agotaron *Ruminococcus* y *Odoribacter*. La cuantificación del ADN humano en las heces podría servir como un enfoque simple y no invasivo para evaluar la inflamación intestinal (Vincent *et al.*, 2014).

Las muestras de heces de pacientes con cáncer colorrectal también contienen concentraciones aumentadas de

ADN humano (Klaassen *et al*, 2003).

La cantidad de ADN hospedador en muestras de heces de pacientes que sufren la enfermedad de Crohn nunca ha sido evaluada hasta el momento. Sin embargo, se ha observado que las muestras de heces de pacientes con CD también contenían concentraciones aumentadas de ADN humano. Esto es muy sorprendente ya que el área total de lesiones intestinales es baja en pacientes con CD (en comparación con la colitis ulcerosa) y el sangrado visible en las heces es bastante infrecuente en la enfermedad de Crohn.

En el contexto de la presente invención se analiza, mediante un análisis metagenómico cuantitativo, pero también por qPCR, la abundancia de ADN humano en una serie de muestras de heces que se han recogido de controles sanos y pacientes con CD. Además, se evalúa la abundancia del ADN hospedador en muestras de heces obtenidas de pacientes que padecían la enfermedad de Crohn agresiva contra una etapa inactiva de dicha enfermedad.

Al hacer esto, se aprecia que la presencia y cantidad de ADN humano en muestras de heces son marcadores de la enfermedad de Crohn y que los pacientes que sufren de la enfermedad de Crohn agresiva contra una etapa inactiva de dicha enfermedad pueden ser discriminados usando este mismo biomarcador.

En resumen, demostraron que la presencia de ADN hospedador en las heces de pacientes con CD puede ser utilizada como biomarcador de la CD, de su actividad o gravedad.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 divulga las gráficas de caja del porcentaje de ADN humano descubierto en muestras de heces procedentes de controles sanos y NASH (a la izquierda) y pacientes con enfermedad de Crohn (a la derecha).

La figura 2 divulga los niveles de abundancia relativa (en %) del ADN hospedador encontrado en las muestras de heces estudiadas, tanto para los pacientes con enfermedad de Crohn en fase activa de la enfermedad (a la izquierda) como en fase inactiva (a la derecha). El estado de la enfermedad (fase activa contra fase inactiva) se determinó utilizando la puntuación combinada del nivel de calprotectina y la puntuación de HBI.

La figura 3 divulga el porcentaje de ADN humano contra los niveles de calprotectina encontrados en las muestras de heces estudiadas.

La figura 4 divulga la curva ROC usando el porcentaje de ADN humano como una puntuación predictiva de la actividad de la enfermedad dentro de una población con CD. El AUC presenta un valor de 0,67 para la puntuación combinada.

La figura 5 divulga la correlación entre los datos cuantitativos de los ensayos VP5 y VP9 qPCR para medir la abundancia del ADN del hospedador.

La figura 6 divulga la correlación entre los datos cuantitativos del ensayo de VP5 qPCR y el porcentaje de abundancia relativa de ADN humano medido por secuenciación de Illumina.

La figura 7 divulga la correlación entre los datos cuantitativos del ensayo de VP9 qPCR y el porcentaje de abundancia relativa de ADN humano medido por secuenciación de Illumina.

La figura 8 divulga la correlación entre el nivel de ARNm de calprotectina fecal mediante el ensayo de qPCR (medida del nivel de ARNm de S100A8 y S100A9) y el nivel de proteína de calprotectina fecal por ELISA (A: S100A8; B: S100A9).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Métodos de medidas, en particular para diagnosticar la CD

En un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para generar datos cuantitativos para un sujeto que presenta o se sospecha que presenta la enfermedad de Crohn (CD), comprendiendo dicho método: realizar por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN del hospedador preferentemente comparada con un valor de referencia.

Es decir, la divulgación se refiere a un método *in vitro* para analizar una muestra biológica de un sujeto que presenta o sospecha que presenta la enfermedad de Crohn (CD), comprendiendo dicho método:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra, y,
- c) determinar si dicha abundancia relativa es superior a un valor de referencia.

Más particularmente, la presente divulgación se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la enfermedad de Crohn (CD) en un sujeto, comprendiendo dicho método:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra, y,
- c) diagnosticar que dicho sujeto sufre de la enfermedad de Crohn, si dicha abundancia relativa es superior a un valor de referencia.

Este método es ventajoso con respecto al método de diagnóstico de la técnica anterior ya que no es invasivo, es económicamente aceptable y presenta una alta especificidad.

Como se usa en la presente memoria, el término "ADN hospedador" se refiere al ADN del hospedador de la microbiota intestinal, en oposición al ADN microbiano o viral. Si el sujeto ensayado es un paciente humano, entonces el término "ADN hospedador" se refiere específicamente al "ADN humano".

El ADN se puede extraer de dicha muestra biológica de interés por ejemplo usando el protocolo de extracción descrito en Godon J.J. *et al*, 1997. Sin embargo, se pueden utilizar otros protocolos y son bien conocidos. Es de destacar que el ADN microbiano y el ADN hospedador no necesitan separarse físicamente para su posterior análisis.

El ADN de mamífero puede distinguirse del ADN microbiano por cualesquier medios convencionales, tal como la detección de metilación de CpG o del ADN ribosómico 16S bacteriano. También es posible utilizar qPCR dirigiéndose a las regiones de repetición de ALU (STR) en el ADN humano, o los genes de beta-globulina, beta-actina y hTERT (Klaassen CHW *et al.*, 2003, Shewale JG *et al.*, Journal of Forensic Science, 2007, vol.52 (2)). Las tecnologías de nanoescala también podrían ser útiles.

La cuantificación del ADN del hospedador y microbiano puede realizarse por cualquier método bien conocido. Los métodos más comúnmente usados conocidos en la técnica para la cuantificación de hebras de ADN en una muestra incluyen transferencia de Northern y hibridación *in situ* (Parker y Barnes, Methods in Molecular Biology 106: 247-283 (1999)), métodos basados en PCR, tales como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) (Heid *et al.*, Genome Research 6: 986-994 (1996)), y técnicas de multiplexación basadas en ácidos nucleicos, tales como multiplex PCR y micromatrices de ADN. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos de secuencia, incluyendo dúplex de ADN o dúplex de ADN-proteína. Los métodos representativos para el análisis basado en secuenciación incluyen métodos de terminación de cadena, métodos de secuenciación aleatoria, secuenciación *de novo*, métodos de secuenciación de siguiente generación (incluyendo secuenciación de firma masiva paralela (MPSS), secuenciación de Polony, pirosecuenciación de 454, secuenciación de Illumina (Solexa) secuenciación SOLiD, secuenciación nanoball de ADN, secuenciación de moléculas individuales Helioscope, secuenciación en tiempo real de molécula única (SMRT), secuenciación RNAP, secuenciación de ADN de Nanopore, secuenciación por hibridación y secuenciación de Microfluidic Sanger).

Como se muestra en los ejemplos siguientes, también es posible medir el ADN hospedador a partir de un conjunto de ADN mediante i) la secuenciación del ADN presente en las muestras de heces utilizando tecnologías de secuenciación de alto rendimiento y ii) alineando las lecturas cortas obtenidas mediante estas tecnologías de secuenciación al genoma humano. En este caso, la "abundancia relativa de ADN hospedador" se puede calcular contando el número de lecturas asignadas a una única secuencia de referencia del genoma humano (H) y el número restante de lecturas generadas (B), y normalizando el número de lecturas H por la cantidad total de lecturas (H + B).

En el contexto de la presente memoria, el término "abundancia de ADN hospedador" se refiere a la cantidad relativa de ADN hospedador en comparación con la cantidad total de ADN presente en dicha muestra (incluyendo en particular ADN bacteriano y fúngico). Por lo tanto, en la presente solicitud se le hace referencia preferentemente como "abundancia relativa" (o "cantidad relativa") de ADN hospedador.

Preferentemente, la abundancia del ADN hospedador se mide mediante qPCR con fragmentos de ácido nucleico específicos humanos, tales como cebadores y/o sondas.

Como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico", "secuencia de ácido nucleico", "nucleótido", "secuencia de nucleótidos", que son intercambiables, se refieren a una sucesión precisa de nucleótidos naturales (por ejemplo, A, T, G, C y U), que corresponde a un ADN de cadena sencilla o de doble hebra, tal como ADNc,

ADN genómico, ADN ribosómico o ADN plasmídico, y el producto de transcripción de dicho ADN, tal como ARN. Un ácido nucleico de acuerdo con la invención puede aislarse y prepararse por cualquier método conocido incluyendo, entre otros aspectos a, cualquier método sintético, cualquier método recombinante, cualquier método de generación *ex vivo* y similares, así como combinaciones de los mismos.

Las sondas y cebadores requeridos o útiles para llevar a cabo la qPCR sobre el ADN hospedador se denominan en la presente memoria "fragmentos de ácido nucleico" en el contexto de la invención.

Por "fragmento de ácido nucleico", se hace referencia más generalmente en la presente memoria a un ácido nucleico que hibrida con un ácido nucleico de interés. Por ejemplo, dicho fragmento de ácido nucleico puede presentar por lo menos 10 nucleótidos de longitud o preferentemente, por lo menos 15 nucleótidos de longitud. También pueden presentar por lo menos 25 o por lo menos 50 nucleótidos de longitud.

Los fragmentos de ácido nucleico de acuerdo con la invención son específicos del ADN hospedador, y preferentemente del ADN hospedador humano, ya que permiten la discriminación del ADN hospedador de otro ADN presente en la muestra biológica (es decir, ADN no hospedador), tal como ADN fúngico y/o bacteriano (es decir, ADN microbiano). En otras palabras, los fragmentos de ácido nucleico de la invención se hibridarán al ADN hospedador, pero no (o esencialmente no) se unirán a una parte sustancial del otro ADN presente en la muestra biológica (es decir, ADN no hospedador), tal como ADN fúngico y/o bacteriano (es decir, ADN microbiano).

En el contexto de la presente invención, el fragmento de ácido nucleico se hibrida preferentemente al ADN hospedador bajo condiciones de hibridación rigurosas. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es en el que la hibridación intentada se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 50°C a aproximadamente 65°C, más preferentemente de aproximadamente 55°C a aproximadamente 65°C, usando una solución de sal que puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,9 molar. Sin embargo, el experto en la materia podrá variar dichas condiciones para considerar variables tales como la longitud del fragmento de ácido nucleico, la composición de base, el tipo de iones presentes, etc.

Un "cebador" se refiere más específicamente a un fragmento de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la amplificación de un ácido nucleico de interés, es decir, de ADN hospedador. Los ejemplos de cebadores nucleicos de la invención incluyen, entre otros aspectos, los cebadores de secuencia SEC ID n°:1, SEC ID n°:2, SEC ID n°:4 y SEC ID n°:5. Tales cebadores pueden usarse en "un conjunto de cebadores" para amplificar el ADN hospedador. Los ejemplos de conjunto de cebadores de la invención incluyen, entre otros aspectos, los conjuntos de cebadores (SEC ID n°:1, SEC ID n°:2) y (SEC ID n°:4, SEC ID n°:5).

Una "sonda" se refiere más específicamente a un fragmento de ácido nucleico que puede usarse para la detección de un ácido nucleico de interés, es decir, de ADN hospedador. Este término comprende diversas formas derivadas tales como "sonda fluorescente". Cuando se usa en combinación con un conjunto de cebadores tal como se ha definido anteriormente, dicha sonda puede usarse para la cuantificación de un ácido nucleico de interés. Los ejemplos de sondas de la invención incluyen, entre otros aspectos, las sondas de la secuencia SEC ID n°:3 y SEC ID n°:6. Las sondas pueden estar marcadas por isótopos, radiomarcadores, fragmentos de unión tales como biotina, haptenos tales como digoxigenina, luminogénicos, etiquetas de masa, restos fosforescentes o fluorescentes, o por tintes fluorescentes solos (por ejemplo, MGB, FAM, VIC, TET, NED, TAMRA, JOE, HEX, ROX, etc.) o en combinación con otros colorantes. Estas etiquetas proporcionan señales detectables por fluorescencia, radiactividad, colorimetría, gravimetría, difracción o absorción de rayos X, magnetismo, actividad enzimática, espectrometría de masas, afinidad de unión y similares, y facilitan la detección o cuantificación del ácido nucleico de interés.

En una forma de realización preferida de la invención, la abundancia del ADN hospedador se mide mediante PCR cuantitativa (qPCR) usando por lo menos un fragmento de ácido nucleico seleccionado de entre el grupo de fragmentos de ácido nucleico de la secuencia SEC ID n°:1 a SEC ID n°:6, variantes y sus secuencias complementarias.

Más preferentemente, la abundancia de ADN hospedador se mide mediante PCR cuantitativa (qPCR) usando el conjunto de cebadores (SEC ID n°:1, SEC ID n°:2) combinado con la sonda de la secuencia SEC ID n°:3 y/o (SEC ID n°:4, SEC ID n°:5) combinado con la sonda de la secuencia SEC ID n°:6.

El término "complementario" significa que, por ejemplo, cada nucleótido de una primera secuencia de ácido nucleico está emparejado con la base complementaria de una segunda secuencia de ácido nucleico cuya orientación se invierte. Los nucleótidos complementarios son A y T (o A y U) o C y G.

Las "variantes" de un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otros aspectos, secuencias de ácido nucleico que son idénticas por lo menos en un 99% después de la alineación con dicho fragmento de ácido nucleico y conservan su capacidad para hibridarse con un ácido nucleico de interés, en la presente memoria para alojar el ADN. Los ejemplos de variantes son fragmentos de ácido nucleico degenerados.

Los métodos de la invención pueden aplicarse a cualquier sujeto, ya sea humano o animal. Sin embargo, en una forma de realización preferida, se aplica a un paciente humano, en particular a un ser humano que se sospecha que sufre de la CD, o necesita la confirmación de presentar la CD. Más precisamente, el método de la invención es útil para monitorear pacientes humanos mostrando un nivel mejorado de marcadores de inflamación tales como recuento de plaquetas, volumen plaquetario medio, velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR), trombopoyetina sérica, eritropoyetina sérica, proteína C reactiva y orosomucoide (glicoproteína de ácido- α_1), TNF α , interleucinas (particularmente IL1, IL2, IL6, IL8, IL10, IL15) así como marcadores fecales de inflamación tales como lactoferrina y calprotectina. Los métodos precisos para diagnosticar CD están detallados en Laas *et al.*, 2014. Más preferentemente, el sujeto no sufre por lo menos una de las siguientes patologías: cáncer o precáncer, más particularmente cáncer de colon, cáncer colorrectal o adenoma colorrectal, colitis ulcerosa, colitis microscópica (como colitis colagenosa o colitis linfocítica), colitis isquémica, colitis de desviación, colitis alérgica, enfermedad de Behçet, pólipos colorrectales, enfermedad celíaca, síndrome del intestino irritable (IBS) y cualquier combinación de los mismos. La muestra biológica utilizada en la etapa a) del método de invención es una muestra de heces. De hecho, tal muestra puede obtenerse mediante una colección completamente inofensiva del paciente. Preferentemente, dicha muestra de heces se recoge y se almacena en tampones apropiados que no desnaturalizan ni afectan al ADN contenido en el mismo (en este objetivo, se puede usar, por ejemplo, el reactivo de estabilización de ARN later® RNA (Ambion) o el estabilizador de ADN de heces (Invitex), o una mezcla de EDTA y DMSO). Más preferentemente, las muestras se almacenan a -80° C hasta la extracción de ADN y el análisis subsiguiente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "valor de referencia" se refiere a un valor específico o conjunto de datos que puede usarse para identificar muestras que es conocido que son pobres en ADN hospedador. Este valor de referencia se obtiene, por ejemplo, de los datos históricos de abundancia obtenidos para sujetos sanos. Puede ser un solo valor de corte, tal como una mediana o media. Puede ser un solo número, igualmente aplicable a cada muestra. En una forma de realización preferida, este valor de referencia es un valor predeterminado. Típicamente, este valor predeterminado es de aproximadamente 1%.

En principio, las muestras de heces de sujetos sanos carecen de ADN hospedador. Por lo tanto, la presencia de ADN hospedador en las muestras de heces de un sujeto es un indicio de que dicho sujeto puede sufrir de una enfermedad relacionada con el intestino. La presente invención comprende asimismo todos los métodos destinados a diagnosticar CD en un sujeto, implicando la detección de la presencia de ADN hospedador en muestras de heces. En otras palabras, cualquier método de diagnóstico que implica el uso de ADN hospedador como biomarcador de la CD está comprendido dentro de la presente invención.

En el contexto de la invención, se entiende que la abundancia relativa de ADN hospedador para el sujeto sometido a prueba es "superior a un valor de referencia" si es superior, preferentemente 10 veces, y más preferentemente 20 veces superior a dicho valor de referencia. En una forma de realización preferida, se puede concluir que el sujeto sometido a ensayo padece de la CD si la abundancia relativa de ADN hospedador, como se ha definido anteriormente, es superior al 1%, preferentemente superior al 10%, más preferentemente superior al 20%.

En otros términos, la cantidad de ADN hospedador se compara con un valor de referencia. Dicha comparación puede realizarse por los expertos en la materia utilizando métodos estadísticos, en particular se puede usar una curva ROC para determinar un corte óptimo para la sensibilidad y especificidad.

En aspecto particular, el método divulgado en la presente memoria comprende: llevar a cabo por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en una muestra de heces de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene enfermedad de Crohn (CD), en el que los datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN hospedador preferentemente en comparación con un valor de referencia de aproximadamente 1%.

Es decir, la invención se refiere a un método *in vitro* para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene enfermedad de Crohn (CD), comprendiendo dicho método:

- a) obtener una muestra de heces de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra, y,
- c) determinar si dicha abundancia relativa es superior a un valor de referencia de aproximadamente 1%.

Más particularmente, en esta forma de realización particular, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

- a) obtener una muestra de heces de un paciente humano,
- b) determinar la abundancia relativa de ADN humano en dicha muestra, mediante cualesquier medios convencionales divulgados anteriormente, y,
- c) diagnosticar que dicho paciente sufre de enfermedad de Crohn, si dicha abundancia relativa es superior a

aproximadamente 1%.

Métodos de medidas, en particular para vigilar los estados de la CD

5 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD) en un estado inestable, comprendiendo dicho método: realizar por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN hospedador preferentemente comparada con un valor de referencia.

10 Es decir, la divulgación se refiere a un método *in vitro* para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene enfermedad de Crohn en un estado inestable, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 15 a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra, y,
- c) determinar si dicha abundancia relativa es mayor que un valor de referencia.

En un aspecto preferido, dicho valor de referencia es de aproximadamente 10%.

20 La presente divulgación se refiere además a un método para generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD) en un estado estable, comprendiendo dicho método: realizar por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN hospedador preferentemente comparada con un primer valor de referencia y con un segundo valor de referencia.

En una forma de realización preferida, dicho primer valor de referencia es de aproximadamente 10%, y dicho segundo valor de referencia es de aproximadamente 1%.

30 Es decir, la divulgación se refiere a un método *in vitro* para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn en un estado estable, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 35 a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra, y,
- c) determinar si dicha abundancia relativa es menor que un primer valor de referencia y mayor que un segundo valor de referencia.

40 En una forma de realización preferida, dicho primer valor de referencia es de aproximadamente 10%, y dicho segundo valor de referencia es de aproximadamente 1%.

45 Más particularmente, los resultados obtenidos en el contexto de la presente invención permitieron identificar un biomarcador (ADN hospedador) que permite distinguir entre pacientes que padecen una enfermedad de Crohn inactiva (estado quiescente) de pacientes que padecen de enfermedad de Crohn agresiva (estado asociado con un periodo de exacerbación inminente) en particular de una manera no invasiva. Sus resultados son, por lo tanto, de valor peculiar con respecto al monitoreo de la etapa de esta enfermedad.

50 En el contexto de la invención, los pacientes "estables" se definen como pacientes CD para los cuales la actividad de la enfermedad es estable durante varias semanas (paciente en un "estado estable"). Mientras que los pacientes "inestables" (o pacientes "en estado inestable") son pacientes con CD que han cambiado o intensificado su tratamiento en las semanas siguientes, cuyos análisis de sangre mostraron/muestran actividad elevada en las semanas siguientes y/o cuya autoevaluación mostró/muestra una disminución de la salud y/o

55 tenían niveles elevados de calprotectina en muestras consecutivas, y/o que tenían o tienen inflamación sistémica de la mucosa, más particularmente ulceraciones sistémicas de la mucosa. Estables o inestables también se pueden definir basándose en puntuaciones colonoscópicas como CDEIS o SES-CD.

60 Por lo tanto, la presente invención se refiere más particularmente a un método que tiene como objeto el diagnóstico de estos dos estados particulares en un sujeto que padece de la CD.

Más particularmente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la actividad de la enfermedad de Crohn en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 65 a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra, y,

c) diagnosticar que dicho sujeto tiene una enfermedad de Crohn en estado inestable, si dicha abundancia relativa es superior a un valor de referencia.

5 Los métodos anteriores son ventajosos con respecto a la técnica anterior ya que no son invasivos, son económicamente aceptables y presentan alta especificidad.

10 Todas las formas de realización divulgadas anteriormente, en particular para el método de diagnóstico de la invención, se aplican también a los presentes métodos, especialmente dirigidos a monitorear la actividad de la enfermedad de Crohn.

15 En particular, dicho sujeto puede ser un paciente humano que se sospecha que sufre de CD, o que necesita una confirmación de tener CD o que ha sido diagnosticado con CD. Más particularmente, los métodos de la invención son útiles para monitorizar pacientes humanos que muestran niveles mejorados de marcadores de inflamación tales como recuento de plaquetas, volumen plaquetario medio, velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR), trombopoyetina sérica, eritropoyetina en suero, proteína C reactiva y orosomucoide (glicoproteína de ácido α_1), TNF α , interleucinas (particularmente IL1, IL2, IL6, IL8, IL10, IL15) así como marcadores fecales de inflamación tales como lactoferrina y calprotectina. Los métodos precisos para diagnosticar CD están detallados en Laas *et al.*, 2014. Además, la muestra biológica es preferentemente una muestra de heces, más preferentemente tratada como se ha descrito anteriormente.

20 En una forma de realización preferida, se determina la abundancia relativa de ADN hospedador como se ha divulgado anteriormente.

25 En el contexto de la presente invención se ha descubierto que estos métodos de la invención son altamente sensibles y específicos cuando se determina la abundancia relativa de ADN del hospedador y se compara, directa o indirectamente, con un valor de referencia.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "valor de referencia" se refiere a un valor o conjunto de datos específico que puede usarse para identificar muestras que tienen una CD estable. Este valor de referencia se obtiene, por ejemplo, de los datos históricos de abundancia obtenidos para un paciente o un grupo de pacientes que han sido diagnosticados inequívocamente por un CD estable. Este valor de referencia se obtiene por ejemplo midiendo la abundancia relativa del ADN del hospedador en muestras de heces de pacientes que se encuentran en un estado estable de CD. Puede ser un solo valor de corte, tal como una mediana o media. Puede ser un solo número, igualmente aplicable a cada muestra. Dicho valor de referencia también puede ser un valor predeterminado. Típicamente, este valor predeterminado es de aproximadamente 10%.

40 En una forma de realización preferida, se puede concluir que el paciente sometido a ensayo sufre de CD inestable si la abundancia relativa de ADN hospedador, como se ha definido anteriormente, es superior a 10%, preferentemente superior a 18%, más preferentemente superior a 20%.

45 En una forma de realización particular, el método de la invención comprende: llevar a cabo por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN del hospedador en una muestra de heces de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene enfermedad de Crohn en un estado inestable, preferentemente en comparación con un valor de referencia de aproximadamente 10%.

50 En otras palabras, la invención se refiere a un método *in vitro* para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn en un estado inestable, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) obtener una muestra de heces de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra, y,
- c) determinar si dicha abundancia relativa es superior a un valor de referencia de aproximadamente 10%.

55 Más particularmente, en esta forma de realización particular, el método de diagnóstico *in vitro* de la invención permite diagnosticar un estado inestable de la enfermedad de Crohn en un paciente humano, que comprende las siguientes etapas:

60 a) medir la abundancia relativa de ADN humano en una muestra de heces de dicho paciente por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, y,

b) determinar que dicho paciente sufre de un CD inestable, si dicha abundancia relativa es superior a 10%.

65 Por el contrario, la presente invención también permite la generación de datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD) en un estado estable, o en otras palabras el análisis de una muestra biológica de dicho sujeto, en particular para diagnosticar una enfermedad de Crohn estable. En este caso, se concluirá que un sujeto sufre de un CD estable si la abundancia relativa de ADN del hospedador

medida en una muestra biológica de dicho sujeto es mayor que el valor de referencia usado para diagnosticar CD (típicamente 1%), pero inferior al valor de referencia utilizado para diagnosticar un estado inestable de la enfermedad (típicamente 10%).

- 5 Los métodos de la invención pueden incluir (o excluir) las etapas que consisten en obtener la muestra de heces y extraer la molécula de ácido nucleico de dicha muestra, tal como se ha definido anteriormente.

10 En principio, las muestras de heces de sujetos que están en una CD inactiva (quiescente) tienen una abundancia relativa de ADN hospedador comprendida entre 0 y 10% (dependiendo de la tecnología de medición, por ejemplo). Sin embargo, la presencia de un nivel intermedio de ADN hospedador (típicamente entre 1% y 10%) en las muestras de heces de un sujeto es un indicio de que dicho sujeto puede sufrir de CD y que dicho CD está en un estado inactivo. Además, la presencia de un alto nivel de ADN hospedador (típicamente superior a 10%) en las muestras de heces de un sujeto es un indicio de que dicho sujeto puede padecer CD y que dicha CD está en estado activo. Por lo tanto, la presente invención comprende todos los métodos destinados a diagnosticar el estado de CD en un sujeto, implicando la detección de la presencia de ADN hospedador en muestras de heces. 15 En otras palabras, cualquier método de diagnóstico que implica el uso del ADN hospedador como biomarcador del estado de CD está comprendido dentro de la presente invención.

Métodos de medidas, en particular para diseñar un tratamiento

20 En otra forma de realización, los métodos de diagnóstico de la invención se pueden usar para adaptar un tratamiento para un sujeto que sufre de la enfermedad de Crohn.

25 En un aspecto, los métodos de la divulgación comprenden, por lo tanto, la etapa adicional de diseñar un tratamiento para el sujeto diagnosticado, adaptándose dicho tratamiento al estado particular de CD que ha sido diagnosticado (tal como por el método de la invención).

30 Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar un sujeto que sufre de enfermedad de Crohn, que comprende:

- 35 i) generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene enfermedad de Crohn (CD) en un estado inestable o estable, de acuerdo con el método mencionado anteriormente,
- ii) tratar a dicho sujeto con un tratamiento apropiado, seleccionándose dicho tratamiento apropiado en los atribuidos clásicamente por el médico.

Es decir, la divulgación se refiere a un método para tratar un sujeto que sufre de enfermedad de Crohn, que comprende:

- 40 i) analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn en un estado inestable o estable, de acuerdo con el método mencionado anteriormente, y
- 45 ii) tratar a dicho sujeto con un tratamiento apropiado, seleccionándose dicho tratamiento apropiado en los atribuidos clásicamente por el médico.

Más preferentemente, la divulgación comprende un método para tratar un sujeto que sufre de enfermedad de Crohn, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- 50 i) diagnosticar la actividad de CD en un sujeto de acuerdo con el método anteriormente mencionado, y
- ii) tratar a dicho sujeto con un tratamiento apropiado, seleccionándose dicho tratamiento apropiado en los clásicamente atribuidos por el médico una vez que se ha diagnosticado dicho estado de CD.

55 Por ejemplo, si un paciente con CD se diagnostica en un estado inestable, un tratamiento adaptado puede ser un tratamiento farmacológico seleccionado de entre el grupo que consiste en azatioprina, mesalamina, abatacept, adalimumab, anakinra, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab, rituximab, tocilizumab, natalizumab, corticosteroides, ciclosporina, metotrexato, tacrolimus, Anti-JAK (tofacitinib), anti-integrinas (Vedolizumab, rhuMAb Beta7, MAdCAM-1 Antagonist) o Anti IL12/IL23 (Ustekinumab, ABT874).

60 Alternativamente, si un paciente con Crohn es diagnosticado en un estado estable, un tratamiento adaptado será intervenciones en el estilo de vida, por ejemplo dietas de diferentes intensidades de restricción calórica y composición de macronutrientes (dietas bajas en carbohidratos, bajas en grasas saturadas).

65 Además, es posible utilizar los métodos de la invención para comprobar la eficacia de un tratamiento en un sujeto que sufre de CD, en particular CD en un estado inestable, o para evaluar la respuesta de un paciente a un tratamiento. Por lo tanto, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

- i) generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD) en un estado inestable, de acuerdo con el método mencionado anteriormente, antes y después de la administración de un tratamiento, y

- 5 ii) concluir que el tratamiento es eficaz en dicho sujeto si el estado antes de la administración del tratamiento era inestable pero se estabilizaba tras la administración del tratamiento.

Es decir, el método de la invención comprende:

- 10 i) analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn en un estado inestable, de acuerdo con el método mencionado anteriormente, antes y después de la administración de un tratamiento, y

- 15 ii) concluir que el tratamiento es eficaz en dicho sujeto si el estado antes de la administración del tratamiento era inestable pero se estabilizaba tras la administración del tratamiento.

Más particularmente, el método de la invención comprende:

- 20 i) diagnosticar la actividad de CD antes y después de la administración de un tratamiento, de acuerdo con el método mencionado anteriormente, y

- ii) concluir que el tratamiento es eficaz en dicho sujeto si el estado antes de la administración del tratamiento era inestable pero se estabilizaba tras la administración del tratamiento.

- 25 Si se diagnostica que el paciente con Crohn es "inestable" antes de la administración del tratamiento y deviene "estable" tras la administración del tratamiento, dicho paciente responde a dicho tratamiento. Por lo tanto, este tratamiento eficaz debe mantenerse preferentemente.

- 30 Por el contrario, si se diagnostica que el paciente de Crohn es "inestable" antes de la administración del tratamiento y permanece "inestable" tras la administración del tratamiento, entonces dicho paciente no responde a dicho tratamiento y es mejor reemplazar dicho tratamiento con otro o combinarlo con otro tratamiento.

- 35 Debe apreciarse que si se diagnostica que el paciente con Crohn es "estable" antes de la administración del tratamiento, entonces no vale la pena administrar ningún tratamiento químico, ya que las intervenciones sobre el estilo de vida podrían ser suficientes.

Métodos combinados de medidas, en particular para el diagnóstico

- 40 Se propone en el contexto de la presente invención además asociar la medida de la abundancia de ADN hospedador con la medida de otro biomarcador comúnmente utilizado para diagnosticar CD, y/o el estado de CD (es decir, activo contra a estado inactivo).

- 45 En una forma de realización particular, la presente divulgación se refiere, por lo tanto, a un método para generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene enfermedad de Crohn (CD), comprendiendo dicho método:

- 50 a) llevar a cabo por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN del hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los primeros datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN hospedador preferentemente comparada con un valor de referencia; y

- b) realizar por lo menos un ensayo para determinar el nivel de calprotectina, o un marcador clínico combinado, en otra muestra biológica de dicho sujeto, en el que un segundo dato cuantitativo representa dicho nivel de calprotectina preferentemente comparado con 150 µg/ml o dicho marcador clínico combinado preferentemente comparado con una puntuación predeterminada.

- 55 Es decir, la divulgación se refiere a un método para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD), comprendiendo dicho método:

- 60 a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,

- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,

- c) determinar el nivel de calprotectina, o una puntuación clínica combinada, en otra muestra biológica de dicho sujeto, y

- 65 d) determinar si dicha abundancia relativa es mayor que un valor de referencia y si dicho nivel de calprotectina es superior a 150 µg/ml o si dicha puntuación clínica combinada es mayor que una

puntuación predeterminada.

Más particularmente, la divulgación se refiere a un método para diagnosticar la enfermedad de Crohn (CD) en un sujeto que comprende:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de calprotectina o un marcador clínico combinado en otra muestra biológica de dicho sujeto, y
- d) diagnosticar que dicho sujeto sufre de la enfermedad de Crohn, si dicha abundancia relativa es superior a un valor de referencia, y si dicho nivel de calprotectina es superior a 150 µg/ml o si dicha puntuación clínica combinada es superior a una puntuación predeterminada.

En un aspecto preferido, dicho valor de referencia es de aproximadamente 1%.

El experto en la materia apreciará fácilmente que el nivel de calprotectina indicado en µg/ml (o en µg/g) se refiere al nivel de proteína calprotectina, o en otras palabras al nivel de expresión de la proteína calprotectina. El nivel de expresión de la proteína se puede evaluar por cualquier método bien conocido en la técnica, revisado en particular por Reeves *et al.* (2000) y Schena (2005). Estos métodos generalmente implican poner en contacto una muestra biológica de interés con uno o más reactivos detectables que es o son adecuados para medir el nivel de expresión de proteína, tal como un anticuerpo, y posteriormente determinar el nivel de expresión de proteína basado en el nivel de reactivo detectado, preferentemente después de la normalización. Los ejemplos de métodos que generalmente implican el uso de un anticuerpo incluyen, entre otros aspectos, transferencia Western, inmunotransferencia, inmunoensayo enzimático (ELISA), inmunoensayo ligado a enzima (ELISPOT), radioinmunoensayo (RIA), inmunohistoquímica e inmunoprecipitación. Pueden usarse otros métodos adecuados para medir un nivel de expresión proteica, que no implican necesariamente el uso de un anticuerpo, incluyendo, entre otros aspectos, clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), microscopía tal como microscopía de fuerza atómica, citometría de flujo, microcitometría, electroforesis en gel de poliacrilamida tal como SDS-PAGE, resonancia de plasmón superficial (SPR), transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET), quimioluminiscencia, polarización de fluorescencia, fosforescencia, espectrometría de masas tal como cromatografía líquida espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía líquida/espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC-MS-MS), tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser asistido por matriz (MALDI-TOF), tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser mejorado en superficie (SELDI-TOF), y resonancia magnética (MRI).

En otro aspecto preferido, la abundancia relativa del ADN del hospedador y el nivel de calprotectina pueden medirse a partir de la misma muestra biológica del sujeto.

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere además a un método para generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD), comprendiendo dicho método:

- a) llevar a cabo por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN del hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los primeros datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN del hospedador preferentemente comparada con un valor de referencia; y
- b) realizar por lo menos un ensayo para determinar el nivel de calprotectina o un marcador clínico combinado en dicha muestra, en el que un segundo dato cuantitativo representa dicho nivel de calprotectina preferentemente comparado con 150 µg/ml o dicho marcador clínico combinado preferentemente comparado con una puntuación predeterminada.

Es decir, la divulgación se refiere a un método para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD), comprendiendo dicho método:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de calprotectina, o una puntuación clínica combinada, en dicha muestra, y
- d) determinar si dicha abundancia relativa es mayor que un valor de referencia y si dicho nivel de calprotectina es superior a 150 µg/ml o si dicha puntuación clínica combinada es mayor que una puntuación predeterminada.

Más particularmente, la divulgación se refiere a un método para diagnosticar la enfermedad de Crohn (CD) en un

sujeto que comprende:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de calprotectina, o una puntuación clínica combinada, en dicha muestra, y
- d) diagnosticar que dicho sujeto sufre de la enfermedad de Crohn, si dicha abundancia relativa es superior a un valor de referencia, y si dicho nivel de calprotectina es superior a 150 µg/ml o si dicha puntuación clínica combinada es superior a una puntuación predeterminada.

En un aspecto preferido, dicho valor de referencia es de aproximadamente 1%.

En un aspecto preferido, la calprotectina se mide en muestras de heces del sujeto sometido a ensayo. En una forma de realización más preferida, la detección del ADN hospedador y de calprotectina como se ha descrito anteriormente se realiza a partir de la misma muestra de heces. Sin embargo, esto puede requerir la realización de dos tipos distintos de detección, uno para medir la abundancia relativa del ADN hospedador (por ejemplo, por qPCR) y otro para medir el nivel de proteína calprotectina (por ejemplo, mediante ELISA).

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente divulgación propone medir el nivel de gen de calprotectina, de manera que se puede realizar un único tipo de detección en el método de la invención. Más preferentemente, dicha detección se lleva a cabo en el mismo recipiente, e incluso más preferentemente de la misma muestra biológica, tal como una muestra de heces.

A este respecto, se ha descubierto en el contexto de la presente invención sorprendentemente que los niveles de proteína y gen de calprotectina correlacionan entre sí, aunque el comportamiento de estos tipos de entidades funcionales (es decir, el gen y la proteína codificados por dicho gen) no puede predecirse entre sí. De hecho, es bien conocido en la técnica que, una vez transcrito, un nivel de expresión proteica puede todavía ser regulado a nivel de traducción, y que la proteína correspondiente puede ser sometida a modificaciones posterior a la traducción, a medias vidas variables y compartimentación.

Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto, la divulgación se refiere a un método para generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD), comprendiendo dicho método:

- a) realizar por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN del hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los primeros datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN del hospedador, preferentemente comparada con un primer valor de referencia; y
- b) realizar por lo menos un ensayo para determinar el nivel del gen de la calprotectina, o un marcador clínico combinado, en dicha muestra (preferido en la presente memoria) o en otra muestra biológica de dicho sujeto, en el que un segundo dato cuantitativo representa dicho nivel del gen de la calprotectina comparado preferentemente con un segundo valor de referencia o dicho marcador clínico combinado preferentemente comparado con una puntuación predeterminada.

Es decir, la divulgación se refiere a un método para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD), comprendiendo dicho método:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel del gen de calprotectina, o un marcador clínico combinado, en dicha muestra (preferido en la presente memoria), o en otra muestra biológica de dicho sujeto, y
- d) determinar si dicha abundancia relativa es mayor que un primer valor de referencia y si el nivel del gen de la calprotectina es mayor que un segundo valor de referencia o si dicha puntuación clínica combinada es mayor que una puntuación predeterminada.

Más particularmente, la divulgación se refiere a un método para diagnosticar la enfermedad de Crohn (CD) en un sujeto que comprende:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel del gen de la calprotectina, o un marcador clínico combinado, en dicha muestra

(preferido en la presente memoria) o en otra muestra biológica de dicho sujeto, y

- d) diagnosticar que dicho sujeto sufre de la enfermedad de Crohn, si dicha abundancia relativa es superior a un primer valor de referencia, y si dicho nivel de calprotectina es superior a un segundo valor de referencia o si dicha puntuación clínica combinada es superior a una puntuación predeterminada.

En un aspecto preferido, dicho primer valor de referencia con respecto al ADN hospedador es como se ha definido anteriormente, y más preferentemente es de aproximadamente 1%.

El nivel de gen, o nivel de expresión génica, se puede medir por cualquier método bien conocido en la técnica, tal como los descritos anteriormente para medir el ADN hospedador y microbiano. Los genes que codifican la calprotectina son bien conocidos en la técnica. En particular, se conoce que la calprotectina humana forma un heterodímero constituido por la proteína de unión A8 al calcio S100 (S100A8, también conocida como calgranulina A) y la proteína A9 de unión al calcio S100 (S100A9, también conocida como calgranulina B o proteína relacionada con el factor inhibidor de la migración 14 (MRP14)). La secuencia de nucleótidos del gen S100A8 humano está disponible bajo el número de registro de Genbank: CR407674, número de versión: CR407674.1, mientras que la del gen S100A9 humano está disponible bajo el número de acceso a la secuencia de referencia NCBI: NM_002965, número de versión: NM_002965.3.

En un aspecto preferido, el segundo valor de referencia es un valor específico o conjunto de datos que puede usarse para identificar muestras que es conocido que pertenecen a sujetos sanos (es decir, que no tienen enfermedad de Crohn). Dicho valor de referencia puede, por lo tanto, ser fácilmente determinado por el experto en la materia. Puede ser un solo valor de corte, tal como una mediana o media. Puede ser un solo número, igualmente aplicable a cada muestra. En un aspecto preferido, esta referencia es un valor predeterminado. Por "superior a un segundo valor de referencia", se entiende por ello que el nivel del gen de la calprotectina es superior a dicho valor de referencia.

Una técnica particularmente preferida para medir la abundancia relativa del ADN hospedador y/o el nivel del gen de la calprotectina es qPCR, utilizando por ejemplo fragmentos de ácido nucleico (tales como cebadores y/o sondas) que son específicos del gen o genes que codifican la calprotectina.

Por "puntuación clínica combinada", se entiende en la presente memoria cualquier puntuación que combina parámetros biológicos con parámetros clínicos para producir una puntuación relacionada con la gravedad de la enfermedad o la cicatrización de la mucosa en CD. Puede ser, por ejemplo, una combinación de niveles de calprotectina (típicamente superiores a 150 µg/ml en pacientes que sufren CD), HBI (típicamente mayor que 4 en pacientes que sufren CD), sexo, edad, duración de la enfermedad, recuento de plaquetas, albúmina, plaquetas, CRP, sangrado rectal (Resumen OP05, 7º congreso de ECCO).

Por "puntuación predeterminada", se hace referencia en la presente memoria al valor resultante de la combinación de estos múltiples parámetros a través de cualquier método estadístico o algorítmico. Es por ejemplo 150 µg/ml para calprotectina y 4 para HBI.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene enfermedad de Crohn en un estado inestable, comprendiendo dicho método:

- a) llevar a cabo por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los primeros datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN hospedador preferentemente comparada con un valor de referencia; y
- b) realizar por lo menos un ensayo para determinar el nivel de calprotectina, o un marcador clínico combinado, en otra muestra biológica de dicho sujeto, en el que un segundo dato cuantitativo representa dicho nivel de calprotectina comparado preferentemente con 150 µg/ml o 250 µg/g o dicha puntuación clínica combinada preferentemente comparada con una puntuación predeterminada.

En decir, la divulgación se refiere a un método *in vitro* para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn en un estado inestable, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de calprotectina o un marcador clínico combinado en otra muestra biológica de dicho sujeto, y
- d) determinar si dicha abundancia relativa es mayor que un valor de referencia y si dicho nivel de

calprotectina es superior a 150 µg/ml o 250 µg/g o si dicha puntuación clínica combinada es mayor que una puntuación predeterminada.

Más particularmente, la presente divulgación se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la actividad de la enfermedad de Crohn en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de calprotectina o un marcador clínico combinado en otra muestra biológica de dicho sujeto, y
- d) diagnosticar que dicho sujeto tiene una enfermedad de Crohn en estado inestable, si dicha abundancia relativa es mayor que un valor de referencia, y si dicho nivel de calprotectina es superior a 150 µg/ml o 250 µg/g o si dicha puntuación clínica combinada es superior a una puntuación predeterminada.

En un aspecto preferido, dicho valor de referencia es de aproximadamente 10%.

En otro aspecto preferido, la abundancia relativa del ADN hospedador y el nivel de calprotectina pueden medirse a partir de la misma muestra biológica del sujeto.

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere además a un método para generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene enfermedad de Crohn en un estado inestable, comprendiendo dicho método:

- a) llevar a cabo por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los primeros datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN hospedador preferentemente comparada con un valor de referencia; y
- b) realizar por lo menos un ensayo para determinar el nivel de calprotectina, o un marcador clínico combinado, en dicha muestra, en el que un segundo dato cuantitativo representa dicho nivel de calprotectina preferentemente comparado con 150 µg/ml o 250 µg/g, o dicho marcador clínico combinado preferentemente comparado con una puntuación predeterminada.

Es decir, la divulgación se refiere a un método para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn en un estado inestable, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de calprotectina o una puntuación clínica combinada, en dicha muestra, y
- d) determinar si dicha abundancia relativa es mayor que un valor de referencia y si dicho nivel de calprotectina es superior a 150 µg/ml o 250 µg/g, o si dicha puntuación clínica combinada es superior a una puntuación predeterminada.

Más particularmente, la presente divulgación se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la actividad de la enfermedad de Crohn en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de calprotectina o una puntuación clínica combinada, en dicha muestra, y
- d) diagnosticar que dicho sujeto tiene una enfermedad de Crohn en estado inestable, si dicha abundancia relativa es mayor que un valor de referencia, y si dicho nivel de calprotectina es superior a 150 µg/ml o 250 µg/g, o si dicha puntuación clínica combinada es mayor que una puntuación predeterminada.

En un aspecto preferido, dicho valor de referencia es de aproximadamente 10%.

En un aspecto preferido, la calprotectina se mide en muestras de heces del sujeto sometido a ensayo. En una forma de realización más preferida, la detección del ADN hospedador y de calprotectina como se ha descrito anteriormente se realiza a partir de la misma muestra de heces. Sin embargo, esto puede requerir la realización de dos tipos distintos de detección, uno para medir la abundancia relativa del ADN hospedador (por ejemplo, por

qPCR) y otro para medir el nivel de proteína calprotectina (por ejemplo, mediante ELISA).

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente divulgación propone medir el nivel de gen de calprotectina, de manera que se puede realizar un único tipo de detección en el método de la invención. Más preferentemente, dicha detección se lleva a cabo en el mismo recipiente, y todavía más preferentemente de la misma muestra biológica, tal como una muestra de heces.

Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto, la divulgación se refiere a un método para generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene enfermedad de Crohn en un estado inestable, comprendiendo dicho método:

- a) realizar por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los primeros datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN hospedador, preferentemente comparada con un primer valor de referencia; y
- b) realizar por lo menos un ensayo para determinar el nivel del gen de la calprotectina, o un marcador clínico combinado, en dicha muestra (preferido en la presente memoria) o en otra muestra biológica de dicho sujeto, en el que un segundo dato cuantitativo representa dicho nivel del gen de la calprotectina comparado preferentemente con un segundo valor de referencia, o dicho marcador clínico combinado preferentemente comparado con una puntuación predeterminada.

Es decir, la divulgación se refiere a un método para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD) en un estado inestable, comprendiendo dicho método:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel del gen de la calprotectina, o un marcador clínico combinado, en dicha muestra (preferido en este documento) o en otra muestra biológica de dicho sujeto, y
- d) determinar si dicha abundancia relativa es mayor que un primer valor de referencia y si el nivel del gen de la calprotectina es mayor que un segundo valor de referencia o si dicha puntuación clínica combinada es mayor que una puntuación predeterminada.

Más particularmente, la divulgación se refiere a un método para diagnosticar la enfermedad de Crohn (CD) en un estado inestable en un sujeto que comprende:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel del gen de la calprotectina, o un marcador clínico combinado, en dicha muestra (preferido en la presente memoria) o en otra muestra biológica de dicho sujeto, y
- d) diagnosticar que dicho sujeto sufre de la enfermedad de Crohn en estado inestable, si dicha abundancia relativa es superior a un primer valor de referencia, y si dicho nivel de gen de calprotectina es superior a un segundo valor de referencia o si dicha puntuación clínica combinada es superior a una puntuación predeterminada.

En un aspecto preferido, dicho primer valor de referencia con respecto al ADN hospedador es como se ha definido anteriormente, y más preferentemente es de aproximadamente 10%; y dicho segundo valor de referencia con respecto a la calprotectina es preferentemente el nivel del gen de la calprotectina observado en sujetos que presentan la enfermedad de Crohn inactiva (es decir, que tienen enfermedad de Crohn en un estado estable).

Por "puntuación clínica combinada", se hace referencia en la presente memoria a cualquier puntuación que combina parámetros biológicos con parámetros clínicos para producir una puntuación relacionada con la gravedad de la enfermedad o la cicatrización de la mucosa en CD. Puede ser por ejemplo una combinación de niveles de calprotectina, HBI, sexo, edad, duración de la enfermedad, recuento de plaquetas, albúmina, plaquetas, CRP, sangrado rectal (Resumen OP05, 7° congreso de ECCO).

Por "puntuación predeterminada", se hace referencia en la presente memoria al valor resultante de la combinación de estos múltiples parámetros a través de cualquier método estadístico o algorítmico (ver, por ejemplo, los parámetros y valores mencionados en el Resumen OP05, 7° congreso de ECCO).

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para generar datos cuantitativos para un

sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn en un estado estable, comprendiendo dicho método:

- a) llevar a cabo por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los primeros datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN hospedador preferentemente comparada con un valor de referencia; y
- b) realizar por lo menos un ensayo para determinar el nivel de calprotectina, o un marcador clínico combinado, en otra muestra biológica de dicho sujeto, en el que un segundo dato cuantitativo representa dicho nivel de calprotectina comparado preferentemente con 150 µg/ml o 250 µg/g, o dicha puntuación clínica combinada preferentemente comparada con una puntuación predeterminada.

Es decir, la divulgación se refiere a un método *in vitro* para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn en un estado estable, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de calprotectina o un marcador clínico combinado en otra muestra biológica de dicho sujeto, y
- d) determinar si dicha abundancia relativa es mayor que un valor de referencia y si dicho nivel de calprotectina es inferior a 150 µg/ml o 250 µg/g, o si dicha puntuación clínica combinada es menor que una puntuación predeterminada.

Más particularmente, la divulgación se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la actividad de la enfermedad de Crohn en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de calprotectina o un marcador clínico combinado en otra muestra biológica de dicho sujeto, y
- d) diagnosticar que dicho sujeto tiene una enfermedad de Crohn en estado estable, si dicha abundancia relativa es mayor que un valor de referencia, y si dicho nivel de calprotectina es inferior a 150 µg/ml o 250 µg/g o si dicha puntuación clínica combinada es inferior a una puntuación predeterminada.

En un aspecto preferido, dicho valor de referencia es de aproximadamente 1%.

En otro aspecto preferido, la abundancia relativa del ADN hospedador y el nivel de calprotectina pueden medirse a partir de la misma muestra biológica del sujeto.

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere además a un método para generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn en un estado estable, comprendiendo dicho método:

- a) llevar a cabo por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los primeros datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN hospedador preferentemente comparada con un valor de referencia; y
- b) realizar por lo menos un ensayo para determinar el nivel de calprotectina, o un marcador clínico combinado, en dicha muestra, en el que un segundo dato cuantitativo representa dicho nivel de calprotectina preferentemente comparado con 150 µg/ml o 250 µg/g, o dicho marcador clínico combinado preferentemente comparado con una puntuación predeterminada.

Es decir, la divulgación se refiere a un método para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD) en un estado estable, comprendiendo dicho método:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de calprotectina o una puntuación clínica combinada, en dicha muestra, y

- d) determinar si dicha abundancia relativa es mayor que un valor de referencia y si dicho nivel de calprotectina es inferior a 150 µg/ml o 250 µg/g o si dicha puntuación clínica combinada es menor que una puntuación predeterminada.

Más particularmente, la divulgación se refiere a un método para diagnosticar la enfermedad de Crohn (CD) en un estado estable en un sujeto que comprende:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de calprotectina o una puntuación clínica combinada en dicha muestra, y
- d) diagnosticar que dicho sujeto presenta una enfermedad de Crohn en estado estable, si dicha abundancia relativa es mayor que un valor de referencia, y si dicho nivel de calprotectina es inferior a 150 µg/ml o 250 µg/g, o si dicha puntuación clínica combinada es inferior a una puntuación predeterminada.

En un aspecto preferido, dicho valor de referencia es de aproximadamente 1%.

En un aspecto preferido, la calprotectina se mide en muestras de heces del sujeto sometido a ensayo. En una forma de realización más preferida, el ADN hospedador y la detección de calprotectina como se ha descrito anteriormente se realizan a partir de la misma muestra de heces. Sin embargo, esto puede requerir la realización de dos tipos distintos de detección, uno para medir la abundancia relativa del ADN del hospedador (por ejemplo, por qPCR) y otro para medir el nivel de proteína calprotectina (por ejemplo, mediante ELISA).

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente divulgación propone medir el nivel de gen de calprotectina, de manera que se puede realizar un único tipo de detección en el método de la invención. Más preferentemente, dicha detección se lleva a cabo en el mismo recipiente, e incluso más preferentemente de la misma muestra biológica, tal como una muestra de heces.

Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto, la divulgación se refiere a un método para generar datos cuantitativos para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn en un estado estable, comprendiendo dicho método:

- a) realizar por lo menos un ensayo para determinar la abundancia relativa del ADN del hospedador en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que los primeros datos cuantitativos representan la abundancia relativa del ADN hospedador, preferentemente comparada con un primer valor de referencia; y
- b) realizar por lo menos un ensayo para determinar el nivel del gen de la calprotectina, o un marcador clínico combinado, en dicha muestra (preferido en la presente memoria) o en otra muestra biológica de dicho sujeto, en el que un segundo dato cuantitativo representa dicho nivel de calprotectina preferentemente comparado con un segundo valor de referencia y/o un tercer valor de referencia, o dicho marcador clínico combinado preferentemente comparado con una puntuación predeterminada.

En decir, la divulgación se refiere a un método para analizar una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad de Crohn (CD) en un estado estable, comprendiendo dicho método:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel del gen de calprotectina, o un marcador clínico combinado, en dicha muestra (preferido en la presente memoria), o en otra muestra biológica de dicho sujeto, y
- d) determinar si dicha abundancia relativa es mayor que un primer valor de referencia y si el nivel del gen de la calprotectina es inferior a un segundo valor de referencia y/o superior a un tercer valor de referencia o si dicha puntuación clínica combinada es inferior a una puntuación predeterminada.

Más particularmente, la divulgación se refiere a un método para diagnosticar la enfermedad de Crohn (CD) en un estado estable en un sujeto que comprende:

- a) obtener una muestra biológica de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel del gen de calprotectina, o un marcador clínico combinado, en dicha muestra (preferido

en la presente memoria), o en otra muestra biológica de dicho sujeto, y

- d) diagnosticar que dicho sujeto sufre de enfermedad de Crohn en estado estable, si dicha abundancia relativa es superior a un primer valor de referencia y si dicho nivel de calprotectina es inferior a un segundo valor de referencia y/o superior a un tercer valor de referencia o si dicha puntuación clínica combinada es menor que una puntuación predeterminada.

En un aspecto preferido, dicho primer valor de referencia con respecto al ADN hospedador es como se ha definido anteriormente para un estado estable (1%); dicho segundo valor de referencia con respecto a la calprotectina es preferentemente el nivel del gen de la calprotectina observado en sujetos que tienen enfermedad de Crohn activa (es decir, que tiene enfermedad de Crohn en un estado inestable); y/o dicho tercer valor de referencia con respecto a la calprotectina es preferentemente el nivel del gen de la calprotectina observado en sujetos sanos (es decir, que no tiene enfermedad de Crohn).

Mediante "puntuación clínica combinada", se hace referencia en la presente memoria a cualquier puntuación que combina parámetros biológicos con parámetros clínicos para producir una puntuación relacionada con la gravedad de la enfermedad o la cicatrización de la mucosa en CD. Puede ser por ejemplo una combinación de niveles de calprotectina, HBI, sexo, edad, duración de la enfermedad, recuento de plaquetas, albúmina, plaquetas, CRP, sangrado rectal (Resumen OP05, 7° congreso de ECCO).

Mediante "puntuación predeterminada", se hace referencia en la presente memoria al valor resultante de la combinación de estos múltiples parámetros a través de cualquier método estadístico o algorítmico (ver, por ejemplo, los parámetros y valores mencionados en el Resumen OP05, 7° congreso de ECCO).

Estos métodos se pueden aplicar a cualquier sujeto, ya sea humano o animal. Sin embargo, en una forma de realización preferida, se aplican a un paciente humano, en particular a un humano que se sospecha que sufre de CD, o que necesita confirmación de CD, o se le ha diagnosticado CD.

La muestra biológica utilizada en el método de la invención es una muestra de heces.

En una forma de realización preferida, la abundancia relativa de ADN se determina usando métodos de perfilado basados en análisis de hibridación de polinucleótidos, y/o secuenciación de polinucleótidos descritos anteriormente.

Como se ha mencionado anteriormente, el nivel de calprotectina se mide de acuerdo con cualquier método conocido comúnmente por el experto en la materia. Preferentemente, el nivel de proteína calprotectina puede expresarse en $\mu\text{g/ml}$, o en $\mu\text{g/g}$.

Estos métodos tienen ventajas significativas respecto a la técnica anterior, en particular comparadas con las que implican la medida del nivel de calprotectina en únicamente muestras de heces. De hecho, como es conocido por el experto en la materia, tales métodos de diagnóstico no son lo suficientemente sensibles y proporcionan resultados falsos positivos.

Además, en el contexto de la presente invención se ha observado que las dos medidas (etapa b) y etapa c)) no reflejan una correlación simple: el porcentaje de ADN humano aumenta significativamente en las muestras con calprotectina superior a $150 \mu\text{g/ml}$, reflejando que existe más ADN humano presente en las heces de pacientes que presentan signos de inflamación intestinal. Por lo tanto, aunque las dos medidas se relacionan no parecen captar exactamente las mismas características clínicas de la enfermedad clínica.

Una técnica preferida para medir la abundancia relativa del ADN hospedador y el nivel del gen de la calprotectina es qPCR.

Kits para su utilización en los métodos de la invención

Los métodos descritos anteriormente pueden realizarse, por ejemplo, utilizando kits preenvasados, que comprenden o consisten en los fragmentos de ácido nucleico de la invención.

La invención se refiere así a un kit para su utilización en cualquier método de la invención, comprendiendo o consistiendo dicho kit en:

- a) por lo menos un fragmento de ácido nucleico que se hibrida específicamente con el ADN hospedador; y
- b) unas instrucciones para realizar dicho método.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "instrucciones" se refiere a una publicación, una grabación, un diagrama o cualesquier otros medios que puedan utilizarse para comunicar cómo llevar a cabo un método de la invención. Dichas instrucciones pueden, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene dicho kit.

Preferentemente, las instrucciones para utilizar dicho kit incluyen un valor de referencia.

De acuerdo con un aspecto preferido, dicho fragmento de ácido nucleico que se hibrida específicamente con el ADN hospedador se selecciona de entre el grupo de los fragmentos de ácido nucleico de la secuencia SEC ID nº:1 a SEC ID nº:6, variantes de los mismos y secuencias complementarias de los mismos. Además, se divulga un kit en la presente memoria que comprende, o consiste en:

- a) el kit de cebadores (SEC ID nº:1, SEC ID nº:2) y la sonda de la secuencia SEC ID nº:3; y/o el kit de cebadores (SEC ID nº:4, SEC ID nº:5) y la sonda de la secuencia SEC ID nº:6; y
- b) unas instrucciones para realizar dicho método.

Sin embargo, aún más preferentemente, el kit anterior puede comprender además:

- c) por lo menos un reactivo apto para determinar específicamente la proteína de calprotectina o el nivel del gen.

El término "reactivo apto para determinar específicamente el nivel de calprotectina" o "reactivo apto para determinar específicamente el nivel de expresión de calprotectina" hace referencia a un reactivo o un conjunto de reactivos que reconocen específicamente la calprotectina y permiten la cuantificación del nivel de expresión de la misma en la proteína o nivel del gen. Estos reactivos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos, aptámeros o aficuerpos que reconocen específicamente la proteína calprotectina, o fragmentos de ácido nucleico tales como cebadores y/o sondas que reconocen el gen o genes que codifican la calprotectina. En el contexto de la presente invención, se hace referencia a que dicho reactivo es "específico" para la calprotectina o "reconoce específicamente" la calprotectina si: 1) presenta un nivel de umbral de actividad de unión y/o hibridación, y/o 2) no presenta reactividad cruzada de manera significativa con moléculas diana conocidas su relación con la calprotectina. La afinidad de unión de tal reactivo puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard. La reactividad cruzada de un reactivo puede ser asimismo fácilmente determinada por un experto en la materia, y por lo tanto, necesita ser detallada adicionalmente en la presente memoria. Los ejemplos de reactivos aptos para determinar específicamente el nivel de expresión de calprotectina incluyen, entre otros aspectos, anticuerpos anticallprotectina (tales como el MAC387 IgG1 de Invitrogen) y fragmentos de ácido nucleico que se hibrida específicamente con genes que codifican calprotectina, tales como S100A8 y/o S100A9 como se describió anteriormente.

La divulgación se refiere además a la utilización (en particular uso *in vitro*) del conjunto como se ha descrito anteriormente, en cualquier método de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

1. Material y Métodos

1.1. Cohorte

1.1.1 Cohorte de CD

Todos los participantes forman parte del estudio "CrohnOmeter 1", cuyo objetivo era recoger muestras de heces de una población diversa de pacientes con enfermedad de Crohn para investigar su microbiota intestinal. Los criterios de inclusión en el estudio fueron un diagnóstico clínico de la enfermedad de Crohn y los participantes firmaron un formulario de consentimiento informado. CrohnOmeter 1 es un estudio longitudinal, en promedio cada participante proporcionó 8 muestras de heces durante un período de 8 meses de tiempo. Se incluyeron un total de 99 participantes y se proporcionaron muestras de heces. De los 99 participantes, 68 tuvieron sus muestras de heces secuenciadas. En total se secuenciaron 438 muestras.

Cada participante del estudio rellenó un cuestionario cada vez que se proporcionó una muestra de heces en el estudio. El cuestionario capturó información sobre la salud del paciente y las características de las heces. En particular, se utilizó la siguiente información para evaluar el estado de actividad de la enfermedad/estado inflamatorio:

- Se midió el nivel de calprotectina (dosificado en las heces de los pacientes) (la calprotectina es un marcador proteico que destaca la inflamación);
- Se registró el índice de Harvey-Bradshaw (HBI) de cada paciente. HBI es un índice autoevaluado compuesto que refleja el estado general de salud del paciente. La puntuación se basa en una evaluación del bienestar general, una evaluación del dolor abdominal, el número de heces líquidas por día, la presencia de masa abdominal y la presencia de complicaciones. Está ampliamente extendida para la

evaluación del estado del paciente con Crohn.

1.1.2 Cohorte de control saludable

Se reunió un grupo control de individuos de individuos sanos. Los principales criterios de exclusión fueron el uso de medicamentos recetados y antecedentes de enfermedad significativa. Se recogieron muestras múltiples de los mismos individuos conduciendo a un total de 137 muestras.

1.1.3 Cohorte de control de NASH

Se secuenciaron otros dos pacientes NASH de un estudio más amplio. El objetivo del estudio NASH más grande, llamado NASH2, fue recoger muestras de heces de una población diversa de pacientes con NASH para investigar su microbioma intestinal e identificar diferencias entre los pacientes con NASH y los pacientes con esteatosis simple. Se encontraban disponibles 6 muestras de estos 2 pacientes. Esta cohorte, aunque pequeña, fue seleccionada como población de control para una enfermedad inflamatoria no localizada en el intestino.

1.2. Recogida y preparación de muestras

1.2.1. Muestreo fecal

Se proporcionó a los sujetos de la cohorte CD kits de recogida dedicados que contenían un estabilizador de ADN y instrucciones escritas cada tres semanas para la recogida de una muestra de heces procedentes de su hogar. Después de la recogida de dos, aproximadamente alícuotas de 1 gramo en un amortiguador de preservación de ADN validado (típicamente RNA later®), los tubos que contenían las muestras fueron enviados por correo regular al laboratorio. Se almacenó directamente un tubo a -80° C como un respaldo de la suspensión de heces. El segundo tubo se utilizó para la extracción de ADN: se prepararon tres alícuotas a partir del material de heces usando centrifugación a alta velocidad. Estas tres alícuotas se almacenaron entonces a -80° C antes de la extracción de ADN.

Se utilizó el mismo conjunto de recogida para las cohortes de control.

1.2.2. Extracción de ADN

Se suspendió una alícuota congelada de cada muestra fecal en 250 µl de tiocianato de guanidina 0,1 M Tris (pH 7,5) y 40 µl de N-lauroil sarcosina al 10%. La suspensión se sometió a continuación a un batido vigoroso de microesferas para liberar ADN de células microbianas y la extracción de ADN se llevó a cabo utilizando un protocolo estándar (Godon *et al.*, 1997). La integridad del ADN y la concentración fueron evaluadas por Nanodrop y Agilent y en electroforesis en gel de agarosa.

1.3. Secuencia de Illumina

La secuenciación se realizó en un laboratorio acreditado ISO17025 en un secuenciador HiSeq 2500 Illumina. Se utilizó el método acreditado ISO 17025-HSHOV4 PE100. La preparación de la biblioteca de ADN siguió las instrucciones del fabricante (Illumina). El flujo de trabajo indicado por el proveedor del dispositivo de secuenciación se utilizó para realizar las diferentes etapas: generación de grupo, hibridación de plantilla, amplificación isotérmica, linealización, bloqueo y desnaturalización e hibridación de los cebadores de secuenciación. La lectura automática de nucleótidos se realizó utilizando la canalización del proveedor. Para cada muestra se generaron 40 millones de lecturas mínimas en pares. La longitud de lectura de secuenciación fue de 100 pb.

1.4 Procesamiento de bioinformática

Las lecturas en bruto se procesaron utilizando la tubería interna Enterome. Brevemente la tubería se basa en MOCAT (Kultima *et al.*, 2012) y una compilación de escritos internos. Consiste en controles de calidad, mapeo y cálculo de la abundancia de genes usando MOCAT v1.3, incluyendo la lista de adaptadores Illumina y genoma humano (hg19). El número de lecturas de mapeo para el genoma humano se basa en el 95% de identidad en el 90% de la longitud y se devuelven después de las etapas de control de calidad que incluye recortar bases con una puntuación de baja calidad. El porcentaje de lecturas humanas en una muestra se calcula usando 1- número de lecturas que mapean a hg19/número de lecturas después del recorte.

2. Resultados

2.1. Comparación entre controles contra pacientes con enfermedad de Crohn (CD)

Utilizando la prueba de Wilcoxon, se compararon las 137 muestras de controles sanos, 6 de pacientes de NASH con las 438 muestras de pacientes con CD. El valor de p fue altamente significativo para CD frente a los controles sanos (p-valor = 1,667e-12), figura 1. El resumen estadístico de las dos cohortes se proporciona en la

Tabla 1.

Tabla 1: Resumen estadístico para el porcentaje de lecturas de mapeo para el genoma humano HG19.

Cohorte	Min.	1 ^{er} Qu.	Mediana	Media	3 ^{er} Qu.	Máx.
CD	0,0000282	0,0003732	0,0009794	0,0318600	0,0036770	0,8986000
Sano	1,278e-05	1,822e-04	3,998e-04	8,975e-04	7,883e-04	1,012e-02
NASH	0,0007524	0,0009039	0,0011470	0,0021420	0,0014250	0,0074630

El 99% de las muestras de controles sanos presentan menos de 1% de ADN humano en su ADN total de heces, en comparación con el 84% de las muestras de Crohn. Así, con un valor de corte de 1%, el 16% de las muestras de Crohn podría ser capturado. Por lo tanto, la presencia de ADN en las heces es muy específica.

2.2. Asociación con la gravedad de la enfermedad en pacientes con enfermedad de Crohn (CD)

Dado que existe una diferencia muy significativa entre los pacientes con enfermedad de Crohn y los controles sanos en términos de porcentaje de ADN humano en la muestra de heces, se estudia la relación con la gravedad de la enfermedad para evaluar si la medida de la abundancia relativa del ADN hospedador podría utilizarse como biomarcador de la actividad de la enfermedad.

Con este fin, los pacientes se clasificaron en grupos activos de enfermedad según tres criterios:

- 1) si tenían un nivel de calprotectina superior a 150,
- 2) si tenían una puntuación HBI por encima de 4,
- 3) si tenían una puntuación de HBI por encima de 4 o su nivel de calprotectina por encima de 150 (puntuación combinada)

La diferencia, basada en la prueba de Wilcoxon, entre el porcentaje de abundancia relativa de ADN humano en muestras de heces de pacientes en reposo (n=227) contra muestras de heces de pacientes en fase activa de CD (n=211) fue altamente significativo (ver la figura 2, P-val=1,034e-09).

El 95,5% de las muestras con más del 20% de ADN humano procedían de pacientes activos.

El 90% de las muestras con más del 10% de ADN humano procedían de pacientes activos.

El 80% de las muestras con más del 1% de ADN humano procedían de pacientes activos.

La curva ROC (figura 4) es una representación visual, que indica el número de positivos verdaderos y falsos basados en varios cortes. Como se puede apreciar en la esquina inferior izquierda, existe una especificidad muy alta (100%, pero una baja sensibilidad, sólo se captura un 10% de los pacientes). La línea recta representa una puntuación "no informativa".

Observando los niveles de calprotectina por sí mismos y comparándolos con el ADN humano (figura 3), las dos medidas no reflejan una correlación simple, sin embargo, el porcentaje de ADN humano aumenta significativamente en las muestras con calprotectina superior a 150 µg/ml (P-valor=1,041e-07), lo que refleja el hecho de que se encuentra más ADN humano presente en las heces de los pacientes con signos de inflamación intestinal. Curiosamente, aunque las dos medidas se relacionan, no parecen capturar exactamente las mismas características clínicas de la enfermedad clínica ya que, como puede apreciarse en la figura 3, algunas muestras presentan unos niveles muy altos de calprotectina y no se encuentra ADN humano.

Ejemplo 2

1. Material y Métodos

1.1. Cohorte

Los participantes formaron parte del estudio "CrohnOmeter 1", como se describe anteriormente. Se secuenciaron en total 11 muestras de heces. La cohorte cumplió los mismos criterios que en el Ejemplo 1.

1.2. Recogida y preparación de muestras

1.2.1. Muestreo fecal y extracción de ADN

Se realizó un muestreo fecal y una extracción de ADN, de acuerdo con un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1 anterior.

1.2.2. qPCR realizado en el ADN hospedador

5 Las once muestras se analizaron con el ensayo ValidPrime® (TATAA Biosciences) y se realizaron por triplicado. ValidPrime está altamente optimizado y es específico para un locus no transcrito de ADN genómico que está presente en exactamente una copia por genoma normal haploide.

10 Los cebadores se llevaron a cabo en una concentración final de 400 nM y la sonda presentaba una concentración final de 200 nM.

Una curva estándar que comprendía 100000 copias a 6,10 copias por reacción se llevó a cabo junto con las muestras, el factor de dilución entre las normas fue de 4x. Las muestras se normalizaron a una concentración de 4,84 ng/μl que era por lo menos una dilución 10x.

15 Tabla 2. Cebadores y sondas para cuantificación qPCR de ADN del hospedador

Cebadores y sondas	Secuencia de nucleótido de 5' a 3' (SEC ID n°:)
VP5 directo	AACTTGGTGCGGAGGT (SEC ID n°:1)
VP5 inverso	ATCGCTTCTGATGGACAC (SEC ID n°:2)
VP5 sonda	CCGCCAGACTGCAATCCATCAATGACA (SEC ID n°:3)
VP9 directo	GCGGAAACACAAGGGAA (SEC ID n°:4)
VP9 inverso	TTAGAGGCAAAAGCAAAGAA (SEC ID n°:5)
VP9 sonda	ACAGCTAATTAATTCACAGTTCCT (SEC ID n°:6)

20 Los datos, Cq-valores, del software de administración CFX (Bio-Rad) fueron generados usando el método del umbral. El umbral se estableció en 230. Las curvas estándares se obtuvieron del software de administración CFX (Bio-Rad). Las concentraciones de la muestra se calcularon en el administrador CFX usando las curvas estándares.

1.2.3. Análisis estadístico de datos qPCR

25 El porcentaje de ADN humano estimado se calculó basándose en el número de lecturas de mapeo al genoma humano dividido por el número total de lecturas en la muestra. Este porcentaje correlacionó con la cuantificación de ADN humano utilizando los ensayos ValidPrime.

30 La capacidad de predecir el valor de una variable (ADN humano) utilizando los valores de otra variable (qPCR ensayo) se determinó típicamente a partir de un análisis de regresión lineal de los datos, suponiendo que existe una respuesta lineal entre las dos variables. El análisis estadístico se realizó en R.

2. Resultados

35 2.1. Cuantificación de la abundancia del ADN hospedador por los cebadores específicos de qPCR

La figura 5 demuestra una correlación estadísticamente significativa en los datos cuantitativos generados entre los ensayos qPCR realizados usando los cebadores y sondas VP5 y VP9 (correlación=0,964).

40 Las Figuras 6 y 7 representan una correlación estadísticamente significativa en los datos cuantitativos generados por el ensayo qPCR realizado usando los cebadores VP5 (figura 6) o VP9 (figura 7) y el porcentaje de ADN humano medido por el método propuesto en el Ejemplo 1 (es decir, secuenciación de Illumina) (correlación = 0,909 para el ensayo VP5 y 0,927 para el ensayo VP9).

45 Por lo tanto, la medida de la abundancia del ADN hospedador por qPCR, utilizando los cebadores VP5 y VP9 y las sondas descritas anteriormente en la Tabla 2, puede permitir el diagnóstico de la enfermedad de Crohn y el control de la actividad de dicha enfermedad.

Ejemplo 3

50 1. Material y métodos

1.1. Cohorte

55 Los participantes formaron parte del estudio "CrohnOmeter 1", como se describió anteriormente. Se secuenciaron en total 15 muestras de heces. La cohorte cumplió los mismos criterios que en el Ejemplo 1.

1.2. Recogida y preparación de muestras

1.2.1. Muestreo fecal y extracción de ARN

5 Se realizó un muestreo fecal, de acuerdo con el procedimiento detallado en el Ejemplo 1 anterior

Las muestras de heces se extrajeron a continuación con el conjunto de aislamiento de ARN/ADN Microbiome PowerMag® (No. de cat. 27500-4-EP, MOBIO Laboratories, Inc) según las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Es decir, se añadieron directamente 650 µl de amortiguador de lisis y 100 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico a las muestras de heces. Se transfirió de la mayor manera posible a la placa de microesferas de vidrio. Se hizo funcionar un homogeneizador (Tissuelyser II, Qiagen) a 30 Hz durante 2 x 5 min. Después de transferir el sobrenadante, se realizó una etapa de batido adicional de microesferas. Los volúmenes añadidos al sedimento fueron 300 µl de amortiguador de lisis y 45 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. Se añadieron 220 µl de solución de eliminación de inhibidores al sobrenadante reunido y se procesaron adicionalmente 450 µl de volumen de muestra total con KingFisher Flex (Thermo Scientific).

1.2.2. Calidad y normalización del ARN

20 La absorbancia y la pureza de las 15 muestras de ARN/ADN extraídas se analizaron en un espectrofotómetro (DropSense96, Trinean nv). La calidad del ARN se midió en valores de RIN en electroforesis en gel (BioAnalyzer, Agilent Technologies). Las muestras se normalizaron a aproximadamente 66,67 ng/µl sobre la base de la medida de absorbancia.

1.2.3. Síntesis de cADN

25 Todas las muestras se transcribieron inversamente en cADN utilizando el kit TATAA GrandScript cDNA Synthesis número A103 (TATAA Biocenter AB). Antes de la síntesis de cADN, se realizó un tratamiento con DNasa utilizando el kit de eliminación de gADN de Heat&Run (Cat No 80200-50, ArticZymes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadió carga máxima de ARN a la reacción para poder recuperar los valores Cq más elevados posible. Los reactivos se mezclaron. La transcripción inversa se realizó en 20 µl de volumen de reacción sobre T100 (Bio-Rad Laboratories, Inc). El programa de temperatura en la tabla 3 se aplicó para la síntesis de cADN.

1.2.4. qPCR

35 Las 15 muestras se diluyeron 9 veces después de la transcripción inversa. Se realizó qPCR con TATAA Probe® GrandMaster Mix número TA02 (TATAA Biocenter AB) y los reactivos se mezclaron. Todas las muestras que incluían ADN genómico y un control negativo se realizaron por triplicado en reacciones de 10 µl en la plataforma CFX384 (Bio-Rad). Las muestras se realizaron utilizando 2 genes de interés (ver Tabla 3), ValidPrime (para la corrección de fondo de ADN genómico) y B2M medio y ensayos cortos (para el control de la fragmentación física, delta Cq grande entre esos dos ensayos indicarán degradación ver Björkman, *et al* (2016) El pipeteo se realizó mediante un robot de pipeteo (EpMotion 5070, Eppendorf, Alemania) Se aplicó un programa de temperatura de 2 etapas y se realizó la detección en el canal FAM.

45 Se realizó qPCR utilizando cebadores y sondas diseñadas para amplificar los genes S100A8 y S100A9, que codifican la proteína que forma el heterodímero de calprotectina. Dichos cebadores y sondas pueden ser diseñados fácilmente por el experto en la materia basándose en la secuencia de nucleótidos disponible públicamente de estos genes.

50 Tabla 3. Genes que codifican las proteínas S100A8 y S100A9

Símbolo genético	Proteína codificada por dicho gen	Secuencia de genes
S100A8	S100 proteína de unión al calcio A8	Genbank CR407674.1
S100A9	S100 proteína de unión al calcio A9	NCBI RefSeq NM_002965.3

Los datos brutos se generaron utilizando el método de umbral en el software de administración CFX (Bio-Rad). Los datos qPCR se analizaron con el software GenEx (MultiD Analyse AB) utilizando la validación de genes de referencia con geNorm y NormFinder para evaluar los genes más establemente expresados.

1.2.5. Análisis estadístico

60 Para cada gen, se promediaron los valores triplicados. Los valores de Cq junto con los valores normalizados por los genes de mantenimiento (valores delta Cq) se compararon con los valores de ELISA transformados log10 obtenidos para medir el nivel de proteína calprotectina (ver el Ejemplo 1, valor de 150 µg/ml). Se calculó la correlación de Spearman. Además, se utilizó un corte de 250 µg/g para clasificar a los pacientes como inflamados o no inflamados (Dhaliwal *et al.*, 2015) y se realizó una prueba de rango de Wilcoxon sobre los valores de Cq para cada gen para comparar los dos grupos. El análisis estadístico se realizó en R.

2. Resultados

2.1. Cuantificación del nivel del gen de la calprotectina mediante cebadores específicos de qPCR

Los genes S100A8 y S100A9 presentaron valores Cq para todos los 12 (S100A9) a 15 (S100A8) de las muestras sometidas a ensayo. Stati

Tabla 4. Datos estadísticos

Símbolo del gen	Correlación de Spearman	P-valor
S100A8	-0,72	0,0025
S100A9	-0,59	0,039

La figura 8 representa una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de mRNA fecal en los genes S100A8 y S100A9 y el nivel de calprotectina fecal (nivel de proteína).

Por lo tanto, la medida del nivel del gen de la calprotectina por qPCR, y más particularmente del nivel del gen S100A8 y/o S100A9, puede permitir el diagnóstico de la enfermedad de Crohn, y más particularmente para el control de la actividad de dicha enfermedad, cuando se combina preferentemente con la medida de la abundancia relativa del ADN del hospedador.

Este ensayo puede realizarse además fácilmente en combinación con la prueba qPCR para medir la abundancia de ADN hospedador descrita en el Ejemplo 2, preferentemente en un único tubo de ensayo.

Referencias bibliográficas

Cho, J. H., & Brant, S. R. (2011). Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 140(6), 1704-12. doi:10.1053/j.gastro. 2011.02.046

HMP, A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012 Jun 13; 486(7402):215-21

Klaassen CH, Jeunink MA, Prinsen CF, Ruers TJ, Tan AC, Strobbe LJ, Thunnissen FB. Quantification of human DNA in feces as a diagnostic test for the presence of colorectal cancer. *Clin Chem*. 2003 Jul; 49(7):1185-7.

Laas et al. Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmun Rev*. 2014 Abr-May; 13(4-5):467-71.

Molodecky NA, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012 Ene; 142(1):46-54.e42; quiz30. doi: 10.1053/j.gastro. 2011.10.001.

Vincent C, Mehrotra S, Loo VG, Dewar K, Manges AR. Excretion of Host DNA in Feces Is Associated with Risk of Clostridium difficile Infection. *Journal of Immunology Research* 2014 Sept; Artículo ID 246203.

Shewale JG, Schneida E, Wilson J, Walker JA, Batzer MA y Sinha SK, Human Genomic DNA Quantitation System, H-Quant: Development and Validation for use in Forensic Casework; *Journal of Forensic Science*, 2007, vol. 52(2)

Reeves J.R. y Bartlett J.M.S. *Methods in Molecular Medicine*; vol. 39, capítulo 51, 471-483 (2000)

Schena M. Protein microarrays; Jones y Bartlett Learning. (2005)

Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F y Moletta R, Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol*. 1997, 63(7):2802.

Parker RM & Barnes NM, mRNA: detection by in Situ and northern hybridization. *Methods in Molecular Biology* 106:247-283 (1999)

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM., Real time quantitative PCR, *Genome Research* 6:986-994 (1996)

Kultima JR, Sunagawa S, Li J, Chen W, Chen H, Mende DR, Arumugam M, Pan Q, Liu B, Qin J, Wang J, Bork P.; MOCAT: a metagenomics assembly and gene prediction toolkit. *PLoS One*. 2012;7(10):e47656

Björkmana J., Svec D., Lott E, Kubistaa M., y Sjöbacka R. *Biomolecular Detection and Quantification*; 2016, volumen 6: 4-12

Dhaliwal A., Zeino Z, Tomkins C., Cheung M., Nwokolo C., Smith S., Harmston C., y Arasaradnam R.P.
Frontline Gastroenterol.; 2015, 6(1):14-19. Epub2014

Listado de secuencias

5	<110> ENTEROME	
	<120> ADN HOSPEDADOR COMO BIOMARCADOR DE LA ENFERMEDAD DE CROHN	
10	<130> B369821D34578	
	<150> EP15305142.0	
	<151> 2015-01-30	
15	<160> 6	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
20	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador directo VP5	
	<400> 1	
	aacttggtgc ggaggt	16
30	<210> 2	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador inverso VP5	
	<400> 2	
40	atcgcttctg atggacac	18
	<210> 3	
	<211> 27	
45	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sonda VP5	
50	<400> 3	
	ccgccagact gcaatccatc aatgaca	27
55	<210> 4	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador directo VP9	
	<400> 4	
65	gcggaaacac aagggaa	17
	<210> 5	

ES 2 693 973 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador inverso VP9	
	<400> 5	
10	ttagaggcaa aagcaaagaa	20
	<210> 6	
	<211> 27	
	<212> ADN	
15	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sonda VP9	
20	<400> 6	
	acagctaatt aaaattgcac agttcct	27

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para diagnosticar la actividad de la enfermedad de Crohn (CD) en un sujeto que sufre de la misma, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) obtener una muestra de heces de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra, y
- c) diagnosticar que dicho sujeto presenta una enfermedad de Crohn en un estado inestable si dicha abundancia relativa es superior a un valor de referencia, siendo dicho valor de referencia preferentemente de aproximadamente 10%.

2. Método según la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:

- d) determinar el nivel de calprotectina, en dicha muestra o en otra muestra biológica de dicho sujeto, y,
- e) diagnosticar que dicho sujeto presenta una enfermedad de Crohn en un estado inestable si dicho nivel de calprotectina es superior a 150 µg/ml o 250 µg/g.

3. Método según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

- a) obtener una muestra de heces de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra,
- c) determinar el nivel de gen de calprotectina, en dicha muestra o en otra muestra biológica de dicho sujeto, y
- d) diagnosticar que dicho sujeto presenta una enfermedad de Crohn en un estado inestable, si dicha abundancia relativa es superior a un primer valor de referencia, preferentemente de aproximadamente 10%, y si dicho nivel de gen de calprotectina es superior a un segundo valor de referencia.

4. Método *in vitro* para poner a prueba la eficacia de un tratamiento en un sujeto que sufre de CD, o para evaluar la respuesta de un paciente a un tratamiento, que comprende las etapas siguientes:

- i) diagnosticar la actividad de CD antes y después de la administración de un tratamiento, de acuerdo con el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, preferentemente de acuerdo con el método según la reivindicación 1, y
- ii) concluir que el tratamiento es eficaz en dicho sujeto si el estado antes de la administración del tratamiento era inestable pero deviene estable tras la administración del tratamiento.

5. Método *in vitro* para diagnosticar la enfermedad de Crohn (CD) en un sujeto que comprende:

- a) obtener una muestra de heces de dicho sujeto,
- b) determinar la abundancia relativa del ADN hospedador en dicha muestra, y
- c) diagnosticar que dicho sujeto sufre de la enfermedad de Crohn, si dicha abundancia relativa es superior a un valor de referencia, siendo dicho valor de referencia preferentemente de aproximadamente 1%.

6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho sujeto se sospecha que sufre de la enfermedad de Crohn.

7. Método según la reivindicación 5 o 6, que comprende además:

- d) determinar el nivel de calprotectina, en dicha muestra o en otra muestra biológica de dicho sujeto, y
- e) diagnosticar que dicho sujeto sufre de la enfermedad de Crohn, si dicha abundancia relativa es superior a un valor de referencia, y si dicho nivel de calprotectina es superior a 150 µg/ml.

8. Método según la reivindicación 7, en el que dicho valor de referencia es de aproximadamente 1%.

9. Método según la reivindicación 5 o 6, que comprende además:

- d) determinar el nivel de gen de calprotectina, en dicha muestra o en otra muestra biológica de dicho sujeto, y

- e) diagnosticar que dicho sujeto sufre de la enfermedad de Crohn, si dicha abundancia relativa es superior a un primer valor de referencia, y si dicho nivel de gen de calprotectina es superior a un segundo valor de referencia.
- 5 10. Método según la reivindicación 9, en el que el valor de referencia para dicha abundancia relativa es de aproximadamente 1%.
- 10 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha abundancia relativa es la cantidad relativa de ADN hospedador en comparación con la cantidad total de ADN presente en dicha muestra.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho sujeto es un paciente humano.
- 15 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha abundancia se mide por PCR cuantitativa.
- 20 14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha abundancia se mide utilizando por lo menos un fragmento de ácido nucleico seleccionado de entre el grupo de fragmentos de ácido nucleico que consiste en la secuencia SEC ID n°:1 a SEC ID n°:6, sus variantes y sus secuencias complementarias, siendo dichas variantes idénticas por lo menos 99% a dichos fragmentos.
15. Kit para su utilización en cualquier método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende:
- 25 a) por lo menos un fragmento de ácido nucleico que hibrida específicamente con el ADN hospedador, siendo seleccionado dicho fragmento de ácido nucleico de entre el grupo de fragmentos de ácido nucleico que consiste en la secuencia SEC ID n°:1, SEC ID n°:3, SEC ID n°:4 y SEC ID n°:5, sus variantes y sus secuencias complementarias, siendo dichas variantes idénticas por lo menos 99% a dichos fragmentos; y
- b) unas instrucciones para realizar dicho método.

Figura 1

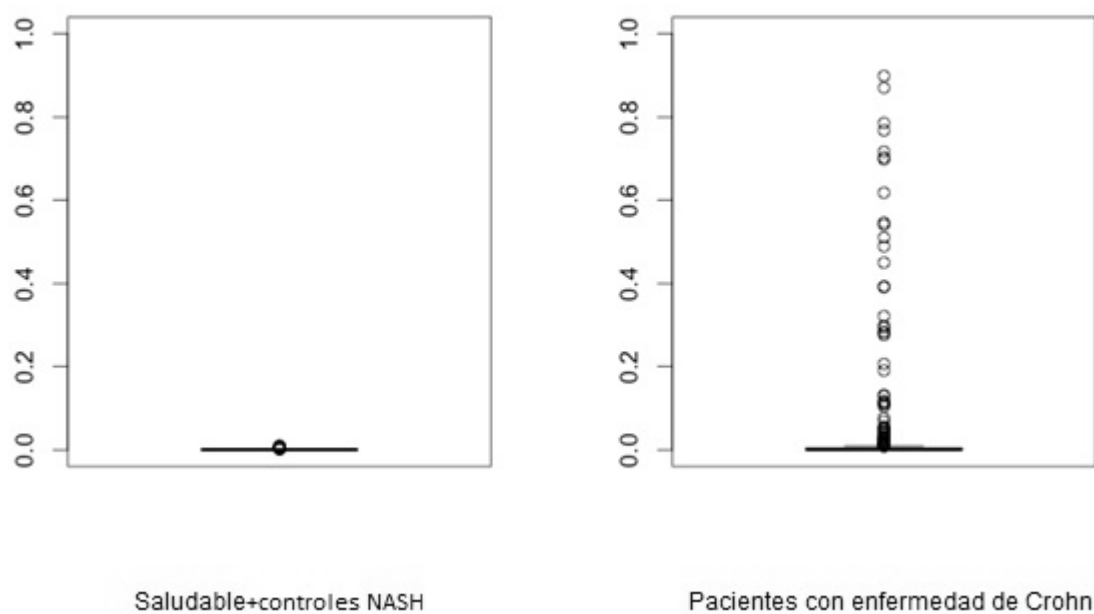


Figura 2

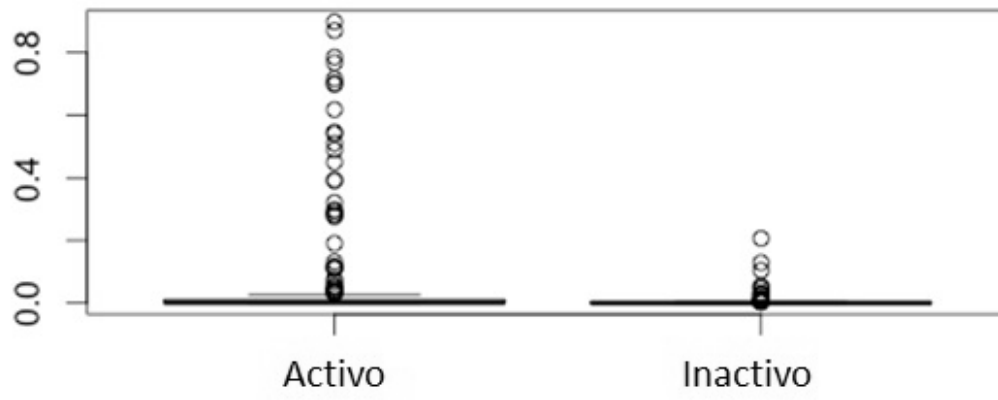


Figura 3

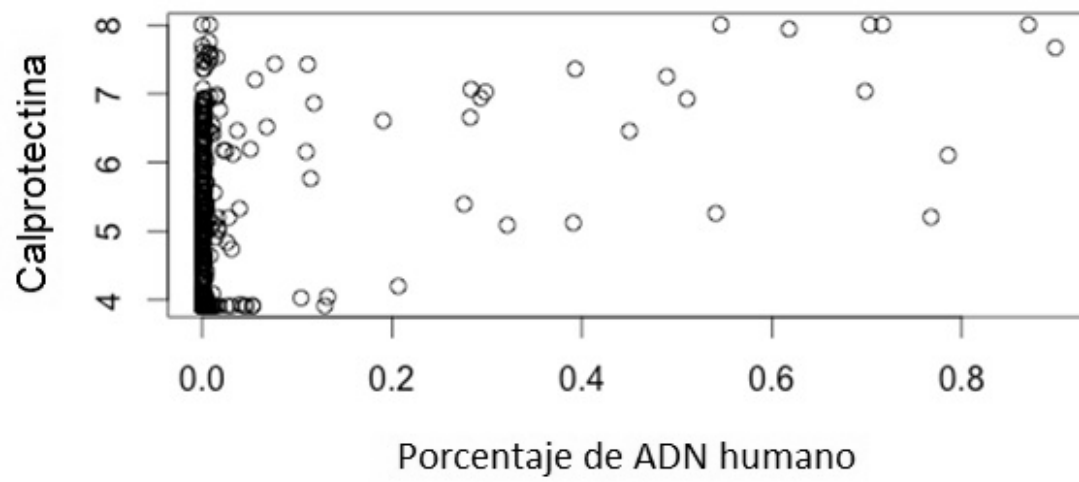


Figura 4

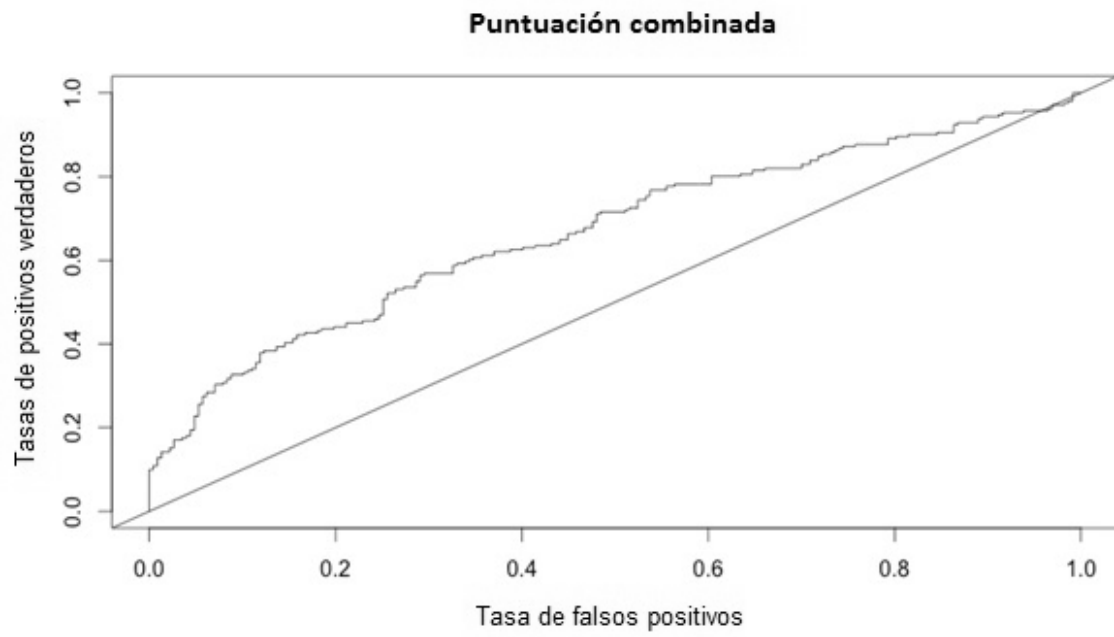


Figura 5

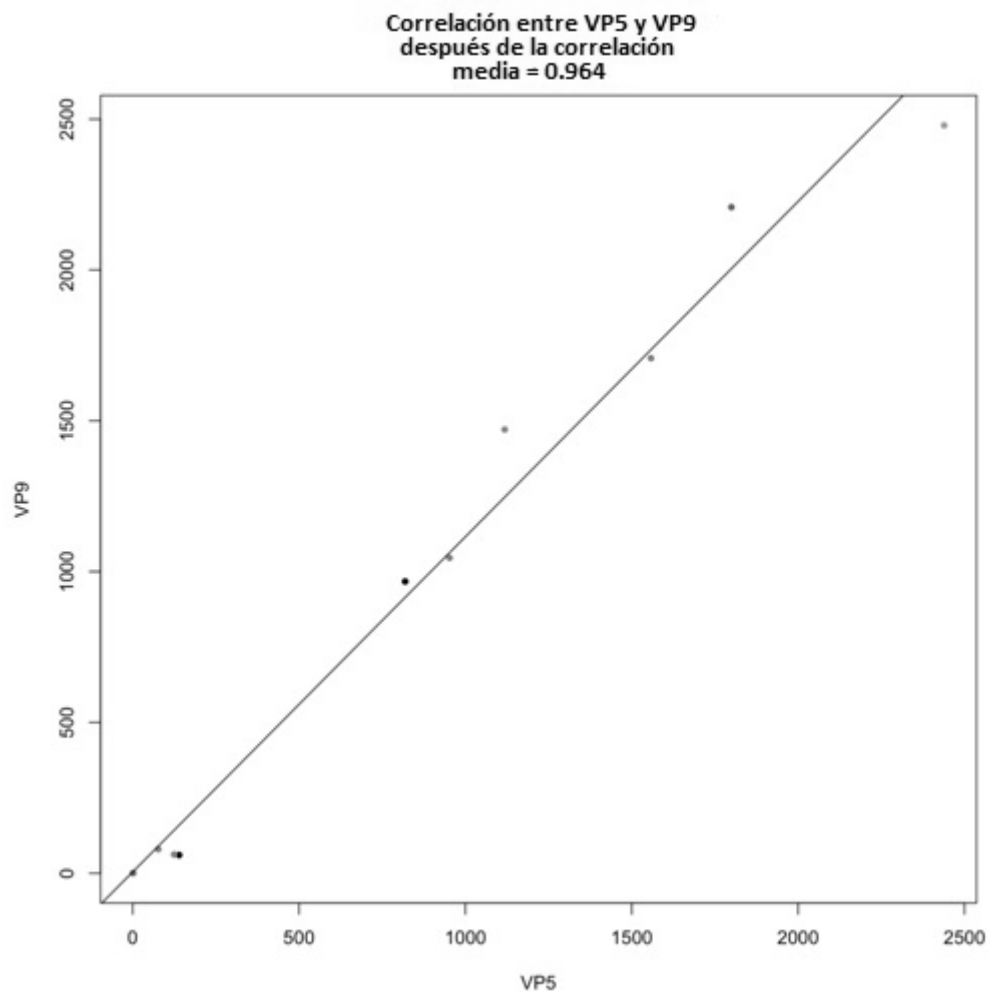


Figura 6

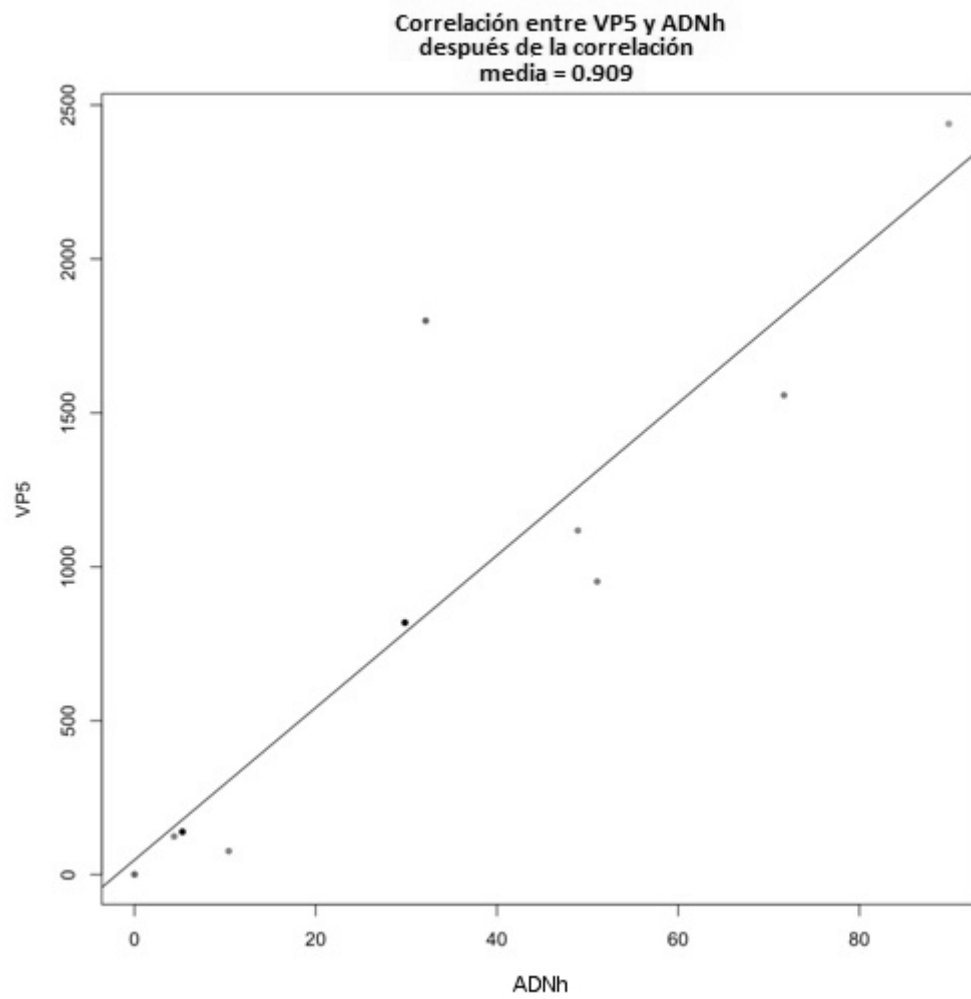


Figura 7

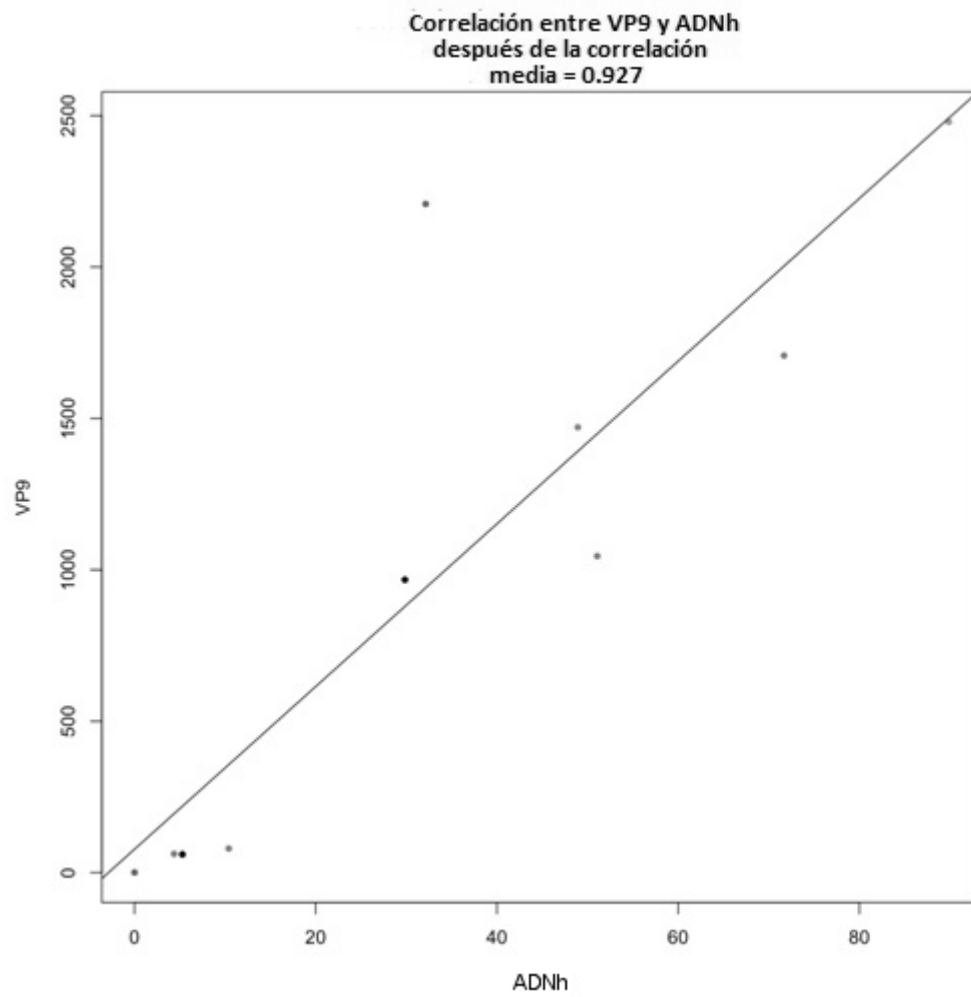


Figura 8

