

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 791**

21 Número de solicitud: 201930195

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**04.03.2019**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**07.09.2020**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)**  
**Paseo de las Delicias, s/n. Pabellón de Brasil**  
**41013 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**ILUNDAIN LARRAÑETA, Maria Anunciación Ana;**  
**PERAL RUBIO, M<sup>a</sup> José;**  
**CALONGE CASTRILLO, M<sup>a</sup> Luisa;**  
**GARCÍA MIRANDA, Pablo;**  
**VÁZQUEZ CARRETERO, M<sup>a</sup> Dolores y**  
**SERRANO MORALES, José Manuel**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel;**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **USO DE LA REELINA COMO BIOMARCADOR DE ENFERMEDADES INTESTINALES**

57 Resumen:

Uso de la reelina como biomarcador de enfermedades intestinales.

La reelina puede ser utilizada como un único biomarcador en el diagnóstico e identificación de diferentes patologías intestinales y como biomarcador de la transición desde una enfermedad inflamatoria intestinal hasta tumorigénesis. Los inventores han demostrado que, en respuesta a un daño tisular, como la inflamación, el intestino responde aumentando la expresión de reelina para reforzar la barrera intestinal y facilitar la reparación tisular. Si la inflamación progresa, se establecen las condiciones que reducen o suprimen la expresión de reelina, donde dicha ausencia favorece la formación de un microambiente desfavorable que agravaría la inflamación y/o induciría la tumorigénesis.

ES 2 781 791 A1

## DESCRIPCIÓN

Uso de la reelina como biomarcador de enfermedades intestinales

5 La presente invención se refiere a la reelina como único biomarcador para el diagnóstico e identificación de diferentes patologías intestinales y como biomarcador de la transición desde una enfermedad inflamatoria intestinal hasta tumorigénesis.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

El epitelio intestinal forma parte de una de las mayores superficies que separa nuestro medio interno del exterior, participa en la digestión y absorción de nutrientes y es un componente clave en la barrera intestinal, impidiendo el paso al medio interno de un amplio espectro de microorganismos y sustancias potencialmente cancerígenas  
15 presentes en la luz del intestino. El epitelio, junto a su vía paracelular sellada por las uniones ocluyentes, supone la principal barrera física de la barrera intestinal. Además, el epitelio, produce componentes de la barrera intestinal como son la capa de moco y los péptidos antimicrobianos, y secreta IgA desde el medio subepitelial a la luz del intestino. Otros componentes de la barrera intestinal son la microbiota, situada por  
20 encima de la capa de moco y el sistema inmune asociado al intestino (Viggiano d., *et al.* Eur. Rev. Med Pharmacol Sci 19 (2015) 1077–1085).

La agresión constante del epitelio por parte del contenido luminal supone una amenaza para su integridad si no existieran mecanismos que lo eviten. El epitelio  
25 intestinal se renueva cada 3-5 días a partir de células madre localizadas en las criptas intestinales, que continuamente se están dividiendo y que, a medida que migran a lo largo de las vellosidades (intestino delgado) o hacia la superficie (colon), se diferencian en enterocitos (intestino delgado) o colonocitos (colon), células productoras de moco (células goblet) y células enteroendocrinas que eventualmente mueren y se  
30 liberan a la luz del intestino (Sellers RS., *et al.* Toxicol Pathol 42 (2014) 67–81). En el intestino delgado hay una población adicional de células diferenciadas, las células de Paneth, que migran hacia el fondo de las criptas y son las productoras de la mayor parte de péptidos antimicrobianos. (Viggiano d., *et al.* Eur. Rev. Med Pharmacol Sci 19 (2015) 1077–1085). Una desregulación de la homeostasis epitelial (por ejemplo, un  
35 desequilibrio entre producción, diferenciación y eliminación celular) compromete la

integridad de la barrera intestinal y si no se re-establece provocará patologías intestinales como la inflamación y el cáncer (Viggiano d., *et al.* Eur. Rev. Med Pharmacol Sci 19 (2015) 1077–1085).

5 La enfermedad inflamatoria del intestino es un trastorno inflamatorio crónico del tracto intestinal padecido por millones de pacientes en todo el mundo y se compone de dos tipos de enfermedades principales: colitis ulcerosa (UC) y enfermedad de Crohn (CD). En ambas formas de inflamación, los microbios intestinales pueden iniciar la enfermedad en individuos genéticamente susceptibles.

10

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria del colon y del recto. Está caracterizada por la inflamación y ulceración de la pared interior del colon. Los síntomas típicos incluyen diarrea (algunas veces con sangre) y con frecuencia dolor abdominal. Su edad de presentación típica es antes de los primeros 40 años de vida; 15 sin embargo, se ha llegado a establecer el diagnóstico en personas de edad avanzada. El diagnóstico se establece realizando una endoscopia digestiva baja (rectoscopia o colonoscopia) que permite el examen de la mucosa del colon mediante una cámara. En el caso de la colitis ulcerosa, la mucosa se observa con evidentes signos inflamatorios como enrojecimiento mucoso, ulceraciones, presencia de moco y 20 material fibrinoide y los llamados pseudopólipos. Para su confirmación definitiva se deben tomar biopsias, que deben ser examinadas por un patólogo.

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria crónica con manifestaciones intermitentes que afectan principalmente al tracto gastrointestinal, en toda su extensión 25 («desde la boca hasta el ano»). Junto con la colitis ulcerosa forma parte de las llamadas enfermedades inflamatorias intestinales. El origen exacto de la enfermedad es desconocido, pero se han reconocido factores inmunológicos, microbiológicos, ambientales y genéticos que aumentan el riesgo de padecerla. La hipótesis más aceptada, en cuanto a la importancia de estos factores, señala que existe una 30 susceptibilidad individual determinada genéticamente, pero que se requieren la incidencia de factores ambientales para que se desarrolle la enfermedad. Entre ellos, la desregulación de la microbiota está cobrando cada vez mayor importancia. El diagnóstico de la enfermedad de Crohn se realiza con la sospecha clínica y los hallazgos radiológicos, endoscópicos e histológicos (biopsia) compatibles. La analítica 35 de sangre se altera en las fases agudas de la enfermedad con elevación de la

velocidad de sedimentación (VSG y de la proteína C reactiva), aumento de las cifras de glóbulos blancos y de plaquetas. Los estudios radiológicos (TAC, ecografía, tránsito intestinal) ponen de manifiesto las posibles complicaciones de estas entidades (abscesos, fístulas, estenosis). La gammagrafía con leucocitos marcados puede  
 5 permitir valorar la extensión de la inflamación. En el momento de la aparición de los síntomas, el médico debe diferenciar de otras enfermedades que pueden también cursar con brotes de diarrea, dolor abdominal con sangre y/o fiebre.

Existen biomarcadores para determinar la presencia de una patología intestinal y/o su  
 10 pronóstico. Las proteínas calprotectina, lactoferrina y S100A12 se utilizan como marcadores fecales de la inflamación intestinal (Galgut BJ., *et al.* Front Pediatr 19. 5-292. (2018) Review). Para la prognosis del cáncer colorectal actualmente se utiliza la presencia en heces de sangre oculta y de la proteína vimentina y de las proteínas CEA (antígeno carcinoembrionario) y CA19-9 (antígeno de carbohidrato 19-9) en sangre,  
 15 entre otras (González-Pons M., *et al.* Biomed Res Int. (2015) 149014. Review). Se han propuesto diferentes proteínas como biomarcadores de la progresión de la patología intestinal (Rubio CA., *et al.* Anticancer Res 35 (7). (2015):4139-44; Gerecke C., *et al.* J Cancer Res Clin Oncol. 141(2015) 2097-107; Altobelli E., *et al.* Oncol Rep. 38(1) (2017) 418-426), pero la correlación de la expresión de las proteínas estudiadas con el  
 20 grado de gravedad de la lesión no es buena y los métodos propuestos para su detección no son eficaces.

La detección de enfermedades intestinales, más particularmente de las inflamatorias y la tumorogénesis, basándose en analíticas de sangre, biopsias, endoscopias o  
 25 estudios radiológicos es limitante para una detección precoz y fiable. Adicionalmente, uno de los motivos para la aparición de tumorogénesis es un proceso inflamatorio crónico prolongado en el tiempo, debido a que los mecanismos reparadores activados para contrarrestar la lesión ocasionada por la inflamación se vuelven ineficaces y el tejido comienza a proliferar sin control.

30 Por tanto, se hace necesario proporcionar nuevos biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y la monitorización de la transición desde una enfermedad inflamatoria intestinal hasta la tumorogénesis de manera efectiva y rápida. El tiempo y un diagnóstico correcto para la elección eficaz del tratamiento son determinantes para  
 35 evitar el agravamiento de la patología, que de lo contrario, podría llegar a ser

irreversible.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 En la presente invención se ha demostrado el uso de los niveles de expresión de reelina como biomarcador de diagnóstico, pronóstico y/o monitorización de patologías intestinales.

10 La reelina es una proteína de la matriz extracelular conocida desde hace unos 70 años por su función en el desarrollo del sistema nervioso central. El estudio de la expresión y función de la reelina en tejidos periféricos ha sido, hasta ahora, escasamente abordado.

15 Los inventores han demostrado que, en respuesta a un daño tisular como la inflamación, el intestino aumenta la expresión de reelina para reforzar la barrera intestinal y facilitar la reparación tisular. Si la inflamación progresa, se establecen las condiciones que reducen o suprimen la expresión de reelina, donde dicha ausencia favorece la formación de un microambiente desfavorable que agravaría la inflamación y/o induciría la tumorigénesis.

20 En muestras de tejido humano procedentes de biopsias o resecciones de colon enfermo procedente de pacientes con colitis ulcerosa, con pólipos no adenomatosos, con adenomas o con adenocarcinomas, y de colon sano, los inventores determinaron los niveles de expresión de reelina mediante aislamiento de ARN de las muestras, retrotranscripción y posterior PCR (*Reacción en Cadena de la Polimerasa*). Así, los  
25 inventores observaron que la expresión del ARN mensajero (*ARNm*) de la reelina aumenta más de 5 veces, respecto al control sano, en estados de inflamación intestinal, disminuyendo progresivamente conforme va avanzando la gravedad de la enfermedad, siendo el nivel de expresión del ARN mensajero en adenocarcinomas  
30 más de 5 veces inferior al control sano.

Por lo tanto, la reelina puede ser utilizada como un único biomarcador en el diagnóstico e identificación de diferentes patologías intestinales, y como biomarcador de la transición desde una enfermedad inflamatoria intestinal hasta la tumorigénesis.

35

A la vista de lo anterior, en un aspecto, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para determinar el pronóstico de una enfermedad intestinal en un sujeto, de aquí en adelante “primer método de la invención” o “método de pronóstico de la invención”, que comprende

5 a) cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica la reelina en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, y

b) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con un nivel de referencia,

de manera que unos niveles de expresión del gen que codifica la reelina mayores que el de referencia, indican que la enfermedad intestinal es leve y el pronóstico es bueno, 10 mientras que unos niveles de expresión del gen que codifica la reelina menores que el de referencia indican que la enfermedad intestinal es grave y el pronóstico es malo.

En la presente invención se entiende por “determinar el pronóstico” a determinar la 15 probabilidad de que un paciente tenga un resultado clínico concreto, ya sea bueno/positivo/leve o malo/negativo/grave, es decir, a una anticipación del progreso de una enfermedad, por ejemplo, la probabilidad, la duración y/o la extensión de la recuperación. Tal como se usa en el presente documento, los términos “predicción” y “pronóstico” son equivalentes. El método de pronóstico de la invención puede ser 20 utilizado clínicamente para tomar decisiones sobre la elección del tratamiento más adecuado para cada paciente en particular. En general, el término pronóstico “bueno” abarca la anticipación de una recuperación parcial o completa y el no empeoramiento de la patología intestinal dentro de un periodo de tiempo dado. Por el contrario, un pronóstico “malo” abarca la anticipación de una recuperación deficiente y/o 25 recuperación insatisfactoriamente lenta, o sustancialmente la no recuperación.

El método de pronóstico de la presente invención es aplicable a enfermedades intestinales. En la presente invención se entiende por “enfermedades intestinales”, o “patología intestinal”, a aquellas enfermedades que afectan al intestino, tanto al 30 intestino grueso como al delgado o cualquiera de sus partes (colon, recto, íleon, duodeno y/o yeyuno), e impide que éste desempeñe su función de forma correcta. El término “intestino delgado” se refiere a la porción del tubo digestivo que se inicia en el estómago y llega hasta el colon. Es el más largo y en él se lleva a cabo la parte final de la digestión y la absorción de las sustancias nutritivas de los alimentos. Tiene 35 vellosidades intestinales para aumentar el número de células epiteliales, y

microvellosidades para aumentar la superficie de contacto entre las sustancias nutritivas y las células del epitelio intestinal, que son las encargadas de absorberlas. El término “colon”, se refiere a la parte de intestino grueso que tiene forma de U invertida y que, en la cavidad abdominal, está situado por delante del intestino delgado. Al igual que el intestino delgado, el colon contiene microorganismos (bacterias, virus y hongos) que constituyen la flora intestinal, mucho más abundante en el colon que en el intestino delgado. Esta flora fermenta los residuos alimenticios que no son digeridos por nuestro intestino, obteniendo de ellos sustancias aprovechables por el ser humano. Además, a lo largo del intestino se absorbe una gran cantidad de agua y la que se absorbe en el colon hace que los residuos de los que no se pueden obtener sustancias nutritivas queden deshidratados formando heces, que se acumulan y se evacuan finalizando el proceso de la digestión. Ejemplos de enfermedades intestinales incluyen, pero no se limitan a, las enfermedades inflamatorias, las enfermedades carcinogénicas, la constipación, la enfermedad diverticular, los pólipos, los adenomas, el síndrome del intestino irritable y las úlceras. En una realización particular del método de pronóstico de la invención, la enfermedad intestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal, pólipos intestinales, un adenoma o un adenocarcinoma intestinal.

En la presente invención, el término “enfermedad inflamatoria intestinal” (EII) se refiere a enfermedades que afectan al intestino y que se caracterizan por producir una inflamación crónica. Ejemplos de enfermedades inflamatorias intestinales incluyen, sin limitar, a diarreas, peritonitis, colitis ulcerosa, síndrome del colon irritable y la enfermedad de Crohn. En una realización particular del método de pronóstico de la invención, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

Tal como se usa en la presente invención, el término “pólipo intestinal” o “pólipo no adenomatoso” se refiere a una masa benigna en el revestimiento del colon o del recto, por lo que no evoluciona a cáncer ni se disemina.

En la presente invención se entiende por “pólipo adenomatoso” o “adenoma” a la proliferación no invasiva de células epiteliales. Se trata de una masa maligna en el revestimiento del colon o del recto que, aun siendo no invasiva, puede evolucionar a cáncer y, eventualmente, diseminarse. Dentro del término “adenoma” se incluyen, sin

limitarse, a un adenoma tubular (sobresale en el lumen del colon), un adenoma tubulovelloso y adenoma vellosos.

5 En el contexto de la presente invención, el término “adenocarcinoma” se refiere a aquella enfermedad carcinogénica que empieza en las células glandulares del intestino o en las criptas. El término “enfermedades carcinogénicas” o “cáncer” se refiere a la enfermedad que se produce como consecuencia de un proceso descontrolado en la división celular del cuerpo, generando una masa anormal (tumor) de tejido cuyo crecimiento excede el de los tejidos normales, está descoordinado, y  
10 que persiste del mismo modo excesivo aún después de finalizar el estímulo que le dio origen. Ejemplos de adenocarcinomas incluyen, sin limitar, a tumores carcinoides, cáncer colorrectal y cáncer gastrointestinal

Tal como se usa en la presente invención, el término “sujeto” o “individuo” se refiere a  
15 cualquier animal que tenga aparato digestivo, en concreto, intestino. El sujeto puede ser un animal invertebrado o vertebrado. Ejemplo de animales invertebrados incluyen, sin limitar a, los artrópodos tales como insectos y crustáceos. Ejemplos de animales vertebrados incluyen, sin limitar a, peces, aves, anfibios, reptiles y mamíferos. Ejemplos de mamíferos incluyen, sin limitar a, animales de granja (tales como  
20 caballos, cerdos, conejos, ovejas, cabras, vacas, etc.), animales de compañía (tales como perros, gatos, cobayas, ratas, ratones, etc.), primates no humanos, y humanos. El término no indica una edad o sexo particular. En una realización particular, el sujeto del método de pronóstico de la invención es un mamífero, preferiblemente un primate, más preferiblemente, un ser humano de cualquier raza, sexo o edad.

25

En una primera etapa, el método de pronóstico de la invención comprende cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica la reelina en una muestra biológica aislada de dicho sujeto.

30 La reelina (o proteína RELN, RL o PRO1598) es una proteína de señalización extracelular que interviene en la regulación de los procesos de migración neuronal y posicionamiento en el desarrollo del cerebro, pero que continúa trabajando en el cerebro ya desarrollado modulando la plasticidad sináptica y mejorando la inducción y el mantenimiento de la memoria a largo plazo. En el ser humano, el gen que codifica la  
35 reelina se encuentra en cromosoma 7q22 y presenta la secuencia de nucleótidos SEQ

ID NO: 1 (NCBI Reference Sequence NM\_005045 versión NM\_005045.2). En la presente invención, dentro del término "reelina" están contemplados todas aquellas variantes de la reelina que, aun teniendo diferentes secuencias de nucleótidos debido a mutaciones neutras de los nucleótidos (sustituciones conservativas), desempeñan la misma función que la reelina en el ser humano. Así, en una realización particular de la invención, el gen que codifica la reelina comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % con la secuencia SEQ ID NO: 1. El grado de identidad se determina usando algoritmos y procedimientos informáticos que son ampliamente conocidos para el experto en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos/nucleótidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP/BLASTN [BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, Md.20894, Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]. En otra realización más particular, la reelina comprende una secuencia de nucleótidos con un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1. Dentro del contexto de la presente invención, también se encuentran aquellos fragmentos de la secuencia de nucleótidos del gen de la reelina que, aun careciendo de parte de los extremos 5' o 3', son capaces de desempeñar su función.

Como entiende el experto en la materia, los niveles de expresión del gen que codifica la reelina se pueden determinar midiendo los niveles del ARNm que codifica la reelina o midiendo los niveles de la proteína reelina. Para ello, primero es necesario aislar el ARNm o la proteína de la muestra biológica aislada del sujeto.

El término "muestra biológica", como se usa en la presente invención, se refiere a toda muestra obtenida o procedente de un individuo que comprende el ácido nucleico, es decir, el material genético de los organismos vivos que controla la herencia y se localiza en el núcleo de las células. Ejemplos de muestras biológicas incluyen, sin limitar, a biopsia, tejido, heces sólidas y biofluidos, tales como orina, heces, suero, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), lágrimas, moco, sudor, leche, extractos de cerebro y similares. En una realización particular del método de pronóstico de la invención, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, biopsia y orina. Dicha muestra se puede obtener mediante métodos convencionales, entre los que se incluyen, sin limitar a, partición de un tumor en trozos, o microdissección u otros métodos de separación de células conocidos en la

técnica. Las células se pueden obtener de forma adicional mediante citología por aspiración con una aguja fina. Para simplificar la conservación y el manejo de las muestras, estas se pueden fijar en formalina y embeber en parafina o congelar primero y después embeber en un medio criosolidificable, mediante inmersión en un medio  
5 altamente criogénico que permite la congelación rápida.

Una vez obtenida la muestra biológica se trata para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o célula para así liberar los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica y preparar los ácidos nucleicos para  
10 análisis adicionales. La degradación del ARNm durante el proceso de extracción se evita, por ejemplo, con una combinación de desnaturalizantes e inhibidores de ARNasas presentes en la solución acuosa u orgánica donde se rompen las células y tejidos y en la posterior separación del ARNm.

15 En una forma de realización particular, se puede aislar el ARNm obtenido de una muestra de tejido fijada en formalina y embebida en parafina. El ARNm se puede aislar de una muestra patológica de archivo o una muestra de biopsia que primero se desparafiniza. Un método de desparafinización de ejemplo implica lavar la muestra en parafina con un solvente orgánico, tal como xileno. Las muestras desparafinizadas se  
20 pueden rehidratar con soluciones de alcoholes de concentración decreciente. Los alcoholes adecuados, incluyen, por ejemplo; metanol, etanol, propanoles, y butanoles. La muestra rehidratada se lisa después y se extrae el ARNm de la muestra.

Una vez aislado el ARNm de la muestra biológica, se determina el nivel de expresión  
25 del gen de interés con técnicas que son ampliamente conocidas por un experto en la materia. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de métodos que pueden ser empleados para determinar los niveles de expresión incluyen métodos basados en hibridación, como análisis por Northern-blot e hibridación in situ, PCR cuantitativa (*qPCR*), PCR con transcripción reversa o retrotranscripción (*RT-PCR*), detección de moléculas  
30 individuales, métodos de citometría de flujo a base de perlas, análisis en serie de la expresión génica, microarrays de expresión o TaqMan y ensayos que usan matrices de ácidos nucleicos.

Mientras que todas las técnicas de determinación del perfil de expresión génica son  
35 adecuadas para determinar el nivel de expresión de reelina de la presente invención,

los niveles de expresión se determinan particularmente mediante PCR con transcripción reversa cuantitativa en tiempo real (*qRT-PCR*), donde el procedimiento se basa en la retrotranscripción de ARN a ADN codificante (ADNc) y posterior amplificación del ADNc mediante una PCR cuantitativa, usando ciclos térmicos y una  
5 ADN polimerasa termoestable.

Para la determinación del nivel de expresión mediante *qRT-PCR* es necesario el empleo de sondas o cebadores. Una sonda o cebador es un oligonucleótido de secuencia definida capaz de hibridar de forma específica con una secuencia  
10 complementaria de un ácido nucleico, por lo que puede utilizarse para detectar e identificar secuencias complementarias o sustancialmente complementarias en ácidos nucleicos. La longitud de la sonda de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, aunque, por razones prácticas, se prefieren sondas de longitud pequeña de no más de 30 nucleótidos, preferiblemente de no más de 25 nucleótidos y más  
15 preferiblemente de no más de 20 nucleótidos. Adicionalmente, los oligonucleótidos empleados pueden contener enlaces modificados tales como enlaces tipo fosfodiéster, fosfotriéster, fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforoamidato, metilfosfonato, boranofosfonato, así como combinaciones de los mismos o bien son péptidos ácidos nucleicos (*peptide nucleic acids, PNA*), en los que los distintos nucleótidos están unidos por enlaces amida. El  
20 empleo de sondas de mayor o menor longitud no afectaría a la sensibilidad o especificidad de la técnica, pero podría precisar de la realización de una serie de modificaciones de las condiciones sobre las que se realiza la misma al variar la temperatura de fusión de las mismas y su contenido en GC, lo cual afectaría a la  
25 temperatura y tiempo de hibridación fundamentalmente.

En una realización preferida, los cebadores específicos para la reelina son cebador sentido: 5'-CCACGAGAACTGATTACCAC-3' (SEQ ID NO: 2) y cebador antisentido:  
30 5'-ATTGTGCTGACATTGGAAGG-3' (SEQ ID NO: 3).

Para la cuantificación del nivel de expresión de la reelina mediante *qRT-PCR*, es necesario un método comparativo con un estándar interno, por ejemplo, con el nivel de ARN mensajero de un gen de mantenimiento o "*housekeeping*", presente en la misma muestra, a modo de gen de control o gen normalizador. Preferiblemente, el gen  
35 normalizador es un gen cuyo nivel de expresión no cambia en una célula, tal como un

gen de mantenimiento que codifica una proteína que se expresa de forma constitutiva y que lleva a cabo funciones celulares esenciales. Genes de mantenimiento adecuados para su uso como estándares internos incluyen, aunque no se limitan, a miosina,  $\beta$ -2-microglobulina, ubiquitina, proteína ribosómica de 18S, ciclofilina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y  $\beta$ -actina. Alternativamente, puede tomarse como normalizador un ARN incluyendo, sin limitación, el snRNA U6 o el snRNA RNU48. En una realización preferida, el ARN control es el ARNm de la  $\beta$ -actina.

En dicho método comparativo, el nivel de expresión de la reelina se determina con el cálculo de número de ciclos necesarios para alcanzar un nivel umbral de fluorescencia ( $C_t$ ) mediante la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\text{Donde } \Delta\Delta C_t \text{ es } = (C_t_{\text{muestra patológica}} - C_t_{\text{control sano}})$$

En una realización más preferida, se relativizó dicho método comparativo con un estándar interno, que preferiblemente es la  $\beta$ -actina, mediante la fórmula:

$$\Delta\Delta C_t = [(C_t_{\text{reelina}} - C_t_{\beta\text{-actina}})_{\text{muestra patológica}} - (C_t_{\text{reelina}} - C_t_{\beta\text{-actina}})_{\text{control sano}}]$$

Tal como se ha explicado anteriormente, los niveles de expresión del gen que codifica la reelina también pueden determinarse midiendo la cantidad de proteína presente en la muestra. Así, en una realización particular, los niveles de expresión del gen que codifica la reelina se determinan midiendo los niveles de expresión de la proteína codificada por el gen de reelina, es decir, la proteína RELN.

En una realización particular de la invención, la proteína RELN comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % con la secuencia SEQ ID NO: 7. En otra realización más particular, la proteína RELN comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7. Como se ha indicado anteriormente, la identidad entre dos secuencias de aminoácidos/nucleótidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP/BLASTN [BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, Md.20894, Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)].

La determinación de los niveles de expresión de las proteínas se puede realizar mediante técnicas inmunológicas tales como, por ejemplo, ELISA, inmunohistoquímica o western-blot. La técnica de western-blot se basa en la detección de proteínas,  
5 previamente separadas mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes e inmovilizadas en una membrana (generalmente nitrocelulosa), mediante incubación con un anticuerpo específico y un sistema de revelado (por ejemplo, quimioluminiscencia). El análisis mediante inmunohistoquímica requiere el uso de un anticuerpo específico para la proteína diana para el análisis de la expresión.  
10 El análisis mediante ELISA está basado en el uso de antígenos y anticuerpos marcados con enzimas, de modo que los conjugados formados entre el antígeno diana y el anticuerpo marcado dan como resultado la formación de complejos enzimáticamente activos. Puesto que uno de los componentes (el antígeno o el anticuerpo marcado) está inmovilizado sobre un soporte, también lo están los  
15 complejos antígeno-anticuerpo y se pueden detectar mediante la adición de un sustrato que es convertido por la enzima en un producto que es detectable mediante, por ejemplo, espectrofotometría o fluorometría.

Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o  
20 reactivo que se une a las proteínas diana con alta afinidad para detectar la cantidad de proteínas diana. Sin embargo, se prefiere el uso de un anticuerpo, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. Por otra parte, la determinación de los niveles de expresión  
25 de proteínas se puede llevar a cabo construyendo una micromatriz de tejidos (TMA) que contenga las muestras ensambladas de los sujetos, y determinar los niveles de expresión de las proteínas mediante técnicas de inmunohistoquímica, conocidas en el estado de la técnica.

30 Una vez determinados los niveles de expresión, éstos tienen que ser correlacionados con un nivel de referencia. Los términos "correlacionar" o "correlación" o equivalentes de los mismos se refieren a una asociación entre expresión de un gen y otro suceso, tal como, pero no se limita a, fenotipo o característica fisiológica, tal como tipo de tumor.

35

Así, el método de pronóstico de la invención comprende una etapa (b) que comprende comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con un nivel de referencia.

5 El término "nivel de referencia" se refiere a un criterio predeterminado utilizado como referencia para evaluar los valores o datos obtenidos de las muestras recopiladas de un sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior o inferior, un rango de valores, un valor promedio, un valor de mediana, un valor medio o un valor en comparación con un control particular o valor de referencia. El valor de referencia puede basarse en un  
10 valor de muestra individual, como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se está evaluando, pero en un momento anterior. También, el valor de referencia se puede basar en un gran número de muestras, como la población de sujetos del grupo de edad cronológica, o en un grupo de muestras que incluyen o excluyen la muestra a analizar.

15

En la presente invención, el nivel de referencia es el nivel de expresión de reelina en tejido de intestino sano. Más preferiblemente, a dicho nivel de expresión de reelina se le otorga el valor absoluto de uno para evaluar y comparar los valores o datos obtenidos de las muestras de sujetos enfermos, dando como resultado incremento o  
20 disminución en número de veces con respecto al valor de referencia.

A partir de la correlación entre el nivel de expresión del gen que codifica la reelina y el nivel de referencia, se puede concluir que:

- unos niveles de expresión del gen que codifica la reelina mayores que el nivel de  
25 referencia, indican que la enfermedad intestinal es leve y el pronóstico es bueno, mientras que
- unos niveles de expresión del gen que codifica la reelina menores que el nivel de referencia indican que la enfermedad intestinal es grave y el pronóstico es malo.

30 La expresión "unos niveles de expresión mayores con respecto a un valor de referencia" se refiere a cualquier variación estadísticamente significativa del nivel de expresión de un gen por encima de su correspondiente nivel de referencia, en particular, a cualquier variación del nivel de expresión de la reelina por encima del nivel de expresión en un control sano.

35

La expresión “unos niveles de expresión menores con respecto a un valor de referencia” se refiere a cualquier variación estadísticamente significativa del nivel de expresión de un gen por debajo de su correspondiente nivel de referencia, en particular, a cualquier variación del nivel de expresión de la reelina por debajo del nivel de expresión en un control sano.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad intestinal en un sujeto, de aquí en adelante “método de diagnóstico de la invención” o “segundo método de la invención”, que comprende

- 10 a) cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica la reelina en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, y
- b) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con un nivel de referencia, en el que:

- 15 - si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son 5 veces mayores o iguales que el nivel de referencia, entonces el individuo padece una enfermedad intestinal inflamatoria,
- si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son hasta 5 veces mayores que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un pólipo intestinal,
- 20 - si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son hasta 5 veces menores que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un adenoma, o
- si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son, al menos, 5 veces menores o iguales que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un adenocarcinoma.

Los términos “enfermedad intestinal” y “sujeto”, así como sus correspondientes realizaciones particulares, han sido definidos y explicados en el anterior aspecto inventivo y son aplicables al método de diagnóstico de la invención.

30 Así, en una realización particular del método de diagnóstico de la invención, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un primate, más preferiblemente, un humano.

En la presente invención se entiende por “diagnóstico” o “diagnosticar” al proceso o acto de reconocer, decidir o concluir sobre una enfermedad o afección en un sujeto,

basándose en los síntomas, signos y/o resultados de diferentes variables, tales como, por ejemplo, conocer la presencia, ausencia y/o cantidad de uno o más biomarcadores característicos de la enfermedad o afección que se va a diagnosticar. En la presente invención, el “diagnóstico de enfermedades intestinales” en un sujeto puede significar, en particular, que el sujeto sufre o padece una enfermedad intestinal.

El método de diagnóstico de la invención comprende dos etapas:

- a) cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica la reelina en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, y
- b) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con un nivel de referencia.

La puesta en práctica de estas etapas, así como sus realizaciones particulares y términos empleados, han sido explicados anteriormente para el método de pronóstico de la invención, e igualmente son aplicables al método de diagnóstico de la invención.

Así, realizaciones particulares del método de diagnóstico de la invención, incluyen, sin limitarse a:

- el gen que codifica la reelina comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 % con la secuencia SEQ ID NO: 1, y/o
- la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la reelina comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen ó del ADN codificante (ADNc) de dicho gen, preferiblemente, dicha cuantificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa, hibridación *in situ*, o mediante un array de ADN o ARN, y/o
- la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la reelina comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dicho gen, preferiblemente, dicha cuantificación se realiza mediante western blot, ELISA o un array de proteínas, y/o
- la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, biopsia, orina.

Una vez llevados a cabo las etapas (a) y (b) del método de diagnóstico de la

invención, se puede concluir que:

- 5 - si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son 5 veces mayores o iguales que el nivel de referencia, entonces el individuo padece una enfermedad intestinal inflamatoria,
- si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son hasta 5 veces mayores que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un pólipo intestinal,
- 10 - si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son hasta 5 veces menores que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un adenoma, o
- si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son, al menos, 5 veces menores o iguales que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un adenocarcinoma.

15 En una realización más particular,

- si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son 7 veces mayores o iguales que el nivel de referencia, entonces el individuo padece una enfermedad intestinal inflamatoria,
- 20 - si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son hasta 3 veces mayores que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un pólipo intestinal,
- si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son hasta 4 veces menores que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un adenoma, o
- 25 - si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son, al menos, 7 veces menores o iguales que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un adenocarcinoma,

en donde los valores intermedios son estados transicionales entre las enfermedades que pueden corroborar con análisis anatómo-patológicos.

30

La puesta en práctica del primer y segundo métodos de la invención comprende el uso de un conjunto de reactivos que pueden estar comprendidos dentro de un kit.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un kit que  
35 comprende los reactivos necesarios para determinar los niveles de expresión del gen

que codifica la reelina, de aquí en adelante “kit de la invención”, en donde dichos reactivos comprenden:

- una pareja de cebadores que hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la reelina, y/o
- 5 - una sonda que hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la reelina, y/o
- uno o varios anticuerpos que reconocen de forma específica la proteína codificada por el gen que codifica la reelina.

- 10 En la presente invención se entiende por “kit” como un producto que comprende los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención adaptado para permitir el transporte y almacenamiento de dichos reactivos. Los materiales adecuados para el embalaje de los componentes del kit pueden ser de plástico (tales como polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), de cristal, y
- 15 pueden comprender botellas, frascos, sobres, etc. Además, el kit de la invención puede contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separado de los diferentes componentes que se encuentran en el kit. Dichas instrucciones pueden ser en forma de material impreso, o en forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones, tales como los discos de almacenamiento (discos
- 20 magnéticos), métodos ópticos (CD-ROM, DVD, etc.) y similares.

La expresión “reactivos necesarios para determinar los niveles de expresión de un gen” significa un compuesto o grupo de compuestos que permiten determinar el nivel de expresión de un gen, tanto por medio de la determinación del nivel de ARNm del

25 gen que codifica la reelina, como por medio de la determinación del nivel de proteína.

En una realización particular del kit de la invención, la pareja de cebadores comprende las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

- 30 En otra realización particular, el gen que codifica la reelina comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 % con la secuencia SEQ ID NO: 1.

Una vez que los reactivos están comprendidos dentro del kit, éste puede emplearse

35 para poner en práctica el primer y segundo métodos de la invención.

Así, en un aspecto, la presente invención se relaciona con el uso *in vitro* del kit de la invención para determinar el pronóstico de una enfermedad intestinal en un sujeto.

- 5 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso *in vitro* del kit de la invención para diagnosticar una enfermedad intestinal en un sujeto.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso *in vitro* del kit de la invención para la puesta en práctica del método de pronóstico de la invención o el  
10 método de diagnóstico de la invención.

Los términos “pronóstico”, “diagnóstico”, “sujeto” y “enfermedad intestinal” han sido definidos previamente en la presente descripción y son aplicables a los presentes aspectos inventivos. Igualmente, las diferentes realizaciones particulares descritas  
15 para aspectos inventivos anteriores también son aplicables a los presentes aspectos inventivos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o  
20 pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La figura 1 describe las variaciones relativas de los niveles de expresión de ARNm de reelina durante la progresión del cáncer de colon humano desde la inflamación intestinal comparado con un colon sano como control. Los valores representan el n° de  
30 veces que cambia la expresión en cada patología en relación al colon sano. Medias  $\pm$  EEM (n=9). t de Student: \*p<0,05; \*\*p<0,01, patología vs. colon sano. El ANOVA reveló un efecto de la progresión de la enfermedad sobre la expresión de reelina (p<0,001). Test de Newman-Keuls: # p<0,01 patología vs. colitis ulcerosa.

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

5

### I. MATERIAL Y MÉTODOS

#### *Muestras de tejido humano*

10 Se utilizaron muestras de tejido humano procedente de biopsias o resecciones de colon de pacientes: i) con colitis ulcerosa, ii) pólipos no adenomatosos, iii) adenomas y iv) adenocarcinomas y v) de regiones del colon alejadas del tumor (colon sano). Las muestras estaban incluidas en parafina y se emplearon secciones de 10 µm de grosor. Fueron cedidas por el Biobanco del Servicio Sanitario Público de Andalucía. Se  
15 utilizaron muestras de 9 pacientes (hombres y mujeres) de cada patología, con edades comprendidas entre 25 y 65 años en el caso de las de colitis ulcerosa y entre 45 y 80 años en las demás. El estudio histopatológico, para confirmar el diagnóstico de las diferentes patologías y su ausencia en colon sano (control), se realizó en el Hospital Universitario Virgen del Rocío. El estudio que aquí se presenta fue aprobado por el  
20 Comité Ético del Hospital Virgen del Rocío y los pacientes firmaron un consentimiento informado.

#### *Aislamiento de ARN de las muestras biológicas*

25 Para extraer el ARN total se utilizaron entre 2 y 5 secciones (dependiendo de su tamaño) de cada tipo de muestra, previamente desparafinadas. Para la desparafinización las secciones se incubaron en xilol pre-calentado a 60°C durante 15 min y después se pasaron a microtubos para su lavado primero dos veces con xilol y después dos veces con etanol (96-100%), de esta forma se mejoró el rendimiento del  
30 aislamiento.

Tras este primer paso de desparafinado se continuó con el protocolo del fabricante del kit comercial "FFPE RNeasy" (Quiagen, nº catálogo 73504) para la extracción del ARN. Una vez aislado el ARN total se determinó su pureza, concentración e integridad  
35 mediante: i) la relación de absorbancias medidas, mediante espectrofotometría

(“nanodrop”), a las longitudes de onda de 260 nm (A260 ) y 280 nm (A280) (relación A260/A280); considerándose aceptable con un valor de esta relación mayor o igual a 1,8; ii) realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1% y utilizando la solución de tinción de ácidos nucleicos “RedSafe” (Intron Biotechnology, nº catálogo 21141),  
5 que permite la visualización de las bandas de ARN ribosómico 28S y 18S, que deben aparecer en una proporción aproximada 2:1; y iii) comprobando la presencia de ADN genómico cuya presencia se detectaría en la parte superior del gel.

#### *Retro-transcripción (RT)*

10

En la retro-transcripción o transcripción reversa (conversión del ARN en ADN codificante, ADNc) se utilizó el kit comercial “QuantiTect Reverse Transcription” (Quiagen, nº catálogo 205311) y se siguieron las instrucciones del fabricante. En este protocolo, primero se eliminó el posible ADN genómico presente en la muestra  
15 mediante un tratamiento con enzimas desoxirribonucleasas (DNAsas) y después se realizó la retro-transcripción propiamente dicha con la enzima transcriptasa reversa del kit. Brevemente, tras incubar 1 µg del ARN con 2 µL de la solución de DNAsas del kit a 42°C durante 2 minutos, se realizó la retro-transcripción incubando el ARN con 1 µL de la enzima transcriptasa reversa, 1 µL de la mezcla de cebadores del kit y 4 µL de la  
20 solución de reacción del kit a 42°C durante 15 minutos, seguido de una incubación a 95°C durante 3 minutos para inactivar a la enzima.

#### *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real*

25

Para la reacción de amplificación por PCR en tiempo real se utilizó: 1 µL del ADNc obtenido de cada muestra, 1 µL de cebadores específicos para la reelina (Gene bank ID: NM\_005045, versión NM\_005045.2); sentido: 5’CCACGAGAACTGATTACCAC3’ [SEQ ID NO: 2] y antisentido: 5’ATTGTGCTGACATTGGAAGG3’ [SEQ ID NO: 3]), 10 µL de la enzima “SsoFast EvaGreen Supermix” (BioRad, nº catálogo 1725200) y se  
30 completó con agua destilada estéril para un volumen final de 20 µL. La concentración final de los cebadores en la reacción fue de 0,4 µM. Para normalizar los valores de ARN mensajero (ARNm) de las diferentes muestras se utilizó como gen de referencia la β-actina con secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4 (Gene bank ID: NM\_007393.3) y los cebadores: sentido 5’ACCCACACTGTGCCCATCTA3’ [SEQ ID NO: 5] y  
35 antisentido: 5’CGGAACCGCTCATTGCC3’ [SEQ ID NO: 6], previamente validado en

nuestro laboratorio.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador MiniOpticon™ (Bio-Rad) según el siguiente protocolo: una primera etapa de desnaturalización del ADNc de 3 minutos a 95°C; posteriormente, treinta y cinco ciclos que comprendían: 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 58°C y 40 segundos a 72°C y, por último, una etapa de elongación de 3 minutos a 72°C. La obtención de un único producto en la PCR se confirmó por la aparición de un único pico en el análisis de las curvas de disociación. Éstas se obtuvieron calentando la muestra desde los 65°C hasta los 95°C a intervalos de 1°C y monitorizando la fluorescencia. Esta curva representa la temperatura a la que las cadenas de ADN se separan o la temperatura de fusión frente a la fluorescencia emitida por el producto de la PCR. La temperatura de fusión es específica para cada fragmento de ADN amplificado.

La reacción de PCR se hizo por triplicado para cada ADNc y para cada pareja de cebadores y se incluyó un control que no tenía ADNc. La reacción de PCR se consideró válida cuando la eficiencia de la misma estaba comprendida entre el 90 y el 110%.

En cada muestra se determinó el número de ciclos necesarios para alcanzar un nivel de fluorescencia umbral (Ct). Los resultados se analizaron con el método 2-Delta-Delta-Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) en una hoja de cálculo "Gene Expression Macro" proporcionada por BioRad. Mediante este método, el valor de Ct obtenido para el gen reelina en cada una de las muestras se normalizó con el obtenido para el gen de referencia  $\beta$ -actina, y después se relativizaron frente al valor de la condición control (en nuestro caso el colon sano).

La fórmula matemática que utiliza este método para obtener los valores de expresión de ARNm de reelina en cada patología respecto al valor del colon sano es:

30

Valores de expresión del ARNm relativizados =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

donde:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct_{\text{reelina}} - Ct_{\beta\text{-actina}})_{\text{patología}} - (Ct_{\text{reelina}} - Ct_{\beta\text{-actina}})_{\text{colon sano}}]$$

35 Los resultados representan el número de veces que cambiaba la abundancia del

ARNm de reelina en cada patología respecto al colon sano:

*Presentación de resultados y análisis estadístico*

5 Los resultados se presentan como la media acompañada de su error estándar (EEM). Se utilizaron 9 muestras de cada patología y 9 muestras de colon sano (45 muestras) que corresponde con el número de experimentos independientes (n=9). La comparación entre los distintos grupos experimentales (datos pareados) se realizó estadísticamente mediante el test de la “t de Student”. Para comparaciones múltiples se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, seguido del test de Newman-Keuls. En todos los test las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa informático “GraphPad Prism 6”.

15 II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cáncer de colon se desarrolla siguiendo una secuencia que va desde la aparición de inflamación o lesiones precancerosas al desarrollo de adenocarcinomas de colon. Resultados de nuestro grupo de investigación realizados en ratón mostraron que durante la colitis aguda se producía un aumento en la expresión de reelina, lo que sugería la participación de la reelina en la reparación y/o regeneración de los tejidos dañados en dicha patología. Sin embargo, en el adenocarcinoma de colon de ratón observamos una disminución en la expresión de reelina. Además, la ausencia de reelina aumentaba la susceptibilidad de los ratones al desarrollo de la inflamación y el cáncer. En conjunto, los resultados sugerían que, si bien la reelina aumenta en la inflamación como mecanismo de defensa frente a la lesión tisular, el cáncer reprime su expresión, eliminando así un mecanismo de defensa. Por ello nos planteamos determinar en humanos en qué etapa de la transición desde la enfermedad inflamatoria intestinal al cáncer de colon se reprime la expresión de reelina y, por tanto, uno de los mecanismos de defensa.

Para ello se evaluaron los cambios en el grado de expresión del gen reelina en la transición de la enfermedad inflamatoria y la progresión hacia el desarrollo del cáncer de colon, midiendo la abundancia del ARNm de la reelina en muestras humanas de colon sano (regiones alejadas de los adenocarcinomas), de colon de pacientes con

colitis ulcerosa, pólipos, adenomas y adenocarcinomas.

La figura 1 muestra el número de veces que cambia la abundancia de ARNm de reelina en cada patología respecto al colon sano. Los resultados revelan que, con respecto al colon sano, dicha abundancia aumenta como 10 veces en las muestras de colitis ulcerosa ( $10,15 \pm 3,39$  veces), ligeramente en los pólipos ( $2,78 \pm 0,30$  veces) y disminuye progresivamente conforme avanza la gravedad de la enfermedad en los adenomas ( $-2,96 \pm 1,04$  veces) y adenocarcinomas ( $-12,74 \pm 5,29$  veces).

En la tabla 1 se muestran los valores de referencia del número de veces que cambia la expresión del ARNm de reelina para diagnosticar cada patología. Por tanto, un aumento de la expresión de reelina de más de 7 veces indicaría que se trata de una muestra con un proceso inflamatorio; si el aumento es de hasta 3 veces, nos encontramos con un pólipo no adenomatoso; si disminuye con respecto al colon sano, indicaría un proceso carcinogénico; si la disminución es de hasta 4 veces, sería clasificado como un adenoma de bajo grado de displasia, y si es mayor de 7 veces indicaría un adenocarcinoma. Valores intermedios podrían ser estados transicionales que se pueden corroborar con los análisis anatómo-patológicos.

<b>PATOLOGÍA</b>	<b>EXPRESIÓN RELATIVA DE REELINA (PATOLOGÍA VS CONTROL)</b>
COLITIS	aumento superior a 7 veces
PÓLIPOS	aumento hasta 3 veces
ADENOMAS	disminución hasta 4 veces
ADENOCARCINOMAS	disminución superior a 7 veces

Tabla 1. Valores de referencia de niveles de expresión del ARNm de reelina.

Estos resultados indican que la expresión de reelina disminuye con la gravedad de la enfermedad. Sin estar vinculado a ninguna teoría, se piensa que, en respuesta a un daño tisular, como la inflamación o lesiones precancerosas en el colon, aumenta la expresión de reelina para reestablecer la barrera intestinal y posiblemente facilitar la reparación tisular, pero la represión de la expresión de reelina indica que el microambiente ha cambiado a otro que favorece el desarrollo de lesiones más graves como los adenomas o los adenocarcinomas. Dado que la expresión de reelina se

modifica a medida que la patología progresa proponemos a la reelina como biomarcador en la transición entre la enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer de colon, además de ser útil para la evaluación del pronóstico clínico.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para determinar el pronóstico de una enfermedad intestinal en un sujeto que comprende
- 5           a) cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica la reelina en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, y
- b) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con un nivel de referencia,
- en el que unos niveles de expresión del gen que codifica la reelina mayores que el
- 10   nivel de referencia, son indicativos de que la enfermedad intestinal es leve y el pronóstico es bueno, mientras que unos niveles de expresión del gen que codifica la reelina menores que el nivel de referencia son indicativos de que la enfermedad intestinal es grave y el pronóstico es malo.
- 15   2. Método según la reivindicación 1, en el que la enfermedad intestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal, pólipos intestinales, un adenoma o un adenocarcinoma.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la enfermedad inflamatoria intestinal es
- 20   colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el gen que codifica la reelina comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 % con la secuencia
- 25   SEQ ID NO: 1.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la reelina comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen ó del ADN codificante (ADNc)
- 30   de dicho gen.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la reelina se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa, hibridación *in situ*, o mediante un
- 35   array de ADN o ARN.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la reelina comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dicho gen.

5

8. Método según la reivindicación 7, en el que la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante western blot, ELISA o un array de proteínas.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, biopsia y orina.

10

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el sujeto es un mamífero, preferiblemente un primate, más preferiblemente, un humano.

11. Un método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad intestinal en un sujeto que comprende

15

a) cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica la reelina en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, y

b) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con un nivel de referencia,

20

en el que

- si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son 5 veces mayores o iguales que el nivel de referencia, entonces el individuo padece una enfermedad intestinal inflamatoria,

25

- si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son hasta 5 veces mayores que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un pólipo intestinal,

- si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son hasta 5 veces menores que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un adenoma, o

30

- si los niveles de expresión del gen que codifica la reelina son, al menos, 5 veces menores o iguales que el nivel de referencia, entonces el individuo padece un adenocarcinoma.

12. Método según la reivindicación 11, en el que el gen que codifica la reelina comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al

35

menos, un 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 % con la secuencia SEQ ID NO: 1.

13. Método según la reivindicación 11 o 12, en el que la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la reelina comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen ó del ADN codificante (ADNc) de dicho gen.

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la reelina se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa, hibridación *in situ*, o mediante un array de ADN o ARN.

15. Método según la reivindicación 11 o 12, en el que la cuantificación de los niveles de expresión del gen que codifica la reelina comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dicho gen.

16. Método según la reivindicación 15, en el que la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante western blot, ELISA o un array de proteínas.

17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, biopsia y orina.

18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el que el sujeto es un mamífero, preferiblemente un primate, más preferiblemente, un humano.

19. Un kit que comprende los reactivos necesarios para determinar los niveles de expresión del gen que codifica la reelina, en donde dichos reactivos comprenden

- una pareja de cebadores que hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la reelina, y/o
- una sonda que hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la reelina, y/o
- uno o varios anticuerpos que reconocen de forma específica la proteína codificada por el gen que codifica la reelina.

20. Kit según la reivindicación 19, en la pareja de cebadores comprende las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

21. Kit según la reivindicación 19 o 20, en el que el gen que codifica la reelina comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, un 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 % con la secuencia SEQ ID NO: 1.

5

22. Uso de un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 para determinar el pronóstico de una enfermedad intestinal en un sujeto, y/o para diagnosticar una enfermedad intestinal en un sujeto.

10 23. Uso de un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 para la puesta en práctica de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18.

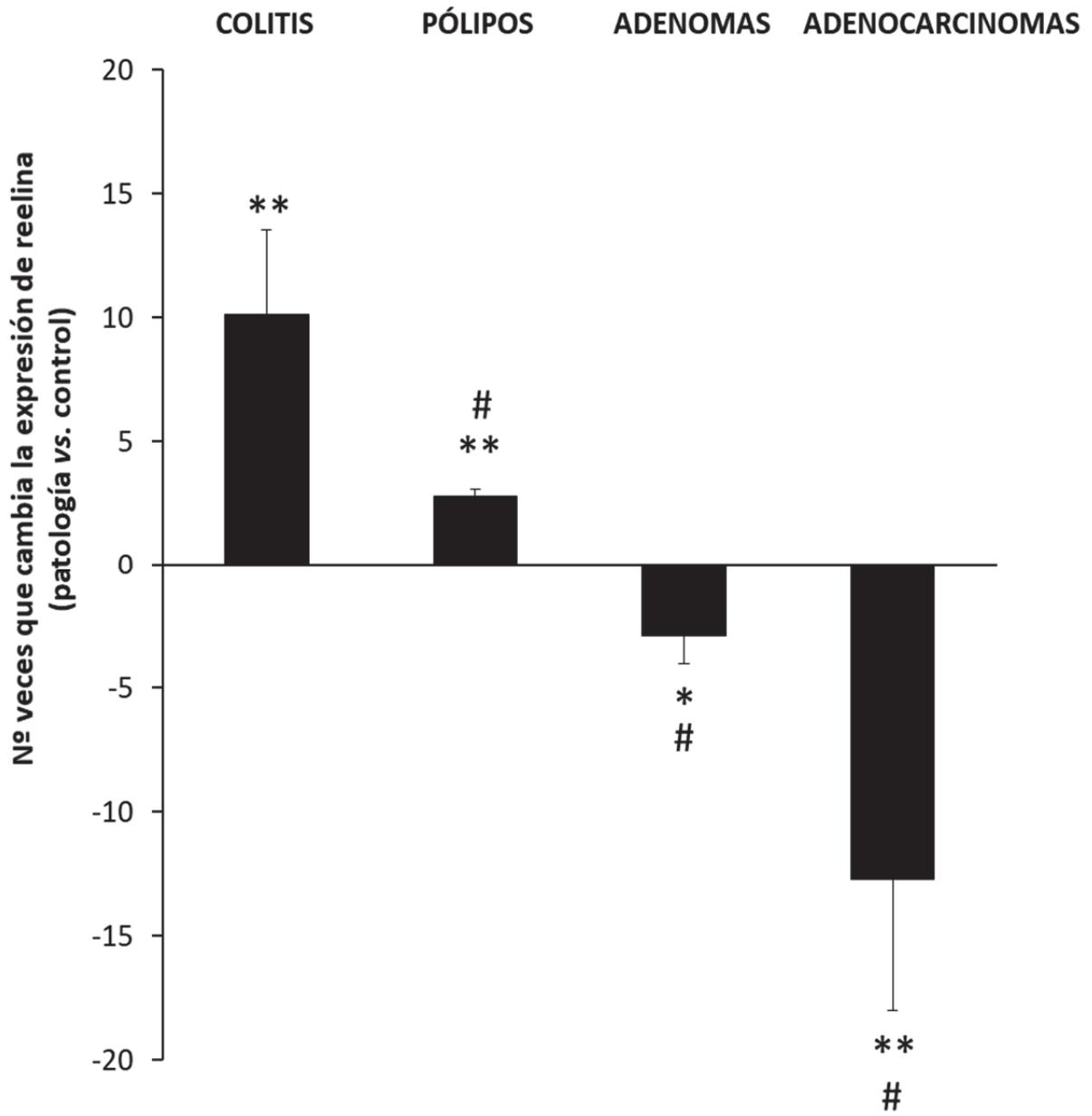


FIG 1



②① N.º solicitud: 201930195

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.03.2019

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CARVAJAL, ANA E., et al. Reelin expression is up-regulated in mice colon in response to acute colitis and provides resistance against colitis. <i>Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease</i> , 2017, Vol. 1863, Nº 2, Páginas 462-473. Páginas 463, 468-472.	1-23
A	CARVAJAL VÁZQUEZ, A. E. El sistema de señalización de la reelina en la homeostasis y en la inflamación del colon. (Tesis Doctoral Inédita). Universidad de Sevilla, Sevilla. 2016. Todo el documento.	1-23
A	GARCÍA MIRANDA, P. La reelina en la mucosa intestinal (Tesis Doctoral Inédita). Universidad de Sevilla, Sevilla. 2010. <URL: <a href="https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/15791">https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/15791</a> >. Todo el documento.	1-23
A	CARVAJAL, ANA E., et al. Reelin protects from colon pathology by maintaining the intestinal barrier integrity and repressing tumorigenic genes. <i>Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease</i> , 2017, Vol. 1863, Nº 9, Páginas 2126-2134. Todo el documento.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
17.04.2019

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
1/3



- ②① N.º solicitud: 201930195  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.03.2019  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SAEED, ATIF, et al. Identification of novel genes in Hirschsprung disease pathway using whole genome expression study. Journal of pediatric surgery, 2012, Vol. 47, Nº 2, Páginas 303-307. Página 306.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
17.04.2019

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
2/3

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q1/68** (2018.01)  
**C07K14/47** (2006.01)  
**G01N33/50** (2006.01)  
**C12N15/09** (2006.01)

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

C12Q, C07K, G01N, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL ALL, INTERNET