

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 902 730**

21 Número de solicitud: 202030978

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.09.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.03.2022

71 Solicitantes:

SERVICIO DE SALUD DE CASTILLA-LA MANCHA (SESCAM) (33.3%)
Avenida Río Guadiana, 4
45007 Toledo (Toledo) ES;
ADMINISTRACIÓN GENERAL COMUNIDAD AUTÓNOMA DE EUSKADI (23.3%);
CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED, M.P. (CIBER) (10.0%) y
UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA (UPV/EHU) (33.3%)

72 Inventor/es:

BUJANDA FERNÁNDEZ DE PIEROLA, Luis;
GARCÍA ETXEBARRIA, Koldo;
LUCENDO VILLARIN, Alfredo;
CASTELLANOS RUBIO, Ainara;
BILBAO CATALA, Jose Ramón y
SEBASTIÁN DE LA CRUZ, Maialen

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: **MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO DE ESOFAGITIS EOSINOFÍLICA EN SALIVA**

57 Resumen:

Método para el diagnóstico y/o pronóstico de esofagitis eosinofílica en saliva.

La presente invención se encuentra dentro del campo del diagnóstico y/o pronóstico de esofagitis eosinofílica (EoE) en saliva, en concreto en el diagnóstico y/o pronóstico por detección y cuantificación del nivel de expresión de genes biomarcadores de EoE presentes en la saliva de sujetos.

ES 2 902 730 A1

DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico y/o pronóstico de esofagitis eosinofílica en saliva

- 5 La presente invención se encuentra dentro del campo del diagnóstico y/o pronóstico de esofagitis eosinofílica (EoE) en saliva, en concreto en el diagnóstico y/o pronóstico por detección y cuantificación del nivel de expresión de genes biomarcadores de EoE presentes en la saliva de sujetos.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- La esofagitis eosinofílica (EoE) es una enfermedad inflamatoria caracterizada por un elevado número de eosinófilos en el esófago. Provoca síntomas como dificultad para para tragar, impactación alimentaria esofágica, vómitos, pirosis o regurgitación.
- 15 Además, en los niños la EoE provoca rechazo al alimento, dolor torácico o abdominal, irritabilidad y un bajo aumento de peso. Tales síntomas variables se podrían confundir con los de otras patologías digestivas, como la enfermedad por reflujo gastroesofágica o la enfermedad celiaca. Aunque se desconoce la causa exacta de la enfermedad, se sabe que es una patología multifactorial a la que contribuyen factores genéticos y
- 20 ambientales, siendo los factores ambientales más aceptados los alérgenos alimentarios.

- La EoE está aumentando en incidencia y prevalencia a un ritmo alto, lo que puede deberse en parte a un mayor reconocimiento y conciencia de los síntomas, pero además a cambios ambientales y etiológicos (Dellon, E. S. y Hirano, I, Gastroenterology 2018;
- 25 154(2): 319–332). Debido a este aumento la EoE se ha convertido en una causa importante de morbilidad gastrointestinal superior en niños y adultos.

- Uno de los problemas relacionados con la EoE está en el retraso en el diagnóstico y consecuente retraso en el tratamiento. El diagnóstico tardío de la enfermedad y la
- 30 persistencia de una respuesta inflamatoria crónica en el esófago origina fenómenos de remodelación fibrosa del esófago, con depósito de colágeno en la pared del esófago y formación de estenosis, cuya frecuencia se relaciona directamente con el tiempo de evolución de los síntomas y el retraso diagnóstico. Así, un diagnóstico temprano de la enfermedad puede afectar positivamente a su curso clínico. Una mejor comprensión de
- 35 la naturaleza progresiva de la enfermedad, su carga de síntomas a lo largo del tiempo y el impacto de las terapias actuales en la resolución de los síntomas son cruciales para

dirigir la práctica clínica actual.

Los criterios actuales de diagnóstico de EoE requieren la realización de una endoscopia esofágica además de una biopsia esofágica para confirmar la presencia de infiltraciones de eosinófilos en el esófago ante un paciente con síntomas compatibles, haciendo que el proceso diagnóstico se extienda en el tiempo y sea altamente invasivo (Dellon *et al.*, Gastroenterology. 2018; 155(4): 1022–1033).

Se han realizado varios trabajos para encontrar biomarcadores de EoE y métodos de diagnóstico y/o pronóstico de EoE que sean menos invasivos y más sencillos y rápidos de realizar. El documento US2017006711 divulga varios posibles biomarcadores para EoE, así como un método de diagnóstico donde se analiza la concentración de eotaxina-3 en la sangre de un paciente donde un nivel elevado de eotaxina-3 en comparación con valores de referencia es indicativo de EoE. El documento US20160304960 divulga un método para diferenciar entre EoE y esofagitis crónica a través del análisis de los niveles de expresión de genes en una biopsia esofágica del paciente. El documento WO2015142739 divulga un método de diagnóstico y/o pronóstico que consiste en determinar el genotipo del paciente para variantes genéticas que están asociadas con el desarrollo de EoE.

Los métodos de diagnóstico y/o pronóstico mencionados, son métodos invasivos, necesitan equipamiento y personal altamente especializado, y/o necesitan de análisis de datos complicados y engorrosos. Así, de acuerdo con lo anteriormente expuesto, es necesario desarrollar un método de diagnóstico alternativo que permita la detección de EoE de modo rápido, simple y no invasivo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han detectado varios biomarcadores de EoE cuyo nivel de expresión cambia significativamente en pacientes que sufren de EoE y que además dicho cambio del nivel de expresión es detectable, de manera rápida y eficaz, en una muestra de saliva del paciente. Esto ha permitido a los inventores desarrollar un método simple y rápido de diagnóstico y/o pronóstico de EoE, y que además permite determinar la respuesta al tratamiento de EoE, a partir de una muestra de saliva, evitando así procedimientos invasivos para obtener muestras biológicas, como biopsias, con las

cuales realizar el diagnóstico y/o pronóstico.

Así, la presente invención hace referencia a biomarcadores de EoE, especialmente los genes HIPK3 y/o ABHD4 en muestras de saliva, así como a métodos de diagnóstico y/o pronóstico y/o de determinación de respuesta al tratamiento de EoE haciendo uso de dichos biomarcadores.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro* de EoE en una muestra de saliva aislada de un sujeto, de ahora en adelante el uso diagnóstico de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 para determinar *in vitro* la respuesta al tratamiento de la EoE en una muestra de saliva aislada de un sujeto, de ahora en adelante el uso de respuesta de la invención.

El término "HIPK3" (número de acceso: ENSG00000110422.12) hace referencia al gen humano de la proteína cinasa 3 que interactúa con homeodominios - *Homeodomain-interacting protein kinase 3* y que comprende la SEQ ID NO: 1. El gen HIPK3 codifica para la proteína HIPK3 la cual tiene 6 isoformas y variantes, isoforma 2 (V3) (Número de acceso a la base de datos NCBI protein: NP_001041665.1), isoforma 2 (V2) (Número de acceso: NP_001265091.1), isoforma 2 (V4) (Número de acceso: NP_001265092.1), isoforma 1 (V1) (Número de acceso: NP_005725.3), isoforma X1 (Número de acceso: XP_005252786.1), isoforma X1 (Número de acceso: XP_016872565.1). En una realización particular del uso de la invención el nivel de expresión es de un gen con al menos un 85% identidad con el gen HIPK3 que comprende la SEQ ID NO: 1, preferiblemente un 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% identidad.

30

El término "identidad" en la presente invención hace referencia a la proporción de aminoácidos o nucleótidos idénticos entre dos péptidos/proteínas o secuencias de nucleótidos comparados, respectivamente, a lo largo de su secuencia completa. Los métodos para comparar secuencias son conocidos en el estado del arte, e incluyen, sin limitación, a los programas BLASTP o BLASTN, ClustalW y FASTA. Se puede

35

considerar que los péptidos, las proteínas o las secuencias de nucleótidos con identidades porcentuales de al menos el 85% mantendrán las mismas propiedades que la secuencia a la que se refieren.

- 5 El término "ABHD4" (número de acceso: ENSG00000100439.10) hace referencia al gen humano que codifica la dominio de la abhidrolasa que contiene 4, N-actil fosfolipasa B - *abhydrolase domain containing 4, N-acyl phospholipase B-* y que comprende la SEQ ID NO: 2. El gen ABHD4 codifica para la proteína ABHD4 (Número de acceso: NP_071343.2) la cual tiene una isoforma (número de acceso: XP_005268043.1). En una
10 realización particular del uso de la invención el nivel de expresión es de un gen con al menos un 85% identidad con el gen ABHD4 que comprende la SEQ ID NO: 2, preferiblemente un 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% identidad.
- 15 Además de los genes HIPK3 y ABHD4, los inventores también detectaron otros biomarcadores en muestras de saliva aisladas, los cuales en conjugación con HIPK3 y/o ABHD4, permiten el diagnóstico y/o pronóstico de EoE. Así, en una realización particular, el uso de diagnóstico de la invención o el uso de respuesta de la invención comprende además el uso de los niveles de expresión de al menos uno de los
20 biomarcadores seleccionados de la lista que consiste en: CAST (número de acceso: ENSG00000153113.23), PRR15L (número de acceso: ENSG00000167183.3), SATB1 (número de acceso: ENSG00000182568.17), SCIN (número de acceso: ENSG00000006747.15) y cualquiera de sus combinaciones, es decir, el uso de diagnóstico de la invención o el uso de respuesta de la invención comprende los niveles
25 de expresión de HIPK3 y CAST, HIPK3 y PRR15L, HIPK3 y SATB1, HIPK3 y SCIN, HIPK3 y CAST y SATB1, HIPK3 y CAST y SCIN, HIPK3 y CAST y PRR15L, HIPK3 y SATB1 y SCIN, HIPK3 y SATB1 y PRR15L, HIPK3 y SCIN y PRR15L, HIPK3 y CAST y SATB1 y SCIN, HIPK3 y CAST y SATB1 y PRR15L, HIPK3 y CAST y SCIN y PRR15L, HIPK3 y SATB1 y SCIN y PRR15L, ABHD4 y CAST, ABHD4 y PRR15L, ABHD4 y
30 SATB1, ABHD4 y SCIN, ABHD4 y CAST y SATB1, ABHD4 y CAST y SCIN, ABHD4 y CAST y PRR15L, ABHD4 y SATB1 y SCIN, ABHD4 y SATB1 y PRR15L, ABHD4 y SCIN y PRR15L, ABHD4 y CAST y SATB1 y SCIN, ABHD4 y CAST y SATB1 y PRR15L, ABHD4 y CAST y SCIN y PRR15L, ABHD4 y SATB1 y SCIN y PRR15L, ABHD4 y CAST y SATB1 y SCIN y PRR15L, HIPK3 y ABHD4, HIPK3 y ABHD4 y CAST, HIPK3 y ABHD4
35 y SATB1, HIPK3 y ABHD4 y SCIN, HIPK3 y ABHD4 y PRR15L, HIPK3 y ABHD4 y CAST

y SATB1, HIPK3 y ABHD4 y CAST y SCIN, HIPK3 y ABHD4 y CAST y PRR15L, HIPK3 y ABHD4 y SATB1 y SCIN, HIPK3 y ABHD4 y SATB1 y PRR15L, HIPK3 y ABHD4 y SCIN Y PRR15L, HIPK3 y ABHD4 y CAST y SATB1 y SCIN, HIPK3 y ABHD4 y CAST y SATB1 y PRR15L, HIPK3 y ABHD4 y CAST y SCIN y PRR15L, HIPK3 y ABHD4 y SATB1 y SCIN y PRR15L o HIPK3 y ABHD4 y CAST y SATB1 y SCIN y PRR15L.

El término “CAST” hace referencia al gen humano que codifica la Calpastatina, un inhibidor de la proteasa cisteínica dependiente de calcio y que comprende la SEQ ID NO: 3. El gen CAST codifica para la proteína CAST la cual tiene 21 isoformas, isoforma f (Número de acceso: NM_001042440.5), isoforma g (Número de acceso: NM_001042441.3), isoforma h (Número de acceso: NM_001042442.3), isoforma i (Número de acceso: NM_001042443.2), isoforma j (Número de acceso: NM_001042444.2), isoforma k (Número de acceso: NM_001042445.2), isoforma l (Número de acceso: NM_001042446.2), isoforma m (Número de acceso: NM_001190442.1), isoforma n (Número de acceso: NM_001284212.3), isoforma o (Número de acceso: NM_001284213.3), isoforma p (Número de acceso: NM_001330626.2), isoforma q (Número de acceso: NM_001330627.2), isoforma r (Número de acceso: NM_001330628.2), isoforma s (Número de acceso: NM_001330629.2), isoforma t (Número de acceso: NM_001330630.1), isoforma u (Número de acceso: NM_001330632.1), isoforma v (Número de acceso: NM_001330633.1), isoforma w (Número de acceso: NM_001330634.1), isoforma x (Número de acceso: NM_001375317.1), isoforma a (Número de acceso: NM_001750.7) e isoforma b (Número de acceso: NM_173060.4). En una realización particular del uso de la invención el nivel de expresión es de un gen con al menos un 85% identidad con el gen CAST que comprende la SEQ ID NO: 3, preferiblemente un 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% identidad.

El término “SATB1” hace referencia al gen humano que comprende la SEQ ID NO: 4. El gen SATB1 codifica para la proteína SATB1 la cual tiene 8 isoformas y variantes, isoforma 1 (V2) (Número de acceso: NP_001124482.1), isoforma 2 (V3) (Número de acceso: NP_001182399.1), isoforma 2 (Número de acceso: NP_001309800.1), isoforma 1 (Número de acceso: NP_001309801.1), isoforma 1 (Número de acceso: NP_001309802.1), isoforma 1 (Número de acceso: NP_001309803.1), isoforma 1 (Número de acceso: NP_001309804.1) e isoforma 3 (Número de acceso: NP_001309805.1). En una realización particular del uso de la invención el nivel de

expresión es de un gen con al menos un 85% identidad con el gen SATB1 que comprende la SEQ ID NO: 4, preferiblemente un 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% identidad.

- 5 El término "SCIN" hace referencia al gen humano que codifica la scinderina, una proteína que corta y tapa la actina de modo dependiente de Ca^{2+} y que comprende la SEQ ID NO: 5. El gen SCIN codifica para la proteína SCIN la cual tiene 2 isoformas y variantes, isoforma 1 (Número de acceso: NP_001106177.1) e isoforma 2 (Número de acceso: NP_149119.1). En una realización particular del uso de la invención el nivel de
- 10 expresión es de un gen con al menos un 85% identidad con el gen SCIN que comprende la SEQ ID NO: 5, preferiblemente un 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% identidad.

- El término "PRR15L" hace referencia al gen humano que codifica una proteína rica en
- 15 prolina y que comprende la SEQ ID NO: 6. El gen PRR15L codifica para la proteína PRR15L la cual tiene 5 isoformas, isoforma 1 (Número de acceso: NP_077296.1), isoforma X1 (Número de acceso: XP_005257723.1), isoforma X1 (Número de acceso: XP_005257720.1), isoforma X1 (Número de acceso: XP_005257721.1), isoforma X1 (Número de acceso: XP_005257722.1). En una realización particular del uso de la
- 20 invención el nivel de expresión es de un gen con al menos un 85% identidad con el gen PRR15L que comprende la SEQ ID NO: 6, preferiblemente un 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% identidad.

- El experto en la materia entiende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de
- 25 los genes que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad, dando lugar a variantes de la proteína. Dichas variantes caen dentro del ámbito de la presente invención, es decir, aquellas variantes de la proteínas codificadas por los genes HIPK3, ABHD4, CAST,
- 30 SATB1, SCIN y PRR15L que presentan inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos con respecto a la secuencias SEQ ID NO: 1 – 6, respetivamente.

- El término "biomarcador", tal como se utiliza en la presente invención hace referencia a un gen cuya transcripción y/o traducción produce una sustancia cuya presencia puede
- 35 determinarse y cuantificarse objetivamente en una muestra de saliva y que se utiliza

como indicador de la presencia/ausencia de la enfermedad y/o del pronóstico de la misma. Además, los biomarcadores descritos en la presente invención también se utilizan como indicadores de la respuesta al tratamiento de EoE. Los biomarcadores de la enfermedad pueden ser detectados y/o cuantificados, lo que significa que se puede
5 detectar su presencia/ausencia y/o detectar cambios en su cantidad o concentración.

La expresión “niveles de expresión del biomarcador” en la presente invención hace referencia al proceso por medio del cual la información codificada por los ácidos nucleicos en los genes es transcrita y/o traducida en productos funcionales. Tal
10 transcripción y/o traducción puede originar proteínas o ácidos ribonucleótidos (ARN) funcionales como ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), pequeños ARN nucleares o ADN complementar (ADNc). Así, los niveles de expresión se refieren a la cantidad de dichas proteínas, ARNs, ADNc o fragmentos de proteínas, ARNs y ADNc que están presentes en una muestra o se obtienen de una muestra y que se
15 pueden cuantificar por unidades de masa por volumen (i.e., miligramos/mililitro) o unidades molares por volumen (i.e., milimoles/mililitro). Métodos para cuantificar los niveles de expresión de los biomarcadores son descritos más abajo en esta descripción en relación a los métodos de la invención, siendo igualmente válidos en relación al uso de la invención.

20 Así, en una realización preferida del uso diagnóstico de la invención o del uso de respuesta de la invención, la determinación de los niveles de expresión de los biomarcadores comprende medir el nivel de ADNc, o un fragmento del mismo, el nivel de ARNm, o un fragmento del mismo, y/o el nivel de la proteína(s), o un fragmento de
25 dicha(s) proteína(s) de lo(s) biomarcador(es).

En la presente invención se entiende por “fragmento de ARNm” o “fragmento de ADNc” a la secuencia de nucleótidos de los genes asociados a los biomarcadores que comprenden uno o más nucleótidos ausentes de los extremos 3' y/o 5' con respecto a
30 la secuencia de nucleótidos completa del genes asociados a los biomarcadoros. En una realización preferida del uso de diagnóstico de la invención o del uso de respuesta de la invención, el fragmento del biomarcador es un fragmento de la secuencia que se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:6, y cualquiera de sus combinaciones.

35

De forma análoga, en la presente invención se entiende por “fragmento de la proteína del biomarcador” a la secuencia de aminoácidos de la(s) proteína(s) de lo(s) biomarcador(es) que comprende uno o más aminoácidos ausentes de su extremo amino terminal o carboxilo terminal con respecto a la secuencia de aminoácidos completa de la proteína la(s) codificada(s) pelo(s) gen(es) biomarcador(es). En una realización preferida, el fragmento de la proteína del biomarcador es un fragmento de la secuencia proteica codificada por la secuencia que se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:6, y cualquiera de sus combinaciones.

10

En la presente invención se entiende por “diagnóstico” el procedimiento por el cual se identifica una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier condición de salud-enfermedad, mediante el análisis de una serie de parámetros clínicos o síntomas característicos de dicha enfermedad, y que la distinguen de otras enfermedades con cuadros clínicos semejantes. En la presente invención la enfermedad a identificar es EoE, y el parámetro clínico es el nivel de expresión de los biomarcadores descritos en la presente invención.

15

El término “pronóstico” en la presente invención se refiere al procedimiento por el cual se determina la probabilidad o posibilidad de que un sujeto desarrolle una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier condición de salud-enfermedad, mediante el análisis de una serie de parámetros clínicos o síntomas característicos de dicha enfermedad, y que la distinguen de otras enfermedades con cuadros clínicos semejantes. En la presente invención la enfermedad a identificar es EoE, y el parámetro clínico es el nivel de expresión de los biomarcadores descritos en la presente invención. Además, el término “pronóstico” en la presente invención también se refiere a la determinación de la probabilidad o posibilidad de que dicha enfermedad, en la presente invención EoE, prosiga al estado siguiente de su desarrollo, en una progresión sin intervención clínica. Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración de pronóstico, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a diagnosticar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse,

20

25

30

35

mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación *P*, test de *Student* o funciones discriminantes de *Fisher*, medidas no paramétricas de *Mann Whitney*, correlación de *Spearman*, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de *p* es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 70%, más preferiblemente en al menos el 80%, mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

El término “respuesta al tratamiento” tal como se usa en la presente invención hace referencia al procedimiento por cual se determina si un sujeto al cual se ha diagnosticado una enfermedad tendrá una “respuesta a tratamiento favorable”, es decir, mediante el análisis de una serie de parámetros clínicos o síntomas característicos de dicha enfermedad se puede determinar la evolución favorable de dicha enfermedad en respuesta al tratamiento, donde en la presente invención una evolución favorable implica una reducción en el número de eosinófilos en la pared del esófago. En la presente invención dicha enfermedad es EoE y los parámetros clínicos son los biomarcadores de la presente invención. Dichos parámetros clínicos permiten determinar si hay una posibilidad de 60 % o más de que habrá una respuesta a tratamiento favorable, es decir, si el número de eosinófilos en la pared del esófago se ha reducido a 15 o menos eosinófilos por campo de gran aumento preferiblemente transcurridos 3 meses desde el diagnóstico inicial o de la no respuesta al tratamiento. La respuesta también se podrá medir por los hallazgos endoscópicos de EoE, medidos con la puntuación de referencia endoscópica de EoE validada (EREFS). Este puntaje cuantifica cinco hallazgos endoscópicos clave: exudados (puntaje 0-2), anillos esofágicos (puntaje 0-3), edema (puntaje 0-1), surcos (puntaje 0-2) y estenosis (puntaje 0-1). El puntaje EREFS varía de 0 a 9, con puntajes más altos que indican hallazgos endoscópicos más severos. También se podrá medir por la repercusión clínica de la disfagia con el índice de actividad de síntomas EoE (EEsAI) que también incorpora evitación y modificación de la dieta (los puntajes varían de 0 a 100, con puntajes más altos indican síntomas más graves; un puntaje <20 indica remisión de los síntomas). Como entenderán los expertos en la materia, tal determinación, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a diagnosticar. La expresión, sin

embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que tendrán una reducción del número de eosinófilos a menos de 15 células por campo de gran aumento. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes

5 herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación *P*, test de *Student* o funciones discriminantes de *Fisher*, medidas no paramétricas de *Mann Whitney*, correlación de *Spearman*, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al

10 menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de *p* es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la respuesta a tratamiento favorable de forma diferencial en al menos el 70%, más preferiblemente en al menos el 80%, mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un

15 determinado grupo o población analizada.

La expresión "el número de eosinófilos en la pared del esófago se ha reducido a 15 células o menos por campo de gran aumento" tal como se utiliza en la presente invención hace referencia a la técnica de histopatología donde se identifican eosinófilos

20 en el tejido aislado del sujeto recurriendo a microscopia óptica, en donde el aumento de magnificación es de al menos 40 veces.

El término "tratamiento", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición

25 patológica de interés en un sujeto (preferentemente un mamífero y, más preferentemente, un humano), incluyendo:

- i) Inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- ii) Aliviar la enfermedad o el estado patológico, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o el estado patológico o su sintomatología;
- 30 iii) Estabilizar la enfermedad o el estado patológico.

Como se ha referido la enfermedad que se diagnostica, pronostica o determina la respuesta al tratamiento en la presente invención es la "esofagitis eosinofílica" o "EoE". La EoE es una enfermedad inflamatoria caracterizada por un elevado número de

35 eosinófilos en el esófago. Provoca síntomas variados todos ellos referidos a una

disfunción del esófago, como dificultad en tragar (disfagia), impactaciones alimentarias, náuseas, vómitos, pirosis o sensación de quemazón que se extiende desde el epigastrio hacia el tórax y región cervical, reducción de la ingesta, dolor torácico o abdominal, regurgitación, o pérdida de peso. Sin intervención clínica la inflamación crónica que
 5 caracteriza la EoE puede desarrollar una fibrostenosis progresiva y puede incluir la estenosis de la luz del esófago. A nivel tisular, la EoE se caracteriza por una infiltración densa de glóbulos blancos del tipo eosinófilo en el revestimiento epitelial del esófago. La EoE generalmente viene determinada por una reacción alérgica a los alimentos ingeridos. Los eosinófilos son células inflamatorias que liberan una variedad de señales
 10 químicas que inflaman el tejido esofágico circundante.

En la presente invención se entiende por “muestra” a una parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella para someterla a estudio, análisis o experimentación. En la presente invención, dicho
 15 estudio, análisis o experimentación hace referencia a la determinación del nivel de expresión de los biomarcadores descritos en la presente invención en una muestra de saliva.

Para hacer uso del nivel de expresión de los biomarcadores mencionados anteriormente
 20 es también un objeto de la presente invención métodos que permitan la detección y/o cuantificación de los biomarcadores identificados como dianas para el diagnóstico y/o pronóstico de EoE, o para determinar la respuesta al tratamiento de la EoE.

Así, otro aspecto de la presente invención es un método de diagnóstico o pronóstico *in vitro* de EoE en un sujeto, de ahora adelante el método diagnóstico de la invención,
 25 donde el método comprende:

- a) identificar y cuantificar los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en una muestra de saliva aislada del sujeto; y
- b) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con valores de
 30 referencia,

donde una reducción en los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en la muestra del sujeto respecto a los valores de referencia para dicho biomarcador, es indicativo de padecer o estar predispuesto a padecer EoE.

35 En una realización preferida del método de diagnóstico de la invención en la etapa (a)

se identifican y cuantifican además los niveles de expresión de al menos uno de los biomarcadores que se seleccionan de la lista que consiste en: CAST, PRR15L, SATB1, SCIN y cualquiera de sus combinaciones, y donde una reducción en los niveles de expresión de al menos uno de los biomarcadores en la muestra del sujeto respecto a los valores de referencia para cada uno de ellos, es indicativo de padecer o estar predispuesto a padecer EoE.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con un método para determinar *in vitro* la respuesta al tratamiento de la EoE en un sujeto, de ahora en adelante el método de respuesta de la invención, donde el método comprende:

- a) identificar y cuantificar los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en una muestra de saliva aislada del sujeto; y
 - b) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con valores obtenidos para el sujeto antes de iniciar el tratamiento,
- donde un aumento en los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en la muestra del sujeto respecto a los valores obtenidos antes de iniciar el tratamiento es indicativo de una respuesta a tratamiento favorable.

En una realización preferida del método de respuesta de la invención en la etapa (a) se identifican y cuantifican además los niveles de expresión de al menos uno de los biomarcadores que se seleccionan de la lista que consiste en: CAST, PRR15L, SATB1, SCIN y cualquiera de sus combinaciones, donde un aumento en los niveles de expresión de al menos uno de los biomarcadores en la muestra del sujeto respecto a los valores obtenidos antes de iniciar el tratamiento, es indicativo de una respuesta a tratamiento favorable.

Los términos “diagnóstico”, “pronóstico”, “respuesta al tratamiento”, “respuesta a tratamiento favorable”, “esofagitis eosinofílica (EoE)”, “niveles de expresión del biomarcador”, “HIPK3”, “ABHD4”, “CAST”, “PRR15L”, “SATB1”, “SCIN” y “muestra” se han definido anteriormente con relación al uso de la invención y dichas definiciones, así como las combinaciones de biomarcadores descritas previamente, son válidas para el presente aspecto de la invención y sus realizaciones preferidas.

El término “sujeto”, tal como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a cualquier animal, preferiblemente un mamífero e incluye, pero no se limita a, animales

domésticos y de granja, primates, y humanos. En una realización preferida, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano de cualquier sexo, edad o raza.

El término “identificar” en el método de la invención se refiere al reportar o detectar la expresión del o de los biomarcadores descritos en la presente invención en la muestra de saliva. El término “cuantificar” en el método de la invención se refiere a la determinación de cantidad, número, o concentración en unidad de volumen, del nivel de expresión del o de los biomarcadores descritos en la presente invención en la muestra de saliva.

Así, en el método de diagnóstico la invención o en el método de respuesta de la invención la expresión “identificar y cuantificar los niveles de expresión” de la etapa a) se refiere al procedimiento de reportar y/o determinar la cantidad del nivel de expresión del o de los biomarcadores descritos en la presente invención, por la detección y/o determinación de la cantidad del ARNm, o un fragmento del ARNm, ADNc o un fragmento del ADNc, o de la proteína o un fragmento de la proteína, codificados por el o los biomarcadores descritos en la presente invención. Así, en una realización particular del método de diagnóstico la invención o del método de respuesta de la invención la etapa (a) se lleva a cabo mediante cuantificación de los niveles de proteína, de ARN mensajero o del ADN complementario.

Los términos “fragmento de ARNm”, “fragmento de ADNc” y “fragmento de proteína” se han definido anteriormente en relación al uso de diagnóstico de la invención y al uso de respuesta de la invención y dichas definiciones son válidas para el presente aspecto.

Si la cuantificación de la expresión de los biomarcadores va a realizarse a partir del ADNc o el ARNm, primero es necesaria la extracción del ácido nucleico de la muestra de saliva aislada del sujeto. Para este fin, la muestra de saliva se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o la célula, liberando los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para aislar y preparar los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente (Sambroock, J., *et al.* 2012, *"Molecular cloning: a Laboratory Manual"*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.).

Una vez extraído los ácidos nucleicos se procede a realizar la cuantificación de la expresión de los biomarcadores. Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm de los biomarcadores o de sus ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm de dichos biomarcadores pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de sondas apropiadas, northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm del biomarcador de interés o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-PCR, hibridación, *microarrays*, etc. En una realización preferida del método de diagnóstico de la invención o del método de respuesta de la invención la cuantificación de los niveles de ARN mensajero se lleva a cabo por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente al ARNm del biomarcador o biomarcadores también pueden ser cuantificados mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc. Métodos convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook *et al.* citado *ad supra*. En una realización preferida, la cuantificación de los niveles de expresión se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, un *array* de ADN o ARN, o RNA-Seq o Secuenciación Masiva aplicada al estudio de ARN.

Si la cuantificación de la expresión del biomarcador o de los biomarcadores va a realizarse a partir de la proteína codificada por el gen asociado al biomarcador, entonces la muestra de saliva aislada del sujeto tiene que ser tratada para extraer las proteínas. Métodos para extraer o aislar proteínas son conocidos para el experto en la materia y están disponibles comercialmente (Sambroock, J., *et al.* 2012, citado *ad supra*).

Los niveles de proteína pueden ser cuantificados mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un

sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a la proteína diana y la posterior cuantificación de los complejos formados.

- 5 Se entiende por "anticuerpo" a una glicoproteína del tipo gamma globulina que forma parte del sistema inmunitario humoral que se une de forma específica a un antígeno. El término anticuerpo, tal como aquí se utiliza, incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies, fragmentos Fab y scFv de anticuerpos, así como los dominios de unión a ligando.
- 10 Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Los términos "marca" o "marcado" se refieren a una composición capaz de producir una señal detectable indicativa de la presencia de la molécula marcada. Ejemplos ilustrativos de marcadores adecuados incluyen, sin limitar a, radioisótopos, cromóforos de
- 15 nucleótidos, enzimas, sustratos, moléculas fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, restos bioluminescentes, y similares. Como tal, una marca es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que
- 20 utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (enzimoinmunoensayo RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (enzimoinmunoensayo competitivo), DAS-ELISA (ELISA tipo sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en
- 25 el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar proteínas, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, espectrometría de masas etc. Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une
- 30 a la proteína diana con alta afinidad para detectar la cantidad de la misma. Ejemplos de anticuerpos o reactivos con capacidad de unirse a dicha la proteína diana incluyen, sin limitarse a, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados.

35

- El término “valores de referencia” en la etapa b) del método de diagnóstico de la invención hace referencia a los valores del nivel de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4, o de los biomarcadores CAST, PRR15L, SATB1 y SCIN, considerados normales en sujetos que no padecen de EoE. Estos valores pueden ser obtenidos a través de la cuantificación de los niveles de expresión de dichos biomarcadores a partir de muestras de saliva aisladas de sujetos que no padecen de EoE y representantes de la población en la cual se encuentre el sujeto susceptible de tener o padecer enfermedad.
- 10 La expresión “comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con valores de referencia” en el método de diagnóstico de la invención hace referencia al proceso o procedimiento de relacionar, examinar o verificar los valores obtenidos para el nivel de expresión de los biomarcadores, y equiparar o verificar los valores obtenidos en la etapa a) con los valores que se esperan obtener para sujetos que no padecen la enfermedad, donde, según el método de diagnóstico de la invención, “una reducción en los niveles de expresión de HIPK3 y/o ABHD4 en la muestra del sujeto respecto a los valores de referencia para dicho biomarcador, es indicativo de padecer o estar predispuesto a padecer EoE”.
- 20 El término “reducción” hace referencia a un decrecimiento, disminución o rebaja de los valores del nivel de expresión obtenidos para un sujeto que padece o es susceptible de padecer de EoE cuando estos valores son equiparados con los valores de referencia, es decir, con valores de un sujeto que no padece de EoE. En particular, se entiende “reducción” del nivel de expresión, cuando los niveles de expresión del biomarcador son de, al menos, 0,1 veces, 0,5 veces, 1 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a los niveles de expresión del biomarcador en un sujeto que no padece de EoE.
- 30 La expresión “comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con valores obtenidos antes de iniciar el tratamiento” en el método de respuesta de la invención hace referencia al proceso o procedimiento de relacionar, examinar o verificar los valores obtenidos para el nivel de expresión de los biomarcadores, y equiparar o verificar los valores obtenidos en la etapa a) con los valores obtenidos para dichos biomarcadores, preferiblemente por el método de diagnóstico de la invención, antes de
- 35

iniciar el tratamiento, donde, según el método de respuesta la invención, “un aumento en los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en la muestra del sujeto respecto a los valores obtenidos antes de iniciar el tratamiento, es indicativo de una respuesta a tratamiento favorable”.

5

El término “aumento” hace referencia a un incremento, crecimiento o subida de los valores del nivel de expresión obtenidos para un sujeto que padece de EoE después de iniciar tratamiento cuando estos valores son equiparados con los valores obtenidos para los mismos biomarcadores antes de que el sujeto inicie el tratamiento. En particular, se entiende “aumento” del nivel de expresión, cuando los niveles de expresión del biomarcador son de, al menos, 1,1 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a los niveles de expresión del biomarcador del sujeto antes de iniciar tratamiento.

15

La puesta en práctica de los usos y los métodos de la invención comprende el empleo de sondas, cebadores y/o anticuerpos, los cuáles puede formar parte de un kit.

Así, otro aspecto de la invención es un kit o dispositivo, de ahora en adelante el kit de la invención, para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de EoE, o para la determinación de la respuesta al tratamiento *in vitro* de EoE que comprende sondas, cebadores y/o anticuerpos específicos para la identificación y cuantificación de los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en muestras aisladas de saliva.

En una realización preferida el kit de la invención además comprende sondas, cebadores y/o anticuerpos para la detección de los niveles de expresión de al menos un biomarcador que se seleccionan de la lista que consiste en: CAST, PRR15L, SATB1, SCIN y cualquiera de sus combinaciones. En otra realización particular del kit de la invención las sondas se seleccionan de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, y cualquiera de sus combinaciones. En aún otra realización particular del kit de la invención los cebadores se seleccionan de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, y cualquiera de sus combinaciones.

En la presente invención se entiende por “sonda” a la molécula de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos hibrida de forma específica con la secuencia de nucleótidos del biomarcador diana. La expresión “hibrida de forma específica”, tal como se usa aquí, se refiere a las condiciones que permiten la hibridación de dos polinucleótidos en condiciones altamente o moderadamente rigurosas. Condiciones de alta rigurosidad implican, en general: (1) fuerza iónica baja y alta temperatura para el lavado, por ejemplo de cloruro de sodio 0,015M/citrato de sodio 0,0015M/0,1% dodecil sulfato de sodio a 50°C, (2) empleo durante la hibridación de un agente de desnaturalización, tales como formamida, por ejemplo, el 50% (v/v) formamida con 0,1% de albúmina de suero bovino/0,1% Ficoll/0,1% polivinilpirrolidone/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio a 750 mM, 75 mM de citrato de sodio a 42°C, o (3) empleo de 50% de formamida, 5xSSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrato de sodio), fosfato sódico 50mM (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 veces solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 mg/mL), 0,1 % SDS, y el 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2xSSC (cloruro sódico/citrato de sodio) y el 50% de formamida, seguido de un lavado de alto rigor que consiste en 0,1xSSC que contiene EDTA a 55°C. “Condiciones moderadamente rigurosas” incluyen el uso de solución de lavado y las condiciones de hibridación menos estrictas que las descritas anteriormente. Como llevar a cabo la hibridación de dos secuencias de nucleótidos puede encontrarse en Sambroock, J., *et al.* 2012, citado *ad supra*.

En una realización preferida del kit de la invención las sondas son sondas doblemente marcadas. El término “sonda doblemente marcadas” se refiere a una secuencia de oligonucleótidos de una sola hebra que tiene un marcador, un *quencher* (marcador que absorbe la señal de otro marcador) y una secuencia de sonda dispuestas entre los dos marcadores, y en la que marcador y el *quencher* están lo suficientemente próximos como para que el *quencher* impida que el marcador emita una señal detectable. La secuencia de la sonda generalmente incluye una secuencia que es sensible a la Taq polimerasa. Típicamente, la sonda comprende 20-30 nucleótidos, preferentemente 20-24 nucleótidos. Moléculas marcadoras y moléculas *quencher* están disponibles comercialmente. Ejemplos, no limitantes, so la molécula marcadora 6-carboxyfluoresceína (FAM) y los *quencher* Iowa Black (IABkFQ) y ZEN de la empresa *Integrated DNA Technologies*.

35

En otra realización preferida del kit de la invención las sondas son sondas triplemente marcadas. El término “sondas triplemente marcadas” hace referencia a una sonda doblemente marcada que además contiene un segundo *quencher* interno localizado entre los nucleótidos 9 y 10 de la secuencia de la sonda. Un ejemplo no limitante de un
 5 *quencher* interno es el ZEN de la empresa *Integrated DNA Technologies*.

Además de sondas, cebadores y/o anticuerpos, el kit puede comprender otros componentes útiles en la puesta en práctica de la presente invención, tales como, buffers, vehículos de entrega, soportes del material, componentes de controles positivos
 10 y/o negativos, etc. Opcionalmente, tales controles comprenden las sondas, cebadores y/o anticuerpos con modificaciones para su uso como controles, por ejemplo, sondas, cebadores y/o anticuerpos que no reconocen el biomarcador HIPK3 y/o el resto de los biomarcadores descritos en la presente invención. Además de los componentes mencionados, los kits podrán incluir también instrucciones para practicar el objeto de la
 15 invención. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits mencionados en una variedad de formas, uno o más de los cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p. ej., una hoja o hojas de papel en las que se imprime la información, en el embalaje del kit, en un inserto de paquete, etc. Otro medio sería un
 20 medio legible por ordenador, por ejemplo, un CD, un USB, etc., en el que se haya registrado la información. Otro medio que puede estar presente es una dirección de sitio web que puede utilizarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio remoto. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

25 Otro aspecto de la invención hace referencia al uso del del kit de la invención para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de EoE en una muestra aislada de saliva de un sujeto, preferiblemente un ser humano.

Aún otro aspecto de la invención hace referencia al uso del kit de la invención para
 30 determinar la respuesta al tratamiento de EoE en una muestra aislada de saliva de un sujeto, preferiblemente un ser humano.

Los términos y expresiones utilizados en el kit de la invención y en los usos del kit de la invención, sus realizaciones preferidas fueron definidos anteriormente en relación a los
 35 aspectos de uso y al método de la invención, siendo tales definiciones validas y

aplicables en referencia al kit de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y 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.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Expresión relativa de los genes diferencialmente expresados en saliva. CTRL: controles, EoE: pacientes con esofagitis eosinofílica. Los datos representan la media y el error standard en 10 muestras de cada grupo. Diferencias calculadas mediante test t-Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fig. 2. Curvas ROC de los genes diferencialmente expresados. AUC: área bajo la curva.

EJEMPLOS

20

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto los aspectos de la presente invención.

Ejemplo 1: Analisis de los genes que presentan expresión reducida en pacientes

25

Material y métodos

Reclutamiento

El proceso de reclutamiento se llevó a cabo a través del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario Donostia y del Hospital General de Tomellos, donde se hizo un cribado de los potenciales pacientes para su participación en el estudio.

30

Se reclutaron voluntarios mayores de edad que cumplieran con las características necesarias para llevar a cabo el estudio.

Los criterios de inclusión/exclusión para el reclutamiento de los participantes fueron los siguientes:

35

- Criterios de inclusión:
 - o Pacientes diagnosticados de Esofagitis Eosinofílica (EoE), que hayan

presentado impactación esofágica y que en la biopsia histológica tengan al menos 15 eosinófilos por campo.

- Criterios de exclusión:

- o Acalasia o esclerodermia;
- 5 o Evidencia de causas distintas de EoE para la eosinofilia esofágica
- o Antecedentes de cirugía esofágica en cualquier momento o de procedimientos de dilatación esofágica en las últimas 8 semanas antes de la detección
- 10 o Cualquier enfermedad sistémica relevante como cardiopatía isquémica, insuficiencia renal, enfermedad crónica pulmonar, hepatopatía crónica, neoplasia, etc
- o Pacientes que reciban glucocorticosteroides sistémicos, inmunosupresores, medicamentos biológicos, glucocorticosteroides tópicos, por otro tipo de enfermedad.

15

Aquellas personas interesadas en participar en el estudio y que cumplieran con los criterios de inclusión, fueron informados de forma oral y escrita de los datos relevantes del estudio y decidieron si participar o no una vez tenían conocimiento claro del estudio. El permiso para realizar el estudio se tramitó por el Comité Ético de Investigación del Área Sanitaria de Gipuzkoa (Código de Protocolo: BUJ-BIO-2020-01), y por el Comité de Etica de Investigación Clínica del Hospital General La Mancha Centro (Código de protocolo 137-C).

20

Recogida datos

- 25 En todos los pacientes incluidos se obtuvieron, además de los datos clínicos habituales de información demográfica, datos del informe endoscópico y de anatomía patológica. Se recopilaron datos de seguimiento clínico, endoscópico e histológico de cara a detección de recibidas; y se contabilizó el número máximo de eosinófilos en cualquiera de los puntos del esófago.

30

Los hallazgos de la endoscopia del esófago se clasificaron de acuerdo con el sistema de clasificación de puntuación de referencia endoscópica (EREFS) modificado, sumando las puntuaciones de los 5 campos principales (edema, exudados, surcos, estenosis y anillos). Se hizo una puntuación total y una evaluación global de la actividad endoscópica de EoE y se clasificaron como ninguna, leve, moderada o grave.

35

Recogida de muestras

Se recogieron muestras de saliva de casos con EoE y controles sanos. Los casos utilizados son pacientes diagnosticados por medio de histología de esofagitis eosinofílica sin tratamiento o sin respuesta al tratamiento. Los controles no presentaban ninguna enfermedad inflamatoria. Las muestras de saliva cada participante se recogieron mediante el kit DNA/RNA Shield™ Collection Tube w/ Swab (Zymo) siguiendo las instrucciones del fabricante.

10 Selección de genes candidato

Para seleccionar los genes a estudiar se analizaron resultados de RNAseq depositados en la base de datos "GEO" con el código GSE113341. Partiendo de esos datos, se compararon los niveles de expresión de biopsias de esófago entre EoE y controles sanos y se realizó un test U de Mann-Whitney. De todos los genes analizados 69 mostraron expresión diferencial significativa después de utilizar corrección False Discovery Rate, genes que fueron utilizados para posteriores análisis de expresión (Tabla 1).

Tabla 1: Genes expresados diferencialmente y numeros de accesion.

Refseq	GeneID
NM_001039132, NM_001544, NM_022377	ICAM4
NM_144982	ZFC3H1
NM_0060721	CCL26
NM_001491	GCNT2
NM_177980	CDH26
NM_000070, NM_024344, NM_173087	CAPN3
NM_018233	OGFOD1
NM_052964	CLNK
NM_001145122	CAPN14
NM_002563	<i>P2RY1</i>
NM_022336	EDAR
NM_001013442	EPGN
NM_001942	<i>DSG1</i>
NM_000965	RARB
NM_002278	KRT32
NR_015447	LOC153684
NM_001112706	SCIN

Refseq	GeneID
NM_004721	MAP3K13
NM_024320	PRR15L
NM_001174160, NM_022071	SH2D4A
NM_014813	LRIG2
NM_145176	SLC2A12
NM_173791	PDZD8
NM_004272	HOMER1
NM_145655	GCNT2
NM_001769	CD9
NM_004174	SLC9A3
NR_026914	MGC16275
NM_000891	KCNJ2
NR_036534	KCNJ2-AS1
NM_022060	ABHD4
NR_040111	LOC100505782
NM_001885	CRYAB
NM_020947	KIAA1609
NM_001252226, NM_006622	PLK2
NM_004490	GRB14
NM_001111319	CLDN22
NM_001170690, NM_020974	SCUBE2
NM_174911	FAM84B
NR_027701	LINC00346
NR_045697	PRICKLE2-AS1
NM_001920	DCN
NR_026979	LOC145837
NM_001048200, NM_005734	HIPK3
NM_004827	ABCG2
NM_017708	FAM83E
NM_006493	CLN5
NM_182922	HEATR3
NM_002991	CCL24
NM_173496	MPP7
NM_153690	FAM43A
NM_001190259, NM_001190260, NM_152785	GCET2
NM_001130081, NM_002662	<i>PLD1</i>
NM_014746	RNF144A
NM_014903	NAV3

Refseq	GeneID
NM_001031689	PLAA
NM_148897	SDR9C7
NM_001042533, NM_001261829, NM_032778, NM_153182	MINA
NM_138806, NM_138939, NM_138940, NM_170780	CD200R1
NM_001129993	KIAA1841
NM_001001991, NM_015430	PAMR1
NM_001005747	CACNB4
NM_001195470, NM_002971	SATB1
NR_033798	CAST
NM_017632	CDKN2AIP
NM_052813, NM_052814	CARD9
NM_001256574, NM_001256575, NM_001256576, NM_003633, NR_046318	ENC1
NR_038291	LOC100507127

Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó utilizando el kit DirectZol Miniprep RNA purification kit (Zymo) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sustrajeron 500ul de muestra de saliva y se mezclaron 1,5 ml de Trizol. Se añadió el mismo volumen de etanol y se procedió a la limpieza del RNA mediante la columna provista en el kit. El RNA se resuspendió en 30ul de agua libre de RNAsas y la concentración se midió mediante espectrometría UV utilizando un Nanodrop ND-1000.

RT-QPCR

La RT-QPCR se realizó utilizando el kit Quantitec Probe RT-PCR (Qiagen) y sondas específicas para cada gen (IDT, Tabla 2). Se utilizaron los genes GAPDH, RPLP0 y 18S como controles endógenos. Las reacciones se corrieron en duplicado en volúmenes de 5 microlitros en placas de 384 pocillos utilizando 5ng de RNA por reacción en un termociclador BioRad CFX.

Análisis de los resultados

Los resultados se analizaron mediante el método deltaCt para calcular expresión relativa. La expresión de los genes candidatos que fueron detectables en saliva se calculó utilizando la media de los tres genes endógenos. Los análisis estadísticos se realizaron mediante una t-Student y los valores menores de 0,05 se consideraron significativos.

Resultados

29 de los genes analizados fueron detectados en las muestras de saliva. Solo se consideraron para el análisis aquellos genes que se expresaron en al menos un 60% de las muestras analizadas. 6 de los 29 genes detectados presentan una expresión relativa significativamente reducida en los pacientes con EoE (Fig. 1).

En una cohorte de validación en la que se incluyen 37 pacientes confirmados de EoE del Hospital Universitario Donostia y del Hospital General de Tomelloso y 27 controles sanos, se confirmó la disminución en la expresión de los genes HIPK3 y ABHD4 (Fig. 1). Además, se observa como la expresión de los biomarcadores HIPK3 y ABHD4 en saliva, cada uno de ellos por separado, presentan una sensibilidad superior al 75% (79%) una especificidad superior al 60% (65%) con un área bajo la curva ROC superior al 0.85 (Fig. 2).

Tabla 2: Sondas y cebadores para los genes indicados

Gene	Tipo	Secuencia y modificación
HIPK3	Sonda	/56-FAM/TTT CTT GGA /ZEN/TGG CCG CTC TAC CC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 7)
	cebador1	ACC TTG AGT CTG AGA AAT GTA TCG (SEQ ID NO: 8)
	cebador2	CAT TGG GAT GTG TGA TTG CAG (SEQ ID NO: 9)
ABHD4	sonda	/56-FAM/TTG AAT GCT /ZEN/GTC TCA CCA CTG GGA TT/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 10)
	cebador1	GCA CAT CTT TTC GAA TCA AGT GA (SEQ ID NO: 11)
	cebador2	GAG TAT ATT TAC CAC TGC AAC GC (SEQ ID NO: 12)
CAST	sonda	/56-FAM/AGG ATA AGT /ZEN/GCA AGA AGG CTG CTT CC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 13)
	cebador1	GAA TCC TTC GCT TTA CCT CCA (SEQ ID NO: 14)
	cebador2	CCT CCA CTA CAG AAA CCT CAC (SEQ ID NO: 15)
PRR15L	sonda	/56-FAM/CCT GGA GCA /ZEN/GTC GGG ATT ACA GAA /3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 16)
	cebador1	CCA ACC AAT TTC AGT CGT CAT (SEQ ID NO: 17)
	cebador2	CTC CTA CAC TCA ACT GCT TCT C (SEQ ID NO: 18)
SATB1	sonda	/56-FAM/ACA CTT TAG /ZEN/CAC GCT TCA TTT CCT GC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 19)
	cebador1	AAC AGC TCG CAC AAC CAT (SEQ ID NO: 20)
	cebador2	ACC AGA GAA CAA TAC CAT GAA CA (SEQ ID NO: 21)
SCIN	sonda	/56-FAM/CAC GCC AAA /ZEN/TCT CCA CTT TGC CAG /3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 22)
	cebador1	GTC ACC ACC ATA GAA TTC ACC A (SEQ ID NO: 23)

	cebador2	GCC TCA AAA TTA CAC AGT TCT CC (SEQ ID NO: 24)
GAPDH	sonda	/56-FAM/AAG GTC GGA /ZEN/GTC AAC GGA TTT GGT C/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 25)
	cebador1	TGT AGT TGA GGT CAA TGA AGG G (SEQ ID NO: 26)
	cebador2	ACA TCG CTC AGA CAC CAT G (SEQ ID NO: 27)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro* de esofagitis eosinofílica (EoE) en una muestra de saliva aislada de un sujeto.
- 10 2. Uso de los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 para determinar *in vitro* la respuesta al tratamiento de EoE en una muestra de saliva aislada de un sujeto.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 o 2 que comprende además los niveles de expresión de al menos uno de los biomarcadores seleccionados de la lista que consiste en: CAST, PRR15L, SATB1, SCIN y cualquiera de sus combinaciones.
- 20 4. Método de diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de EoE en un sujeto, donde el método comprende:
 - a) identificar y cuantificar los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en una muestra de saliva aislada del sujeto; y
 - b) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con valores de referencia,
- 25 donde una reducción en los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en la muestra del sujeto respecto a los valores de referencia para dicho biomarcador, es indicativo de padecer o estar predispuesto a padecer EoE.
- 30 5. El método según la reivindicación 4, donde en la etapa (a) se identifican y cuantifican además los niveles de expresión de al menos un biomarcador que se seleccionan de la lista que consiste en: CAST, PRR15L, SATB1, SCIN y cualquiera de sus combinaciones, y donde una reducción en los niveles de expresión de al menos uno de los biomarcadores en la muestra del sujeto respecto a los valores de referencia para cada uno de ellos, es indicativo de padecer o estar predispuesto a padecer EoE.
- 35 6. Método para determinar *in vitro* la respuesta al tratamiento de EoE en un sujeto,

donde el método comprende:

- a) identificar y cuantificar los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en una muestra de saliva aislada del sujeto; y
 - b) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) con valores obtenidos antes de iniciar el tratamiento para EoE, donde un aumento en los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en la muestra del sujeto respecto a los valores obtenidos antes de iniciar el tratamiento para EoE, es indicativo de una respuesta a tratamiento favorable.
- 5
7. El método según la reivindicación 6, donde en la etapa (a) se identifican y cuantifican además los niveles de expresión de al menos un biomarcador que se seleccionan de la lista que consiste en: CAST, PRR15L, SATB1, SCIN y cualquiera de sus combinaciones, y donde un aumento en los niveles de expresión de al menos uno de los biomarcadores en la muestra del sujeto respecto a los valores obtenidos antes de iniciar el tratamiento para EoE es indicativo de una respuesta a tratamiento favorable.
- 10
- 15
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 donde la etapa (a) se lleva a cabo mediante cuantificación de los niveles de proteína, de ARN mensajero o del ADN complementario.
- 20
9. El método según la reivindicación 8, donde la cuantificación de los niveles de proteína se lleva a cabo por Western blotting o ensayo inmunoenzimático.
- 25
10. El método según la reivindicación 8, donde la cuantificación de los niveles de ARN mensajero se lleva a cabo por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa.
- 30
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, donde el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano.
- 35
12. Uso *in vitro* de un kit o dispositivo para el diagnóstico y/o pronóstico de EoE que comprende sondas, cebadores y/o anticuerpos específicos para la identificación y cuantificación de los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en una muestra aislada de saliva de un sujeto.

13. Uso *in vitro* de un kit o dispositivo para determinar la respuesta al tratamiento de EoE que comprende sondas, cebadores y/o anticuerpos específicos para la identificación y cuantificación de los niveles de expresión del biomarcador HIPK3 y/o ABHD4 en una muestra aislada de saliva de un sujeto.
14. Uso según la reivindicación 12 o 13 donde además el kit o dispositivo comprende sondas, cebadores y/o anticuerpos específicos para la identificación y cuantificación de los niveles de expresión de al menos un biomarcador que se seleccionan de la lista que consiste en: CAST, PRR15L, SATB1, SCIN y cualquiera de sus combinaciones.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano.

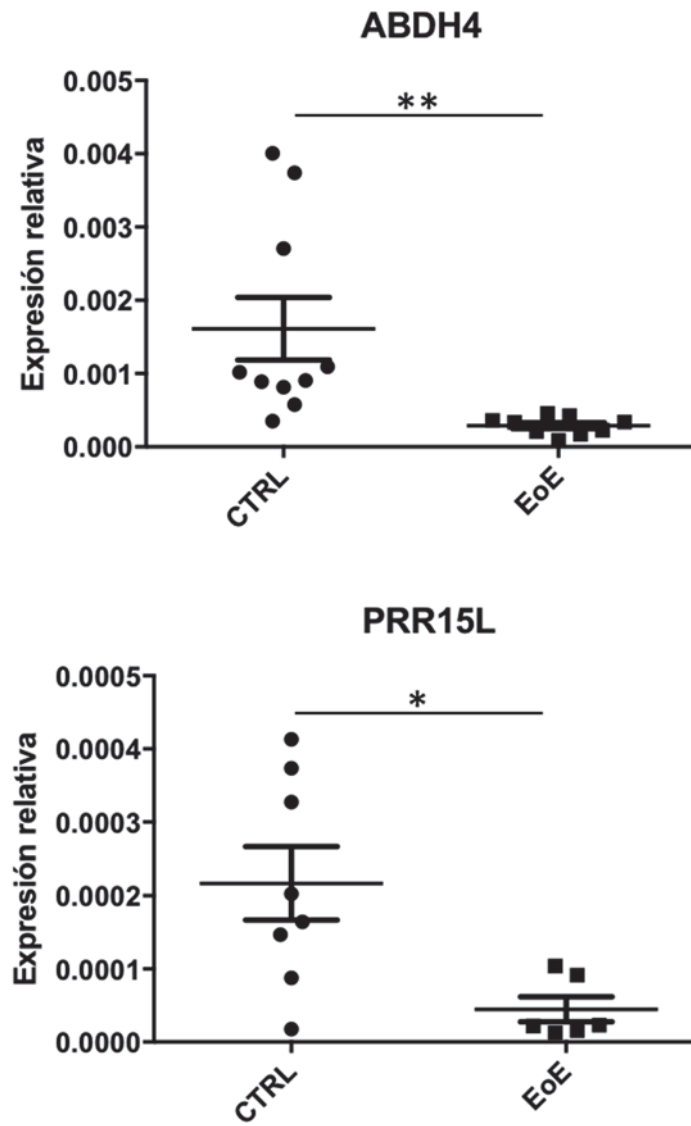


Fig. 1

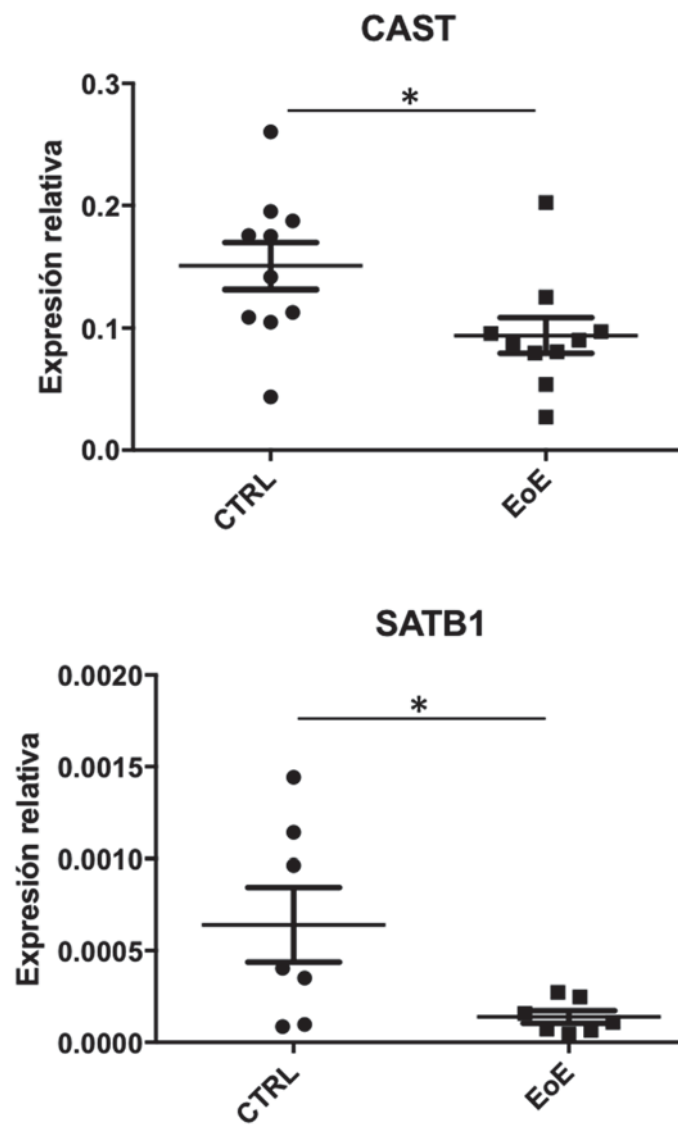


Fig. 1 (continuación)

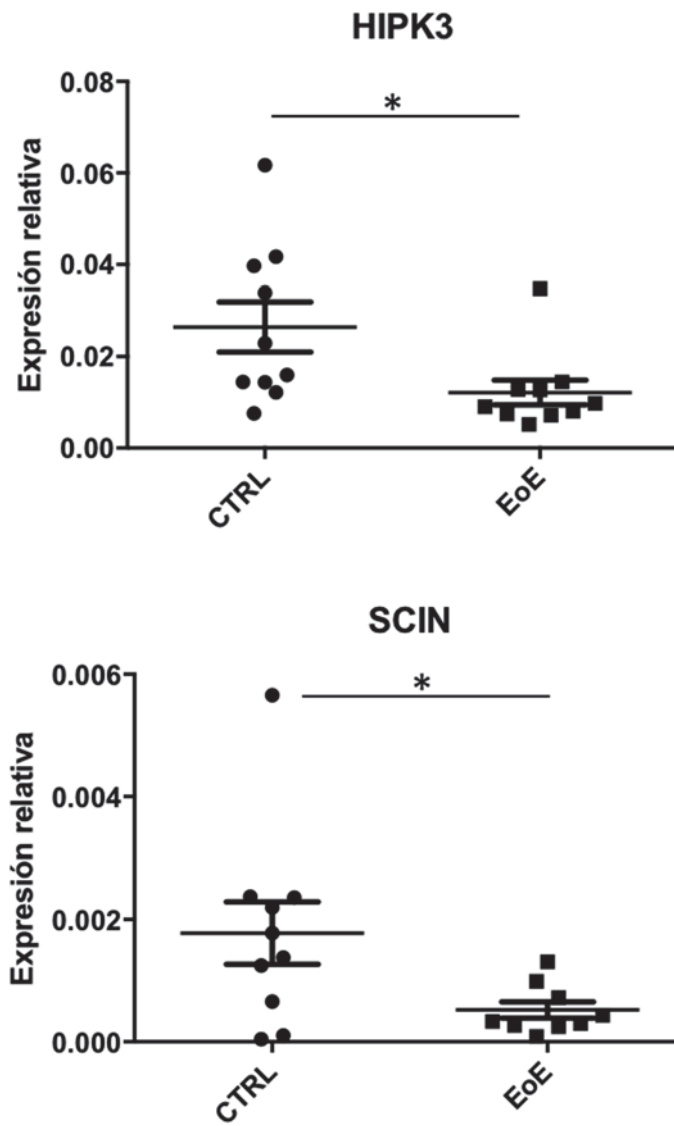


Fig. 1 (continuación)

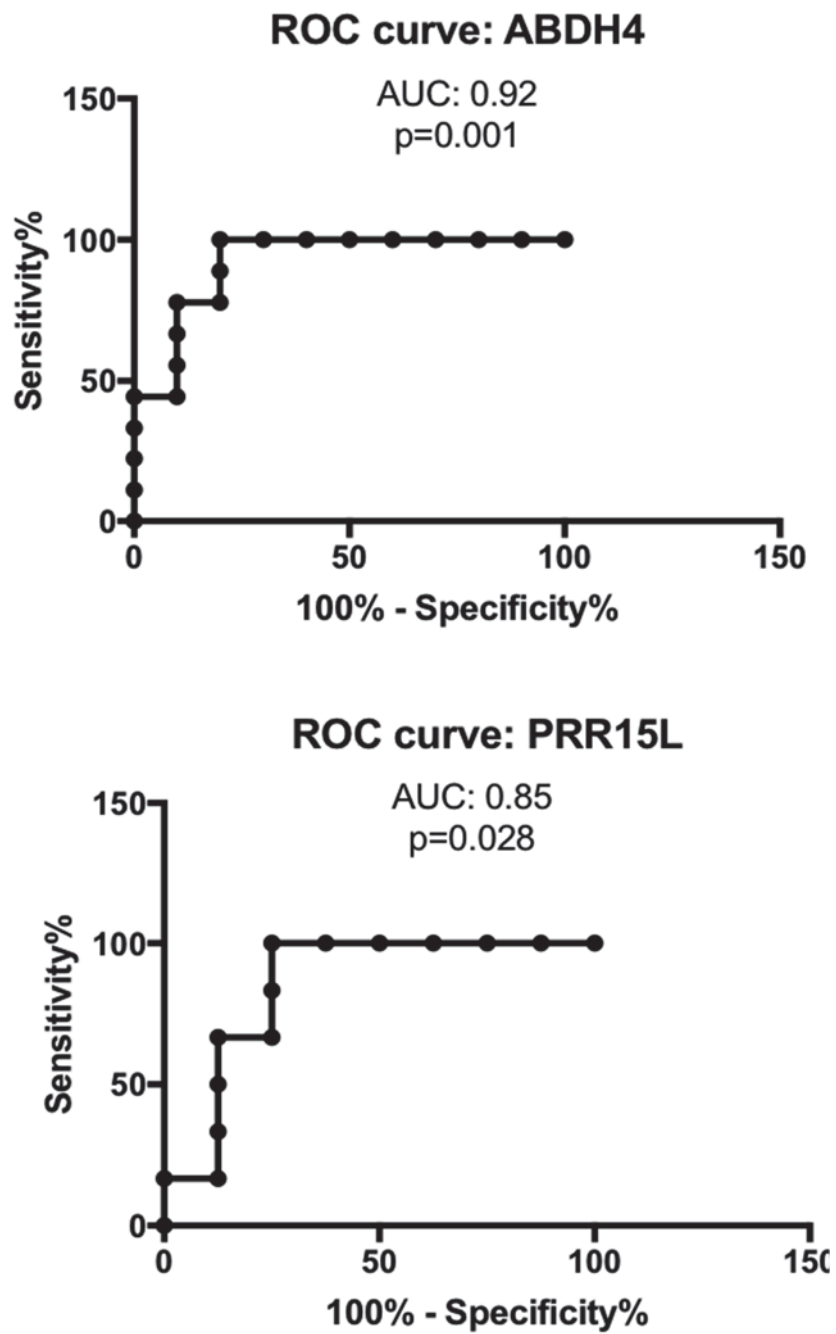


Fig. 2

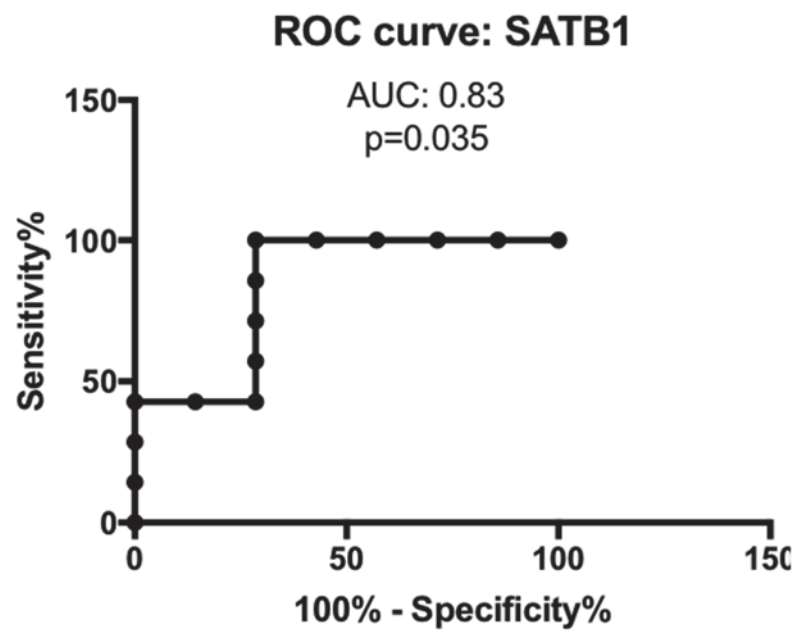
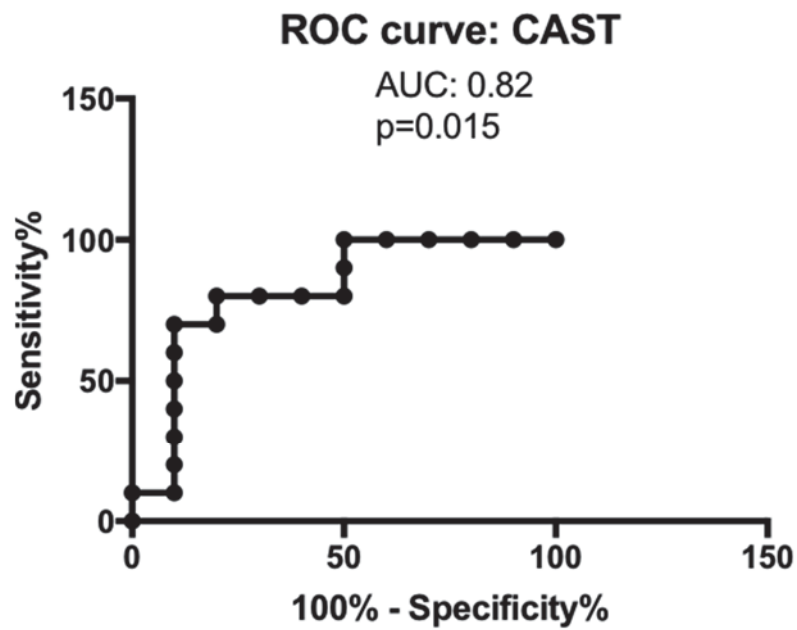


Fig. 2 (continuación)

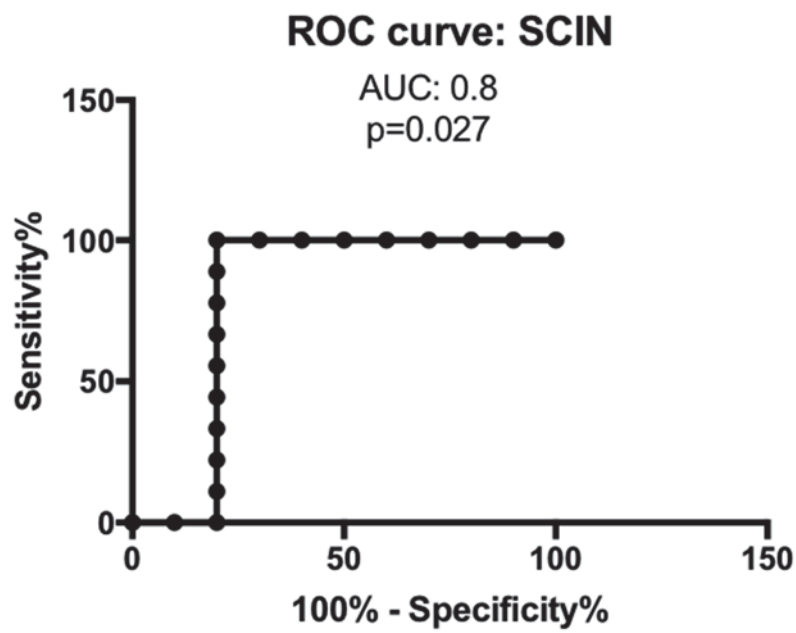
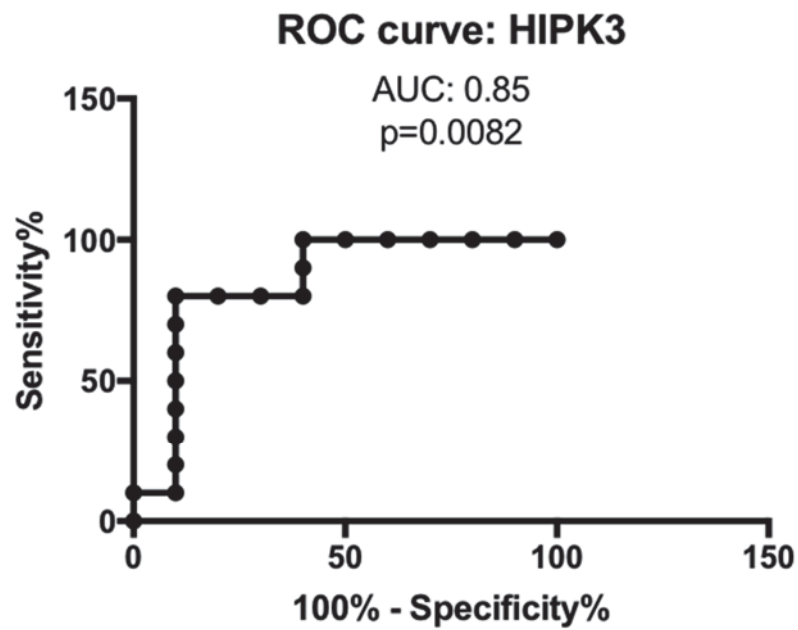


Fig. 2 (continuación)



- ②① N.º solicitud: 202030978
②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.09.2020
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/68** (2006.01)
C12Q1/68 (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2014059178 A1 (RHODE ISLAND HOSPITAL) 17/04/2014, todo el documento.	1-15
A	WO 2016023026 A1 (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER) 11/02/2016, todo el documento.	1-15
A	WO 2020160516 A1 (UNIV CALIFORNIA) 06/08/2020, todo el documento.	1-15
A	WO 2012094643 A2 (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER et al.) 12/07/2012, todo el documento.	1-15
A	WO 2013126834 A1 (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER) 29/08/2013, todo el documento.	1-15
A	BHARDWAJ NEETI et al. MiR-4668 as a Novel Potential Biomarker for Eosinophilic Esophagitis.. Allergy & rhinology (Providence, R.I.) United States., 31/12/2019, Vol. 11, Páginas 2152656720953378, ISSN 2152-6575 (Print), <DOI: doi:10.1177/2152656720953378 pubmed:32923026>. todo el documento.	1-15
A	JHAVERI P LAMBERT K ISHMAEL F JHAVERI P et al. Salivary miRNA Profiles in Pediatric Eosinophilic Esophagitis. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 01/02/2020, Vol. 145, Nº 2, Supplement, Páginas AB343, ISSN 0091-6749 (print) ISSN 1097-6825 (electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.jaci.2019.12.082>. 2020 Annual Meeting of the American-Academy-of-Allergy-Asthma-and-Immunology (AAAAI) Annual Meeting. Philadelphia, PA, USA; March 13 -16, 2020. todo el documento.	1-15
A	LIU YIFEI et al. The expression level and prognostic value of HIPK3 among non-small-cell lung cancer patients in China. OncoTargets and Therapy 2018., 30/11/2017, Vol. 11, Páginas 7459-7469, ISSN 1178-6930(print) ISSN 1178-6930(electronic), <DOI: doi:10.2147/OTT.S166878>. todo el documento.	1-15
A	WO 2017165663 A1 (UNIV ARIZONA) 28/09/2017, todo el documento.	1-15

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
24.08.2021

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/2

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

G01N, C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET