

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 404**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2012 PCT/GB2012/053057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13084002**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2012 E 12803518 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2788767**

54 Título: **Procedimiento para detectar aductos de nucleosomas**

30 Prioridad:

07.12.2011 GB 201121040

07.12.2011 US 201161568090 P

12.12.2011 GB 201121230

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

11.01.2018

73 Titular/es:

BELGIAN VOLITION SPRL (100.0%)

22 Rue Phocas Lejeune

5032 Isnes, BE

72 Inventor/es:

**MICALLEF, JACOB VINCENT;
ECCLESTON, MARK EDWARD y
HERZOG, MARIELLE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 649 404 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para detectar aductos de nucleosomas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a la detección y medida de la presencia de aductos de nucleosoma-proteína y al uso de tales medidas para la detección y el diagnóstico de enfermedades.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cuerpo humano comprende varios cientos de tipos celulares. Todos estos tipos celulares contienen el mismo genoma, pero fenotipos ampliamente diferentes y funciones diferentes en el cuerpo. Esta diversidad fenotípica es debida a la expresión diferencial del genoma en diferentes tipos celulares. El control de la expresión génica diferencial no se entiende totalmente, pero los mecanismos básicos incluyen regulación génica por una serie de señales epigenéticas interconectadas asociadas al gen, incluyendo control del empaquetamiento de cromatina como eucromatina o heterocromatina, control de la localización de nucleosomas y sitios accesibles a nucleasa, metilación del ADN y variación de la estructura de los nucleosomas alrededor de los cuales se envuelve el ADN.

20 El nucleosoma es la unidad básica de la estructura de cromatina y consiste en un complejo proteico de ocho histonas nucleares altamente conservadas (que comprenden un par de cada histona H2A, H2B, H3 y H4). Alrededor de este complejo se envuelven aproximadamente 146 pares de bases de ADN. Otra histona, H1 o H5, actúa como conector y está implicada en la compactación de cromatina. El ADN se enrolla alrededor de nucleosomas consecutivos en una estructura que a menudo se dice que parece de "collar de perlas" y esto forma la estructura básica de la cromatina abierta o eucromatina. En la cromatina compactada o heterocromatina, este collar está enrollado y superenrollado en una estructura cerrada y compleja (Herranz y Esteller, 2007).

El recambio celular normal en adultos humanos implica la creación por división celular de unas 10^{11} células diariamente y la muerte de un número similar, principalmente por apoptosis. Durante el proceso de apoptosis, se degrada la cromatina en mononucleosomas y oligonucleosomas, que se liberan de las células. En condiciones normales, estos se eliminan y el nivel de nucleosomas en circulación encontrado en sujetos sanos es bajo. Se encuentran niveles elevados en sujetos con una variedad de afecciones, incluyendo muchos cánceres, enfermedades autoinmunitarias, afecciones inflamatorias, apoplejía e infarto de miocardio (Holdenrieder y Stieber, 2009).

35 Se pueden detectar mononucleosomas y oligonucleosomas por ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA) y se han reseñado varios procedimientos (Salgame y col., 1997; Holdenrieder y col., 2001; van Nieuwenhuijze y col., 2003). Estos ensayos emplean típicamente un anticuerpo antihistona (por ejemplo, anti-H2B, anti-H3 o anti-H1, H2A, H2B, H3 y H4) como anticuerpo de captura y un anticuerpo anti-ADN o anticomplejo de ADN de H2A-H2B como anticuerpo de detección. Sin embargo, se ha encontrado que los resultados de estos ensayos no coinciden entre sí. Además, aunque la mayoría del ADN en circulación en suero o plasma se reseña que existe como mononucleosomas y oligonucleosomas (Holdenrieder y col., 2001), los niveles medidos de nucleosomas y ADN en suero o plasma no coinciden bien. El coeficiente de correlación entre los resultados de ELISA para niveles de nucleosomas exentos de célula en circulación y los niveles de ADN en circulación medidos por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) instantánea se ha reseñado que es de $r=0,531$ en suero y de $r=0,350$ en plasma (Holdenrieder y col., 2005).

Se usan procedimientos ELISA de nucleosoma en cultivo celular, principalmente como procedimiento para detectar la apoptosis (Salgame y col., 1997; Holdenrieder y col., 2001; van Nieuwenhuijze y col., 2003) y se usan también para la medida de los nucleosomas exentos de célula en circulación en suero y plasma (Holdenrieder y col., 2001). Se han medido los niveles sérico y plasmático de nucleosomas exentos de célula liberados en la circulación por células moribundas mediante procedimientos de ELISA en estudios de una serie de cánceres diferentes para evaluar su uso como biomarcador potencial (Holdenrieder y col., 2001). Se reseña que los niveles medios de nucleosomas en circulación son altos en la mayoría, pero no todos, los cánceres estudiados. Se observaron los niveles mínimos de nucleosomas en circulación máximos en sujetos de cáncer de pulmón. Se observaron los niveles mínimos en cáncer de próstata, que estaban dentro del intervalo normal de sujetos sanos. Sin embargo, se reseña que los sujetos con tumores malignos tienen concentraciones séricas de nucleosomas que variaban considerablemente, y se encontró que algunos sujetos con enfermedad tumoral avanzada tenían bajos niveles de nucleosomas en circulación, dentro del intervalo medido para sujetos sanos (Holdenrieder y col., 2001). Debido a esto y a la variedad de causas no cancerosas de los niveles elevados de nucleosomas, los

niveles de nucleosomas en circulación no se usan clínicamente como biomarcador de cáncer (Holdenrieder y Stieber, 2009).

5 La estructura de los nucleosomas puede variar por modificación postranscripcional (MPT) de proteínas histonas y por la inclusión de proteínas histonas variantes. La MPT de proteínas histonas aparece típicamente en las colas de las ocho histonas nucleares y las modificaciones comunes incluyen acetilación, metilación o ubiquitinación de residuos de lisina, así como metilación de residuos de arginina y fosforilación de residuos de serina.

10 Las modificaciones de histona son conocidas por estar implicadas en la regulación epigenética de la expresión génica (Herranz y Esteller, 2007). La estructura del nucleosoma puede variar también por la inclusión de isoformas de histona alternativas o variantes que son diferentes productos génicos o de empalme y tienen diferentes secuencias aminoacídicas. Las variantes de histona pueden clasificarse en una serie de familias que se subdividen en tipos individuales. Son conocidas las secuencias nucleotídicas de un gran número de variantes de histona y están públicamente disponibles por ejemplo en la Base de datos de Histona del National Human
15 Genome Research Institute NHGRI (Mariño-Ramírez, L., Levine, K.M., Morales, M., Zhang, S., Moreland, R.T., Baxevanis, A.D. y Landsman, D. The Histone Database: an integrated resource for histones and histone fold-containing proteins. Database Vol. 2011. (remitido) y en <http://genome.nhgri.nih.gov/histones/complete.shtml>), la base de datos GenBank (secuencia genética NIH), la base de datos de secuencias nucleotídicas EMBL y el DNA Data Bank of Japan (DDBJ).

20 Se ha mostrado que difieren las variantes de histona y patrones de modificación de histona presentes en células sanas y enfermas en numerosos estudios (la mayoría inmunohistoquímicos) (Herranz y Esteller, 2007). Una desventaja de los procedimientos inmunohistoquímicos para uso clínico es que la recogida de muestra de tejido es invasiva al implicar cirugía o biopsia.

25 Además de la señalización epigenética mediada por la estructura y posición del nucleosoma, el control de la expresión génica en células está también mediado por el estado de metilación del ADN (Herranz y Esteller, 2007). Es conocido en la materia desde hace tiempo que el ADN puede metilarse en la posición 5 de los nucleótidos de citosina formando 5-metilcitosina.

30 Se reseñó la implicación de la metilación del ADN en el cáncer tan temprano como en 1983 (Feinberg y Vogelstein, 1983). Los patrones de metilación de ADN observados en células cancerosas difieren de aquellos de células sanas. Se reseña que los elementos repetitivos, particularmente alrededor de las áreas pericentroméricas, están hipometilados en las células cancerosas respecto a las sanas, pero se reseña que los
35 promotores de genes específicos están hipermetilados en cáncer. Se reseña que el equilibrio de estos dos efectos da como resultado una hipometilación de ADN global en células cancerosas (Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011).

La hipermetilación de ciertos genes específicos puede usarse como biomarcador de diagnóstico para cánceres.
40 Por ejemplo, se reseñó que un procedimiento reseñado para la detección de hipermetilación del gen de septina 9 por amplificación por PCR del ADN extraído de plasma detectaba un 72 % de los cánceres de colon con una tasa de falsos positivos del 10 % (Grutzmann y col., 2008). El estado de metilación del ADN de genes o loci específicos se detecta habitualmente por desaminación de citosina con bisulfito selectiva, pero no de 5-metilcitosina, hasta uracilo, conduciendo a un cambio en la estructura primaria del ADN que puede detectarse
45 secuenciando o por otros medios (Allen y col., 2004).

La hipometilación de ADN global es un distintivo de las células cancerosas (Esteller 2007 y Hervouet y col., 2010). La metilación de ADN global puede estudiarse en células usando técnicas de inmunohistoquímica. Como alternativa, se extrae el ADN de las células para análisis.

50 Es conocido desde hace muchos años que, además de ácido nucleico y proteínas histonas, la cromatina comprende un gran número de proteínas no histonas unidas a su ADN y/o histonas constituyentes (Yoshida y Shimura, 1972). Estas proteínas asociadas a cromatina son de una amplia variedad de tipos y tienen una variedad de funciones, incluyendo factores de transcripción, factores de potenciación de la transcripción, factores
55 de represión de la transcripción, enzimas modificadoras de histona, proteínas reparadoras del daño al ADN y muchos más. El estudio de las proteínas unidas a cromatina se ha llevado a cabo en gran medida por procedimientos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Estos procedimientos son bien conocidos en la materia, pero son complejos, laboriosos y caros.

60 En un procedimiento de ChIP típico, la cromatina celular se reticula de modo que todos los componentes de

proteína y ácido nucleico se enlacen covalentemente entre sí. Se cizalla entonces la cromatina formando una preparación de mononucleosomas y oligonucleosomas. Se añade un anticuerpo de la proteína de interés a la cromatina cizallada para inmunoprecipitar aquellos fragmentos de cromatina que contienen la proteína. El anticuerpo se enlaza normalmente con una fase sólida (p.ej., perlas de plástico) para facilitar el aislamiento del complejo de cromatina que contiene la proteína de interés. Se revierte entonces la reticulación y se elimina la proteína por digestión con una proteinasa. Se aísla el ADN asociado al complejo de cromatina y se analiza para determinar la secuencia de ADN, gen o locus asociado a la unión a proteína particular usando cualquiera de una variedad de técnicas, incluyendo PCR seguida de electroforesis en gel, secuenciación de ADN (ChIP-Seq) o micromatrices de ADN (ChIP-on-chip).

Estos procedimientos de ChIP revelan las secuencias de ADN asociadas a proteínas histonas unidas a cromatina. Se han desarrollado derivados del procedimiento de ChIP para facilitar estudios de la asociación de proteínas no histonas con histonas y nucleosomas, incluyendo por ejemplo ensayos asociados a histonas (Ricke y Bielinsky, 2005).

Muchas proteínas que se unen a cromatina están implicadas en el cáncer y otros mecanismos patológicos, pero su abundancia en forma de aducto de nucleosoma en la circulación no se ha investigado anteriormente. Los ejemplos incluyen la proteína de secuencia 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1), la proteína de Polycomb potenciadora del homólogo de Zeste 2 (EZH2) y el grupo de proteínas receptores nucleares.

El grupo de alta movilidad de proteínas son un componente de la cromatina presente a aproximadamente un 3 % en peso del ADN o histonas. Son proteínas estructurales que se unen a nucleosomas sin ninguna especificidad conocida por la secuencia de ADN subyacente (Gerlitz y col., 2009). La HMGB1 es una proteína cromosómica arquitectural y un mediador proinflamatorio. Está implicada en la muerte celular, apoptosis y en numerosas enfermedades incluyendo diversas afecciones inflamatorias y autoinmunitarias, sepsis, meningitis y neurodegeneración. La sobreexpresión de HMGB1 está asociada a todos los distintivos esenciales del cáncer (Tang y col., 2010). La HMGB1 está estrechamente enlazada con la cromatina de células apoptóticas. Los estudios de complejos de nucleosoma-HMGB1 han mostrado que estos aductos se encuentran en la circulación de sujetos que padecen la enfermedad autoinmunitaria lupus sistémico eritematoso (LSE) y que los aductos están implicados en el desarrollo de anticuerpos antinucleares, lo que es un rasgo clave del LSE. Los nucleosomas no enlazados con HMGB1 no desencadenan una respuesta inmunitaria. La unión de HMGB1 a nucleosomas en estos aductos se demostró por inmunoprecipitación de nucleosomas con un anticuerpo dirigido a ADN o histonas seguida de transferencia Western usando un anticuerpo anti-HMGB1 para demostrar la presencia de HMGB1 en los nucleosomas inmunoprecipitados (Urbonaviciute y col., 2008).

Las proteínas HMGB interactúan con muchas otras proteínas conocidas por afectar a la función de la cromatina y se ha mostrado que aparecen complejos de cromatina que implican proteínas HMGB más proteínas adicionales (Gerlitz y col., 2009). Por tanto, además de aductos de nucleosoma-proteína sencillos, aparecen en la cromatina aductos de complejos de nucleosoma-proteína en que están asociadas dos o más proteínas a nucleosomas.

La EZH2 es un miembro de la familia del grupo Polycomb (PcG) que forma complejos proteicos multiméricos implicados en el mantenimiento del estado represivo transcripcional de los genes. La EZH2 es una enzima de modificación de histona (histona-lisina N-metiltransferasa) que metila el residuo aminoacídico lisina 27 de la histona 3 de nucleosomas. Esta modificación de histona está asociada a la condensación de cromatina y el silenciamiento génico (Cao y col. 2002).

Los receptores nucleares son moléculas que regulan la expresión génica bajo el control de hormonas o ligandos, por ejemplo el receptor de estrógeno (ER) regula la expresión de genes dependientes de estrógeno. Muchas de estas proteínas están implicadas en procesos patológicos, por ejemplo ER está implicado en la progresión de cáncer de mama y muchos tratamientos de cáncer de mama están orientados a ER y/o a la prevención de la interacción de ER con su ligando estradiol.

Además de los aductos de nucleosoma-proteína que aparecen en la célula, hay otros aductos de nucleosoma-proteína que pueden formarse después de la liberación de nucleosomas de la célula después de la muerte celular. Tales aductos de nucleosomas incluyen los aductos de nucleosoma-inmunoglobulina que son un rasgo clave del LSE.

Urbonaviciute y col. (2011) *J. Int. Med.*, 270(4): 309-318 y Urbonaviciute y col. (2008) *J. Exp. Med.*, 205(13): 3007-3018 describen a HMGB1 como un marcador potencial en la sangre de pacientes con LSE. El documento

EP1668368 describe el diagnóstico de afecciones patológicas mediante el análisis de las modificaciones postraduccionales de histona en nucleosomas exentos de célula. El documento WO2005/040814 describe la determinación de la presencia o cantidad de modificación postraduccionales de residuos en secuencias de histona para la detección y el diagnóstico de cáncer. Füllgrabe y col. (2011) *Oncogene*, 30(31): 3391-3404 es una revisión de las modificaciones postraduccionales en histonas que se han ligado al cáncer. Louie y col. (2003) *PNAS*, 100(5): 2226-2230 describe la inmunoprecipitación de complejos de cromatina con anticuerpos antireceptor de andrógeno (AR) para medir la ocupación de cromatina de AR en el gen de antígeno específico de próstata (PSA). Sun y col. (1987) *J. Steroid. Biochem*, 26(1): 83-92 describe una investigación sobre las interacciones entre preparaciones de anticuerpo antireceptor y fracciones de cromatina aisladas de células sensibles a hormonas.

Se reseñan ahora procedimientos de inmunoensayo sencillos para la estimación directa de aductos de proteína-nucleosoma en muestras biológicas. Se han desarrollado procedimientos sencillos para la detección de EZH2, HMGB1 y varios receptores nucleares unidos a nucleosoma y se ha mostrado que tales aductos de nucleosoma pueden detectarse en muestras de suero y tienen uso como biomarcadores en enfermedades.

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un aducto de nucleosoma-proteína como biomarcador en una muestra de sangre para el diagnóstico del cáncer, donde la proteína en aducto con el nucleosoma comprende un factor de transcripción o una enzima modificadora de cromatina.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1: Curva de dosis-respuesta de ELISA para la detección de los niveles de aducto de nucleosoma-EZH2 en cromatina digerida extraída de células Hela diluida en suero equino.

Figura 2: Resultados de ELISA del aducto de nucleosoma-EZH2 para muestras de suero tomadas de 5 sujetos sanos y 11 sujetos con tumores.

Figura 3: Curva de dosis-respuesta de ELISA para la detección de los niveles de aducto de nucleosoma-HMGB1 en cromatina digerida extraída de células Hela diluida en suero equino.

Figura 4: Resultados de ELISA del aducto de nucleosoma-HMGB1 para muestras de suero tomadas de 5 sujetos sanos y 11 sujetos con tumores.

Figura 5: Resultados de ELISA del aducto de nucleosoma-HMGB1 para muestras de suero tomadas de 31 sujetos sanos y 74 sujetos con (A) cáncer de colon, (B) cáncer de mama o (C) cáncer de pulmón.

Figura 6: Curva de dosis-respuesta de ELISA para la detección de los niveles de aducto de nucleosoma-receptor de progesterona en nucleosomas exentos de célula preparados mediante el procedimiento de *Holdenrieder y col., 2001.

Figura 7: Resultados de ELISA para la detección de los niveles de aducto de nucleosoma-receptor de andrógeno en 2 casos de cáncer de próstata y una muestra de nucleosoma exento de célula preparada mediante el procedimiento de *Holdenrieder y col., 2001.

Figura 8: Curva de dosis-respuesta de ELISA para la detección de los niveles de aducto de nucleosoma-receptor alfa de estrógeno (ER α) en nucleosomas exentos de célula preparados mediante el procedimiento de *Holdenrieder y col., 2001.

Figura 9: Resultados de ELISA para la detección de los niveles de aducto de nucleosoma-ER β en cromatina de MCF7 digerida. Se llevó a cabo el ensayo en dos formatos diferentes. En el primer formato, se recubrió el anticuerpo antinucleosoma sobre los pocillos y se biotiniló el anticuerpo anti-ER β . En el segundo formato, se recubrió el anticuerpo anti-ER β sobre los pocillos y se biotiniló el anticuerpo antinucleosoma.

Figura 10: Resultados de ELISA del aducto de H2AZ de nucleosoma-ER β .

Figura 11: Resultados de ELISA del aducto de nucleosoma-ER β para muestras de suero tomadas de 12 sujetos sanos y 16 sujetos con tumores.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un aducto de nucleosoma-proteína como biomarcador en una muestra de sangre para el diagnóstico del cáncer, donde la proteína en aducto con el nucleosoma incluye un factor de transcripción o una enzima modificadora de cromatina. Se ha mostrado que tales dos aductos que contienen HMGB1 y EZH2 están presentes en la circulación de sujetos con cáncer, pero no se detectan en la circulación de sujetos sanos.

Es bien conocido en la materia que los cánceres pueden ser dependientes de hormonas y requerir la presencia

- de hormonas para el crecimiento. Es también bien conocido que las hormonas nucleares funcionan mediante localización nuclear del complejo de hormona unida a receptor y unión a elementos de respuesta hormonal específicos en el genoma. La expresión de genes asociados a los elementos está regulada por la unión del complejo de hormona unida a receptor al elemento de respuesta genómica. En una realización, la divulgación
- 5 proporciona biomarcadores de aducto de receptor hormonal-nucleosoma y aducto de complejo de hormona-receptor hormonal-nucleosoma para caracterizar el estado tumoral de un sujeto. Estos aductos pueden ser aductos en circulación presentes en la sangre o en otro fluido corporal o pueden producirse por la digestión de cromatina de una muestra de tejido tumoral.
- 10 Es bien conocido en la materia que los receptores de hormonas nucleares regulan la expresión génica bajo control hormonal o de ligando. Por ejemplo, el receptor de estrógeno funciona uniéndose a su sustrato (la hormona esteroidea estrógeno) en la membrana de la superficie celular. La unión es seguida por la internalización del complejo de hormona-receptor y la localización intranuclear, donde el receptor se une a elementos de respuesta hormonal específicos en el genoma. La secuencia génica específica a la que se une el
- 15 receptor de estrógeno es conocida como el elemento de respuesta a estrógeno (ERE). La expresión de genes asociados al ERE puede regularse por el receptor y, por ello, por la presencia o nivel de estrógeno en la circulación de un sujeto. Es también bien conocido en la materia que el crecimiento de cáncer de mama está a menudo bajo control estrogénico y que tal cáncer se denomina a menudo dependiente de estrógeno. Como estos tumores sobreexpresan el receptor de estrógeno (ER), se denominan a menudo tumores ER+. El crecimiento
- 20 de tumores dependientes de estrógeno puede retardarse o prevenirse por intervenciones terapéuticas dirigidas a la prevención de la unión de estrógeno al receptor de estrógeno y este es un procedimiento común de tratamiento de cáncer de mama. Los ejemplos de tales tratamientos incluyen el fármaco tamoxifeno, que actúa como antagonista de estrógeno en cáncer de mama dependiente de estrógeno e inhibidores de aromataasa, que retardan o previenen la producción de estrógeno. Sin embargo, con el tiempo, los cánceres evolucionan a
- 25 tumores independientes de estrógeno que crecerán incluso en ausencia de estimulación estrogénica y requerirán tratamientos diferentes. El diagnóstico de tumores dependientes e independientes de estrógeno se practica actualmente de forma rutinaria por inmunotinción de tejido de biopsia tumoral para determinar la abundancia o lo contrario de receptor de estrógeno en las células tumorales. Los médicos clínicos pueden tener que volver a ensayar la dependencia de estrógeno de un tumor repetidamente durante el transcurso del tratamiento tumoral
- 30 para determinar si es apropiado o no un tratamiento dependiente de estrógeno adicional, o si debería alterarse el régimen de tratamiento del sujeto para reflejar la naturaleza cambiante del tumor a medida que progresa la enfermedad. Desgraciadamente, las pruebas actuales son subóptimas y requieren una dolorosa biopsia repetida en cada ocasión que se practica la prueba. En una realización de la invención, se usa la detección de aductos de receptor de estrógeno-nucleosoma en la circulación de pacientes de cáncer de mama como indicador de la unión
- 35 de receptor de estrógeno a ERE en el núcleo de células tumorales como indicador de la dependencia de estrógeno de un tumor, para ayudar a la selección del tratamiento apropiado y para información de pronóstico predictivo. Este procedimiento tiene las ventajas de que es indicativo de unión de ERE-receptor de estrógeno en el tumor, en lugar de un simple indicador de la presencia o abundancia de receptor de estrógeno, y que puede repetirse lo frecuentemente que se desee mediante una sencilla prueba sanguínea sin necesidad de biopsia. Se han desarrollado procedimientos de ELISA sencillos para la detección y cuantificación de aductos de nucleosoma-ER que contienen ambas formas ER α y ER β del receptor. Sorprendentemente, estos aductos están presentes en la circulación de pacientes de cáncer.
- 40 Resultará evidente para los especialistas en la materia que puede aplicarse el mismo principio para la detección de aductos de receptor de estrógeno-nucleosoma en digestiones de cromatina celular producidas a partir del tejido tumoral mismo. Este procedimiento para valorar la dependencia de estrógeno de un tumor es superior a los procedimientos actuales porque es indicativo de la unión de ERE-receptor de estrógeno en el tumor, en lugar de un simple indicador de la presencia o abundancia de receptor de estrógeno.
- 45
- 50 En otra realización de la invención, la detección de la presencia del estrógeno esteroideo mismo en un aducto de complejo de estrógeno-receptor de estrógeno-nucleosoma en la circulación o en otro fluido corporal, o en nucleosomas producidos como digestión de cromatina desde tejido tumoral, se usa como indicador del estado de dependencia de estrógeno de un tumor.
- 55 Se reseña que los nucleosomas en circulación son elevados en endometriosis (Holdenrieder y *col.*; 2001) y, como el tejido de endometriosis es sensible a estrógeno, la unión del receptor de estrógeno en la cromatina de células de endometriosis puede conducir a aductos de receptor de estrógeno-nucleosoma o aductos de complejo de estrógeno-receptor de estrógeno-nucleosoma en la circulación. Los aductos de receptor de estrógeno-nucleosoma o aductos de complejo de estrógeno-receptor de estrógeno-nucleosoma pueden detectarse en un
- 60 fluido corporal como biomarcador de la presencia de una afección ginecológica dependiente de estrógeno

incluyendo, por ejemplo, endometriosis.

De manera similar al cáncer de mama dependiente de estrógeno, el crecimiento de cáncer de próstata dependiente de andrógeno requiere, o se acelera por, andrógeno. Los tumores de próstata dependientes de andrógeno se tratan de forma similar mediante procedimientos que previenen la unión de andrógeno al receptor de andrógeno (AR). Los tumores de próstata dependientes de andrógeno pueden desarrollarse también convirtiéndose en independientes de andrógeno, y por ello resistentes a tratamientos que incluyen castración física o química por fármacos para prevenir la unión de andrógeno a su receptor. El estado de dependencia de andrógeno de un tumor puede determinarse por el nivel de unión de receptor de andrógeno a elementos de respuesta a andrógeno (ARE) en el genoma, y esto puede determinarse mediante el análisis de los niveles de aducto de receptor de andrógeno-nucleosoma presentes en la circulación de un sujeto o en las digestiones de cromatina de tejido de próstata. Las realizaciones de la invención con este fin incluyen la detección de aductos de receptor de andrógeno-nucleosoma o aductos de complejo de andrógeno-receptor de andrógeno-nucleosoma en la circulación o en un fluido corporal de un sujeto o en nucleosomas producidos por digestión de cromatina de tejido tumoral de un sujeto. Se han desarrollado ahora procedimientos de ELISA sencillos para la detección y cuantificación de aductos de nucleosoma-AR y se ha demostrado su utilidad. Se han desarrollado también procedimientos de ELISA sencillos para la detección y cuantificación de aductos de nucleosoma-receptor de progesterona. Pueden abordarse otras enfermedades dependientes de hormona con procedimientos similares de la divulgación. Tales procedimientos incluyen la detección de otros aductos de receptor-nucleosoma que incluyen, por ejemplo, aductos de receptor de glucocorticoide, receptor de hormona tiroidea y receptor de ácido retinoico con nucleosoma para la detección de tumores incluyendo, por ejemplo, diversos tipos de leucemia que implican al receptor de ácido retinoico.

De acuerdo con una realización adicional de la invención, el aducto de nucleosoma-proteína comprende aductos de complejo de hormona-receptor hormonal-nucleosoma. En una realización, los aductos de complejo de hormona-receptor hormonal-nucleosoma comprenden un aducto de complejo de tiroxina-receptor de hormona tiroidea-nucleosoma, un aducto de complejo de triyodotironina-receptor de hormona tiroidea-nucleosoma o un aducto de complejo de ácido retinoico-receptor de ácido retinoico-nucleosoma, un aducto de complejo de andrógeno-receptor de andrógeno-nucleosoma o un aducto de complejo de estrógeno-receptor de estrógeno-nucleosoma. Esta realización de la invención tiene la ventaja de distinguir los aductos activados por hormona así como los aductos que contienen receptor hormonal de tipo silvestre o normal del receptor hormonal que no se une a su ligando, por ejemplo debido a mutación en el transcurso de la progresión de la enfermedad (por ejemplo, en cáncer de mama independiente de estrógeno). Esta realización de la invención puede llevarse a cabo de múltiples modos. En una realización, se usa un anticuerpo u otro ligador dirigido a unirse a la hormona misma en lugar del anticuerpo dirigido a unirse al receptor hormonal. En una realización alternativa, se extrae la hormona de un aducto de complejo de hormona capturada por anticuerpo-receptor hormonal-nucleosoma y se cuantifica mediante procedimientos establecidos, por ejemplo procedimientos de inmunoensayo, procedimientos espectrográficos incluyendo cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida seguida de espectroscopía de masas (LC/MS) o cromatografía de gases seguida de espectroscopía de masas (GC/MS). Por ejemplo, se captura el aducto de complejo de andrógeno-receptor de andrógeno-nucleosoma por anticuerpos inmovilizados dirigidos a unirse a un epítipo presente en el aducto (por ejemplo, en el receptor de andrógeno o en un nucleosoma). Se extrae entonces la hormona del aducto unido a la fase sólida en un disolvente orgánico (por ejemplo, dietiléter). Se transfiere el disolvente, se seca, se redisuelve el andrógeno en tampón de ensayo y se mide su concentración (por ejemplo, mediante inmunoensayo competitivo). Resultará evidente para los especialistas en la materia que esta realización tendrá aplicación particular para hormonas de molécula pequeña tales como hormonas esteroideas y tiroideas.

La presente invención está encaminada a la detección de proteínas que están unidas a nucleosomas. Esto puede realizarse mediante una prueba ELISA de doble anticuerpo en que un anticuerpo está dirigido a unirse a nucleosomas y el otro está dirigido a unirse a la proteína unida al nucleosoma. Sin embargo, el anticuerpo dirigido a unirse al nucleosoma no tiene que estar dirigido a todo el complejo de nucleosoma, sino que puede estar dirigido a una proteína o ácido nucleico parte componente del nucleosoma. En esta realización de la invención, el anticuerpo empleado para unirse al nucleosoma puede dirigirse a unirse a cualquier parte componente de un nucleosoma incluyendo, por ejemplo, a una histona particular, modificación de histona, variante o isoforma de histona o a un nucleótido particular o nucleótido modificado. Se ha mostrado que este diseño de ensayo funciona bien usando el ejemplo de uso de un anticuerpo dirigido a unirse a la variante de histona H2AZ como ligador de nucleosomas. Resultará evidente para los especialistas en la materia que este procedimiento tiene la ventaja adicional de unirse selectivamente solo a aquellos nucleosomas que contienen tanto la proteína de interés en el aducto como H2AZ. Este diseño proporciona un procedimiento de un ensayo para probar cualquier combinación de proteína de aducto con cualquier histona particular, modificación de

histona, variante de histona, nucleótido, nucleótido modificado u otra estructura de nucleosoma.

De acuerdo con un segundo aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un aducto de nucleosoma-proteína en una muestra que comprende las etapas de:

- 5
- (i) poner en contacto la muestra con un primer agente de unión que se une a nucleosomas o un componente de los mismos;
 - (ii) poner en contacto los nucleosomas o muestra con un segundo agente de unión que se une a una proteína en aducto con un nucleosoma;
- 10
- (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a la proteína en aducto en la muestra y
 - (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de aductos de nucleosoma en la muestra.

Resultará evidente para los especialistas en la materia que el agente de unión para detectar puede seleccionarse para ser el anticuerpo dirigido a la proteína en aducto o al nucleosoma o a una parte componente del nucleosoma.

De acuerdo con un tercer aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un aducto de nucleosoma en una muestra que comprende las etapas de:

- 20
- (ii) poner en contacto una muestra con un primer agente de unión que se une a una proteína en aducto con un nucleosoma;
 - (ii) poner en contacto los nucleosomas o muestra con un segundo agente de unión que se une a nucleosomas o un componente de los mismos;
- 25
- (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a nucleosomas o un componente de los mismos en la muestra y
 - (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de aductos de nucleosoma en la muestra.

30 En una realización, la proteína en aducto con el nucleosoma es un factor de transcripción. En una realización adicional, el factor de transcripción es un receptor de hormona nuclear.

En una realización, la enzima modificadora de cromatina es una enzima de acetilación, desacetilación, metilación, desmetilación, fosforilación, desfosforilación, ubiquitinación, desubiquitinación, sumoilación, desumoilación o ADN metiltransferasa de histona. En una realización alternativa, la enzima modificadora de cromatina es EZH2.

En una realización, cuando el aducto de nucleosoma-proteína incluye un receptor de hormona nuclear, dicho receptor de hormona nuclear es un receptor de estrógeno, receptor de andrógeno, receptor de progesterona, receptor de hormona tiroidea, receptor de glucocorticoide o receptor de ácido retinoico. En una realización alternativa, cuando el aducto de nucleosoma-proteína incluye un receptor nuclear, dicho receptor de hormona nuclear es el receptor de estrógeno, receptor de andrógeno o receptor de ácido retinoico.

En una realización, cuando el aducto de nucleosoma-proteína incluye una hormona, dicha hormona es una hormona tiroidea, un estrógeno, un andrógeno o ácido retinoico.

En una realización, cuando el aducto de nucleosoma-proteína incluye un receptor hormonal, dicho receptor hormonal es el receptor de estrógeno, receptor de andrógeno, receptor de progesterona, receptor de hormona tiroidea o receptor de ácido retinoico.

50 Se ha mostrado que el procedimiento puede practicarse usando un anticuerpo dirigido al nucleosoma mismo en combinación con un anticuerpo dirigido a unirse a la proteína en aducto con el nucleosoma o usando un anticuerpo dirigido a un componente de un nucleosoma, de nuevo en combinación con un anticuerpo dirigido a unirse a la proteína en aducto con el nucleosoma. En una realización, el anticuerpo o ligador de nucleosoma o componente de nucleosoma está dirigido a unirse a un epítipo de nucleosoma epigenético particular, por ejemplo cualquier variante de histona (p.ej. H2AZ), cualquier modificación de histona (p.ej., trimetil-H3K9) o cualquier nucleótido o nucleótido modificado (p.ej., 5-metilcitosina). En una realización alternativa, el ligador de nucleosoma o componente de nucleosoma está dirigido a unirse a una estructura de señal epigenética particular de tal modo que solo se detecte un subconjunto particular de aductos de nucleosoma que contengan dicha estructura de señal epigenética.

60

En una realización, el agente de unión usado es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un aptámero. En una realización adicional, el agente de unión usado es un anticuerpo.

5 La muestra puede ser un fluido biológico. La muestra puede ser sangre o suero o plasma. Resultará evidente para los especialistas en la materia que la detección de aductos de nucleosoma en un fluido corporal tiene la ventaja de ser un procedimiento mínimamente invasivo que no requiere biopsia.

10 En algunos casos, sin embargo, puede ser preferible valorar el estado del aducto de nucleosoma de una célula directamente produciendo nucleosomas a partir de esa célula y analizando en los nucleosomas la presencia de aductos de nucleosoma particulares.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar un aducto de nucleosoma en una célula que comprende las etapas de:

15

- (i) aislar cromatina de una célula;
- (ii) digerir, sonicar o degradar de otro modo la cromatina formando mononucleosomas y/u oligonucleosomas y
- (iii) detectar o medir la presencia del aducto de nucleosoma de acuerdo con un procedimiento de ELISA descrito en cualquiera de los segundo a sexto aspectos anteriores.

20

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar o diagnosticar un estado patológico en un sujeto animal o humano que comprende las etapas de:

- (i) detectar o medir un aducto de nucleosoma en un fluido corporal de un sujeto; y
- 25 (ii) usar el nivel de aducto de nucleosoma detectado para identificar el estado patológico del sujeto.

30 Puede usarse la presencia de un aducto de nucleosoma en una muestra para determinar el régimen de tratamiento óptimo para un sujeto necesitado de tal tratamiento. Es un ejemplo la detección de un aducto de receptor de hormona nuclear-nucleosoma o un aducto de complejo de hormona-receptor hormonal-nucleosoma para la valoración de la dependencia de hormona de un tumor.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para la valoración en un sujeto animal o humano de la idoneidad de un tratamiento médico que comprende las etapas de:

- 35 (i) detectar o medir un aducto de nucleosoma en un fluido corporal del sujeto; y
- (ii) usar el nivel de aducto de nucleosoma detectado como parámetro para la selección de un tratamiento adecuado para el sujeto.

40 De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para monitorizar un tratamiento de un sujeto animal o humano que comprende las etapas de:

- (i) detectar o medir un aducto de nucleosoma en un fluido corporal del sujeto;
- (ii) repetir la detección o medida de un aducto de nucleosoma en un fluido corporal del sujeto en una o más ocasiones;
- 45 (iii) usar cualquier cambio en el nivel de aducto de nucleosoma detectado como parámetro para cualquier cambio en la afección del sujeto.

El aducto de nucleosoma puede detectarse o medirse como uno de un panel de medidas.

50 De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar o medir un aducto de nucleosoma, solo o como parte de un panel de medidas, con fines de detectar o diagnosticar un estado patológico, o para valoración en un sujeto animal o humano de la idoneidad de un tratamiento médico, o para monitorizar un tratamiento de un sujeto animal o humano para uso en sujetos con cáncer real o sospechado, tumores benignos, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, endometriosis, 55 enfermedad infecciosa, sepsis, apoplejía o infarto de miocardio.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para identificar un biomarcador de aducto de nucleosoma para detectar o diagnosticar un estado patológico en un sujeto animal o humano que comprende las etapas de:

60

- (i) detectar o medir un aducto de nucleosoma en un fluido corporal del sujeto;
- (ii) detectar o medir un aducto de nucleosoma en un fluido corporal de un sujeto sano o un sujeto de control; y
- (iii) usar la diferencia entre los niveles detectados en los sujetos enfermos y de control para identificar si un aducto de nucleosoma es útil como biomarcador para el estado patológico.

5

Además de los componentes de histona y ácido nucleico, la cromatina es conocida por contener una amplia variedad de proteínas que practican un amplio intervalo de funciones. Se seleccionaron HMGB1, EZH2 y varios receptores nucleares como ejemplos de estas proteínas y se han desarrollado procedimientos de ELISA sencillos para la detección de aductos de mononucleosoma y oligonucleosoma de estas proteínas. Se practicaron estos

10

procedimientos de ELISA directamente en muestras de suero tomadas de sujetos sanos y enfermos y los procedimientos no requieren extracción de muestra ni otro pretratamiento de muestra. Sorprendentemente, se ha mostrado que estos aductos de nucleosoma pueden detectarse en el suero de sujetos de cáncer y que los ensayos ELISA de aducto de nucleosoma son útiles en la detección y diagnóstico de estados patológicos.

15

La HMGB1 es una proteína de patrón molecular asociado al daño (DAMP) asociada a muerte celular, apoptosis y numerosas enfermedades, incluyendo diversas afecciones inflamatorias y autoinmunitarias, sepsis, meningitis, neurodegeneración, LSE y cáncer (Tang y *col.*; 2010). Aparece una expresión elevada de HMGB1 en muchos cánceres y se cree que está asociada a invasión y metástasis (Sims y *col.*, 2010). Aparecen también niveles elevados de HMGB1 en la sangre de pacientes de cáncer así como en una variedad de otras afecciones

20

(Stoetzer y *col.*, 2012). La HMGB1 en circulación puede medirse por ELISA, pero tales medidas no se usan en la práctica clínica rutinaria porque la HMGB1 en circulación aparece en formas unida y libre y los procedimientos de inmunotransferencia Western actualmente disponibles para distinguir estas no son adecuados para uso rutinario.

25

Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento fiable para distinguir entre HMGB1 libre y complejos de HMGB1 (Urbonaviciute y Voll, 2011). Es una clase importante de complejos de HMGB1 en circulación los aductos de HMGB1-nucleosoma y un aspecto de la presente divulgación está dirigido a la detección de aductos de HMGB1-nucleosoma y otros aductos de HMG-nucleosoma. Se ha mostrado que los aductos de HMG-nucleosoma pueden medirse en la sangre de pacientes de cáncer usando un procedimiento ELISA rápido y sencillo.

30

La HMGB1 está estrechamente enlazada con la cromatina de células apoptóticas. Los estudios de complejos de nucleosoma-HMGB1 han mostrado que estos aductos se encuentran en la circulación de sujetos que padecen la enfermedad autoinmunitaria LSE y que los aductos están implicados en el desarrollo de anticuerpos antinucleares, lo que es un rasgo clave del LSE. La presencia de estos aductos en la circulación no se ha usado con fines de diagnóstico clínico porque los procedimientos de transferencia Western usados para su detección

35

son caros, lentos y laboriosos y no adecuados para uso clínico rutinario. La presente divulgación supera estos inconvenientes.

La EZH2 es una enzima de modificación de cromatina (histona lisina N-metiltransferasa) que metila el residuo aminoacídico lisina 27 de la histona 3 de nucleosomas, conduciendo a la condensación de cromatina y el silenciamiento génico (Cao y *col.*; 2002). Esta proteína es conocida por unirse a la cromatina en el núcleo de células vivas. Sorprendentemente, se ha mostrado que la EZH2 permanece unida a nucleosomas después de la muerte celular y pueden detectarse aductos de mononucleosoma-EZH2 y oligonucleosoma-EZH2 en el suero de sujetos de cáncer usando los procedimientos ELISA novedosos divulgados en la presente memoria.

40

45

Es conocido que las enzimas modificadoras de cromatina están implicadas en el cáncer (Fullgrabe y *col.*, 2011) y la inhibición de la actividad de estas enzimas mediante el uso de fármacos orientados es una forma importante de terapia de cáncer. Estos fármacos incluyen, por ejemplo y sin limitación, inhibidores del complejo de desacetilación de histona (HDACi), inhibidores de histona metiltransferasa (HMTi) e inhibidores de ADN metiltransferasa (DNMTi). Aunque la presencia de aductos de HMGB1 en la circulación es conocida por ser patológica y estar asociada a anticuerpos antinucleares, el hallazgo de que los aductos de enzima modificadora de cromatina-nucleosoma están presentes en la circulación no se ha reseñado anteriormente. Los ensayos de aductos de enzima modificadora de cromatina-nucleosoma tienen múltiples usos en el cáncer, incluyendo por ejemplo en la valoración de los estados patológicos cancerosos y en la determinación de la eficacia de los fármacos inhibidores de la enzima modificadora de cromatina, por ejemplo para determinar si el nivel de aducto

50

de enzima modificadora de cromatina-nucleosoma en circulación se altera por el tratamiento con fármacos particulares. El procedimiento de la divulgación puede usarse para determinar los niveles de aducto de enzima modificadora de cromatina-nucleosoma en circulación para una amplia variedad de fines de diagnóstico patológico, incluyendo detección, monitorización, pronóstico, diagnóstico diferencial de enfermedades y elección de regímenes de tratamiento. Se ha mostrado que los aductos de nucleosoma que contienen la enzima HMT

55

EZH2 pueden detectarse en la circulación de pacientes de cáncer. Resultará evidente para los especialistas en la

60

materia que el uso de la invención puede aplicarse a otras enzimas modificadoras de cromatina, incluyendo las enzimas HDAC y DNMT anteriormente mencionadas, así como muchas otras enzimas incluyendo, por ejemplo, enzimas para acetilación, desmetilación, fosforilación, desfosforilación, ubiquitinación, desubiquitinación, sumoilación y desumoilación de histona.

5

Los receptores nucleares ejercen sus efectos reguladores génicos en el núcleo bajo el control hormonal de ligando. Los ejemplos incluyen los receptores de hormona esteroidea, receptor tiroideo, receptor de glucocorticoide y ácido retinoico y receptor de vitamina D. Estos receptores están implicados en una variedad de cánceres y otros mecanismos patológicos. Algunos ejemplos incluyen la implicación del receptor de ácido retinoico (RAR) en la leucemia, del receptor de estrógeno (ER) en el cáncer de mama y endometriosis, del receptor de andrógeno (AR) en el cáncer de próstata y del receptor de hormona tiroidea en enfermedad y cáncer tiroideos.

Sorprendentemente, se ha mostrado que los aductos de receptor nuclear-nucleosoma pueden detectarse en la circulación de pacientes de cáncer.

Por tanto, todas las proteínas asociadas a cromatina intracelular que se eligieron para el estudio pueden encontrarse en el suero de pacientes de cáncer en forma de aductos de nucleosoma. Estos hallazgos indican que tales aductos pueden no ser inhabituales y que muchos de tales aductos de nucleosoma-proteína intracelulares, que implican muchas proteínas asociadas a cromatina diferentes, pueden retener su integridad después de la muerte celular y ser susceptibles de detección en el suero de pacientes de cáncer, enfermedad autoinmunitaria e inflamatoria mediante el procedimiento de la presente divulgación.

Se ha usado un anticuerpo antihistona como anticuerpo de captura para estos ensayos en combinación con un anticuerpo antiproteína de cromatina específico apropiado (anti-HMGB1, anti-EZH2 o antireceptor nuclear). Se han usado los ensayos para mostrar que pueden medirse aductos de nucleosoma que contienen proteínas específicas en muestras de sangre tomadas de sujetos con cáncer y son discriminativos para uso como biomarcadores no invasivos o mínimamente invasivos. Los niveles de aducto de nucleosoma detectados en muestras de suero tomadas de sujetos enfermos diferían de aquellos detectados en muestras de suero de sujetos sanos.

Se han medido los niveles de aductos de nucleosoma-HMGB1 y aductos de nucleosoma-EZH2 exentos de célula en circulación en muestras de sangre tomadas de 3 sujetos con cáncer de colon, 6 sujetos con cáncer de pulmón y 2 sujetos con cáncer pancreático y se han comparado estos con los niveles presentes en muestras de sangre de 5 sujetos sanos así como con una preparación producida artificialmente de nucleosomas séricos de sujetos sanos preparada como se describe en la bibliografía (*Holdenrieder y col., 2001) y con una preparación comercialmente disponible de nucleosomas preparados por digestión de cromatina extraída de células Hela.

Se calcularon los intervalos normales a partir de los resultados de los 5 sujetos sanos (resultado medio \pm 2 desviaciones estándares de la media) para los aductos de nucleosoma-HMGB1 y nucleosoma-EZH2 y se examinaron los resultados para sujetos de cáncer para ver si entran dentro, o fuera, del intervalo normal respectivo. Los datos muestran que 2 de las 3 muestras de cáncer de colon, 4 de las 6 muestras de cáncer de pulmón y 1 de las 2 muestras de cáncer pancreático tenían niveles elevados de aducto de nucleosoma-HMGB1, y de forma similar, que 2 de las 3 muestras de cáncer de colon, 4 de las 6 muestras de cáncer de pulmón y 1 de las 2 muestras de cáncer pancreático tenían niveles elevados de aducto de nucleosoma-EZH2 (resultados de densidad óptica mayores que el máximo del intervalo normal).

Se han medido de forma similar los niveles de aductos de receptor nuclear-nucleosoma en pacientes sanos y enfermos y se ha mostrado que estos están presentes en el suero de pacientes de cáncer.

50

Las proteínas que se unen a cromatina incluyen, sin limitación, receptores nucleares, proteínas del grupo de alta movilidad (tales como HMGB1), proteínas Polycomb, enzimas de modificación de cromatina (tales como EZH2), enzimas de modificación de ADN, receptores nucleares, factores de transcripción, proteínas arquitecturales o estructurales, factores de potenciación, factores de represión de la transcripción, proteínas de replicación, proteínas de reparación del daño de ADN y cualquier otra proteína implicada en el control de la expresión génica, empaquetamiento de cromatina o replicación.

Los aductos de nucleosoma pueden aparecer también debido a la unión de nucleosomas presentes en un fluido biológico después de la muerte celular. Sería un ejemplo de tal aducto un aducto de nucleosoma-anticuerpo formado en una enfermedad autoinmunitaria tal como LSE.

60

- Por tanto, en un aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento para la detección o medida de la presencia de un complejo o aducto de nucleosoma-proteína. Los aductos de nucleosoma para medir pueden ser de cualquier origen incluyendo, sin limitación, aductos de nucleosoma de origen natural presentes en fluidos biológicos como consecuencia de una condición sana o enferma o aductos de nucleosoma producidos por la digestión de cromatina extraída de células, o pueden producirse por apoptosis inducida o necrosis de células (por ejemplo, mediante el procedimiento de *Holdenrieder y col.; 2001). Sorprendentemente, se ha mostrado que los aductos de nucleosoma aparecen en todas estas situaciones y pueden detectarse mediante el procedimiento de la divulgación.
- En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar o medir la presencia de un aducto de nucleosoma-proteína en un fluido biológico.
- En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar o diagnosticar la presencia, tipo, recurrencia o gravedad de una enfermedad o valorar el fármaco óptimo u otras opciones de tratamiento ensayando en una muestra de sujeto la presencia o nivel de uno o más complejos o aductos de nucleosoma-proteína.
- En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar o diagnosticar la presencia, tipo, recurrencia o gravedad de una enfermedad o valorar el fármaco óptimo u otras opciones de tratamiento ensayando en una muestra tomada de un sujeto la presencia o nivel de un complejo o aducto de nucleosoma-proteína como parte de un panel de pruebas. Se ha reseñado un procedimiento ELISA para la detección de nucleosomas exentos de célula que contienen diferentes modificaciones de histona (Bawden y col.; 2005).
- Por tanto, tal panel de pruebas puede consistir, por ejemplo, en dos o más medidas de nucleosomas que contienen diferentes epítomos de nucleosoma; incluyendo sin limitación diferentes aductos y/o modificaciones de histona y/o variantes de histona y/o nucleótidos modificados y/o medidas de nucleosomas *per se*, o cualquier combinación o relación de cualquiera de estos y cualquier otro epítomo de nucleosoma, como indicador del estado de salud o enfermedad de un sujeto.
- Se concluye que el procedimiento divulgado es un procedimiento exitoso para la detección y la medida de aductos de nucleosoma que contienen proteínas particulares, y que este procedimiento es un procedimiento superior para la detección de aductos de nucleosomas que los procedimientos de la materia actuales. El procedimiento es rápido, de bajo coste y adecuado para uso en medios y fluidos biológicos complejos incluyendo sangre y sus derivados. Se ha demostrado que el procedimiento puede usarse para detectar aductos de nucleosoma en sangre, y que este puede usarse como biomarcador para cáncer. Resultará evidente para los especialistas en la materia que un biomarcador presente en la sangre tiene valor para un amplio intervalo de fines de diagnóstico y cribado de enfermedades para cáncer y otras enfermedades que están asociadas a nucleosomas en circulación elevados (Holdenrieder y col., 2001).
- De acuerdo con un aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento de anticuerpo doble, inmunométrico o de inmunoensayo en sándwich para detectar y medir aductos de nucleosoma exentos de célula en una muestra. Es un ejemplo de este aspecto un inmunoensayo que comprende las etapas de:
- (i) poner en contacto una muestra que puede contener aductos de nucleosoma con un primer anticuerpo u otro ligador que se una a nucleosomas o un componente de los mismos;
 - (ii) poner en contacto los nucleosomas o muestra con un segundo anticuerpo u otro ligador que se una a una proteína que puede estar presente como aducto de nucleosoma-proteína;
 - (iii) detectar y/o cuantificar la unión de dicho segundo anticuerpo u otro ligador a un aducto de nucleosoma-proteína en la muestra; y
 - (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de un aducto de nucleosoma-proteína en la muestra.
- De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar y medir aductos de nucleosoma exentos de célula en una muestra mediante un inmunoensayo inmunométrico que comprende las etapas de:
- (i) poner en contacto la muestra que puede contener aductos de nucleosoma que contienen una proteína particular con un primer anticuerpo u otro ligador que se una a la proteína de interés;

- (ii) poner en contacto los nucleosomas o la muestra con un segundo anticuerpo u otro ligador que se una a nucleosomas o un componente de los mismos;
 - (iii) detectar y/o cuantificar la unión de dicho segundo anticuerpo u otro ligador a una muestra de nucleosomas con un segundo anticuerpo u otro ligador que se una a nucleosomas o un componente del mismo en la muestra;
- 5 y
- (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de un aducto de nucleosoma en la muestra.

Resultará evidente para los especialistas en la materia que el anticuerpo u otro ligador usado para unirse a nucleosomas o un componente de los mismos en la fase (i) del primer aspecto anterior y en la fase (ii) del segundo aspecto anterior puede ser un anticuerpo (u otro ligador) dirigido contra nucleosomas intactos o contra cualquier parte componente de un nucleosoma incluyendo, sin limitación, una histona, una variante de histona, una modificación de histona, un nucleótido, un nucleótido modificado u otra parte del componente de ADN de un nucleosoma. Por tanto, en un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar (solo) aquellos aductos de nucleosoma-proteína que contienen adicionalmente otro rasgo al que está dirigido este ligador incluyendo, sin limitación, una modificación de histona, variante de histona o nucleótido particular. Es una ventaja de este diseño que el epítipo del componente de nucleosoma y el epítipo de la proteína en aducto del ensayo pueden seleccionarse para ser epítipos cuyos niveles difieren ambos en gran medida en paciente sanos o enfermos, o en otro estado del paciente bajo investigación. Por tanto, es probable reducir la proporción de nucleosomas detectados por el ensayo, pero aumentar la selectividad o especificidad clínica del ensayo.

Se ha practicado este diseño de ensayo usando un anticuerpo dirigido al componente H2AZ de nucleosoma como anticuerpo antinucleosoma junto con anticuerpos anti-EZH2 y se ha mostrado que los aductos de nucleosoma-EZH2 asociados específicamente a H2AZ pueden detectarse mediante tales ensayos y que estos ensayos pueden usarse para discriminar entre muestras tomadas de sujetos sanos y enfermos.

En un aspecto adicional de la invención, el aducto de nucleosoma para detectar puede contener más de una proteína. Las proteínas adicionales en un aducto pueden unirse directa o indirectamente al nucleosoma. Por ejemplo, un nucleosoma puede unirse a una proteína HMGB y adicionalmente a una proteína o proteínas adicionales. La proteína o proteínas adicionales pueden unirse directamente al nucleosoma o pueden unirse a la proteína HMGB, y por ello indirectamente al nucleosoma. Los aductos de nucleosoma pueden contener grandes complejos de proteína consistentes en múltiples componentes de proteína, donde la unión de una proteína particular en el aducto de complejo al nucleosoma puede ser a través de múltiples conexiones de unión intermedias. Resultará evidente para los especialistas en la materia que una proteína unida a un nucleosoma en un aducto de nucleosoma, directa o indirectamente, puede detectarse mediante un procedimiento de la presente divulgación.

Resultará evidente para los especialistas en la materia que los procedimientos de la divulgación descritos incluyen una variedad de realizaciones, incluyendo ensayos de tipo biosensor y ensayos exentos de marcación del tipo comercializado, por ejemplo, por ForteBio Incorporated de EE.UU.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar la proporción de nucleosomas que comprende un aducto de nucleosoma particular en una muestra que comprende las etapas de:

- (i) detectar o medir el nivel de nucleosomas en una muestra;
- (ii) detectar o medir el nivel de un aducto de nucleosoma de acuerdo con un procedimiento de la presente divulgación; y
- (iii) usar las dos medidas para determinar la proporción de nucleosomas que comprende el aducto de nucleótido.

Se ha mostrado que la detección y la medida de aductos de nucleosoma en la sangre tomada de sujetos pueden usarse como procedimiento de diagnóstico para identificar sujetos con cáncer y para diferenciarlos de los sujetos sanos. De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar o diagnosticar la presencia de una enfermedad midiendo o detectando la presencia y/o el nivel o concentración de aductos de nucleosoma exentos de célula en un fluido corporal, y usando el nivel detectado como biomarcador del estado patológico de un sujeto incluyendo, sin limitación, un diagnóstico clínico de una enfermedad, un diagnóstico diferencial de un tipo o subtipo de enfermedad o un pronóstico de enfermedad, o una recaída de enfermedad o un diagnóstico de la susceptibilidad del sujeto a regímenes de tratamiento. Se apreciará por los especialistas en la materia que los fluidos corporales usados para ensayo de diagnóstico incluyen, sin limitación, sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y otros fluidos. En una realización preferida, el fluido

corporal seleccionado como muestra es sangre, suero o plasma. La respuesta al ensayo, nivel, concentración o cantidad de un aducto de nucleosoma en un fluido corporal pueden expresarse en términos absolutos o términos relativos, por ejemplo sin limitación como la proporción del nivel de nucleosoma total presente o como la relación del nivel de nucleosomas que contienen otra estructura de nucleosoma tal como una modificación de histona o del nivel de ADN total.

La medida del aducto de nucleosoma puede usarse como miembro de un panel de diagnóstico de pruebas o medidas para la detección o el diagnóstico del estado patológico de un sujeto incluyendo, sin limitación, un diagnóstico clínico de una enfermedad, un diagnóstico diferencial de un tipo o subtipo de enfermedad o un pronóstico de enfermedad o una recaída de enfermedad o un diagnóstico de la susceptibilidad del sujeto a regímenes de tratamiento.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar o medir la presencia y/o el nivel de unión a cromatina de una proteína en una célula que comprende las etapas de:

- 15 (i) aislar cromatina de una célula;
- (ii) degradar la cromatina formando mononucleosomas y/u oligonucleosomas; y
- (iii) detectar o medir la presencia de un aducto de nucleosoma en los mononucleosomas y/u oligonucleosomas mediante un procedimiento de inmunoensayo de la divulgación.

Los procedimientos para producir mononucleosomas y/u oligonucleosomas a partir de cromatina son bien conocidos en la materia e incluyen digestión enzimática y sonicación (Dai y *col.*, 2011). Se ha demostrado este aspecto para nucleosomas producidos a partir de células Hela y MCF7.

Resultará evidente para los especialistas en la materia que los términos anticuerpo, ligador o ligando no son limitantes, sino que pretenden incluir fragmentos de anticuerpo, aptámeros o cualquier ligador capaz de unirse a moléculas o entidades particulares y que puede usarse cualquier ligador adecuado en el procedimiento divulgado.

Resultará también evidente que el término nucleosomas pretende incluir mononucleosomas y oligonucleosomas y cualquiera de tales fragmentos de cromatina que pueda analizarse en medios fluidos.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento para identificar un biomarcador aducto de nucleosoma para detectar o diagnosticar el estado patológico en animales o seres humanos que comprende las etapas de:

- 35 (i) detectar o medir el nivel de un aducto de nucleosoma exento de célula en un fluido corporal de sujetos enfermos;
- (ii) detectar o medir el nivel de un aducto de nucleosoma exento de célula en un fluido corporal de sujetos de control; y
- 40 (iii) usar la diferencia entre los niveles detectados en los sujetos enfermos y de control para identificar si un aducto de nucleosoma es útil como biomarcador para esa enfermedad.

Resultará evidente para los especialistas en la materia que los sujetos de control pueden seleccionarse con una variedad de bases que pueden incluir, por ejemplo, sujetos conocidos por estar exentos de la enfermedad o pueden ser sujetos con una enfermedad diferente (por ejemplo, para la investigación de diagnóstico diferencial).

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para identificar un biomarcador de aducto de nucleosoma para valorar el pronóstico de un animal o sujeto humano enfermo que comprende las etapas de:

- 50 (i) detectar o medir el nivel de un aducto de nucleosoma exento de célula en un fluido corporal de sujetos enfermos; y
- (ii) correlacionar el nivel de aducto de nucleosoma exento de célula detectado en un fluido corporal de sujetos enfermos con el resultado clínico de la enfermedad de los sujetos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para identificar un biomarcador de aducto de nucleosoma para usar para la selección de un régimen de tratamiento para un sujeto animal o humano enfermo necesitado de tratamiento que comprende las etapas de:

- 60 (i) detectar o medir el nivel de un aducto de nucleosoma exento de célula en un fluido corporal de sujetos

enfermos; y

(ii) correlacionar el nivel de aducto de nucleosoma exento de célula detectado en un fluido corporal de sujetos enfermos con la eficacia observada de un régimen de tratamiento en esos sujetos.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para identificar un biomarcador de aducto de nucleosoma para usar para monitorizar el tratamiento de un sujeto animal o humano enfermo que comprende las etapas de:

(i) detectar o medir el nivel de un aducto de nucleosoma exento de célula en un fluido corporal de un sujeto

10 enfermo;

(ii) repetir dicha detección o medida en una o más ocasiones durante la progresión de la enfermedad del sujeto; y

(iii) correlacionar el nivel de aducto de nucleosoma exento de célula detectado en un fluido corporal de un sujeto enfermo con la progresión de la enfermedad en el sujeto.

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un biomarcador identificado mediante el procedimiento como se define en la presente memoria.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona ligandos o ligadores, tales como compuestos de origen natural o sintetizados químicamente, capaces de unión específica al biomarcador. Un ligando o ligador de acuerdo con la divulgación puede comprender un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo, o un ligando sintético tal como un anticuerpo plástico, o un aptámero u oligonucleótido capaz de unión específica al biomarcador. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo capaz de unión específica al biomarcador. Un ligando de acuerdo con la divulgación puede marcarse con un marcador detectable, tal como un marcador luminiscente, fluorescente, enzimático o radiactivo; como alternativa o

20 adicionalmente, un ligando de acuerdo con la divulgación puede marcarse con un marcaje de afinidad, p.ej. un marcaje de biotina, avidina, estreptavidina o His (p.ej., hexa-His). Como alternativa, la unión de ligando puede determinarse usando tecnología exenta de marcación, por ejemplo aquella de ForteBio Inc.

Un biosensor de acuerdo con la divulgación puede comprender el biomarcador o un mimético estructural/conformacional del mismo capaz de unión específica a un anticuerpo contra el biomarcador. Se proporciona también una matriz que comprende un ligando o mimético como se describe en la presente memoria.

30

Se proporciona también por la divulgación el uso de uno o más ligandos como se describen en la presente memoria, que pueden ser de origen natural o sintetizados químicamente, y es adecuadamente un péptido, anticuerpo o fragmento del mismo, aptámero u oligonucleótido, o el uso de un biosensor de la divulgación, o un kit de la divulgación, para detectar y/o cuantificar el biomarcador. En estos usos, la detección y/o cuantificación pueden practicarse en una muestra biológica como se define en la presente memoria.

35

Se proporcionan kits de diagnóstico o monitorización para practicar los procedimientos de la divulgación. Tales kits comprenderán adecuadamente un ligando de acuerdo con la divulgación para la detección y/o cuantificación del biomarcador y/o un biosensor y/o una matriz como se describe en la presente memoria, opcionalmente junto con instrucciones para el uso del kit.

40

Es un aspecto adicional de la divulgación un kit para detectar la presencia de un estado patológico, que comprende un biosensor capaz de detectar y/o cuantificar uno o más de los biomarcadores definidos en la presente memoria.

45

Los biomarcadores para detectar la presencia de una enfermedad son dianas esenciales para el descubrimiento de dianas novedosas y moléculas farmacológicas que retarden o detengan la progresión del trastorno. Como el nivel de biomarcador es indicativo de enfermedad y de respuesta farmacológica, el biomarcador es útil para la identificación de compuestos terapéuticos novedoso en ensayos *in vitro* y/o *in vivo*. Los biomarcadores pueden emplearse en procedimientos para el cribado de compuestos que modulen la actividad del biomarcador.

50

Por tanto, en un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona el uso de un ligador o ligando como se describe que puede ser un péptido, anticuerpo o fragmento del mismo o aptámero u oligonucleótido de acuerdo con la divulgación; o el uso de un biosensor de acuerdo con la divulgación, o una matriz de acuerdo con la divulgación, o un kit de acuerdo con la divulgación, para identificar una sustancia capaz de promover y/o suprimir la generación del biomarcador.

55

60

Se proporciona también un procedimiento de identificación de una sustancia capaz de promover o suprimir la generación del biomarcador en un sujeto, que comprende administrar una sustancia de prueba a un sujeto animal y detectar y/o cuantificar el nivel del biomarcador presente en una muestra de prueba del sujeto.

- 5 El término "biomarcador" significa un indicador biológico o derivado biológicamente distintivo de un proceso, evento o afección. Los biomarcadores pueden usarse en procedimientos de diagnóstico, p.ej. cribado clínico y en valoración de pronóstico y en monitorización de los resultados de la terapia, identificación de los sujetos que es más probable que respondan a un tratamiento terapéutico particular, cribado y desarrollo de fármacos. Los biomarcadores y usos de los mismos son valiosos para la identificación de nuevos tratamientos farmacológicos y
10 para el descubrimiento de nuevas diana para tratamiento farmacológico.

Los términos "detectar" y "diagnosticar" como se usan en la presente memoria engloban identificación, confirmación y/o caracterización de un estado patológico. Los procedimientos de detección, monitorización y diagnóstico de acuerdo con la divulgación son útiles para confirmar la existencia de una enfermedad, para
15 monitorizar el desarrollo de la enfermedad valorando inicio y progresión o para valorar la mejora o regresión de la enfermedad. Los procedimientos de detección, monitorización y diagnóstico son también útiles en procedimientos para la valoración de cribado clínico, pronóstico, elección de terapia y evaluación del beneficio terapéutico, es decir para el cribado de fármacos y el desarrollo de fármacos.

20 Los procedimientos de diagnóstico y monitorización eficientes proporcionan "soluciones de sujeto" muy potentes con el potencial de un pronóstico mejorado al establecer el diagnóstico correcto, permitir una identificación rápida del tratamiento más apropiado (por tanto rebajando la exposición innecesaria a los efectos secundarios farmacológicos dañinos) y reducir las tasas de recaída.

25 Dicho biomarcador puede liberarse a partir de las células de un tumor. Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento para la detección de un crecimiento tumoral que comprende las etapas de (i) medir un biomarcador en una muestra biológica que está asociado a o liberado a partir de las células de un tumor y (ii) demostrar que el nivel de dicho biomarcador está asociado al tamaño, fase, agresividad o difusión del tumor.

30

Es conocido que un recambio celular, muerte celular y apoptosis aumentados conducen a niveles circulatorios aumentados de nucleosomas exentos de células (Holdenrieder y *col.*, 2001). El nivel de nucleosomas exentos de célula en circulación es un indicador no específico y aparece en una variedad de afecciones incluyendo enfermedades inflamatorias, una gran variedad de afecciones benignas y malignas, enfermedades
35 autoinmunitarias así como después de traumatismo o isquemia (Holdenrieder y *col.* 2001). Resultará evidente para los especialistas en la materia que la divulgación tendrá aplicación en una variedad de áreas de enfermedades donde se han encontrado nucleosomas en circulación en sujetos. Estas incluyen, sin limitación, traumatismo (por ejemplo, lesión grave o cirugía), ejercicio extremo (por ejemplo, correr una maratón), apoplejía y ataque cardíaco, sepsis u otra afección grave y endometriosis.

40

Los inmunoensayos de la divulgación incluyen ensayos inmunométricos que emplean procedimientos de detección enzimática (por ejemplo ELISA), ensayos inmunométricos marcados con fluorescencia, ensayos inmunométricos marcados con fluorescencia resueltos en el tiempo, ensayos inmunométricos quimioluminiscentes, ensayos inmunoturbidimétricos, ensayos inmunométricos marcados con partículas y
45 ensayos inmunoradiométricos y procedimientos de inmunoensayo competitivo incluyendo procedimientos de inmunoensayo competitivo de antígeno marcado y anticuerpo marcado con una variedad de tipos de marcación, incluyendo marcaciones radiactiva, enzimática, fluorescente, fluorescente resuelta en el tiempo y con partículas. Todos dichos procedimientos de inmunoensayo son bien conocidos en la materia, véanse por ejemplo Salgame y *col.*, 1997 y van Nieuwenhuijze y *col.*, 2003.

50

Dicha muestra biológica puede comprender un fluido corporal. Por ejemplo, las muestras biológicas que pueden ensayarse en un procedimiento de la divulgación incluyen líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre completa, suero sanguíneo, plasma, sangre menstrual, fluido endométrico, orina, saliva u otro fluido corporal (heces, líquido lagrimal, líquido sinovial, esputo), aliento, p.ej. como aliento condensado, o un extracto o purificación de las
55 mismas o dilución de las mismas. Las muestras biológicas incluyen también especímenes de un sujeto vivo, o tomados postmortem. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, cuando sea apropiado diluirse o concentrarse, y almacenarse de la manera habitual.

El procedimiento de la divulgación puede repetirse en múltiples ocasiones. Esto proporciona la ventaja de
60 permitir monitorizar los resultados de la detección durante un periodo de tiempo. Tal disposición proporcionará el

beneficio de monitorizar o valorar la eficacia de tratamiento de un estado patológico. Pueden usarse tales procedimientos de monitorización de la divulgación para monitorizar el inicio, progresión, estabilización, mejora, recaída y/o remisión.

5 Por tanto, la divulgación proporciona también un procedimiento de monitorización de la eficacia de una terapia para un estado patológico en un sujeto sospechoso de tener tal enfermedad, que comprende detectar y/o cuantificar el biomarcador presente en una muestra biológica de dicho sujeto. En procedimientos de monitorización, pueden tomarse muestras de prueba en dos o más ocasiones. El procedimiento puede comprender además comparar el nivel del biomarcador o biomarcadores presentes en la muestra de prueba con
10 uno o más controles y/o con una o más muestras de prueba anteriores tomadas previamente del mismo sujeto de prueba, p.ej. antes del comienzo de la terapia, y/o del mismo sujeto de prueba en una fase previa de la terapia. El procedimiento puede comprender detectar un cambio en la naturaleza o la cantidad de biomarcador o biomarcadores en muestras de prueba tomadas en diferentes ocasiones.

15 Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para monitorizar la eficacia de la terapia para un estado patológico en un sujeto humano o animal que comprende:

(a) cuantificar la cantidad de biomarcador como se define en la presente memoria; y

(b) comparar la cantidad de dicho biomarcador en una muestra de prueba con la cantidad presente en uno o más
20 controles y/o una o más muestras de prueba anteriores tomadas en un momento previo del mismo sujeto de prueba.

Un cambio en el nivel del biomarcador en la muestra de prueba respecto al nivel en una muestra de prueba anterior tomada previamente del mismo sujeto de prueba puede ser indicativo de un efecto beneficioso, p.ej. estabilización o mejora, de dicha terapia sobre el trastorno o trastorno sospechado. Además, una vez se ha
25 completado el tratamiento, puede repetirse el procedimiento de la divulgación periódicamente para monitorizar la recurrencia de una enfermedad.

Los procedimientos para monitorizar la eficacia de una terapia pueden usarse para monitorizar la efectividad terapéutica de terapias existentes y nuevas terapias en sujetos humanos y en animales no humanos (p.ej. en
30 modelos animales). Estos procedimientos de monitorización pueden incorporarse a cribados de nuevas sustancias farmacológicas y combinaciones de sustancias.

La monitorización de cambios más rápidos debidos a terapias de acción rápida puede realizarse en intervalos
35 más cortos de horas o días.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para identificar un biomarcador para detectar la presencia de un estado patológico. El término "identificar" como se usa en la presente memoria significa confirmar la presencia del biomarcador presente en la muestra biológica. Cuantificar
40 la cantidad de biomarcador presente en una muestra puede incluir determinar la concentración del biomarcador presente en la muestra. La identificación y/o cuantificación puede practicarse directamente en la muestra, o indirectamente en un extracto de la misma, o en una dilución de la misma.

En aspectos alternativos de la divulgación, se valora la presencia del biomarcador detectando y/o cuantificando
45 el anticuerpo o fragmentos del mismo capaces de unión específica al biomarcador que se generan por el cuerpo del sujeto en respuesta al biomarcador y por tanto están presentes en una muestra biológica de un sujeto que tiene un estado patológico.

La identificación y/o cuantificación pueden practicarse mediante cualquier procedimiento adecuado para
50 identificar la presencia y/o cantidad de una proteína específica en una muestra biológica de un sujeto o una purificación o extracto de una muestra biológica o una dilución de la misma. En el uso de la invención, la cuantificación puede practicarse midiendo la concentración del biomarcador en la muestra o muestras. Las muestras biológicas que pueden ensayarse en un procedimiento de la divulgación incluyen aquellas definidas anteriormente en la presente memoria. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, cuando sea apropiado
55 diluirse o concentrarse, y almacenarse de la manera habitual.

La identificación y/o cuantificación de los biomarcadores puede practicarse mediante la detección del biomarcador o de un fragmento de mismo, p.ej. un fragmento con truncamiento C-terminal, o con truncamiento
60 N-terminal. Los fragmentos son adecuadamente mayores de 4 aminoácidos de longitud, por ejemplo de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de longitud. Se señala en particular que los péptidos

de la misma secuencia o relacionada con la de colas de histona son fragmentos particularmente útiles de proteínas histonas.

- El biomarcador puede detectarse directamente, p.ej. por SELDI o MALDI-TOF. Como alternativa, el biomarcador
- 5 puede detectarse directa o indirectamente mediante interacción con un ligando o ligandos tales como un anticuerpo o fragmento de unión a biomarcador del mismo, u otro péptido o ligando, p.ej. aptámero, u oligonucleótido, capaz de unirse específicamente al biomarcador. El ligando o ligador puede poseer una marcación detectable, tal como una marcación luminiscente, fluorescente o radiactiva y/o un marcaje de afinidad.
- 10 Por ejemplo, la detección y/o cuantificación pueden practicarse mediante uno o más de los procedimientos seleccionados del grupo consistente en: SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), análisis basado en gel 1D, análisis basado en gel 2D, espectroscopía de masas (MS), LC en fase inversa (RP), permeación por tamaño (filtración en gel), intercambio iónico, afinidad, HPLC, UPLC u otras técnicas basadas en LC o LC MS. Las técnicas de LC MS apropiadas incluyen ICAT® (Applied Biosystems, CA, EE.UU.), o iTRAQ® (Applied Biosystems, CA, EE.UU.).
- 15 Podrían usarse también cromatografía líquida (p.ej., cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía líquida de baja presión (LPLC)), cromatografía en capa fina y espectroscopía de RMN (resonancia magnética nuclear).

Los procedimientos de diagnóstico o monitorización de acuerdo con la divulgación pueden comprender analizar

20 una muestra por SELDI TOF o MALDI TOF para detectar la presencia o nivel del biomarcador. Estos procedimientos son también adecuados para cribado clínico, pronóstico, monitorización de los resultados de la terapia, identificación de los sujetos que es más probable que respondan a un tratamiento terapéutico particular, cribado y desarrollo de fármacos e identificación de nuevas dianas para tratamiento farmacológico.

25 La identificación y/o cuantificación de los biomarcadores de analito pueden practicarse usando un procedimiento inmunológico, que implica un anticuerpo o fragmento del mismo capaz de unión específica al biomarcador. Los procedimientos inmunológicos adecuados incluyen inmunoensayos de sándwich, tales como ELISA de sándwich, en que la detección de los biomarcadores de analito se practica usando dos anticuerpos que reconocen diferentes epítopos en un biomarcador de analito; radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunosorción ligada a

30 enzima (ELISA) directa, indirecta o competitiva, inmunoensayos enzimáticos (EIA), inmunoensayos de fluorescencia (FIA), transferencia Western, inmunoprecipitación y cualquier inmunoensayo basado en partículas (p.ej., que usa partículas de oro, plata o látex, partículas magnéticas o puntos cuánticos). Los procedimientos inmunológicos pueden practicarse, por ejemplo, en formato de placa de microvaloración o tira.

35 La identificación de biomarcadores clave específicos de una enfermedad es esencial para la integración de los procedimientos de diagnóstico y regímenes terapéuticos. Usando biomarcadores predictivos pueden desarrollarse herramientas de diagnóstico apropiadas tales como biosensores; por consiguiente, en usos de la invención, la identificación y cuantificación pueden practicarse usando un biosensor, sistema microanalítico, sistema micromanipulado, sistema de microseparación, sistema inmunocromatográfico u otros dispositivos

40 analíticos adecuados. El biosensor puede incorporar un procedimiento inmunológico para la detección del biomarcador o biomarcadores, tecnologías eléctrica, térmica, magnética, óptica (p.ej. holograma) o acústica. Usando tales biosensores, es posible detectar el biomarcador o biomarcadores diana a la concentraciones previstas encontradas en muestras biológicas.

45 Como se usa en la presente memoria, el término "biosensor" significa algo capaz de detectar la presencia del biomarcador. Se describen en la presente memoria ejemplos de biosensores.

Los biosensores pueden comprender un ligador ligando o ligandos, como se describen en la presente memoria, capaces de unión específica al biomarcador. Tales biosensores son útiles en la detección y/o cuantificación de

50 un biomarcador.

El biomarcador o biomarcadores pueden detectarse usando un biosensor que incorpora tecnologías basadas en hologramas "inteligentes" o sistemas acústicos de alta frecuencia, tales sistemas son particularmente susceptibles de configuraciones de "código de barras" o matriz.

55 En sensores de hologramas inteligentes (Smart Holograms Ltd, Cambridge, RU), se almacena una imagen holográfica en una película polimérica fina que se sensibiliza para reaccionar específicamente con el biomarcador. Tras la exposición, el biomarcador reacciona con el polímero conduciendo a una alteración de la imagen exhibida por el holograma. La lectura resultado de la prueba puede ser un cambio en el brillo óptico,

60 imagen, color y/o posición de la imagen. Para aplicaciones cualitativas y semicuantitativas, puede leerse un

holograma sensor a simple vista, eliminando por tanto la necesidad de un equipo de detección. Puede usarse un sensor de color sencillo para leer la señal cuando se requieren medidas cuantitativas. La opacidad del color de la muestra no interfiere con la operación del sensor. El formato del sensor permite la multiplexación para detección simultánea de varias sustancias. Pueden diseñarse sensores reversibles e irreversibles para satisfacer diferentes requisitos, y es factible una monitorización continua de un biomarcador particular de interés.

Adecuadamente, los biosensores para la detección de uno o más biomarcadores combinan el reconocimiento biomolecular con medios apropiados para convertir la detección de la presencia, o la cuantificación, del biomarcador en la muestra en una señal. Los biosensores pueden adaptarse para un ensayo de diagnóstico de "sitio alternativo", p.ej. en sala, servicio ambulatorio, cirugía, hogar, campo y lugar de trabajo.

Los biosensores para detectar uno o más biomarcadores incluyen sensores acústicos, de resonancia de plasmón, holográfico, de interferometría de biocapa (BLI) y micromanipulados. Pueden emplearse elementos de reconocimiento grabados, tecnología de transistor de película fina, dispositivos resonadores acústicos magnéticos y otros sistemas acusticoeléctricos novedosos en biosensores para la detección de uno o más biomarcadores.

Los procedimientos que implican la identificación y/o cuantificación de uno o más biomarcadores pueden practicarse en instrumentos de laboratorio o pueden incorporarse a plataformas de diagnóstico o monitorización desechables que pueden usarse en un entorno no de laboratorio, p.ej. en la consulta del médico o en el lecho del sujeto. Los biosensores adecuados para practicar los procedimientos de la divulgación incluyen tarjetas "de crédito" con lectores ópticos o acústicos. Los biosensores pueden configurarse para permitir transmitir electrónicamente los datos recogidos al médico para interpretación y por tanto pueden constituir la base de medicina a distancia.

Se describen en la presente memoria kits de diagnóstico para el diagnóstico y la monitorización de la presencia de un estado patológico. Los kits pueden contener adicionalmente un biosensor capaz de identificar y/o cuantificar un biomarcador. Adecuadamente, un kit puede contener uno o más componentes seleccionados del grupo de: un ligador ligando o ligandos específicos del biomarcador o un mimético estructural/conformacional del biomarcador, uno o más controles, uno o más reactivos y uno o más consumibles; opcionalmente junto con instrucciones para el uso del kit de acuerdo con cualquiera de los procedimientos definidos en la presente memoria.

La identificación de biomarcadores para un estado patológico permite la integración de los procedimientos de diagnóstico y los regímenes terapéuticos. La detección de un biomarcador puede usarse para cribar sujetos antes de su participación en ensayos clínicos. Los biomarcadores proporcionan los medios para manifestar la respuesta terapéutica, falta de respuesta, perfil de efectos secundarios desfavorable, grado de cumplimiento de la medicación y consecución de niveles séricos de fármaco adecuados. Los biomarcadores pueden usarse para proporcionar avisos de respuesta adversa a fármacos. Los biomarcadores son útiles en el desarrollo de terapias personalizadas, como valoración de respuesta pueden usarse para ajuste fino de la dosificación, minimizar el número de medicaciones prescritas, reducir el retraso en el logro de una terapia efectiva y evitar reacciones farmacológicas adversas. Por tanto, al monitorizar un biomarcador, la asistencia al sujeto puede adaptarse precisamente para satisfacer las necesidades determinadas por el trastorno y el perfil farmacogenómico del sujeto, por tanto el biomarcador puede usarse para titular la dosis óptima, predecir una respuesta terapéutica positiva e identificar aquellos sujetos con alto riesgo de efectos secundarios graves.

Las pruebas basadas en biomarcadores proporcionan una valoración de primera línea de sujetos "nuevos" y proporcionan medidas objetivas para un diagnóstico exacto y rápido, no alcanzable usando las medidas actuales.

Además, las pruebas de biomarcador de diagnóstico son útiles para identificar miembros de la familia o sujetos con enfermedad leve o asintomática o que puedan estar con alto riesgo de desarrollar la enfermedad sintomática. Esto permite el inicio de una terapia apropiada o de medidas preventivas, p.ej., gestionando los factores de riesgo. Se reconoce que estos enfoques mejoran el resultado clínico y pueden prevenir un inicio evidente del trastorno.

Los procedimientos de monitorización de biomarcador, biosensores y kits son también vitales como herramientas de monitorización del sujeto, para posibilitar al médico determinar si la recaída es debida al empeoramiento del trastorno. Si se valora que el tratamiento farmacológico es inadecuado, entonces puede restablecerse o aumentarse la terapia; puede darse un cambio de terapia si es apropiado. Como los biomarcadores son sensibles al estado del trastorno, proporcionan una indicación del impacto de la terapia farmacológica.

La invención se ilustrará ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

- 5 Se tomaron muestras de suero de 5 sujetos sanos, 3 sujetos con cáncer de colon, 6 sujetos con cáncer de pulmón y 2 sujetos con cáncer pancreático. Se diluyó en serie en suero equino una preparación de nucleosoma comercialmente disponible producida mediante digestión de cromatina extraída de células Hela, en que el ADN y las proteínas en el nucleosoma están reticuladas para estabilidad. Se preparó una preparación de nucleosoma en sangre humana de acuerdo con el procedimiento de Holdenrieder (*Holdenrieder y col.; 2001). Se ensayó en estas muestras y preparaciones por duplicado el educto de nucleosoma-EZH2 mediante el procedimiento de la divulgación. Se ensayó también suero equino puro disponible comercialmente producido para uso en cultivo de tejido como muestra de control negativo que no contiene nucleosomas ni aductos de nucleosoma.
- 10
- 15 El procedimiento ELISA usaba un anticuerpo de captura antihistona en fase sólida que se une a nucleosomas intactos y un anticuerpo monoclonal de detección anti-EZH2 biotinilado como sigue: Se añadió una solución de anticuerpo antihistona en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 a pocillos de microvaloración (100 µl/pocillo) y se incubó durante una noche a 4 °C para recubrir los pocillos con anticuerpo de captura. Se decantó el anticuerpo antihistona en exceso. Se añadió una solución de seroalbúmina bovina (20 g/l) a los pocillos (200 µl/pocillo) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los sitios de unión a proteína en exceso en los pocillos. Se decantó la solución de seroalbúmina bovina en exceso y se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo, tampón TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contiene 1 % de Tween 20). Se añadieron muestra de suero (10 µl/pocillo) y tampón de ensayo (50 µl/pocillo, TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contiene 0,9 % de NaCl, 0,05 % de desoxicolato de sodio y 1 % de sustituto de Nonidet P40) a los pocillos incubados durante una noche a 4 °C. Se decantó la mezcla de suero y tampón de ensayo y se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de anticuerpo de detección anti-EZH2 biotinilado (50 µl/pocillo) y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el anticuerpo de detección en exceso y se lavaron de nuevo los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución que contiene conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (50 µl/pocillo) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el conjugado en exceso y se lavaron de nuevo los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de sustrato coloreado (100 µl/pocillo, sal de diamonio del ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se midió la densidad óptica (DO) de los pocillos a una longitud de onda de 405 nm usando un lector de placas de microvaloración estándar. Se observó una curva de dosis-respuesta de color creciente con una concentración creciente de aducto de nucleosoma-EZH2, con una baja señal de fondo observada en ausencia de aducto de nucleosoma (suero equino). La señal de ELISA positiva indica que la EZH2 detectada por ELISA está incorporada a un aducto de nucleosoma-EZH2 que comprende tanto proteína histona como EZH2 ya que (i) el anticuerpo de captura se une a las histonas de la muestra y (ii) el anticuerpo de detección se une al componente EZH2 del aducto. Se muestran los resultados en las Figuras 1 y 2.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40

EJEMPLO 2

- 45 Se tomaron muestras de suero de 5 sujetos sanos, 3 sujetos con cáncer de colon, 6 sujetos con cáncer de pulmón y 2 sujetos con cáncer pancreático. Se diluyó en serie en suero equino una preparación de nucleosoma disponible comercialmente mediante digestión de cromatina extraída de células Hela. Se preparó una preparación de nucleosoma en sangre humana de acuerdo con el procedimiento de Holdenrieder (*Holdenrieder y col.; 2001). Se ensayó en estas muestras y preparaciones por duplicado el aducto de nucleosoma-HMGB1 mediante el procedimiento de la divulgación. Se ensayó también suero equino puro como muestra de control negativo que no contiene nucleosomas ni aductos de nucleosoma.
- 50

- El procedimiento ELISA usaba un anticuerpo de captura antihistona en fase sólida que se une a nucleosomas intactos y un anticuerpo monoclonal de detección anti-HMGB1 biotinilado como sigue: Se añadió una solución de anticuerpo antihistona en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 a pocillos de microvaloración (100 µl/pocillo) y se incubó durante una noche a 4 °C para recubrir los pocillos con anticuerpo de captura. Se decantó el anticuerpo antihistona en exceso. Se añadió una solución de seroalbúmina bovina (20 g/l) a los pocillos (200 µl/pocillo) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los sitios de unión a proteína en exceso en los pocillos. Se decantó la solución de seroalbúmina bovina en exceso y se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo, tampón TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contiene 1 % de Tween 20). Se añadieron muestra de suero (10 µl/pocillo) y tampón de ensayo (50 µl/pocillo, TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contiene 0,9 %
- 55
- 60

de NaCl, 0,05 % de desoxicolato de sodio y 1 % de sustituto de Nonidet P40) a los pocillos incubados durante una noche a 4 °C. Se decantó la mezcla de suero y tampón de ensayo y se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de anticuerpo de detección anti-HMGB1 biotinilado (50 µl/pocillo) y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el anticuerpo de detección en exceso y se lavaron de nuevo los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución que contiene conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (50 µl/pocillo) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el conjugado en exceso y se lavaron de nuevo los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de sustrato coloreado (100 µl/pocillo, sal de diamonio del ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se midió la densidad óptica (DO) de los pocillos a una longitud de onda de 405 nm usando un lector de placas de microvaloración estándar. Se observó una curva de dosis-respuesta de color creciente con una concentración creciente de aducto de nucleosoma-HMGB1, con una baja señal de fondo observada en ausencia de aducto de nucleosoma (suero equino). La señal de ELISA positiva indica que la HMGB1 detectada por ELISA está incorporada a un aducto de nucleosoma-HMGB1 que comprende tanto proteína histona como HMGB1 ya que (i) el anticuerpo de captura se une a las histonas de la muestra y (ii) el anticuerpo de detección se une al componente HMGB1 del aducto. Se muestran los resultados en las Figuras 3 y 4.

En un experimento mayor, se tomaron muestras de suero de 25 pacientes con cáncer de colon, 25 pacientes con cáncer de mama y 24 pacientes con cáncer de pulmón, así como muestras de 31 sujetos sanos. Se ensayó en las muestras el nivel de nucleosoma-HMGB1 y, usando el resultado medio sano más 2 desviaciones estándares de la media como corte, se obtuvieron los siguientes resultados para cáncer de colon, mama y pulmón:

- Colon: Se detectaron un 76 % de los cánceres (19 de 25 pacientes) con un 90 % de especificidad (3 falsos positivos de 31 muestras sanas);
 - Mama: Se detectaron un 96 % de los cánceres (24 de 25 pacientes) con un 90 % de especificidad (3 falsos positivos de 31 muestras sanas); y
 - Pulmón: Se detectaron un 100 % de los cánceres (24 de 24 pacientes) con un 86 % de especificidad (4 falsos positivos de 28 muestras sanas);
- donde un nivel de aducto de nucleosoma-HMGB1 medido por encima del nivel de corte se considera un resultado positivo y un nivel menor se considera un resultado negativo. Se muestran los resultados en la Figura 5.

Se llevó a cabo el ensayo de los niveles de aducto de nucleosoma-HMGB1 también en formato inverso, donde se recubrió el anticuerpo anti-HMGB1 en pocillos como anticuerpo de captura y se biotiniló el anticuerpo antinucleosoma y se usó como anticuerpo de detección. Este formato de ensayo detectaba también exitosamente los aductos de nucleosoma-HMGB1 en los controles positivos usados (DO405 nm= 1,15), pero no en suero equino o tampón (ambos DO406 nm= 0,13).

40 EJEMPLO 3

Se llevó a cabo un ensayo ELISA de nucleosoma-PR usando el procedimiento del Ejemplo 1 anterior, excepto porque se dirigió el anticuerpo biotinilado a unirse al receptor de progesterona (PR). Se muestran los resultados en la Figura 6.

45 EJEMPLO 4

Se ensayaron muestras de suero tomadas de dos pacientes de cáncer de próstata, así como controles positivos y negativos, usando un ensayo ELISA de aducto de nucleosoma-AR llevado a cabo usando el procedimiento del Ejemplo 1 anterior, excepto porque se dirigió el anticuerpo biotinilado usado a unirse al receptor de andrógeno (AR). Se muestran los resultados en la Figura 7.

EJEMPLO 5

Se llevó a cabo un ensayo ELISA de aducto de nucleosoma-ER α usando una muestra de nucleosoma preparada mediante el procedimiento de *Holdenrieder y col.; 2001 mediante el procedimiento del Ejemplo 1, excepto porque se dirigió el anticuerpo biotinilado usado a unirse a la forma alfa del receptor de estrógeno (ER α). Se muestran los resultados en la Figura 8.

60 EJEMPLO 6

Se preparó una muestra de nucleosoma mediante digestión de cromatina extraída de células MCF7 y se ensayó el aducto de nucleosoma-ER β por ELISA. Se llevó a cabo el ensayo mediante un procedimiento similar al del Ejemplo 1 anterior, excepto porque se practicó el ensayo usando un anticuerpo antinucleosoma diferente y un anticuerpo dirigido a unirse a la forma beta del receptor de estrógeno (ER β). Se llevó a cabo el ensayo en dos formatos diferentes. En el primer formato, se recubrió el anticuerpo antinucleosoma sobre los pocillos y se biotiniló el anticuerpo anti-ER β . En el segundo formato, se recubrió el anticuerpo anti-ER β sobre los pocillos y se biotiniló el anticuerpo antinucleosoma. El ensayo fue exitoso en ambos formatos. De forma interesante, el ensayo parecía practicarse menos bien cuando la cromatina de MCF7 estaba reticulada, como se realiza a menudo en los procedimientos de CHIP. Se muestran los resultados en la Figura 9.

EJEMPLO 7

Se llevó a cabo un ensayo ELISA de aducto de H2AZ de nucleosoma-ER β usando una muestra de nucleosoma preparada mediante el procedimiento de *Holdenrieder y col.; 2001 mediante el procedimiento del Ejemplo 6 anterior, donde se recubrió el anticuerpo anti-ER β sobre los pocillos, excepto porque se dirigió el anticuerpo biotinilado usado a unirse a la variante de histona H2AZ de tal modo que se detectara solo el subconjunto de aductos de nucleosoma-ER β que contuviera H2AZ. Usando este procedimiento, donde el ligador de nucleosoma o componente de nucleosoma se dirige a unirse a una estructura de señal epigenética particular, es posible detectar un subconjunto particular de aductos de nucleosoma que contienen solo esa señal epigenética. Se muestran los resultados en la Figura 10.

EJEMPLO 8

Se tomaron muestras de suero de 12 sujetos sanos, 3 sujetos con cáncer de colon, 6 sujetos con cáncer de mama, 3 sujetos con cáncer de pulmón y 4 sujetos con cáncer pancreático. Se preparó una preparación de nucleosoma en sangre humana de acuerdo con el procedimiento de Holdenrieder (*Holdenrieder y col.; 2001) y se diluyó en serie en suero equino. Se ensayó en estas muestras y preparaciones por duplicado el educto de nucleosoma-ER β mediante el procedimiento de la divulgación. Se ensayó también suero equino puro disponible comercialmente producido para uso en cultivo de tejido como muestra de control negativo que no contiene nucleosomas ni aductos de nucleosoma. Se llevó a cabo el ensayo usando el procedimiento del Ejemplo 1 anterior, excepto porque se dirigió el anticuerpo de detección usado contra el receptor de estrógeno (ER β). Usando un corte calculado como el resultado sano medio más 2 desviaciones estándares de la media; se encontró que 2 de las 3 muestras de cáncer de colon, 3 de las 6 muestras de cáncer de mama, 2 de las 3 muestras de cáncer de pulmón y 4 de las 4 muestras de cáncer pancreático eran positivas de aducto de nucleosoma-ER β . Se muestran los resultados en la Figura 11.

EJEMPLO 9

Se lleva a cabo un ensayo ELISA de nucleosoma-receptor de estrógeno-estrógeno esteroideo usando el procedimiento del Ejemplo 6 anterior, excepto porque se dirigió el anticuerpo de detección usado contra estrógeno esteroideo. Este ensayo detectaba por lo tanto solo aductos de nucleosoma-receptor de estrógeno que contenían adicionalmente hormona esteroidea.

45 EJEMPLO 10

Se lleva a cabo un ensayo ELISA de aducto de nucleosoma-receptor de estrógeno-estrógeno usando un procedimiento similar al del Ejemplo anterior, excepto porque se practica el ensayo en una placa de microvaloración o tubo que es resistente a disolventes orgánicos y, después de la captura por el anticuerpo antinucleosoma de los aductos de nucleosoma-receptor de estrógeno sobre la superficie del pocillo, se decantan los contenidos sólidos del pocillo y se añade dietiléter para disolver cualquier esteroide presente en el aducto capturado. Se transfiere el éter a otro pocillo o tubo y se seca. Se redisuelve el extracto secado en tampón de ensayo y se determina la concentración de estrógeno usando un procedimiento de inmunoensayo competitivo clásico para análisis de estrógeno. Este ensayo detecta por lo tanto solo aductos de nucleosoma-receptor de estrógeno que contienen adicionalmente estrógeno.

EJEMPLO 11

Se lleva a cabo un ensayo ELISA de nucleosoma-receptor de ácido retinoico-ácido retinoico usando el procedimiento del Ejemplo 10 anterior, excepto porque se dirigió el inmunoensayo competitivo esteroideo usado

contra ácido retinoico. Este ensayo por lo tanto detecta solo aductos de nucleosoma-receptor de ácido retinoico que contienen adicionalmente el esteroide ácido retinoico.

EJEMPLO 12

5

Se practican ensayos de aducto de nucleosoma similares a los descritos en los Ejemplos 1-10, excepto porque se dirigió el anticuerpo recubierto en fase sólida usado contra 5-metilcitosina. Estos ensayos por lo tanto detectan solo aductos de nucleosoma-receptor hormonal y aductos de complejo de nucleosoma-receptor hormonal-hormona que están adicionalmente asociados a ADN metilado.

10

REFERENCIAS

- Allen y col., A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research*: 32(3) e38DOI: 10.1093/nar/gnh032, 2004
- 15 Bawden y col., Detection of histone modification in cell-free nucleosomes. WO 2005/019826, 2005
Cao y col., Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing *SCIENCE* 298, 1039-1043, 2002
- Dai y col., Detection of Post-translational Modifications on Native Intact Nucleosomes by ELISA. <http://www.jove.com/details.php?id=2593> doi: 10.3791/2593. *J Vis Exp*. 50 (2011).
- 20 Esteller, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps *Nature Reviews Genetics*: 8, 286-298, 2007
Feinberg y Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*: 301, 89-92, 1983
Fullgrabe y col., Histone onco-modifications. *Oncogene*: 30, 3391-3403, 2011
- 25 Gerlitz y col., The dynamics of HMG protein-chromatin interactions in living cells. *Biochem Cell Biol*, 87, 127-137, 2009
Grutzmann y col., Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. *PLoS ONE* 3(11): e3759. doi:10.1371/journal.pone.0003759, 2008
Herranz y Esteller, DNA methylation and histone modifications in subjects with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. *Methods Mol Biol*.361: 25-62, 2007
- 30 Hervouet y col., Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 Interactions Promotes Tumorigenesis from Human and Mice Glial Cells *PLoS ONE* 5(6): e11333. doi:10.1371/journal.pone.0011333, 2010
Holdenrieder y col., Nucleosomes in serum of subjects with benign and malignant diseases. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*: 95, 114-120, 2001
- 35 *Holdenrieder y col, Nucleosomes in Serum as a Marker for Cell Death. *Clin Chem Lab Med*; 39(7), 596-605, 2001
Holdenrieder y col., Cell-Free DNA in Serum and Plasma: Comparison of ELISA and Quantitative PCR. *Clinical Chemistry*: 51(8), 1544-1546, 2005
Holdenrieder y Stieber, Clinical use of circulating nucleosomes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*; 46(1): 1-24, 2009
- 40 Ricke y Bielinsky, Easy detection of chromatin binding proteins by the histone association assay. *Biol Proced Online*; 7(1), 60-69, 2005
Rodríguez-Paredes y Esteller, Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature Medicine*: 17(3), 330-339, 2011
- 45 Salgame y col., An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 25(3), 680-681, 1997
Sims y col., HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 367-388, 2010
Stoetzer y col., Circulating nucleosomes and biomarkers of immunogenic cell death as predictive and prognostic markers in cancer patients undergoing cytotoxic therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 12 (Supl. 1): S217-S224, 2012
Tang y col., High-mobility Group Box 1 [HMGB1] and Cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1799(1-2) 131, 2010
- 50 Urbonaviciute y col., Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1 - nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med*, 205(13), 3007-3018, 2008
Urbonaviciute y Voll, High-mobility group box 1 represents a potential marker of disease and novel therapeutic target in systemic lupus erythematosus. *J Internal Medicine*, 270, 309-318, 2011
van Nieuwenhuijze y col., Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*; 62: 10-14, 2003
- 55 Yoshida y Shimura, Isolation of nonhistone chromosomal protein from calf thymus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*; 263(3), 690-695, 1972

REIVINDICACIONES

1. Uso de un aducto de nucleosoma-proteína como biomarcador en una muestra de sangre para el diagnóstico de cáncer, donde la proteína en aducto con el nucleosoma comprende un factor de transcripción o
5 una enzima modificadora de cromatina.
2. Uso como se define en la reivindicación 1, donde la proteína en aducto con el nucleosoma es un factor de transcripción.
- 10 3. Uso como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el factor de transcripción es un receptor de hormona nuclear.
4. Uso como se define en la reivindicación 1, donde la enzima modificadora de cromatina es una enzima de acetilación, desacetilación, metilación, desmetilación, fosforilación, desfosforilación, ubiquitinación,
15 desubiquitinación, sumoilación, desumoilación o ADN metiltransferasa de histona.
5. Uso como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 4, donde la enzima modificadora de cromatina es EZH2.
- 20 6. Uso como se define en la reivindicación 3, donde el receptor de hormona nuclear es un receptor de estrógeno, receptor de andrógeno, receptor de progesterona, receptor de hormona tiroidea, receptor de glucocorticoide o receptor de ácido retinoico.
7. Uso como se define en la reivindicación 6, donde el receptor de hormona nuclear está
25 adicionalmente unido a una hormona que se selecciona de una hormona tiroidea, un estrógeno, un andrógeno o ácido retinoico.

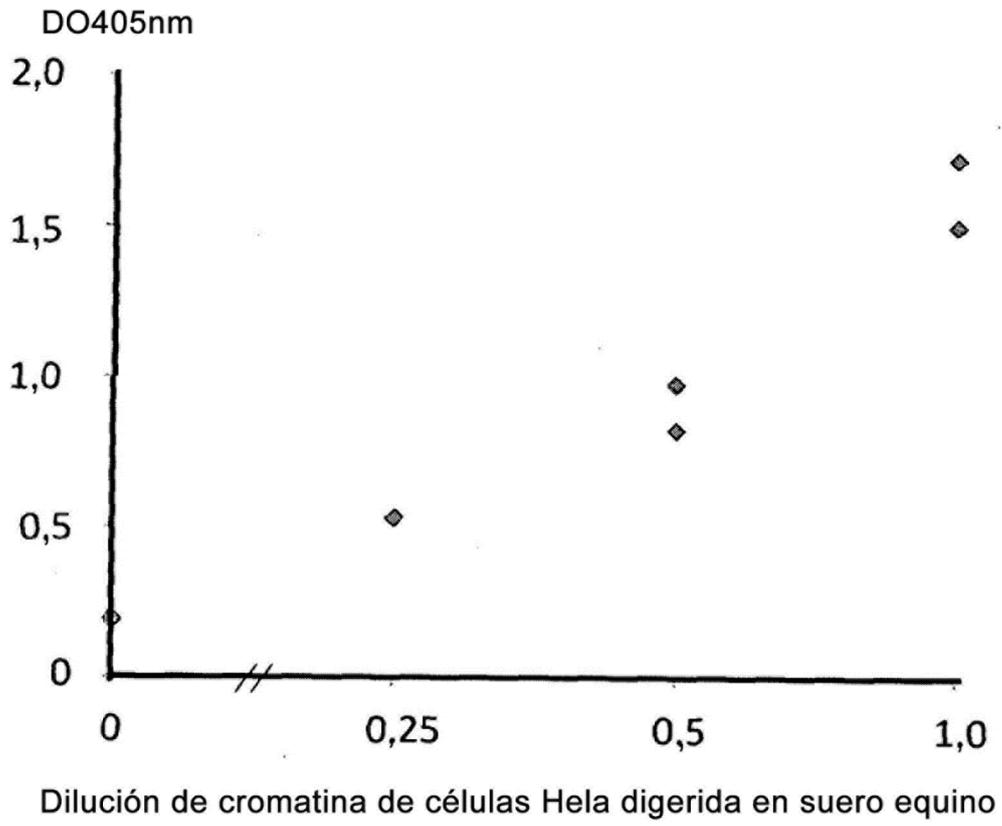


FIGURA 1

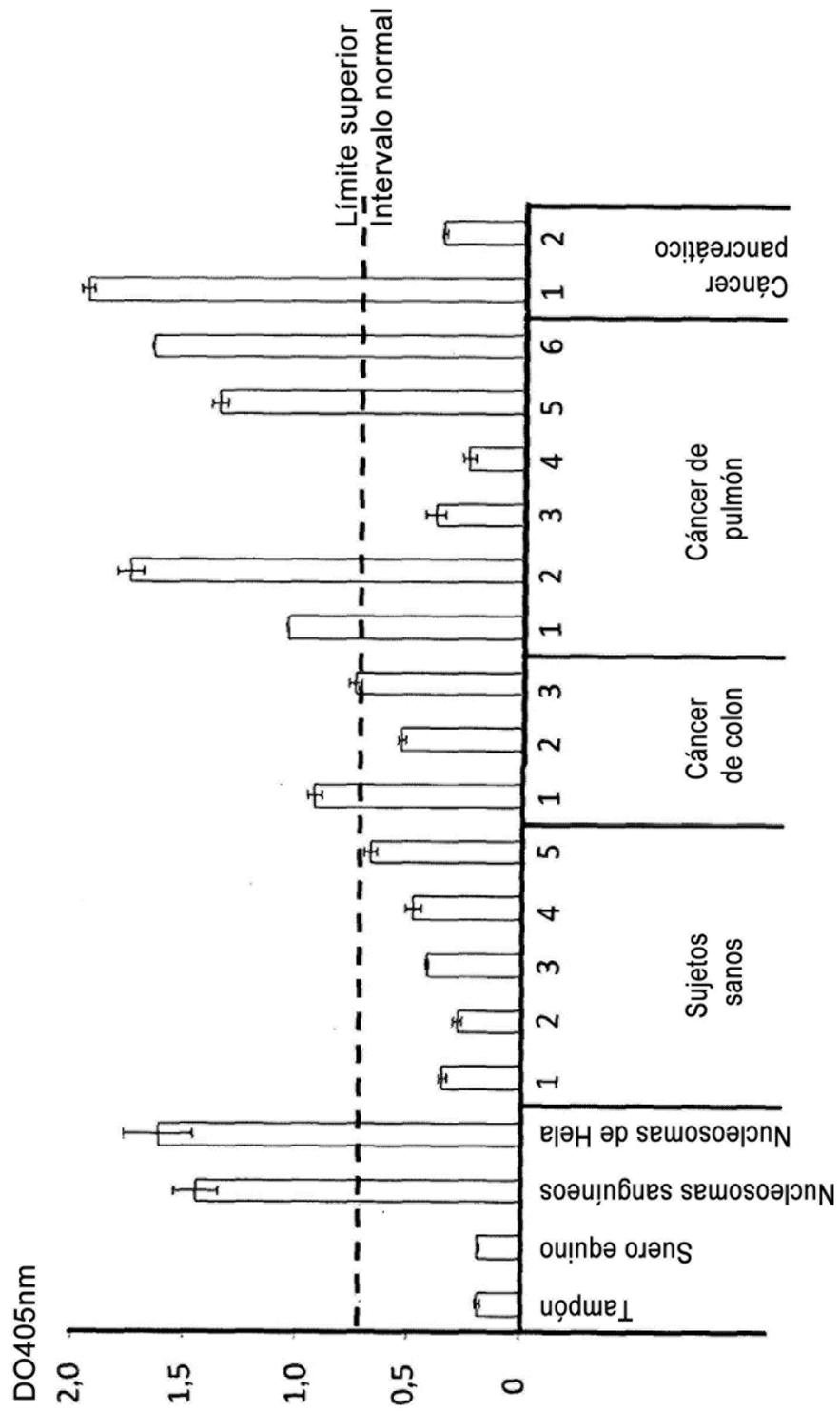


FIGURA 2

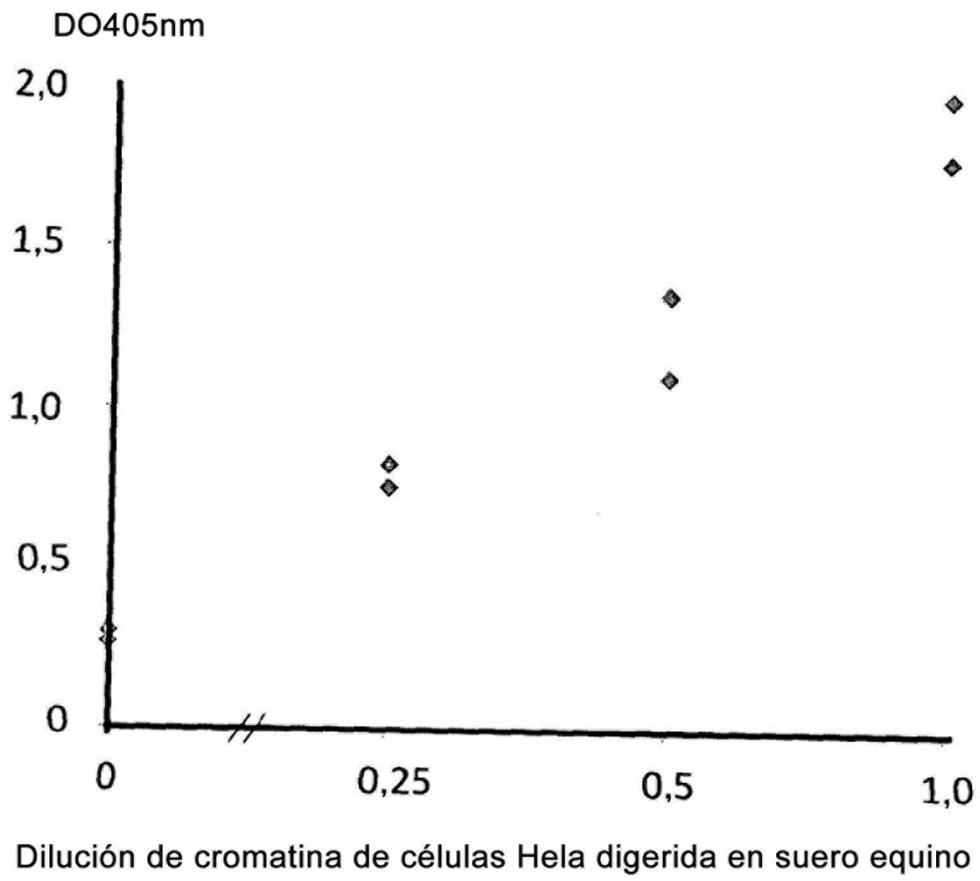


FIGURA 3

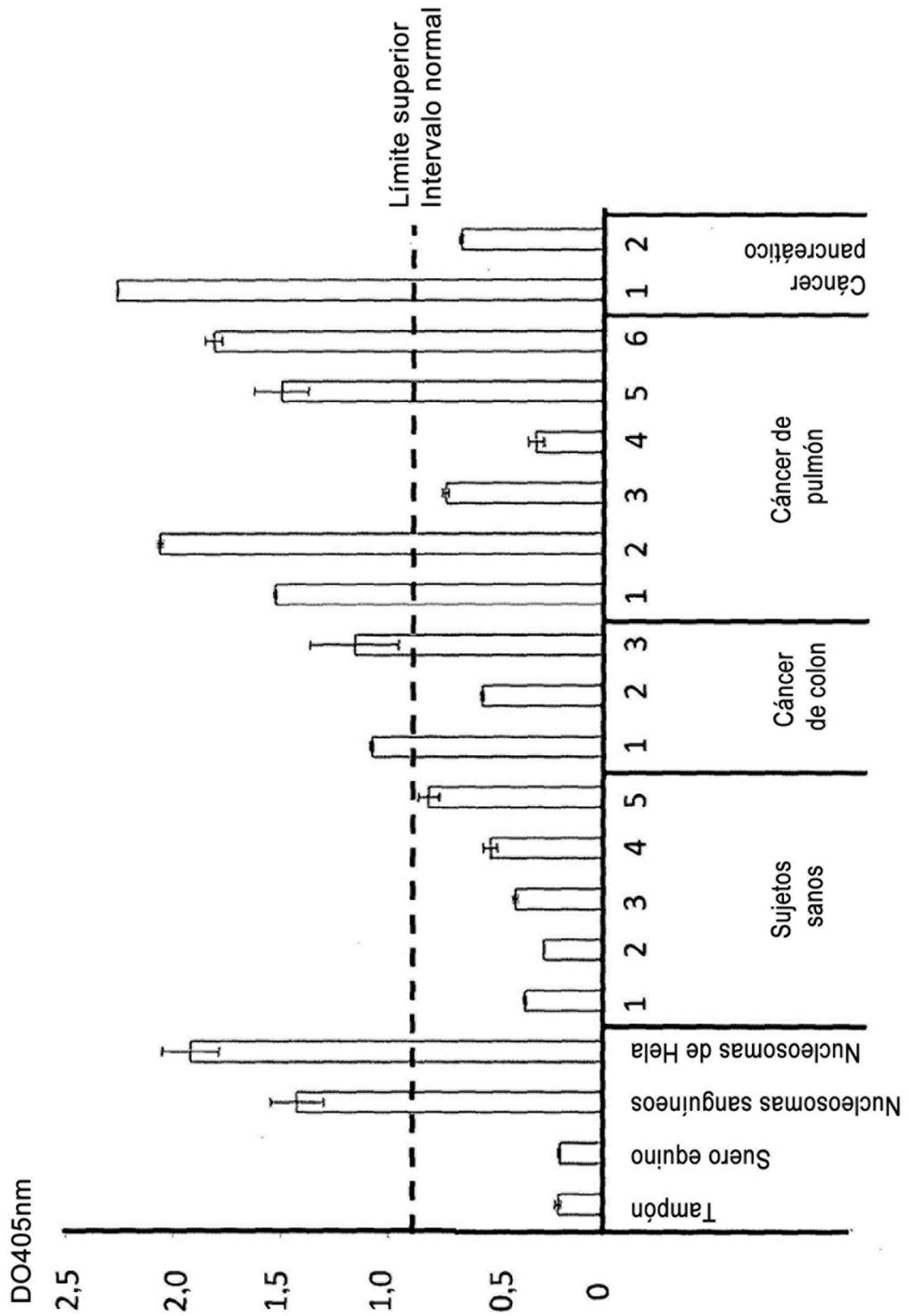


FIGURA 4

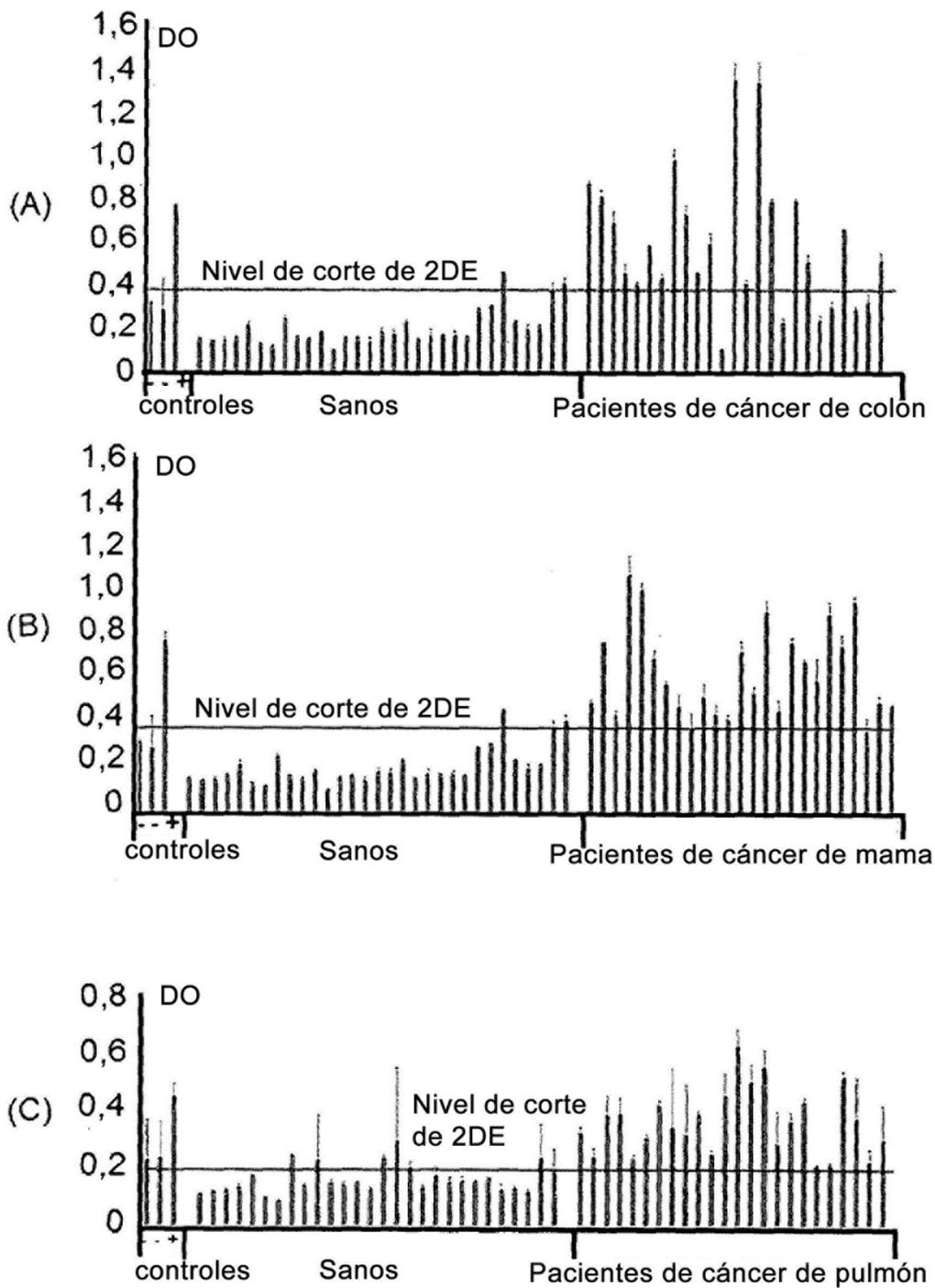


FIGURA 5

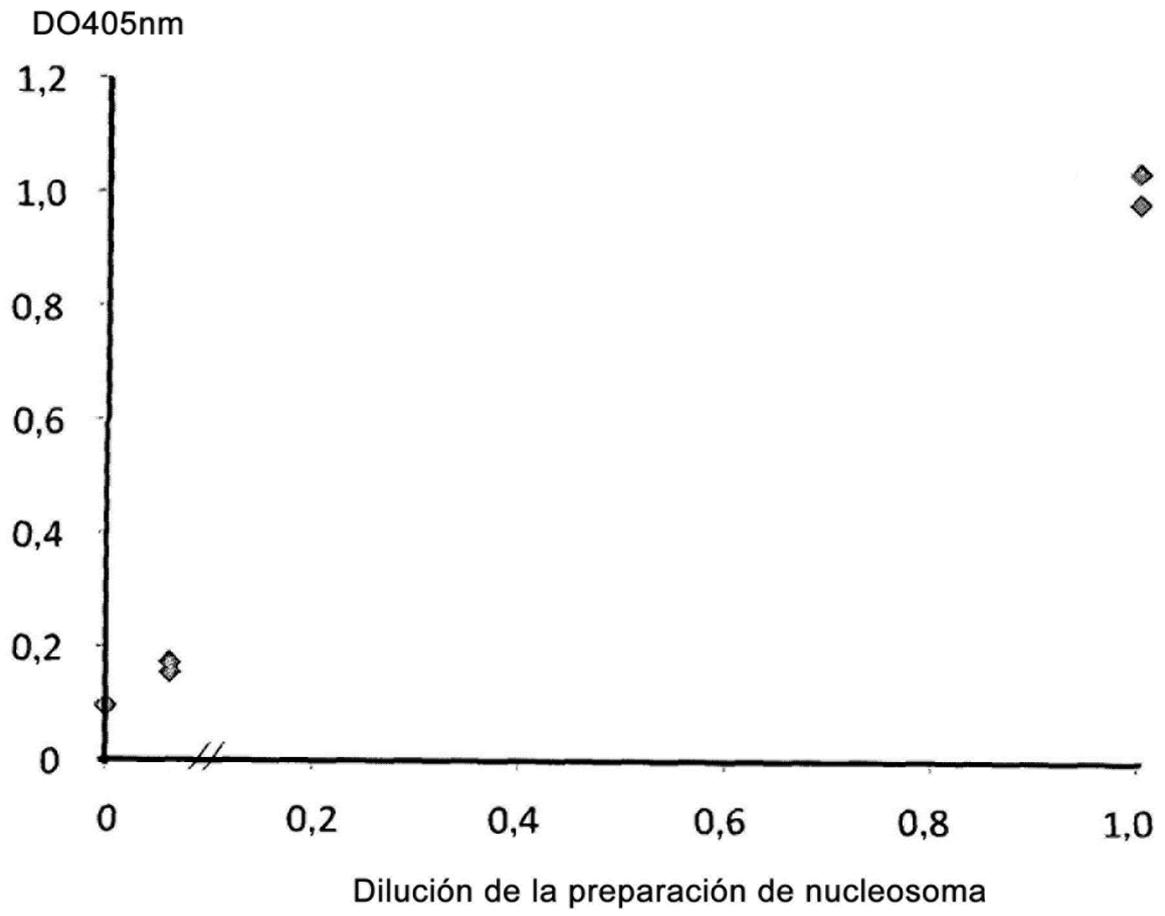


FIGURA 6

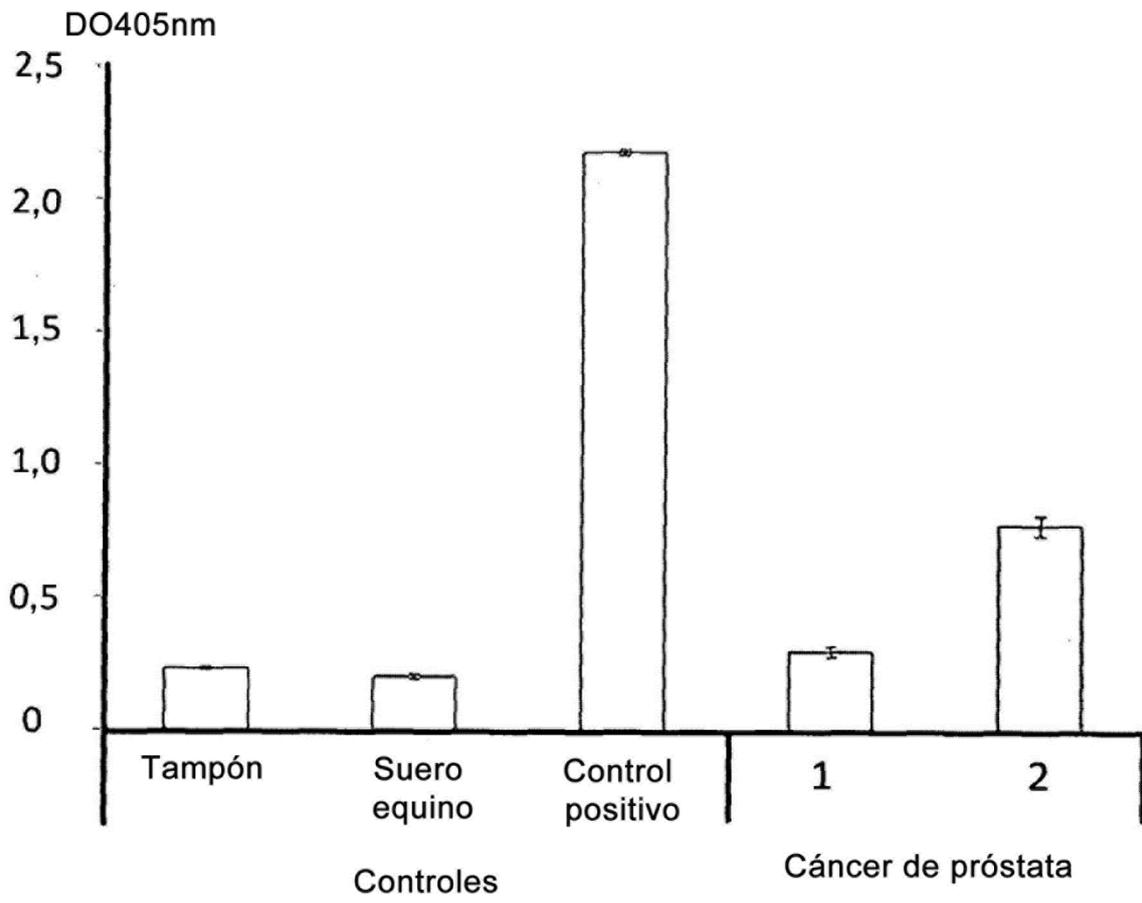


FIGURA 7

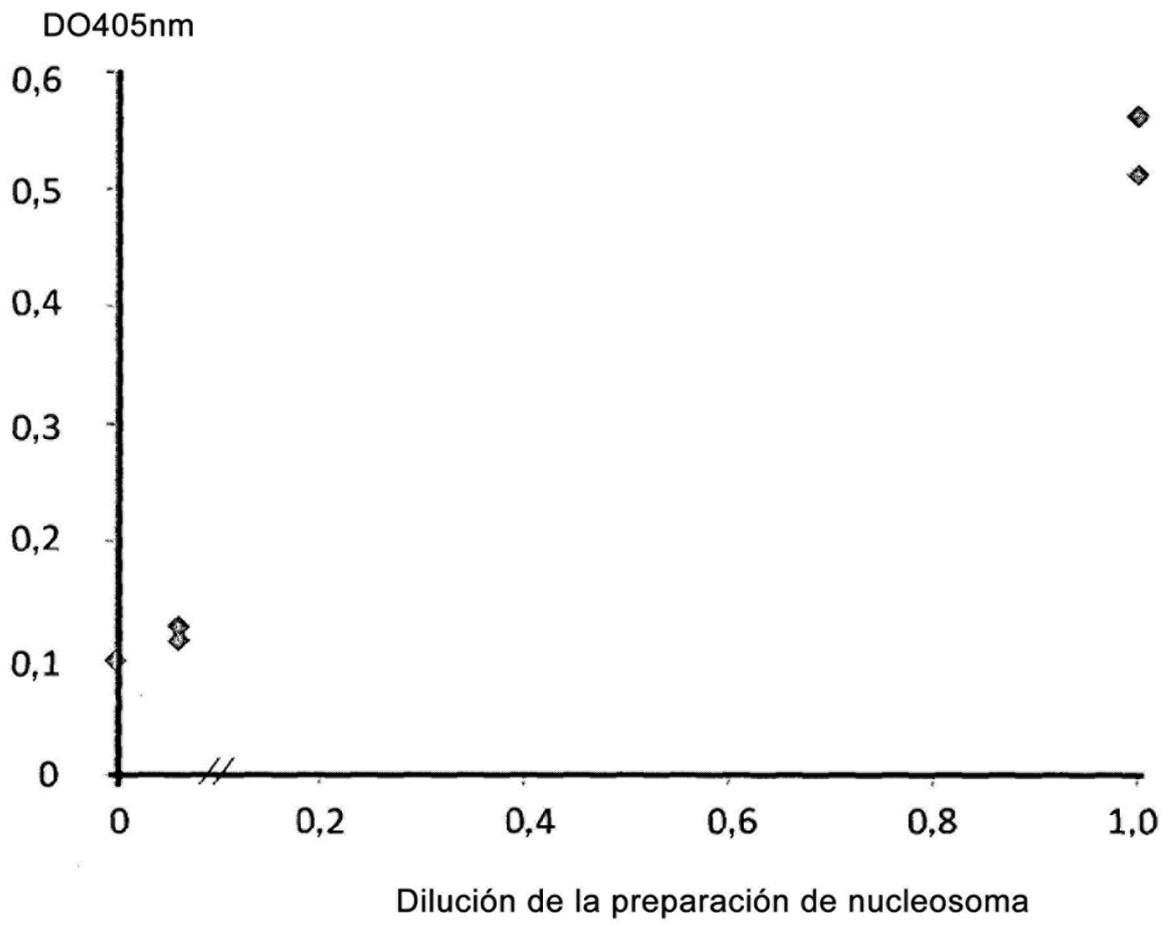


FIGURA 8

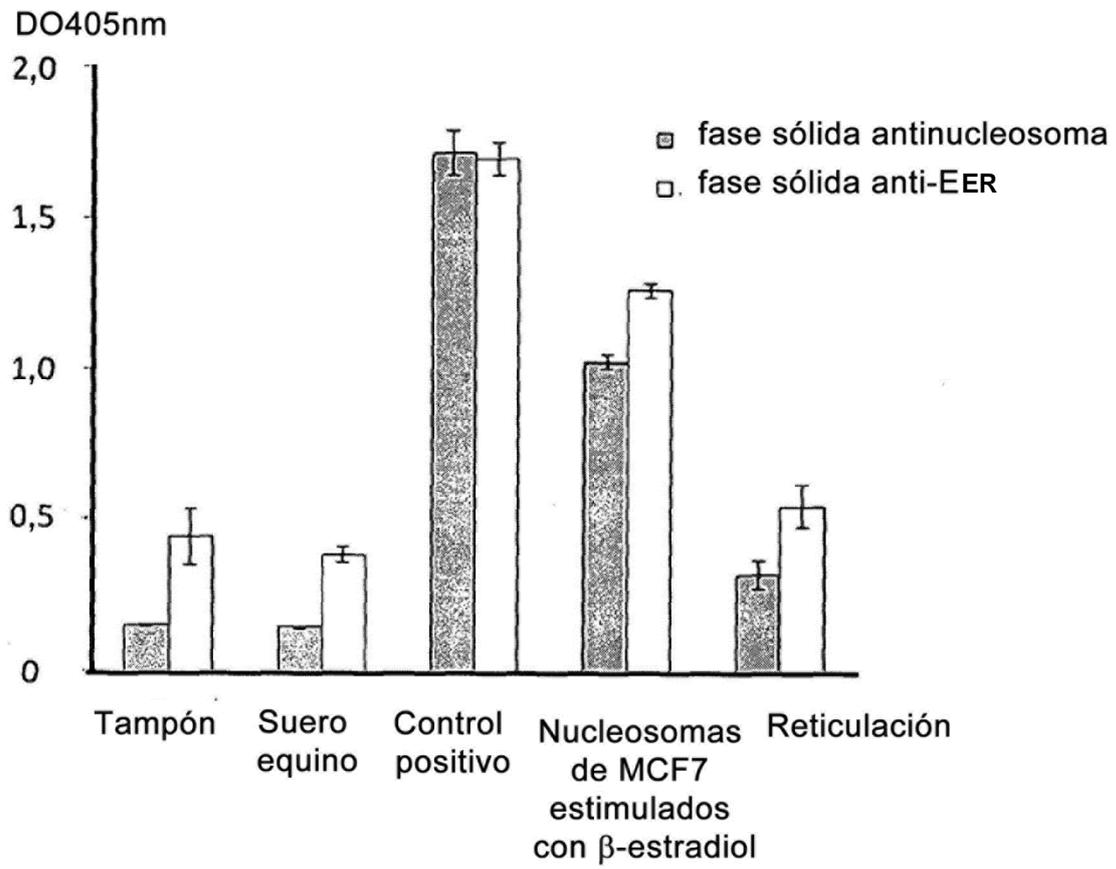


FIGURA 9

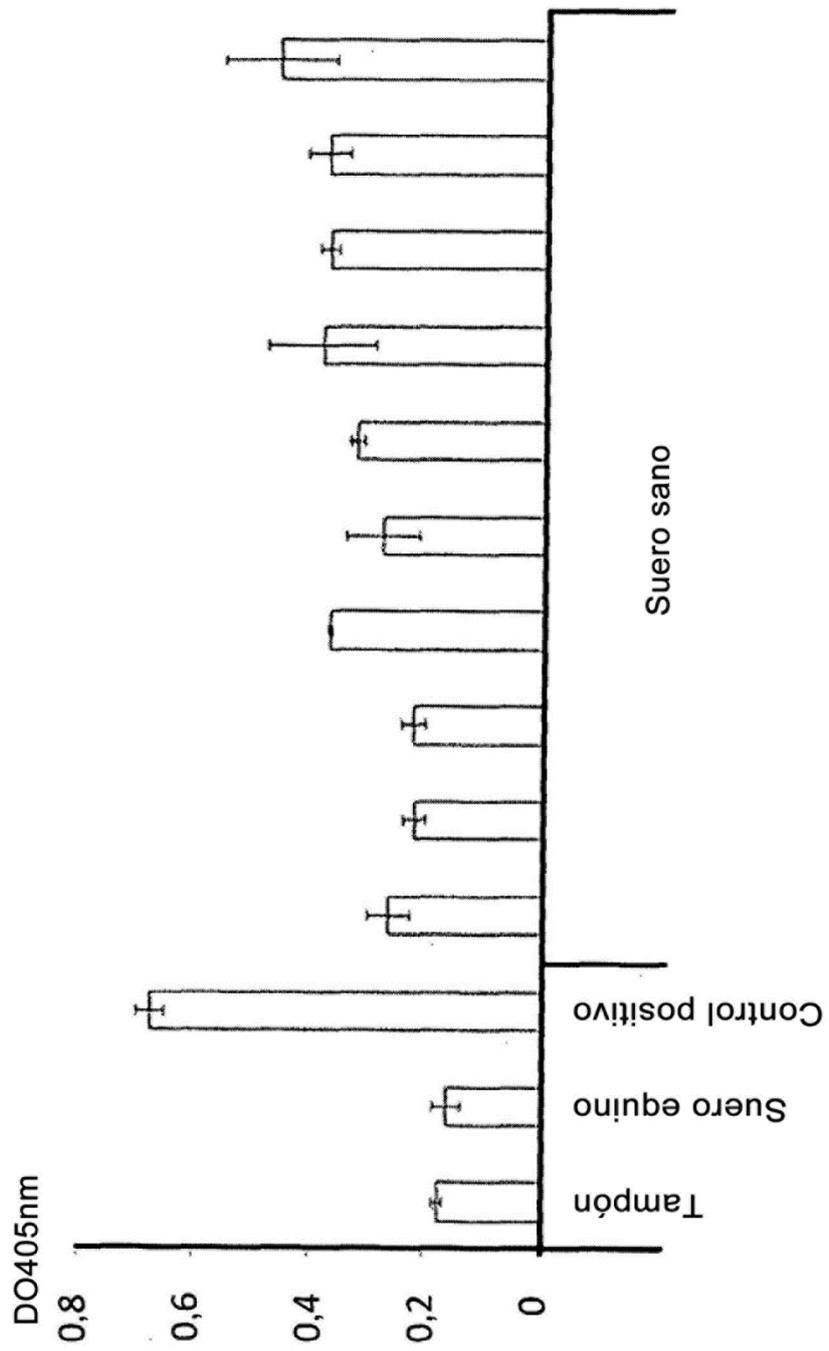


FIGURA 10

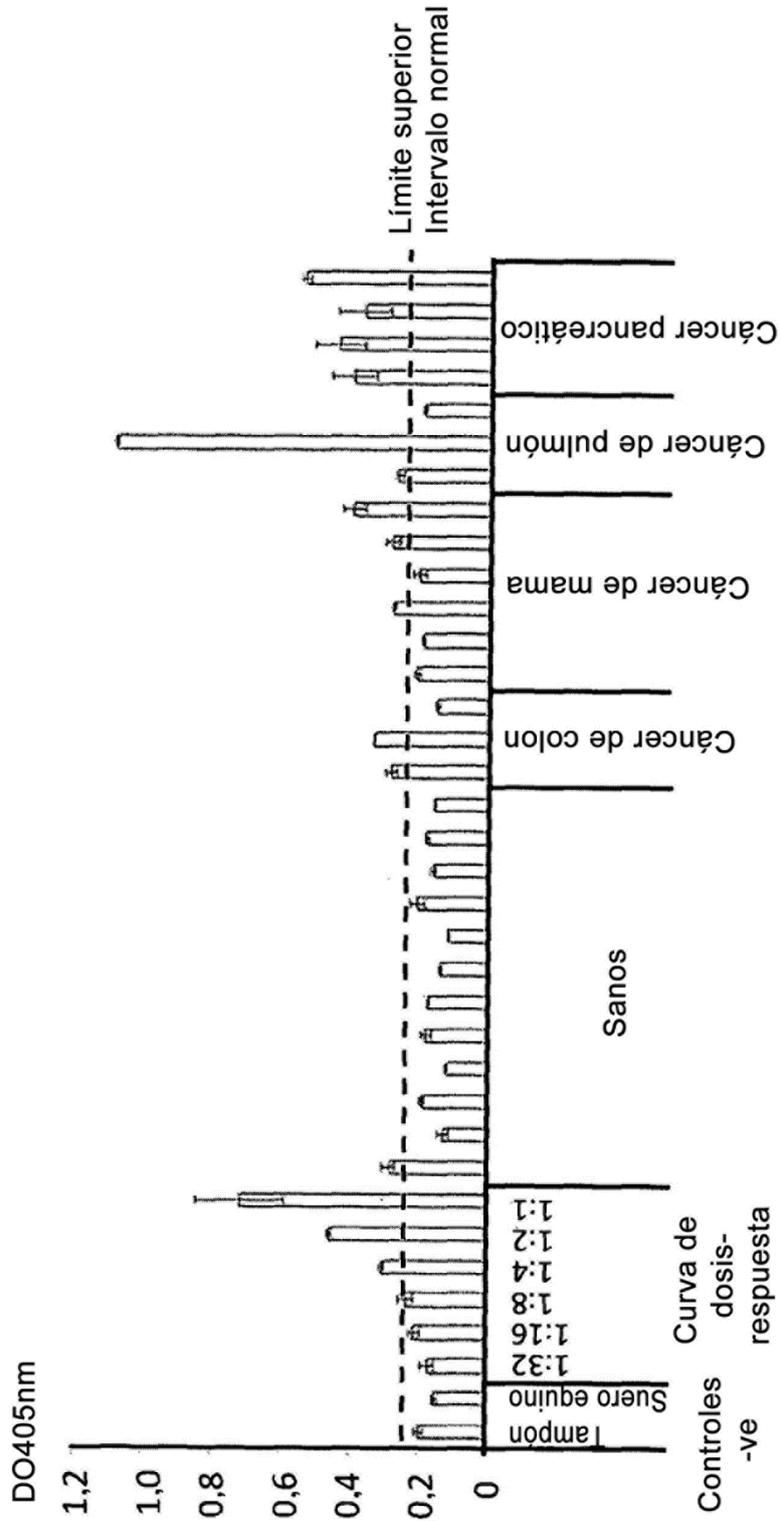


FIGURA 11