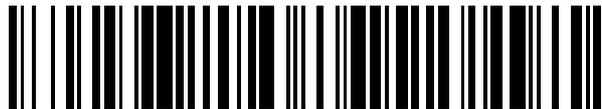


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 380**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2012 PCT/GB2012/052131**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13030579**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2012 E 12762367 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2751569**

54 Título: **Método para detectar nucleosomas que contienen variantes de histonas**

30 Prioridad:

**01.09.2011 GB 201115098**  
**01.09.2011 US 201161530304 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.04.2018**

73 Titular/es:

**BELGIAN VOLITION SPRL (100.0%)**  
**22 Rue Phocas Lejeune**  
**5032 Isnes, BE**

72 Inventor/es:

**MICALLEF, JACOB VINCENT**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 662 380 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

Método para detectar nucleosomas que contienen variantes de histonas

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un método para detectar y medir la presencia de mononucleosomas y oligonucleosomas y nucleosomas que contienen isoformas de histonas particulares y el uso de dichas mediciones para la detección y el diagnóstico de la enfermedad.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cuerpo humano comprende varios cientos de tipos de células. Todos estos tipos de células contienen el mismo genoma, pero tienen fenotipos muy diferentes y diferentes funciones 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 nucleasas, 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 una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4). Alrededor de este complejo están envueltos 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).

25

La estructura de los nucleosomas puede variar por modificación postranscripcional (PTM) de proteínas histonas y por la inclusión de proteínas histonas variantes. La PTM de proteínas histonas aparece típicamente en las colas de las 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 y muchos otros. 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 aminoácidas. 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 National Human Genome Research Institute NHGRI Histone DataBase (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).

30

La renovación 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, se informa que el nivel de nucleosomas circulantes encontrados en sujetos sanos es bajo. Se encuentran niveles elevados en sujetos con una diversidad de afecciones, incluyendo muchos cánceres, enfermedades autoinmunes, afecciones inflamatorias, ictus e infartos de miocardio (Holdenrieder y Stieber, 2009).

45

Se pueden detectar mononucleosomas y oligonucleosomas por ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA) y se han notificado varios procedimientos (Salgame *et al*, 1997; Holdenrieder *et al*, 2001; van Nieuwenhuijze *et al*, 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. Usando estos ensayos, los trabajadores en el campo informan que el nivel de nucleosomas en el suero es más alto (hasta en un orden de magnitud) que en las muestras de plasma tomadas de los mismos pacientes. Esto también es cierto para las mediciones de ADN en suero y plasma hechas por PCR (Holdenrieder *et al*, 2005). Se desconoce el motivo, pero los autores especulan que puede deberse a una liberación adicional de ADN durante el proceso de coagulación. Sin embargo, se ha encontrado que los resultados de los ensayos de ELISA de nucleosomas de la técnica actual no concuerdan entre sí. Además, aunque se informa que la mayoría del ADN

50

55

60

circulante en suero o plasma existe como mononucleosomas y oligonucleosomas (Holdenrieder et al, 2001), los niveles medidos de nucleosomas y ADN en suero o plasma no concuerdan bien. Se ha indicado que el coeficiente de correlación entre los resultados de ELISA para los niveles circulantes de nucleosomas libres y los niveles circulantes de ADN medidos por PCR en tiempo real (Reacción en cadena de la polimerasa) es  $r = 0,531$  en suero y  $r = 0,350$  en plasma (Holdenrieder et al, 2005).

Los métodos de ELISA de nucleosomas actuales se usan en cultivo celular, principalmente como un método para detectar apoptosis (Salgame et al, 1997; Holdenrieder et al, 2001; van Nieuwenhuijze et al, 2003), y también se usan para la medición de nucleosomas libres de células circulantes en suero y plasma (Holdenrieder et al, 2001). Los niveles de nucleosomas séricos y plasmáticos libres de células liberados en la circulación por las células moribundas se han medido mediante métodos ELISA en estudios de varios cánceres diferentes para evaluar su uso como biomarcador potencial (Holdenrieder et al, 2001). Se reseña que los niveles medios de nucleosomas en circulación son altos en la mayoría, pero no en todos, los cánceres estudiados. Se observaron los niveles 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 informa que los pacientes con tumores malignos tienen concentraciones séricas de nucleosomas que varían considerablemente y se encontró que algunos pacientes con enfermedad tumoral avanzada tienen bajos niveles circulantes de nucleosomas, dentro del intervalo medido para sujetos sanos (Holdenrieder et al, 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 (Holdenrieber y Stieber, 2009). Sorprendentemente, se ha demostrado que muchos sujetos con cáncer cuyos niveles circulantes de nucleosomas son bajos o indetectables según se mide mediante estos métodos de ELISA nucleosómicos de la técnica actual, de hecho, tienen niveles elevados de nucleosomas libres de células circulantes. Hemos diseñado y demostrado nuevos métodos de ELISA para nucleosomas que detectan nucleosomas no detectados por los métodos de ELISA de la técnica actual.

Los métodos de ELISA para la detección de PTM de histonas también son conocidos en la técnica. Los métodos ELISA para la detección de PTM en proteínas de histonas libres (no unidas a otras histonas y ADN en un complejo de nucleosomas) se usan para la detección de PTM en histonas extraídas, usualmente por extracción de ácido, de lisados celulares. Se ha informado sobre inmunoensayos para la detección de PTM en nucleosomas libres de células circulantes (Bawden et al, 2005). Recientemente se ha informado sobre un método para la detección por ELISA de PTM de histonas en nucleosomas purificados recubiertos directamente con pocillos de microtitulación (Dai et al, 2011). En este método, los nucleosomas obtenidos por digestión de extractos de cromatina de células cultivadas se recubren directamente en pocillos de microtitulación y se hacen reaccionar con anticuerpos anti-PTM. Será evidente para los expertos en la técnica que este método requiere muestras de nucleosomas relativamente puras y no es adecuado para la medición directa de PTM de histonas en medios biológicos complejos tales como sangre o suero.

Se ha informado sobre un método de inmunoprecipitación de cromatina modificado (ChIP) para la detección de una PTM de histona (H3K9Me, histona H3 monometilada en el residuo de lisina K9) en nucleosomas libres de células asociados con una secuencia de ADN particular en plasma. Se informó que el nivel de metilación de la histona específica de la secuencia era independiente de la concentración de nucleosomas circulantes (Deligezer et al, 2008).

Además de la señalización epigenética mediada por la posición del nucleosoma y la estructura del nucleosoma (en términos tanto de variante de proteína histona constituyente y estructuras PTM), el control de la expresión génica en células también está mediado por modificaciones en nucleótidos de ADN que incluyen el estado de metilación de citosina del ADN. 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. Se informa que el ADN metilado en forma de 5-metilcitosina se produce en posiciones en la secuencia de ADN donde se produce un nucleótido de citosina junto a un nucleótido de guanina. Estas posiciones se denominan "CpG" para abreviar. Se informa que más del 70% de las posiciones CpG están metiladas en vertebrados (Pennings et al, 2005). Las regiones del genoma que contienen una alta proporción de sitios CpG a menudo se denominan "islas CpG", y aproximadamente el 60% de las secuencias promotoras de genes humanos están asociadas con dichas islas CpG (Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011). En genes activos, estas islas CpG generalmente están hipometiladas. La metilación de las secuencias de promotor del gen está asociada con la inactivación del gen estable. La metilación del ADN también se produce comúnmente en elementos repetitivos que incluyen elementos repetitivos Alu y elementos de nucleótidos intercalados largos (Herranz y Estellar, 2007; Allen et al, 2004).

Se reseñó la implicación de la metilación del ADN en el cáncer ya en 1983 (Feinberg y Vogelstein, 1983). Los patrones de metilación de ADN observados en células cancerosas difieren de aquellos de células sanas. Se informa que los elementos repetitivos, particularmente alrededor de las áreas pericentroméricas, están hipometilados en el

cáncer en relación con las células sanas, pero se ha informado que los promotores de genes específicos están hipermetilados en el cáncer. Se informa que el balance de estos dos efectos da como resultado la hipometilación global del ADN en las células cancerosas (Rodríguez-Paredes, Esteller, 2007).

5 La hipermetilación de ciertos genes específicos se puede usar como un biomarcador de diagnóstico para cánceres. Por ejemplo, se indicó que un método 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 et al., 2008). El estado de metilación del ADN de genes o loci específicos usualmente se detecta por desaminación selectiva de bisulfito de citosina, pero no 5-metilcitosina, a uracilo, lo que  
10 conduce a un cambio de secuencia de ADN primario que puede detectarse por secuenciación u otros medios (Allen et al, 2004).

La hipometilación global del ADN es un sello distintivo de las células cancerosas (Estellar 2007 y Hervouet et al, 2010). La metilación global del ADN se puede estudiar en las células usando técnicas de inmunohistoquímica (IHC).  
15 Como alternativa, se extrae el ADN de las células para análisis. Se han notificado varios métodos para la detección de metilación global en ADN extraído de células incluyendo la digestión de restricción y el análisis de vecinos más cercanos, ensayos fluorescentes usando cloracetaldéhidó, determinación inversa por metilación de todos los sitios CpG usando ADN metiltransferasa junto con S-adenosil metionina marcada con tritio para calcular la cantidad de CpG no metilado y la digestión del ADN en nucleótidos únicos para el análisis mediante cromatografía líquida de alto  
20 rendimiento, cromatografía de capa fina, o cromatografía líquida seguida de espectroscopía de masas. Las desventajas de estos métodos son los que requieren mucha mano de obra y/o requieren grandes cantidades de ADN extraído de buena calidad (Allen et al 2004). Los métodos basados en PCR que implican desaminación con bisulfito superan la necesidad de grandes cantidades de ADN, pero deben amplificar regiones genómicas específicas, típicamente secuencias repetitivas, como indicativo del contenido total del genoma de 5-metilcitosina  
25 (Allen et al 2004). Estos métodos para la medición de la metilación del ADN global se han utilizado para estudiar el ADN extraído de una diversidad de células y tejidos. Algunos trabajadores han estudiado el ADN extraído de los glóbulos blancos en sangre entera, ya que es más fácil de obtener de una manera mínimamente invasiva (Moore et al, 2008, Ting Hsiung et al, 2007, Mansour et al, 2010). La cromatografía líquida con espectrometría de masas se considera el estándar de oro para la medición de la metilación del ADN global, pero es costosa y el ADN se debe  
30 digerir en un único nucleótido antes del análisis (Vasser et al, 2009).

Métodos recientes para la estimación de la metilación del ADN global incluyen cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con espectrometría de masas de ADN hidrolizado extraído de tejido (Zhang et al, 2011) y un método de secuenciación digital específica de metilación (MSDS) (Ogoshi et al 2011). Se ha descrito un inmunoensayo  
35 competitivo clásico para la metilación del ADN global (así como un ensayo similar para la metilación de 5-hidroximetilcitosina). En este método, el ADN extraído de células o tejidos se añade a un pocillo de microtitulación recubierto con un conjugado de citidina 5-metilado, se añade un anticuerpo anti-5-metilcitidina y la distribución de la unión de anticuerpos entre el conjugado de 5-metilcitidina recubierto y el ADN metilado en la muestra extraída se compara con la de los estándares conocidos para estimar el nivel de metilación del ADN global presente en la  
40 muestra (Cell Biolabs, 2011). En otro método de tipo inmunoensayo, el ADN extraído de tejidos o de muestras de plasma o suero se recubre con un pocillo de microtitulación y se detecta ADN metilado usando un anticuerpo anti-5-metilcitosina (Vasser, et al, 2009; Epigentek, 2009). Una desventaja de estos métodos es que requieren la extracción de ADN que implica la desnaturalización y la eliminación de todo el nucleosoma y la estructura de la cromatina del ADN. No son adecuados, por ejemplo; para la medición directa de la metilación del ADN global en fluidos biológicos  
45 tales como lisado tisular, sangre, plasma o suero sin una etapa de extracción de ADN.

También se ha informado sobre la modificación de 5-hidroximetilo de bases de citosina en ADN. El papel de la 5-hidroximetilación aún no se conoce bien, pero parece estar involucrado en la regulación genética (Stroud et al, 2011).

50 Los métodos actuales para la detección de la metilación del ADN global implican la extracción o purificación del ADN y no son adecuados para métodos de diagnóstico rápidos, de alto rendimiento, de bajo coste y mínimamente invasivos. De forma similar, el análisis de ADN para otras bases modificadas o inusuales (por ejemplo, uracilo, inosina, xantina e hipoxantina) solamente puede investigarse mediante el análisis de ADN sustancialmente puro o  
55 extraído. Dicho análisis no puede realizarse directamente en medios biológicos complejos tales como lisado tisular, sangre, plasma o suero.

Las variantes de histona (también conocidas como isoformas de histona) también se conocen como reguladores epigenéticos de expresión génica (Herranz y Esteller, 2007). Las variantes de histona se han estudiado in vivo e in  
60 vitro utilizando una diversidad de técnicas que incluyen estudios de inactivación del gen que codifica una variante

particular (por ejemplo, usando desactivación de ARNi), inmunoprecipitación de cromatina, marcado isotópico estable de aminoácidos y proteómica de espectrometría de masas cuantitativa, inmunohistoquímica y Western Blotting (Whittle et al, 2008, Boulard et al, 2010, Sporn et al, 2009, Kapoor et al, 2010, Zee et al, 2010, Hua et al, 2008).

5

Se ha informado sobre estudios de inmunohistoquímica de la expresión de variantes de histona en muestras de tejido extraídas en cirugía o mediante biopsia de sujetos diagnosticados con cáncer de pulmón, cáncer de mama y melanoma. Estos estudios de inmunohistoquímica informan que la tinción de las variantes de histona macroH2A (mH2A) y H2AZ en muestras de tejido de cáncer resecado puede tener aplicación pronóstica en estos cánceres (Sporn et al, 2009, Hua et al, 2008, Kapoor et al, 2010). Una desventaja de los métodos inmunohistoquímicos para uso clínico es que la recogida de muestra de tejido es invasiva al implicar cirugía o biopsia. Otra desventaja de los métodos de inmunohistoquímica es que no son aptos para el diagnóstico precoz o para el diagnóstico de detección ya que, usualmente, ya existe una expectativa razonable de la enfermedad antes de realizar una biopsia o resección de tejido. Las pruebas de ELISA en sangre mínimamente invasivas son adecuadas para una gama más amplia de aplicaciones y superarían estas desventajas y serían preferibles para el paciente, así como también más rápidas, de menor coste y de mayor rendimiento para el proveedor de atención médica.

El documento WO2005019826 describe métodos para detectar modificaciones de histonas en nucleosomas libres de células con el fin de diagnosticar una enfermedad. Salgame et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25(3): 680-681 describe un método de ELISA para detectar la apoptosis mediante la medición de nucleosomas. El kit PathScan Pan-Methyl Histone H3 Sandwich ELISA (véase Cell Signalling, 2008) detecta los niveles endógenos de la histona H3 cuando se metila en Lys9. MotifVations (2011) 12(1): 1-12 describe productos de Active Motif que incluyen pruebas de ELISA para la medición de modificaciones de histonas postraduccionales. Sporn et al. (2009) Oncogene 28:3423-3428 describe la detección de isoformas de histonas macroH2A para predecir el riesgo de recurrencia del cáncer de pulmón. Hua et al. (2008) Mol. Syst. Biol. 4: 1-14 describe la medición de la isoforma de histona H2AZ en células de cáncer de mama MCF7 usando inmunohistoquímica. Zeerleder et al. (2003) Crit. Care Med. 31(7): 1947-1951 describe la medición de nucleosomas circulantes en pacientes con inflamación sistémica y sepsis.

Sin embargo, los nucleosomas libres de células que contienen nucleótidos particulares, nucleótidos modificados o variantes de histonas no se han medido en sangre ni en ningún otro medio y no se han sugerido o contemplado dichas mediciones. No se han indicado estudios sobre la presencia o ausencia de nucleótidos, nucleótidos modificados o variantes de histonas en nucleosomas libres de células en la sangre ni si tienen valor como biomarcadores sanguíneos de la enfermedad. Actualmente no existen métodos para la detección o medición de nucleótidos, nucleótidos modificados o variantes de histonas en nucleosomas intactos libres de células. Ahora se indican los métodos para tales pruebas y su uso en muestras de plasma y suero tomadas de sujetos sanos y dañados. Sorprendentemente, se ha demostrado que pueden detectarse niveles elevados de nucleosomas intactos que comprenden variantes de histonas específicas en muestras de plasma y suero para las que no se detectan nucleosomas, o niveles bajos, mediante métodos de ELISA de nucleosomas de la técnica actual.

#### 40 RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de una isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células como un biomarcador en una muestra de fluido corporal para el diagnóstico de cáncer.

45

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar la presencia de una isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células en una muestra de fluido corporal que comprende las etapas de:

50 (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un agente de unión que se une a la isoforma de histona;  
 (ii) detectar o cuantificar la unión de dicho agente de unión a la isoforma de histona en la muestra de fluido corporal;  
 y  
 (iii) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia de nucleosomas que contienen la isoforma de histona en la muestra de fluido corporal.

55

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar la presencia de una isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células en una muestra de fluido corporal que comprende las etapas de:

60 (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un primer agente de unión que se une a los nucleosomas;

(ii) poner en contacto los nucleosomas o muestra de fluido corporal con un segundo agente de unión que se une a la isoforma de histona;

(iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a la isoforma de histona en la muestra de fluido corporal; y

5 (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia de nucleosomas que contienen la isoforma de histona en la muestra de fluido corporal.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar la presencia de una isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células en una muestra de fluido corporal que comprende  
10 las etapas de:

(i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un primer agente de unión que se une a la isoforma de histona;

15 (ii) poner en contacto los nucleosomas o muestra de fluido corporal con un segundo agente de unión que se une a nucleosomas;

(iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a nucleosomas en la muestra de fluido corporal; y

20 (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia de nucleosomas que contienen la isoforma de histona en la muestra de fluido corporal.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método in vitro para detectar o diagnosticar cáncer en un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

25 (i) detectar o medir una isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células en un fluido corporal obtenido de un sujeto; y

(ii) usar el nivel de isoforma de histona asociado al nucleosoma detectado para identificar el cáncer en el sujeto.

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

30 Figura 1. Curva de respuesta a la dosis de ELISA para la detección de nucleosomas libres de células humanas preparados mediante un método publicado (\*Holdenrieder et al, 2001) que contiene la variante de histona macroH2A1.1 diluida en suero de ternero.

Figura 2. Curva de respuesta a la dosis de ELISA para la detección de la variante de histona macroH2A2 en  
35 nucleosomas libres de células en cromatina digerida reticulada extraída de células MCF7 diluidas en suero de ternero.

Figura 3. Curva de respuesta a la dosis de ELISA para la detección de la variante de histona H2AZ en nucleosomas libres de células en cromatina digerida reticulada extraída de células MCF7 diluidas en suero de ternero.

40 Figura 4. Niveles de nucleosomas detectados para muestras séricas y plasmáticas con EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos usando métodos de ELISA de nucleosomas de la técnica actual.

Figura 5. Niveles asociados a nucleosomas libres de células de la variante de histona mH2A1.1 detectados para  
45 muestras séricas y plasmáticas con EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos usando el ELISA de la invención.

Figura 6. Niveles asociados a nucleosomas libres de células de la variante de histona mH2A2 detectados para  
muestras séricas y plasmáticas con EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos usando el ELISA de la invención.

50 Figura 7. Niveles asociados a nucleosomas libres de células de la variante de histona H2AZ detectados para  
muestras séricas y plasmáticas con EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos usando el ELISA de la invención.

Figura 8. Niveles asociados a nucleosomas libres de P-H2AX(Ser139) detectados para muestras séricas y  
plasmáticas con EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos usando el ELISA de la invención.

55 Figura 9. Niveles asociados a nucleosomas libres de células de ADN metilado con 5-metilcitosina detectados para  
muestras séricas y plasmáticas con EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos usando el ELISA de la invención.

Figura 10. Niveles asociados a nucleosomas libres de células de ADN metilado con 5-hidroximetilcitosina detectados  
60 para muestras séricas tomadas de 20 voluntarios sanos usando el ELISA de la invención.

Figura 11. Niveles asociados a nucleosomas libres de células de tipos de histonas y nucleótidos detectados para muestras plasmáticas con EDTA tomadas de 3 sujetos con cáncer de colon detectado usando los métodos de ELISA de la invención.

5 Figura 12. Niveles asociados a nucleosomas libres de células de tipos de histonas y nucleótidos detectados para muestras plasmáticas con EDTA tomadas de 13 sujetos con cáncer de pulmón detectado usando los métodos de ELISA de la invención.

Figura 13. Niveles asociados a nucleosomas libres de células de tipos de histonas y nucleótidos detectados para muestras plasmáticas con EDTA tomadas de 2 sujetos con cáncer de páncreas detectado usando los métodos de ELISA de la invención.

Figura 14. Niveles asociados a nucleosomas libres de células de tipos de histonas y nucleótidos detectados para una muestra plasmática con EDTA tomada de 1 sujeto con cáncer oral detectado usando los métodos de ELISA de la invención.

Figura 15. Niveles asociados a nucleosomas libres de células de tipos de histonas y nucleótidos detectados para muestras plasmáticas con EDTA tomadas de 4 enfermedades diferentes con cáncer normalizadas como una proporción de niveles de ADN metilado con 5-metilcitosina asociados a nucleosoma detectados usando los métodos de ELISA de la invención. Se muestran los niveles normalizados para una muestra que contiene nucleosomas de voluntarios sanos producidos por el método de \*Holdenrieder et al 2001 para comparación.

Figura 16. Niveles de histonas H2AZ asociadas a nucleosomas libres de células de muestras plasmáticas con EDTA humanas tomadas de pacientes con cáncer medidos usando un anticuerpo de detección biotinilado anti-H2AZ con dos anticuerpos monoclonales de captura anti-histona diferentes.

Figura 17. Niveles asociados a nucleosomas libres de mH2A1.1, H2AZ, P-H2AX (Ser139) y 5-metilcitosina (5 mc) detectados en muestras de plasma con EDTA, plasma de citrato y plasma de heparina tomadas de voluntarios sanos usando el método de ELISA de la invención.

Figura 18. Niveles de 5-metilcitosina asociados a nucleosomas libres de células detectados para muestras de suero tomadas de 3 voluntarios sanos y 10 sujetos con cáncer de colon detectados usando el método de ELISA de la invención.

Figura 19. Niveles de variantes de histona H2AZ asociados a nucleosomas libres de células detectados para muestras de plasma con EDTA tomadas de 13 voluntarios sanos y 55 pacientes con cáncer. Se muestran los puntos de corte definidos como el valor medio de las muestras sanas más una o dos desviaciones estándar en la media.

Figura 20. Niveles de variantes de histona H2AZ asociados a nucleosomas libres de células detectados para muestras de plasma con EDTA tomadas de 10 voluntarios sanos y 61 pacientes con cáncer. Se muestra el punto de corte definido como el valor medio de las muestras sanas más dos desviaciones estándar en la media.

Figura 21. Niveles de variantes de histonas H2AZ asociados a nucleosomas libres de células detectados para muestras de suero tomadas de 4 voluntarios sanos y 20 pacientes con cáncer de páncreas. El punto de corte mostrado se define como el valor medio de las muestras sanas más dos desviaciones estándar en la media.

Figura 22. Se detectaron niveles de variantes de histona H2AZ asociados a nucleosomas libres de células para muestras plasmáticas con EDTA tomadas de pacientes con cáncer de pulmón con un tamaño tumoral, estadio y desarrollo ganglionar en aumento.

N1 Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales peribronquiales y/o ipsilaterales hiliares y nodos intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa  
 N2 Metástasis en uno o más ganglios linfáticos ipsilaterales mediastínicos y/o subcarinales  
 N3 Metástasis en uno o más ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos contralaterales o ipsilaterales, o supraclaviculares  
 T1: tumor <3 cm  
 T2: 3 cm <tumor <7 cm  
 T3: tumor >7 cm  
 T4: tumor de cualquier tamaño que invade otro órgano, tejido  
 M0: no hay diseminación de la enfermedad más allá de los ganglios linfáticos regionales

M1: diseminación de la enfermedad a metástasis distantes.

Figura 23. Niveles medios asociados a nucleosomas libres de células de nucleótidos y tipos de histonas detectados utilizando los métodos de ELISA de la invención para muestras plasmáticas con EDTA tomadas de 10 enfermedades cancerosas normalizadas diferentes como una proporción de niveles de ADN metilados de 5-metilcitosina (5mc) asociados a nucleosomas y expresados en relación con las proporciones medias encontradas en 11 sujetos sanos.

Figura 24. Niveles medios asociados a nucleosomas libres de células de nucleótidos y tipos de histonas detectados mediante métodos de ELISA de la invención para muestras plasmáticas con EDTA tomadas de 2 pacientes con miocardiopatía, 10 pacientes con lupus eritematoso sistémico (lupus), 12 pacientes con colitis ulcerosa, 10 pacientes con enfermedad pulmonar obstrucción crónica (EPOC), 8 pacientes con enfermedad de Crohn, y 10 pacientes con artritis reumatoide (AR) normalizadas como una proporción de los niveles de ADN metilado con 5-metilcitosina (5mc) asociados con nucleosomas y expresados con respecto a las proporciones medias encontradas en 11 sujetos sanos.

## 15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de una isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células como un biomarcador en una muestra de fluido corporal para el diagnóstico de cáncer.

20 En una realización, el nucleosoma es un mononucleosoma o un oligonucleosoma.

En una realización, el cáncer es un cáncer de vejiga, mama, colon, cuello uterino, esófago, riñón, intestino grueso, pulmón, cavidad oral, ovario, páncreas, próstata, recto, piel o estómago. En una realización particular que se puede mencionar, el cáncer es un cáncer de colon, pulmón, cavidad oral o páncreas.

Se han desarrollado pruebas ELISA para la detección y medición de nucleosomas que contienen las variantes de histonas macroH2A1.1 (mH2A1.1), macroH2A2 (mH2A2) y H2AZ. Se ha utilizado un anticuerpo anti-histona como anticuerpo de captura para estos ensayos junto con un anticuerpo de variante anti-histona específico apropiado como anticuerpo de detección. Se ha demostrado que estos métodos ELISA funcionan con anticuerpos de captura anti-nucleosoma alternativos. También se han utilizado los ensayos para mostrar que los nucleosomas que contienen variantes de histonas específicas se pueden medir en muestras de sangre tomadas de sujetos enfermos y se discriminan para su uso como biomarcadores no invasivos o mínimamente invasivos. Los niveles de variante de histona detectados en nucleosomas en muestras séricas y plasmáticas tomadas de sujetos enfermos, en relación con los niveles de otros epítomos de nucleosomas, difieren de los detectados en muestras de sujetos sanos. Además, se encontró que el patrón de los niveles de nucleosomas que contienen diferentes variantes de histonas detectados en nucleosomas en muestras de diferentes enfermedades era diferente para diferentes enfermedades, particularmente cuando los patrones de variantes de histonas asociadas al nucleosoma se examinaron junto con los patrones determinados para nucleosomas que contenían diferentes nucleótidos y PTM, de tal forma que fue posible un diagnóstico diferencial de la enfermedad. Será evidente para los expertos en la técnica que la inclusión de pruebas para nucleosomas que contienen variantes de histonas diferentes o adicionales o modificaciones de histonas o nucleótidos probablemente mejorará la discriminación del diagnóstico diferencial usando dichos patrones.

Para investigar los niveles de nucleosomas encontrados en sujetos sanos usando los métodos de la técnica actual, se midieron los nucleosomas en muestras de suero y plasma, tomadas de los 20 sujetos sanos. Ambos métodos de la técnica actual produjeron señales más altas en muestras de suero tomadas de sujetos sanos que en muestras de plasma. Se muestran los resultados en la Figura 4. Esto es consistente con los datos publicados de que los niveles de nucleosomas son más altos en suero que en plasma (\*Holdenrieder et al, 2001).

Para investigar los niveles de nucleosomas encontrados en sujetos sanos usando los métodos de la invención, se midieron los nucleosomas que contenían las tres variantes de histonas en los sueros de 20 sujetos sanos y en suero bovino sano. Los resultados del suero para las tres pruebas de ELISA fueron todos bajos o indetectables para los 20 sujetos sanos. También se realizó una prueba similar en muestras de plasma con EDTA, tomadas de los 20 sujetos sanos, para los tres métodos de ELISA de la invención y, sorprendentemente, se observaron señales más altas. Fueron detectables altos niveles de nucleosomas libres de células que contenían las variantes de histonas mH2A1.1, mH2A2, H2AZ, así como la histona P-H2AX (Ser139) mediante métodos de la presente invención en plasma con EDTA humano sano, pero se detectaron niveles inferiores en suero humano sano como se muestra en las Figuras 5-8. Las Figuras 9 y 10 muestran que se obtuvieron resultados similares para otras estructuras de nucleosomas. Este hallazgo es inesperado y diferente tanto de los resultados publicados (\*Holdenrieder et al, 2001) como de los resultados que se encontraron para los métodos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual. Por lo tanto,

sorprendentemente, los métodos de la invención producen resultados opuestos a los métodos de la técnica actual para los niveles relativos de nucleosomas que se producen en muestra séricas y plasmáticas con EDTA.

Se investigó si las estructuras de nucleosomas son detectables en cada uno de los diversos tipos comunes de plasma que se pueden recolectar. Se ha encontrado que los altos niveles de H2AZ, mH2A1.1 y P-H2AX (Ser139) asociados a los nucleosomas libres fueron detectables por el método de la invención en plasma con EDTA y, en menor medida, en plasma de citrato tomado de sujetos sanos, pero que las H2AZ, mH2A1.1 y P-H2AX (Ser139) asociadas a nucleosomas fueron indetectables sobre señales de fondo de tampón o suero de caballo en plasma con heparina tomado de sujetos sanos. Se encontró que algunas muestras de plasma con heparina (2 de 5) contenían niveles detectables de 5-metilcitosina asociada al nucleosoma. Se muestran los resultados en la Figura 17. En resumen, los nucleosomas libres de células se encuentran en concentraciones relativamente altas en la mayoría o en todas las muestras de plasma con EDTA y plasma de citrato tomadas de sujetos sanos usando el método de la invención, pero son bajos o ausentes en plasma de heparina o muestras de suero tomadas de sujetos sanos. Por lo tanto, resulta evidente que la elección precisa del tipo de muestra será fundamental para diferentes aplicaciones.

Se ha demostrado que la selección de muestras para la detección de nucleosomas libres de células que contienen estructuras de histonas particulares implica varios parámetros. Estos incluyen los bajos niveles de nucleosomas libres de células generalmente presentes muestras séricas y plasmáticas con heparina tomadas de sujetos sanos, los niveles más altos generalmente presentes en muestras de plasma con EDTA y citrato tomadas de sujetos sanos, la recomendación de que las muestras de suero que contienen nucleosomas libres de células deben estabilizarse mediante la adición de EDTA después de la separación del suero del coágulo (\*Holdenreider et al, 2001), y el protocolo de muestreo de suero. Se pueden usar también otros agentes estabilizantes (por ejemplo, inhibidores de proteasa). Siempre que fue posible, se usaron muestras de suero centrifugadas a 1 hora de la punción venosa, después de lo cual se añadió EDTA 10 mM y la muestra se congeló.

La elección del tipo de muestra de sangre para muestras clínicas debe hacerse sobre la base de la discriminación clínica óptima para la prueba particular. Después del hallazgo de niveles consistentemente bajos de nucleosomas por el método de la invención en el suero de sujetos sanos, se midieron los nucleosomas que contenían las variantes de histonas mH2A1.1 y H2AZ en muestras de suero tomadas de sujetos con una diversidad de enfermedades cancerosas. Se observaron sensibilidades clínicas de hasta el 75% para cáncer de pulmón y el 80% para cáncer de páncreas (Figura 21). También se ensayaron muestras de suero de pacientes con cáncer para nucleosomas que contenían 5-metilcitosina y se observaron sensibilidades clínicas de hasta el 100%, como se muestra en la Figura 18 para muestras de cáncer de colon.

También se midieron los niveles relativos de nucleosomas libres de células que contenían diversas variantes de histona y otras estructuras de nucleosomas en muestras de plasma con EDTA tomadas de sujetos con una diversidad de enfermedades. Los niveles de nucleosomas libres de células son altos en muestras de plasma con EDTA tomadas tanto de sujetos sanos como de sujetos enfermos y, por lo tanto, las muestras de plasma con EDTA no parecen ser la mejor elección de muestra para un discriminador sensible de sujetos sanos y enfermos. Sin embargo, se ha demostrado que los niveles y la composición de los nucleosomas libres de células circulantes, en términos de los niveles relativos de nucleosomas que contienen diferentes variantes de histona (así como otras estructuras nucleosómicas), varían entre individuos enfermos y sanos y también entre diferentes enfermedades. Por lo tanto, los presentes inventores son los primeros en informar tanto sobre que (i) están presentes altos niveles de nucleosomas circulantes en todas o en la mayoría de las muestras de plasma con EDTA tomadas tanto de sujetos sanos como enfermos, pero esto no es cierto para todos los tipos de muestras de sangre; como también sobre que (ii) sorprendentemente, la detección de la enfermedad y la discriminación del tipo de enfermedad pueden realizarse sin embargo por análisis de estos nucleosomas de plasma con EDTA sobre la base de los niveles y el perfil estructural de uno o más de los tipos relativos de estructuras de nucleosomas presentes en el plasma de sujetos enfermos y sanos.

Se midieron los nucleosomas libres de células en plasma con EDTA tomado de sujetos sanos y 117 sujetos con una diversidad de tipos de cáncer en dos experimentos que consistían en 55 y 62 sujetos con cáncer, respectivamente. En total, el 90 % (105 de 117) de las muestras de cáncer se identificaron correctamente como positivas para cáncer utilizando el método de la invención para la variante de histona H2AZ asociada al nucleosoma usando un nivel de corte del resultado medio para sujetos sanos + 2 desviaciones estándar de la media.

En el primero de estos 2 experimentos se midieron los nucleosomas libres de células en plasma con EDTA tomado de 13 sujetos sanos y 55 sujetos con cáncer de estómago, intestino grueso, recto, pulmón (carcinoma de células pequeñas y diversos carcinomas de células no pequeñas), mama, ovario, próstata, riñón y diversos cánceres orales (cavidad oral, paladar, faringe y laringe). Todas las muestras de sujetos sanos y pacientes con cáncer dieron positivo

para nucleosomas libres de células. Sin embargo, los niveles detectados en muestras tomadas de sujetos con cáncer fueron más altos que los encontrados en muestras de sujetos sanos y los resultados mostraron que los sujetos sanos y con cáncer pueden ser discriminados. Por ejemplo, el rango normal calculado en términos de DO como la media  $\pm$  2 desviaciones estándar en la media, para el ensayo de nucleosomas de H2AZ fue de 0 - 0,95.

5 Usando este nivel de corte de 0,95; los 13 sujetos sanos fueron negativos para niveles elevados de nucleosomas de H2AZ. Por el contrario, se encontró un resultado positivo para los niveles elevados de nucleosomas de H2AZ en 46 de las 55 muestras de cáncer (una sensibilidad clínica total del 84%) que incluían el 100% (8 de 8) de estómago, el 100% (5 de 5) de intestino grueso, el 67% (2 de 3) de recto, el 83% (5 de 6) de pulmón de células pequeñas, el 79% de pulmón de células no pequeñas, el 50% (3 de 6) de mama, el 100% (1 de 1) de ovario, el 83% (5 de 6) de próstata, el 100% (1 de 1) de riñón y el 100% (5 de 5) de muestras de cáncer oral. Se muestran los resultados en la Figura 19.

En una realización de la invención, se proporciona una muestra de control y el nivel de corte para el ensayo para distinguir entre resultados positivos o negativos se define en relación con el resultado para la muestra de control.

15 Esto podría ser cualquier proporción igual a por encima o por debajo del nivel del resultado de la muestra de control. Los resultados de pacientes por debajo de este nivel se consideran negativos y los resultados de pacientes por encima de este nivel se consideran positivos. También puede haber un rango de "área gris" de resultados de pacientes muy cerca del nivel de corte para el cual la decisión se considera indeterminada y/o la prueba debe repetirse.

20 De manera similar para el ensayo de mH2A1.1 asociado a nucleosomas, el intervalo normal fue de 0 - 0,91. Usando este valor de corte, las 13 muestras sanas fueron negativas y el 64% (35 de 55) de las muestras de cáncer fueron positivas. Para el análisis de P-H2AX (Ser139) asociada a nucleosomas, el rango normal fue de 0 a 1,08. Usando este valor de corte, las 13 muestras sanas fueron negativas y el 60% (33 de 55) de las muestras de cáncer fueron 25 positivas. La 5-metilcitosina asociada a nucleosomas también se midió y el intervalo normal fue de 0 - 1,41. Usando este valor de corte, las 13 muestras sanas fueron negativas y el 55% (30 de 55) de las muestras de cáncer fueron positivas. Por lo tanto, algunos ensayos de nucleosomas presentan una mejor sensibilidad clínica que otros.

Además, es posible usar el patrón de estructuras de nucleosomas para mejorar la utilidad clínica de la invención.

30 Esto se puede hacer, por ejemplo, disminuyendo el punto de corte del ensayo de H2AZ asociado a nucleosomas con respecto a la media + 1 desviación estándar que da un intervalo de hasta 0,69. En este caso, el número de falsos negativos se reduce a 3, lo que da una sensibilidad clínica mejorada del 95% (52 de 55) a expensas de un aumento en los resultados de falsos positivos para muestras tomadas de sujetos sanos del 0% al 23% (3 de 13). Se muestran los resultados en la Figura 19.

35 Las muestras encontradas positivas para los nucleosomas asociados a H2AZ, o cualquier nucleosoma, pueden ser interrogados por el perfil de la estructura nucleosómica. El perfil nucleosómico se puede usar para distinguir entre pacientes sanos y enfermos como se ilustra en las Figuras 23 y 24, donde las proporciones relativas de diversas estructuras nucleosómicas en pacientes enfermos se expresan en relación con las encontradas en pacientes sanos 40 y pacientes con otras enfermedades no cancerosas. Esto muestra que la investigación de múltiples estructuras nucleosómicas en un panel de ensayo puede facilitar una mejor discriminación clínica.

De manera similar, la especificidad y/o sensibilidad diagnóstica de la invención puede aumentarse combinando datos de más de un ensayo en forma de relaciones. Por ejemplo, mediante el uso de la relación H2AZ:mH2A1.1 asociadas 45 a nucleosomas.

Por lo tanto, los métodos de la invención son capaces de detectar cáncer tanto en muestras de plasma como de suero tomadas de pacientes con cáncer.

50 Se midieron los niveles de nucleosomas libres de células circulantes que contenían tres variantes de histona diferentes en muestras de plasma con EDTA tomadas de 3 pacientes con cáncer de colon, 13 pacientes con cáncer de pulmón, 2 pacientes con cáncer de páncreas, y 1 paciente con cáncer oral y se compararon con los niveles presentes en muestras de sangre de 20 sujetos sanos, así como con una preparación producida artificialmente de nucleosomas de sujetos sanos preparados como se describe en la bibliografía (\*Holdenreider et al, 2001). También 55 se han expresado los niveles observados en una forma normalizada como relaciones del nivel de nucleosomas que contienen epítomos diferentes y se ha demostrado que tales relaciones o patrones de relaciones son útiles para el diagnóstico tanto de cáncer en general como para el diagnóstico diferencial de tipos específicos de cáncer. También se investigó si el nivel de histoma H2AZ asociado a nucleosomas varía con la progresión de la enfermedad. Se observó que el nivel medio de nucleosomas libres de células que contienen variantes de histonas aumenta con la 60 gravedad de la enfermedad y se eleva con la propagación creciente de la enfermedad a los ganglios linfáticos y con

el aumento del tamaño y el estadio tumoral. Esto proporciona evidencia de que los nucleosomas detectados están asociados a tumores.

También se midieron los nucleosomas presentes en estas 19 muestras de cáncer usando dos métodos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual. De los 19 sujetos con cáncer estudiados, se encontró que la mayoría tenían bajos niveles de nucleosomas plasmáticos con EDTA según se determinó por el ensayo ELISA 1 y 2 de nucleosomas de la técnica actual. Este resultado ilustra una razón por la cual los ensayos de la técnica actual no se usan con fines clínicos de rutina.

10 Se usaron métodos de ELISA de la presente invención para medir los nucleosomas que contenían las variantes de histona mH2A1.1, mH2A2 y H2AZ en las mismas 19 muestras. Los nucleosomas que contenían variantes de histona, particularmente mH2A2 y H2AZ, fueron detectables en 16 de las 19 muestras. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un nuevo método de ELISA de nucleosomas capaz de detectar nucleosomas no detectados mediante ensayos de nucleosomas de la técnica actual.

15 También se han medido los niveles de nucleosomas que contienen 2 nucleótidos diferentes y una PTM de histona en las mismas 19 muestras tomadas de sujetos con cáncer, así como una muestra de nucleosomas generada a partir de sujetos sanos por un método descrito en la bibliografía (\*Holdenrieder et al. al, 2001). Se han utilizado estas mediciones junto con las mediciones de variantes de histona asociadas a nucleosomas descritas aquí, como un panel de la diversidad de nucleosomas libres de células presentes en fluidos biológicos tomados de sujetos con 4 tipos diferentes de cánceres y con nucleosomas generados a partir de sujetos sanos. Sorprendentemente, el patrón de nucleosomas encontrado en los 4 tipos de cáncer investigados (pulmón, colon, páncreas y oral) se distinguía del encontrado en una muestra de nucleosoma generada a partir de sujetos sanos. Además, los diferentes tipos de cáncer también se distinguían entre sí en función del patrón de nucleosomas libres de células detectables en la sangre de los sujetos. Por lo tanto, en una realización de la invención se proporciona un método para detectar o diagnosticar la presencia, tipo, recurrencia o gravedad de una enfermedad analizando una muestra para un panel de diferentes epítomos nucleosómicos que consiste en dos o más mediciones de nucleosomas que contienen diferentes variantes de histona, o una combinación de una o más variantes de histona de ADN y una o más bases de ADN de histona y/o una o más modificaciones de histona y/o mediciones de nucleosomas per se, o cualquier combinación o relación de cualquiera de estos, como un indicador del estado de salud o de enfermedad de un sujeto.

Se usaron de manera similar los métodos de ELISA de la invención para detectar la variabilidad en las estructuras de histonas y nucleótidos de nucleosomas libres de células circulantes en una diversidad de enfermedades cancerosas y no cancerígenas y se compararon con la estructura de nucleosomas encontrados en 11 sujetos sanos. Se encontró que los nucleosomas estaban presentes en todas las enfermedades cancerosas y no cancerosas investigadas y se encontró que tenían perfiles que diferían de los de sujetos sanos.

Se estudiaron muestras de plasma con EDTA tomadas de 2 pacientes con miocardiopatía, 10 pacientes con lupus eritematoso sistémico (lupus), 12 pacientes con colitis ulcerosa, 10 pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), 8 pacientes con enfermedad de Crohn y 10 pacientes con artritis reumatoide (AR) y se normalizaron los niveles de diversas estructuras de nucleosomas como una proporción de los niveles de 5-metilcitosina asociados a nucleosomas y se expresaron en relación con los niveles encontrados en sujetos sanos. Se encontró que las enfermedades se asociaron con perfiles de estructuras de nucleosomas que diferían de los de sujetos sanos o con cáncer. Por lo tanto, los perfiles de estructura de nucleosomas pueden usarse como una herramienta de diagnóstico para la detección, predicción de pronóstico, monitorización y predicción de eficacia terapéutica en una amplia diversidad de enfermedades no cancerosas. Se muestran los resultados en la Figura 24.

También se estudió la variabilidad en la estructura de nucleosomas libres en cuanto a los tipos de histonas y nucleótidos detectados utilizando los métodos de ELISA de la invención para muestras plasmáticas con EDTA tomadas de 55 pacientes con 10 enfermedades cancerosas normalizadas diferentes como una proporción de niveles de ADN metilados de 5-metilcitosina (5mc) asociados a nucleosomas y expresados en relación con las proporciones medias encontradas en 11 sujetos sanos. Se encontraron nucleosomas presentes en todos los sujetos y perfiles de estructuras nucleosómicas que variaban entre las enfermedades cancerosas, enfermedades no cancerosas y los sujetos sanos. Por lo tanto, los perfiles de estructura de nucleosomas pueden usarse como una herramienta de diagnóstico para la detección, predicción de pronóstico, monitorización y predicción de eficacia terapéutica en cáncer y otras enfermedades. Se muestran los resultados en las Figuras 23 y 24.

Se han informado múltiples isoformas o variantes para las histonas H2A, H2B y H3. Por otro lado, se informa que la histona H4 existe como una forma única (Tachiwana et al, 2011). Será evidente para los expertos en la técnica que un método de ELISA de la invención que usa un anticuerpo o un ligador dirigido a unirse a la histona H4 se unirá a

prácticamente a todos los nucleosomas en una muestra. Por lo tanto, también se describe un nuevo método para la detección de nucleosomas per se en el que los nucleosomas que contienen una variante de histona común se miden como una forma de asegurar que se detecten todos o la mayoría de los nucleótidos. Será más evidente para los expertos en la técnica que los anticuerpos o ligandos adecuados producidos para esta solicitud pueden dirigirse a regiones de la histona H4 que no están sujetas a modificación de PTM. Esto aumentará aún más la universalidad del epítipo seleccionado como un epítipo común a todos o la mayoría de los nucleosomas. De manera similar, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden dirigir anticuerpos adecuados similares para unir regiones de otros restos de histona seleccionados de tal forma que las regiones son comunes a todas o la mayoría de las variantes de histona o isoformas de dicho resto de histona y que no están sometidos a PTM (por ejemplo, sin limitación, regiones comunes de las histonas H2A, H2B o H3). Por lo tanto, la presente invención descrita proporciona un medio para detectar la totalidad o la mayoría de los nucleosomas en una muestra a pesar de la variación en las isoformas de histonas constituyentes y las PTM.

Se concluye que el método de la presente invención es un método exitoso para la detección y medición de nucleosomas que contienen isoformas de histonas específicas, que este método también puede usarse como un método para la detección de nucleosomas per se, y que es un método superior para la detección de nucleosomas per se que los métodos de la técnica actual. Por lo tanto, los métodos de la invención empleados de esta manera tienen ventajas sobre los métodos para medir nucleosomas de la técnica actual. Será evidente para los expertos en la técnica que los métodos de la invención pueden usarse para detectar y medir nucleosomas directamente en fluidos biológicos tales como muestras de sangre, suero o plasma. También será evidente que los métodos descritos en el presente documento se pueden desarrollar para cualquier variante de histona o variante de histona modificada para la que se pueda producir un anticuerpo u otro ligador.

La invención se ha probado en muchas enfermedades cancerosas y no cancerosas y se ha encontrado eficaz en la detección de todas las enfermedades probadas. Esto incluye la detección de casos de cáncer de próstata que se informa que es indetectable por las pruebas nucleosómicas de la técnica actual (Holdenrieder, 2001). Resulta evidente que la invención es eficaz para la detección de todos o la mayoría de los cánceres. Será evidente para los expertos en la técnica que el rendimiento clínico de la invención puede mejorarse adicionalmente mediante la inclusión de ensayos de estructura nucleosómica adicionales y mediante el examen de las relaciones de diferentes estructuras de nucleosomas presentes.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar y medir nucleosomas libres de células que contienen isoformas de histona específicas en una muestra de fluido corporal mediante un inmunoensayo que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un anticuerpo u otro ligador que se une a una isoforma de histona;
- (ii) detectar y/o cuantificar la unión de dicho anticuerpo u otro ligador a especies de isoformas de histonas en la muestra de fluido corporal; y
- (iii) usar la presencia o el grado de tal unión como una medida de la presencia de una isoforma de histona asociada a nucleosoma en la muestra de fluido corporal.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de inmunoensayo de doble anticuerpo, inmunométrico o de tipo sándwich para detectar y medir nucleosomas libres de células que contienen isoformas de histona específicas en una muestra de fluido corporal. Una realización de este aspecto es un inmunoensayo que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal que puede contener nucleosomas con un primer anticuerpo u otro ligador que se une a los nucleosomas;
- (ii) poner en contacto los nucleosomas o muestra de fluido corporal con un segundo anticuerpo u otro ligador que se une a una isoforma de histona;
- (iii) detectar y/o cuantificar la unión de dicho segundo anticuerpo u otro ligador a una especie de isoforma de histona en la muestra de fluido corporal; y
- (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia de una isoforma de histona asociada al nucleosoma en la muestra de fluido corporal.

De acuerdo con otra realización, se proporciona un método para detectar y medir nucleosomas libres de células que contienen isoformas de histona específicas en una muestra de fluido corporal mediante un inmunoensayo que comprende las etapas de:

60

- (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal que puede contener nucleosomas con un primer anticuerpo u otro ligador que se une a una isoforma de histona;
  - (ii) poner en contacto los nucleosomas o muestra de fluido corporal con un segundo anticuerpo u otro ligador que se une a nucleosomas;
  - 5 (iii) detectar y/o cuantificar la unión de dicho segundo anticuerpo u otro ligador a nucleosomas en la muestra de fluido corporal; y
  - (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia de una isoforma de histona asociada al nucleosoma en la muestra de fluido corporal.
- 10 Se puede emplear una diversidad de anticuerpos u otros ligadores en la invención como un ligador que se une a nucleosomas. Estos incluyen ligadores dirigidos a unirse a epítomos que se producen en nucleosomas intactos y no en histonas libres (por ejemplo, un epítomo encontrado en la unión entre dos histonas en un nucleosoma) y también ligadores dirigidos a cualquier componente nucleosómico, incluyendo una proteína de nucleosoma común, histona o epítomos de ácido nucleico. Se han realizado muestras con el método de la invención usando dos anticuerpos de
- 15 captura diferentes y se ha demostrado que el anticuerpo de captura particular utilizado no afecta materialmente a los resultados del método de la invención. Se muestran los resultados en la Figura 16.

Será evidente para los expertos en la técnica que los métodos de la invención descritos incluyen una diversidad de realizaciones que incluyen inmunoensayos competitivos clásicos, así como ensayos de tipo biosensor y ensayos sin etiquetas del tipo comercializado, por ejemplo, por ForteBio Incorporated de Estados Unidos, que pueden ser de naturaleza inmunométrica.

20

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un método para detectar y medir una isoforma de histona asociada a nucleosoma en una muestra mediante un inmunoensayo inmunométrico sin etiqueta que

25 comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un anticuerpo u otro ligador que se une a una isoforma de histona;
- (ii) detectar y/o cuantificar la unión de dicho anticuerpo u otro ligador a una isoforma de histona en la muestra de
- 30 fluido corporal; y
- (iii) usar la presencia o el grado de tal unión como una medida de la presencia de una isoforma de histona asociada a nucleosoma en la muestra de fluido corporal.

De acuerdo con una realización adicional de la invención, se proporciona un método para detectar y medir una

35 isoforma de histona asociada a nucleosomas en una muestra de fluido corporal mediante un inmunoensayo competitivo que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un anticuerpo u otro ligador que se une a una isoforma de histona;
- 40 (ii) detectar y/o cuantificar la unión de dicho anticuerpo u otro ligador a una isoforma de histona en la muestra de fluido corporal; y
- (iii) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia de una isoforma de histona en la muestra de fluido corporal.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para detectar la proporción de nucleosomas que comprende una isoforma de histona 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 una isoforma de histona asociada a nucleosoma de acuerdo con un método de la
- 50 invención; y
- (iii) usar las dos medidas para determinar la proporción de nucleosomas que contienen la isoforma de histona.

Tanto el nivel de nucleosoma total en la muestra como el nivel de la variante de histona asociada a nucleosomas de interés pueden medirse usando el método de la invención. Los métodos de ELISA de nucleosoma de la técnica

55 actual se pueden usar para determinar los niveles totales de nucleosomas. Una medida de ADN total se puede usar como un proxy para el nivel total de nucleosomas.

Hemos demostrado que la detección y medición de nucleosomas que contienen variantes de histona en la sangre tomada de sujetos se puede utilizar como un método de diagnóstico para identificar sujetos con cáncer y para

60 diferenciarlos de sujetos sanos. Además, se ha demostrado que los patrones de nucleosomas que contienen un

panel de diferentes variantes de histona, nucleótidos y PTM de histona se pueden usar para distinguir entre diferentes tipos de cáncer. Será evidente para los expertos en la técnica que esto proporciona la base para una prueba de sangre del cáncer que detectará cáncer en sujetos y puede usarse para distinguir entre tipos de cáncer en sujetos positivos para el cáncer. De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para  
 5 detectar o diagnosticar la presencia de una enfermedad midiendo o detectando la presencia y/o el nivel o concentración de nucleosomas libres de células que contienen una isoforma de histona en un fluido corporal, y usar el nivel detectado como un biomarcador del estado de la enfermedad de un sujeto que incluye, sin limitación, un diagnóstico clínico de una enfermedad, un diagnóstico diferencial del tipo o subtipo de la enfermedad, o un pronóstico de la enfermedad, o una recaída de la enfermedad, o un diagnóstico de susceptibilidad del sujeto a los  
 10 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. El nivel de respuesta del ensayo, la concentración o la cantidad de una variante de histona asociada al nucleosoma en un fluido corporal puede expresarse en términos absolutos o relativos, por ejemplo, sin limitación, como una proporción del  
 15 nucleosoma total o nivel total de ADN presente o como una relación con respecto al nivel de nucleosomas que contienen otra variante de histona o nucleótido o PTM.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para detectar o medir la presencia y/o el nivel de nucleosomas que contienen una variante de histona particular en una célula que comprende las etapas de:  
 20

- (i) aislar cromatina de una célula;
- (ii) descomponer la cromatina para formar mono-nucleosomas y/u oligonucleosomas; y
- (iii) detectar o medir la presencia de una variante de histona en los mono-nucleosomas y/u oligo-nucleosomas por  
 25 medio de un método de inmunoensayo como se describe en el presente documento.

Los métodos para producir mono-nucleosomas y/u oligo-nucleosomas a partir de la cromatina se conocen bien en la técnica e incluyen la digestión con enzimas y la sonicación (Dai et al, 2011). Se han producido nucleosomas libres de células a partir de células MCF7 utilizando procedimientos estándar y se ha utilizado el método de la invención  
 30 para mostrar que estos nucleosomas MCF7 incluyen nucleosomas que contienen las variantes de histona mH2A1.1, H2AZ, así como P-H2AX (Ser139).

En una realización, la isoforma de histona seleccionada para la detección mediante el método es una isoforma común que se produce en todos o en la mayoría de nucleosomas intactos, proporcionando un método para la  
 35 detección o medición de nucleosomas per se. En otra realización, el epítipo en una isoforma de histona seleccionada para detección mediante el método se localiza en una región de la isoforma de histona que es común a, y se produce en, todas o la mayoría de las isoformas de dicha histona y, por lo tanto, en todos o la mayoría de los nucleosomas intactos y, además, no está sometido a PTM, proporcionando un método para la detección o medición de nucleosomas per se.  
 40

Los expertos en la técnica apreciarán que el método descrito para detectar variantes de histona asociadas a nucleosomas en células o tejidos es más sencillo, más rápido, más barato, más cuantitativo y/o más reproducible que los métodos usados actualmente, incluyendo IHC, Western Blotting o FACS. El nivel, la concentración o la cantidad de una variante de histona asociada a nucleosomas particular pueden expresarse en términos absolutos o  
 45 relativos, por ejemplo, como una proporción del total de nucleosomas o el total de ADN presente o como una relación del nivel de nucleosomas que contienen otra variante de histona o PTM o nucleótido.

Será evidente para los expertos en la técnica que los términos anticuerpo, ligador o ligando con respecto a cualquier aspecto de la invención no son limitantes, sino que pretenden incluir cualquier ligador capaz de unirse a moléculas o  
 50 entidades específicas y que puede usarse cualquier ligador adecuado en el método de la invención. También resultará evidente que el término nucleosomas pretende incluir mononucleosomas y oligonucleosomas y cualquier fragmento de cromatina de este tipo que pueda analizarse en medios fluidos.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un kit para detectar o medir nucleosomas que comprende un ligando o ligador específico para la variante de histona o una parte componente de la misma, o una imitación estructural/de forma del nucleosoma o componente de la misma, junto con las instrucciones para el uso del kit de acuerdo con cualquiera de los métodos definidos en el presente documento.  
 55

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un kit para detectar o medir nucleosomas que contienen una variante de histona particular que comprende un ligando o ligador específico para la variante de  
 60

histona o una parte componente de la misma, o una imitación estructural/de forma del nucleosoma o parte componente del mismo, junto con las instrucciones para el uso del kit de acuerdo con cualquiera de los métodos definidos en el presente documento.

5 De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para identificar un biomarcador de variante de histona para detectar o diagnosticar el estado de enfermedad en animales o humanos, que comprende las etapas de:

- 10 (i) detectar o medir el nivel de nucleosomas libres de células que contienen una variante de histona en un fluido corporal de sujetos enfermos;
- (ii) detectar o medir el nivel de nucleosomas libres de células que contienen una variante de histona en un fluido corporal de sujetos de control; y
- (iii) usar la diferencia entre los niveles detectados en sujetos enfermos y de control para identificar si una variante de histona particular es útil como biomarcador para esa enfermedad.

15

Será evidente para los expertos en la técnica que los sujetos de control se pueden seleccionar sobre una diversidad de bases que pueden incluir, por ejemplo, sujetos que se sabe que están libres de la enfermedad o pueden ser sujetos con una enfermedad diferente (para ejemplo, para la investigación del diagnóstico diferencial).

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para identificar un biomarcador de variante de histona para evaluar el pronóstico de un sujeto animal o humano enfermo que comprende las etapas de:

- (i) detectar o medir el nivel de nucleosomas libres de células que contienen una variante de histona en un fluido corporal de sujetos enfermos; y
- 25 (ii) correlacionar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen una variante de histona detectada en un fluido corporal de sujetos enfermos con el resultado de la enfermedad de los sujetos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para identificar un biomarcador de variante de histona que se usará para la selección de un régimen de tratamiento para un sujeto animal o humano enfermo que necesite tratamiento, que comprende las etapas de:

- (i) detectar o medir el nivel de nucleosomas libres de células que contienen una variante de histona en un fluido corporal de sujetos enfermos; y
- (ii) correlacionar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen una variante de histona detectada en un fluido corporal de sujetos enfermos con la eficacia observada de un régimen de tratamiento en estos sujetos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para identificar un biomarcador de variante de histona que se usará para supervisar el tratamiento de un sujeto animal o humano enfermo que comprende las etapas de:

40

- (i) detectar o medir el nivel de nucleosomas libres de células que contienen una variante de histona en un fluido corporal de un sujeto 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 nucleosomas libres de células que contienen una variante de histona detectada en un fluido corporal de un sujeto enfermo con la progresión de la enfermedad en el sujeto.

45

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un biomarcador identificado por el método como se define en el presente documento.

50 Será evidente para los expertos en la técnica que los nucleosomas libres de células que contienen una variante de histona también se pueden detectar en un fluido biológico que incluye sangre, plasma, suero y orina mediante un procedimiento que implica la extracción de la proteína de variante de histona del complejo nucleosómico seguido de un método para la detección o cuantificación de la proteína de variante de histona libre extraída. Los procedimientos de extracción adecuados incluyen procedimientos de extracción de ácidos usados comúnmente para histonas que utilizan la naturaleza básica de proteínas de histonas. La detección de la variante de histona libre puede realizarse, por ejemplo, mediante un inmunoensayo para el resto de histona libre. Por lo tanto, en una realización de la invención, se extrae una isoforma de histona de un fluido biológico que incluye sangre, plasma, suero y orina, y se ensaya el extracto para detectar la presencia de una isoforma de histona.

60 Se sabe en la técnica que se puede detectar la presencia de una proteína que está comprendida como parte de un

- complejo que contiene otros restos por métodos de inmunoensayo. Será evidente para los expertos en la técnica que los nucleosomas libres de células que contienen una variante de histona se pueden detectar en un fluido biológico que incluye sangre, plasma, suero y orina mediante un procedimiento que implica el inmunoensayo directo de la propia variante de histona en el fluido. En este procedimiento, se usa un inmunoensayo de anticuerpo único, que utiliza un anticuerpo dirigido a un epítipo presente en una variante de histona, o un inmunoensayo de 2 sitios, que utiliza dos anticuerpos dirigidos a dos epítopos presentes en una variante de histona, para detectar la presencia de una variante de histona dentro de un nucleosoma. Por lo tanto, en otra realización de la invención, se detecta una isoforma de histona contenida dentro de un nucleosoma directamente en un fluido biológico que incluye sangre, plasma, suero y orina mediante el uso de un método de inmunoensayo para una isoforma de histona.
- 10 Por lo tanto, en una realización de la invención, se extrae una isoforma de histona de un fluido biológico que incluye sangre, plasma, suero y orina, y se ensaya el extracto para detectar la presencia de una isoforma de histona.
- También se describen ligandos o ligadores, tales como compuestos de origen natural o sintetizados químicamente, capaces de unirse específicamente al biomarcador. Un ligando o ligador puede comprender un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo, o un ligando sintético tal como un anticuerpo de plástico, o un aptámero u oligonucleótido, capaz de unirse específicamente al biomarcador. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo capaz de unión específica al biomarcador. Un ligando puede marcarse con un marcador detectable, tal como un marcador luminiscente, fluorescente, enzimático o radioactivo; como alternativa, o adicionalmente, un ligando puede marcarse con una etiqueta de afinidad, por ejemplo, una etiqueta de biotina, avidina, estreptavidina o His (por ejemplo, hexa-His). Como alternativa, la unión de ligando puede determinarse usando tecnología exenta de marcación, por ejemplo, aquella de ForteBio Inc.
- Un biosensor puede comprender el biomarcador o un mimético estructural/de forma del mismo capaz de unirse específicamente a un anticuerpo contra el biomarcador. Se proporciona también una matriz que comprende un ligando o mimético como se describe en la presente memoria.
- También se describe el uso de uno o más ligandos como se describe en el presente documento, que pueden ser de origen natural o sintetizarse químicamente, y es adecuadamente un péptido, anticuerpo o fragmento del mismo, aptámero u oligonucleótido, o el uso de un biosensor, o una matriz, o un kit 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.
- Se describen kits de diagnóstico o monitorización para realizar métodos de la invención. Dichos kits comprenderán adecuadamente un ligando, para la detección y/o cuantificación del biomarcador, y/o un biosensor, y/o una matriz como se describe en el presente documento, opcionalmente junto con instrucciones para el uso del kit. Un aspecto adicional de la divulgación es un kit para detectar la presencia de un estado de enfermedad, que comprende un biosensor capaz de detectar y/o cuantificar uno o más de los biomarcadores como se define en el presente documento.
- Los biomarcadores para detectar la presencia de una enfermedad son dianas esenciales para el descubrimiento de nuevas dianas y moléculas de fármaco que retarden o detengan el avance del trastorno. Dado que el nivel del biomarcador es indicativo de trastorno y de respuesta al fármaco, el biomarcador es útil para la identificación de nuevos compuestos terapéuticos 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.
- Por lo tanto, se describe el uso de un ligador o ligando, como se describe, que puede ser un péptido, anticuerpo o fragmento del mismo o un aptámero u oligonucleótido; o el uso de un biosensor, o una matriz; o un kit, para identificar una sustancia capaz de promover y/o de suprimir la generación del biomarcador.
- También se describe un método para identificar una sustancia capaz de promover o suprimir la generación del biomarcador en un sujeto, que comprende administrar una sustancia de ensayo a un sujeto animal y detectar y/o cuantificar el nivel del biomarcador presente en una muestra de ensayo del sujeto.
- El término "biomarcador" se refiere a un indicador distintivo biológico o derivado biológicamente de un proceso, evento o condición. Los biomarcadores pueden usarse en métodos de diagnóstico, por ejemplo, evaluación clínica, y evaluación del pronóstico y en la supervisión de los resultados de la terapia, identificando los pacientes con mayor probabilidad de responder a un tratamiento terapéutico en particular, detección y desarrollo de fármacos. Los biomarcadores y usos de los mismos son valiosos para la identificación de nuevos tratamientos farmacológicos y para el descubrimiento de nuevas dianas para tratamiento farmacológico.

Los términos "detectar" y "diagnosticar" tal como se usan en el presente documento incluyen la identificación, confirmación y/o caracterización de una patología. Los métodos de detección, supervisión y de diagnóstico de acuerdo con la invención son útiles para confirmar la existencia de una enfermedad, para supervisar el desarrollo de la enfermedad evaluando el inicio y la progresión, o para evaluar la mejora o la 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.

10 Los métodos de diagnóstico y supervisión eficaces proporcionan "soluciones para el paciente" muy potentes con el potencial de mejorar el pronóstico, estableciendo el diagnóstico correcto, permitiendo la identificación rápida del tratamiento más apropiado (disminuyendo así la exposición innecesaria a efectos secundarios perjudiciales), y reduciendo las tasas de recaída.

15 En una realización, dicho biomarcador se libera 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.

20 Se sabe que el aumento de la renovación celular, la muerte celular y la apoptosis conducen a niveles circulatorios aumentados de nucleosomas libres de células (Holdenrieder et al., 2001). El nivel de nucleosomas libres de células circulantes es un indicador inespecífico y se produce en una diversidad de afecciones, incluyendo enfermedades inflamatorias, una gran diversidad de afecciones benignas y malignas, enfermedades autoinmunes, así como después de un trauma o isquemia (Holdenrieder et al 2001). Será evidente para los expertos en la técnica que la invención tendrá aplicación en una diversidad de áreas de enfermedad donde se han encontrado nucleosomas circulantes en sujetos. Estas incluyen, sin limitación, trauma (por ejemplo, lesión grave o cirugía), ejercicio extremo (por ejemplo, correr una maratón), ictus y ataque cardíaco y sepsis u otra infección grave. Se ha utilizado el método de inmunoensayo de la invención para medir los niveles de nucleosomas e investigar su variabilidad estructural de histonas y nucleótidos en una diversidad de dichas enfermedades incluyendo cardiomiopatía, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide y se han comparado estos con los resultados de sujetos sanos. Se pueden detectar nucleosomas y determinar sus estructuras relativas (en términos de composición de histonas y nucleótidos) en todas estas enfermedades. Dado que los métodos de la presente invención son capaces de detectar una gama más amplia de nucleosomas que los métodos de ELISA de nucleosoma actuales, los métodos de la invención tienen aplicaciones en una amplia gama de áreas de cáncer y enfermedades no cancerosas.

Los inmunoensayos de la invención incluyen ensayos inmunométricos que emplean métodos de detección de enzimas (por ejemplo, ELISA), ensayos inmunométricos marcados con fluorescencia, ensayos inmunométricos marcados con fluorescencia resuelta en el tiempo, ensayos inmunométricos quimioluminiscentes, ensayos inmunoturbidimétricos, ensayos inmunométricos marcados en partículas y ensayos inmunoradiométricos y métodos de inmunoensayo competitivos que incluyen métodos de inmunoensayo competitivo de antígeno marcado y anticuerpo marcado con una diversidad de tipos de etiquetas que incluyen etiquetas radiactivas, enzimáticas, fluorescentes, fluorescentes resueltas en el tiempo y particuladas. Todos los métodos de inmunoensayo se conocen bien en la técnica, véase, por ejemplo, Salgame et al, 1997 y van Nieuwenhuijze et al, 2003.

Las muestras biológicas que pueden ensayarse en un método de la invención incluyen líquido cefalorraquídeo (CSF), sangre entera, suero sanguíneo, plasma, sangre menstrual, fluido endometrial, orina, saliva u otro fluido corporal (heces, fluido lagrimal, líquido sinovial, esputo), aliento, por ejemplo, como aliento condensado, o un extracto o purificación de los mismos, o dilución de los mismos. 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.

En una realización, el método de la invención se repite en múltiples ocasiones. Esta realización proporciona la ventaja de permitir que los resultados de la detección se controlen durante un período de tiempo. Tal disposición proporcionará el beneficio de monitorizar o valorar la eficacia de tratamiento de un estado patológico. Dichos métodos de control se pueden usar para controlar el inicio, la progresión, la estabilización, la mejora, la recaída y/o la remisión.

60 Por lo tanto, la divulgación también proporciona un método para controlar la eficacia de una terapia para una

patología en un sujeto, sospechoso de tener dicha 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 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.

10 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para controlar la eficacia de la terapia para una patología en un sujeto humano o animal, que comprende:

- (i) cuantificar la cantidad del biomarcador como se define en el presente documento; y
- (ii) comparar la cantidad de dicho biomarcador en una muestra de ensayo con la cantidad presente en uno o más controles y/o una o más muestras de ensayo anteriores tomadas en un momento anterior del mismo sujeto de ensayo.

Un cambio en el nivel del biomarcador en la muestra de ensayo con respecto al nivel en una muestra de ensayo anterior tomada anteriormente del mismo sujeto de ensayo puede ser indicativo de un efecto beneficioso, por ejemplo, estabilización o mejora, de dicha terapia en el trastorno o sospecha de trastorno. Además, una vez que se ha completado el tratamiento, el método puede repetirse periódicamente para controlar la recurrencia de una enfermedad.

Los métodos para controlar la eficacia de una terapia se pueden usar para controlar la eficacia terapéutica de terapias existentes y nuevas terapias en sujetos humanos y en animales no humanos (por ejemplo, en modelos animales). Estos procedimientos de monitorización pueden incorporarse a cribados de nuevas sustancias farmacológicas y combinaciones de sustancias.

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

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para identificar un biomarcador para detectar la presencia de una patología. El término "identificar" como se usa en la presente memoria significa confirmar la presencia del biomarcador presente en la muestra biológica. Cuantificar 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.

La presencia del biomarcador se evalúa detectando y/o cuantificando el anticuerpo o fragmentos del mismo capaces de unirse específicamente al biomarcador que son generados por el cuerpo del sujeto en respuesta al biomarcador y, por lo tanto, están presentes en una muestra biológica de un sujeto que tiene una patología.

La identificación y/o cuantificación se puede realizar mediante cualquier método adecuado para identificar la presencia y/o cantidad de una proteína específica en una muestra biológica de un paciente o una purificación o extracto de una muestra biológica o una dilución de la misma. En los métodos de la invención, la cuantificación puede realizarse midiendo la concentración del biomarcador en la muestra o muestras. Las muestras biológicas que se pueden ensayar en un método de la invención incluyen las que se han definido anteriormente en el presente documento. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, cuando sea apropiado diluirse o concentrarse, y almacenarse de la manera habitual.

La identificación y/o cuantificación de biomarcadores se puede realizar mediante la detección del biomarcador o de un fragmento del mismo, por ejemplo, un fragmento con truncamiento C-terminal, o con truncamiento 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 se puede detectar directamente, por ejemplo, por SELDI o MALDI-TOF. Como alternativa, el biomarcador 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.

Por ejemplo, la detección y/o cuantificación se puede realizar mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste 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.). 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).

10

Los métodos de diagnóstico o supervisión de acuerdo con la invención pueden comprender analizar una muestra mediante SELDI TOF o MALDI TOF para detectar la presencia o el nivel del biomarcador. Estos métodos también son adecuados para el cribado clínico, el pronóstico, el seguimiento de los resultados de la terapia, la identificación de pacientes con mayor probabilidad de responder a un tratamiento terapéutico particular, para el cribado y el desarrollo de fármacos, y la identificación de nuevas dianas para el tratamiento farmacológico.

15

La identificación y/o cuantificación de los biomarcadores de analito se puede realizar usando un método inmunológico, que implica un anticuerpo, o un fragmento del mismo capaz de unirse específicamente 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 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.

20

25

La identificación de biomarcadores clave específicos de una enfermedad es fundamental para la integración de procedimientos de diagnóstico y regímenes terapéuticos. Utilizando biomarcadores predictivos se pueden desarrollar herramientas de diagnóstico apropiadas tales como biosensores; por consiguiente, en los métodos y usos de la invención, la identificación y cuantificación se puede realizar usando un biosensor, un sistema microanalítico, un sistema de microingeniería, un sistema de microseparación, un sistema de inmunocromatografía u otros dispositivos 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 en las concentraciones previstas encontradas en muestras biológicas.

30

35

Como se usa en el presente documento, el término "biosensor" se refiere a cualquier cosa capaz de detectar la presencia del biomarcador. Se describen en la presente memoria ejemplos de biosensores.

40

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

45

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 a "código de barras" o configuraciones de matriz.

50

En los sensores de hologramas inteligentes (Smart Holograms Ltd, Cambridge, Reino Unido), se almacena una imagen holográfica en una fina película de polímero 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 resultada de la prueba puede ser un cambio en el brillo óptico, 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.

55

60

De forma adecuada, los biosensores para la detección de uno o más biomarcadores combinan el reconocimiento biomolecular con los medios apropiados para convertir la detección de la presencia, o cuantificación, del

biomarcador en la muestra en una señal. Los biosensores se pueden adaptar para pruebas diagnósticas de "sitios alternos", por ejemplo, en la sala, la habitación de pacientes los ambulatorios, el quirófano, el hogar, el campo y el lugar de trabajo.

- 5 Los biosensores para detectar uno o más biomarcadores incluyen sensores acústicos, resonancia de plasmón, holografía, interferometría de Bio-Layer (BLI) y sensores de microingeniería. 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.
- 10 Los métodos que implican la identificación y/o cuantificación de uno o más biomarcadores se pueden realizar en instrumentos de mesa o se pueden incorporar a plataformas desechables, de diagnóstico o control que se pueden usar en un entorno no de laboratorio, por ejemplo, en el consultorio del médico o la cama del paciente. Los biosensores adecuados para realizar métodos de la invención incluyen tarjetas de "crédito" con lectores ópticos o acústicos. Los biosensores pueden configurarse para permitir que los datos recopilados se transmitan
- 15 electrónicamente al médico para su interpretación y, por lo tanto, pueden formar la base de la medicina electrónica.

Los kits de diagnóstico para el diagnóstico y control de la presencia de una patología se describen en el presente documento. 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:

20 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 una patología permite la integración de procedimientos de diagnóstico y
- 25 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
- 30 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 lo tanto, al supervisar un biomarcador, la atención del paciente se puede adaptar precisamente para que coincida con las necesidades determinadas por el trastorno y el perfil farmacogenómico del paciente; por lo tanto, el biomarcador puede usarse para valorar la dosis óptima, predecir una respuesta terapéutica positiva e identificar a los pacientes en alto riesgo de
- 35 efectos secundarios graves.

Los ensayos basados en biomarcadores proporcionan una evaluación de primera línea de pacientes "nuevos" y proporcionan medidas objetivas para un diagnóstico preciso y rápido, que no se pueden lograr con las medidas

40 actuales.

- Además, los ensayos de biomarcador de diagnóstico son útiles para identificar miembros de la familia o pacientes con enfermedad leve o asintomática o que pueden estar en alto riesgo de desarrollar 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.
- 45

- Los métodos de monitorización de biomarcadores, biosensores y kits también son vitales como herramientas de monitorización del paciente, para permitir al médico determinar si la recaída se debe 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,
- 50 proporcionan una indicación del impacto de la terapia farmacológica.

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

#### EJEMPLO 1

- 55 Se analizó una muestra de sangre humana que contenía nucleosomas libres de células de sujetos sanos preparada de acuerdo con el método descrito por Holdenrieder (\*Holdenrieder et al, 2001) usando un ELISA para la variante de histona asociada a nucleosomas macroH2A1.1 usando un anticuerpo de captura de fase sólida anti-histona que se une a los nucleosomas intactos y un anticuerpo de detección de variante macroH2A1.1 antihistona policlonal
- 60 biotinilado purificado por afinidad. La muestra humana se diluyó en serie en suero fetal de ternero y se ensayó por

duplicado en el ELISA sin diluir y en diluciones de 1:2, 1:4 y 1:8. El suero fetal de ternero puro también se procesó en el ELISA como una muestra de control que no contenía nucleosomas libres de células. El método de ensayo fue el siguiente: 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 albúmina sérica bovina (20 g/l) a los pocillos (150 µl/pocillo) y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente para bloquear el exceso de sitios de unión a proteínas en los pocillos. Se decantó la solución de albúmina sérica bovina en exceso y se lavaron los pocillos dos veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo, tampón TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contenía 1 % de Tween 20). Se añadieron a los pocillos una muestra (10 µl/pocillo) y al tampón de ensayo (50 µl/pocillo, TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contenía NaCl al 0,9%, desoxicolato sódico al 0,05% y sustituto Nonidet P40 al 1%) y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. La mezcla de muestra y tampón de ensayo se decantó y los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de anticuerpo de detección de variante anti-histona macroH2A1.1 policlonal biotinilado purificado por afinidad (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 contenía un 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 el tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de sustrato coloreado (100 µl/pocillo, sal de 2,2'-azinobis[ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]-diamonio) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se añadió una solución de DETENCIÓN (100 µl/pocillo) que contenía dodecilsulfato de sodio al 1% y se midió la densidad óptica (DO) de los pocillos a una longitud de onda de 405 nm usando un lector de placas de microtitulación estándar. Se observó una curva de respuesta a la dosis reproducible de color en aumento con la concentración creciente de variante de histona macroH2A1.1 asociada a nucleosoma con una baja señal de fondo observada en ausencia de la variante de histona asociada a nucleosoma macroH2A1.1 (suero fetal de ternera). La señal de ELISA positiva indica que la variante de histona macroH2A1.1 detectada por el ELISA se incorpora dentro de un nucleosoma ya que el anticuerpo de captura utilizado se une a las histonas dentro de nucleosomas intactos y no se une a la histona H2. Se muestran los resultados en la Figura 1.

## EJEMPLO 2

Una preparación de nucleosomas comercialmente disponible producida por digestión de cromatina extraída de células MCF7 en la que el ADN y las proteínas en el nucleosoma están reticulados para la estabilidad (asegurando que todas las histonas presentes en la preparación se incorporan a nucleosomas intactos) se ensayó usando un método de ELISA para la variante de histona asociada a nucleosoma macroH2A2 que usa un anticuerpo de captura anti-histona en fase sólida que se une a nucleosomas intactos y un anticuerpo de detección de variante anti-histona macroH2A2 policlonal purificado por afinidad biotinilado. La muestra de nucleosomas se diluyó en serie en suero fetal de ternera y se ensayó por duplicado en el ELISA. El suero fetal de ternero puro también se procesó en el ELISA como una muestra de control que no contenía nucleosomas libres de células. El método de ensayo fue el siguiente: 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 albúmina sérica bovina (20 g/l) a los pocillos (200 µl/pocillo) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear el exceso de sitios de unión a proteínas 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 a los pocillos una muestra (10 µl/pocillo) y el tampón de ensayo (50 µl/pocillo, TRIS/HCl 0,05 M, pH 7,5 que contenía NaCl al 0,9%, desoxicolato de sodio al 0,05% y sustituto de Nonidet P40 al 1%) y se incubaron durante una noche a 4 °C. La mezcla de muestra y tampón de ensayo se decantó y los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de anticuerpo de detección de variante anti-histona macroH2A1.1 policlonal biotinilado purificado por afinidad (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 contenía un 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 2,2'-azinobis[ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]-diamonio) 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 respuesta a la dosis de color en aumento con la concentración creciente de variante de histona macroH2A2 asociada a nucleosoma con una baja señal de fondo observada en ausencia de la variante de histona macroH2A2 (suero fetal de ternera). La señal de ELISA positiva indica que la variante de histona macroH2A2 detectada por el ELISA se incorpora dentro de un

nucleosoma ya que (i) no están presentes histonas libres en la muestra y (ii) el anticuerpo de captura utilizado se une a las histonas dentro de nucleosomas intactos y no se une a la histona H2. Se muestran los resultados en la Figura 2.

### 5 EJEMPLO 3

Se ensayó una preparación de nucleosomas comercialmente disponible producida por digestión de cromatina extraída de células MCF7 en la que el ADN y las proteínas se entrecruzaron para la estabilidad (asegurando que todas las histonas presentes se incorporan a nucleosomas intactos) usando un método de ELISA para una variante de histona asociada a nucleosomas H2AZ usando un anticuerpo de captura de anti-histona en fase sólida que se une a nucleosomas intactos y no se une a la histona H2 y un anticuerpo de detección de variante anti-histona H2AZ policlonal purificado por afinidad biotinilado. Los detalles del procedimiento de ensayo son similares a los descritos en el EJEMPLO 2 anterior. Se observó una curva de respuesta a la dosis reproducible de color en aumento con la concentración creciente de variante de histona H2AZ asociada a nucleosoma con una baja señal de fondo observada en ausencia de la variante de histona asociada a nucleosoma H2AZ (suero fetal de ternera). La señal de ELISA positiva indica que la variante de histona macroH2A2 detectada se incorpora dentro de un nucleosoma ya que (i) no están presentes histonas libres en la muestra y (ii) el anticuerpo de captura utilizado se une a las histonas dentro de nucleosomas intactos y no se une a la histona H2. Se muestran los resultados en la Figura 3.

### 20 EJEMPLO 4

Se usaron dos métodos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual para medir el contenido de nucleosomas libres de células circulantes de muestras de sangre en suero y plasma tomadas de 20 sujetos sanos. El primer método de ELISA actual (ELISA 1) fue el Roche Cell Death ELISA y el otro (ELISA 2) un ELISA que emplea un anticuerpo de captura anti-histona y un anticuerpo de detección del complejo anti-histona-ADN. Los niveles de nucleosomas detectados por ambos métodos de ELISA de nucleosomas actuales fueron más bajos en plasma normal que en suero normal. El intervalo normal (expresado en unidades de densidad óptica) para el nivel sérico de nucleosomas se calculó (media  $\pm$  2 desviaciones estándar de la media de los resultados séricos de 20 sujetos sanos) en 0 - 4,3 unidades de DO para ELISA 1 y 0 - 1,4 para ELISA 2. Los intervalos respectivos para plasma fueron 0 - 0,95 y 0 - 0,96. Se muestran los resultados en la Figura 4.

También se midieron los niveles de nucleosomas que contienen una PTM de histona y dos nucleótidos, así como las tres variantes de histona asociadas a nucleosoma mH2A1.1, mH2A2 y H2AZ, en las mismas muestras. Los resultados muestran que las muestras de suero tomadas de sujetos sanos tienen niveles uniformemente bajos de nucleosomas que contienen variantes de histonas o PTM o nucleótidos. Los intervalos normales (expresados como densidad óptica) para el nivel sérico de nucleosomas que contienen variantes de histonas, PTM o nucleótidos fueron; (a) 0 - 0,36 para mH2A1.1, (b) 0,05 - 0,78 para mH2A2, (c) 0,11 - 0,58 para H2AZ, (d) 0,06 - 0,61 para P-H2AX (Ser139), (e) 0,06-0,36 para 5-metilcitosina y (f) 0,03-0,36 para 5-hidroximetilcitosina. Los resultados del plasma con EDTA medidos fueron más altos para los 20 sujetos sanos. Los resultados se muestran en las Figuras 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

### EJEMPLO 5

Se midieron los nucleosomas libres de células en plasma con EDTA tomado de 13 sujetos sanos y 55 sujetos con cáncer de estómago, intestino grueso, recto, pulmón (carcinoma de células pequeñas y diversos carcinomas de células no pequeñas), mama, ovario, próstata, riñón y diversos cánceres orales (cavidad oral, paladar, faringe y laringe). Todas las muestras de sujetos sanos y pacientes con cáncer dieron positivo para nucleosomas libres de células. Sin embargo, los niveles detectados en muestras tomadas de sujetos con cáncer fueron más altos que los encontrados en muestras de sujetos sanos y los resultados mostraron que los sujetos sanos y con cáncer pueden ser discriminados. Por ejemplo, el rango normal calculado en términos de DO como la media  $\pm$  2 desviaciones estándar en la media, para el ensayo de nucleosomas de H2AZ fue de 0 - 0,95. Usando este nivel de corte de 0,95; los 13 sujetos sanos fueron negativos para niveles elevados de nucleosomas de H2AZ. Por el contrario, se encontró un resultado positivo para los niveles elevados de nucleosomas de H2AZ en 46 de las 55 muestras de cáncer (una sensibilidad clínica total del 84%) que incluían el 100% (8 de 8) de estómago, el 100% (5 de 5) de intestino grueso, el 67% (2 de 3) de recto, el 83% (5 de 6) de pulmón de células pequeñas, el 79% de pulmón de células no pequeñas, el 50% (3 de 6) de mama, el 100% (1 de 1) de ovario, el 100% (1 de 1) de páncreas, el 80% (4 de 5) de próstata, el 100% (1 de 1) de riñón y el 100% (5 de 5) de muestras de cáncer oral. Se muestran los resultados en la Figura 19.

De manera similar para el ensayo de mH2A1.1 asociado a nucleosomas, el intervalo normal fue de 0 - 0,91. Usando

este valor de corte, las 13 muestras sanas fueron negativas y el 64% (35 de 55) de las muestras de cáncer fueron positivas. Para el análisis de P-H2AX (Ser139) asociada a nucleosomas, el rango normal fue de 0 a 1,08. Usando este valor de corte, las 13 muestras sanas fueron negativas y el 60% (33 de 55) de las muestras de cáncer fueron positivas. La 5-metilcitosina asociada a nucleosomas también se midió y el intervalo normal del ensayo fue de 0 - 1,41. Usando este valor de corte, las 13 muestras sanas fueron negativas y el 55% (30 de 55) de las muestras de cáncer fueron positivas.

También se usaron los métodos de la invención para medir una diversidad de otras estructuras asociadas a nucleosomas en las mismas muestras. Los resultados de estos inmunoensayos se compilaron para proporcionar un perfil de estructuras de nucleosomas en muestras tomadas de pacientes con cáncer normalizados en relación con los niveles detectados de nucleosomas que contenían 5-metilcitosina. Se compararon los perfiles resultantes con la estructura nucleosómica de muestras tomadas de sujetos sanos. Se encontró que el perfil de la estructura del nucleosoma de los nucleosomas libres de células era diferente del de los sujetos sanos. Se muestran los resultados en la Figura 23. De manera similar, se compilaron los perfiles de estructura nucleosómica para muestras tomadas de una diversidad de enfermedades no cancerosas y se compararon con el perfil de nucleosomas en muestras tomadas de pacientes con cáncer y de sujetos sanos. Se muestran los resultados en la Figura 24.

Después, se realizó otro experimento similar que incluyó muestras de 10 sujetos sanos y 62 pacientes más con cáncer de diversos tipos. Los resultados fueron similares al primer experimento. Por ejemplo, utilizando los resultados para la variante de histona asociada a nucleosomas H2AZ y un corte de la media + 2 desviaciones estándar de la media de los resultados para sujetos sanos, se obtuvieron resultados negativos para los 10 sujetos sanos y se obtuvieron resultados positivos para el 95% (59 de 62) de pacientes con cáncer incluyendo 9 de 9 pacientes con cáncer de próstata, 5 de 5 pacientes con cáncer de piel, 6 de 8 pacientes con cáncer de esófago, 12 de 13 pacientes con cáncer de vejiga, 2 de 2 pacientes con cáncer de cuello uterino y 1 de 1 pacientes con cáncer de colon, 4 de 4 pacientes con cáncer de mama, 7 de 7 pacientes con cáncer de ovario, 7 de 7 pacientes con cáncer de laringe, 3 de 3 pacientes con cáncer de pulmón, y 3 de 3 pacientes con cáncer renal. Este resultado indica que las variantes de histonas asociadas a nucleosomas son biomarcadores clínicamente sensibles para el cáncer. Se muestran los resultados en la Figura 20.

### 30 EJEMPLO 6

Se usaron dos métodos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual para medir el contenido de nucleosomas libres de células circulantes de muestras de plasma con EDTA tomadas de 3 sujetos con cáncer de colon, 13 sujetos con cáncer de pulmón, 2 sujetos con cáncer de páncreas, 1 sujeto con cáncer oral y una muestra de nucleosoma producida a partir de sujetos sanos según el método de Holdenrieder (\*Holdenrieder et al, 2001). El primer método de ELISA actual (ELISA 1) fue el Roche Cell Death ELISA y el otro (ELISA 2) un ELISA que emplea un anticuerpo de captura anti-histona y un anticuerpo de detección del complejo anti-histona-ADN.

También se midieron los niveles de nucleosomas que contienen tres variantes de histona, una PTM de histona y dos nucleótidos. Los resultados muestran que, aunque se detectaron bajos resultados de nucleosomas para métodos de ELISA de la técnica actual para la mayoría de los sujetos, particularmente para pacientes con cáncer pancreático y oral, la mayoría de estas muestras tienen niveles detectables de nucleosomas que contienen una o más variantes de histona asociadas a nucleosomas. Los resultados para muestras tomadas de 3 sujetos con cáncer de colon, 13 sujetos con cáncer de pulmón, 2 sujetos con cáncer de páncreas y 1 sujeto con cáncer oral se muestran en las Figuras 11, 12, 13 y 14, respectivamente. Se detectaron niveles significativos de variantes de histonas asociadas a nucleosomas en 16 de las 19 muestras de cáncer (todas menos 3 muestras de cáncer de pulmón). Además, se detectó 5-hidroximetilcitosina asociada a nucleosomas en 12 de las 19 muestras de cáncer y se detectó 5-metilcitosina asociada a nucleosomas en las 19 muestras de cáncer.

Además, el patrón de niveles de nucleosomas que contienen diferentes niveles de variantes de histona no es uniforme para todos los sujetos, pero muestra diferentes patrones para diferentes cánceres ensayados. Para facilitar la comparación entre los resultados para sujetos con el mismo o diferentes cánceres; los resultados para los ensayos de nucleosomas (para nucleosomas que contienen macroH2A1.1, macroH2A2, H2AZ, P-H2AX (Ser139), 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina) se normalizaron como una proporción de la señal de DO observada para nucleosomas que contenían 5-metilcitosina. Los resultados normalizados (con barras de error que muestran la desviación estándar en los resultados donde se analizaron muestras de más de un sujeto) se muestran para cada cáncer en la Figura 15, así como los mismos resultados para la muestra de nucleosomas producida de sujetos sanos (no se midieron mH2A2 y 5-hidroximetilcitosina para esta muestra). La Figura 15 muestra que el patrón de distribución de los nucleosomas que contienen las diferentes variantes de histona normalizadas, nucleótidos o PTM en los cuatro cánceres investigados difiere bastante marcadamente de la distribución de nucleosomas en la muestra

de sujetos sanos. Por lo tanto, la presente invención se puede usar como un método para la detección de cáncer en una sencilla prueba de cribado basada en sangre. Será evidente para los expertos en la técnica que la invención incluye el ensayo de nucleosomas que contienen otras variantes de histonas adicionales, nucleótidos y/o modificaciones de histonas para discriminar adicionalmente o mejor entre nucleosomas libres de células circulantes de origen tumoral u de otra enfermedad.

Además, el patrón de tipos de nucleosomas observado difiere para diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo; la muestra tomada de un sujeto con cáncer oral tiene niveles normalizados inferiores de ambos nucleosomas que contienen mH2A2 o P-H2AX (Ser139) que cualquiera de los otros tres tipos de cáncer. De manera similar, las muestras de sujetos con cáncer de páncreas se pueden distinguir de las muestras de sujetos con cáncer de colon sobre la base de un nivel normalizado diferente de nucleosomas que contienen la variante macroH2A1.1. Por lo tanto, la presente invención se puede usar como un método para diagnosticar el cáncer en general y para distinguir un tipo de cáncer particular. Será evidente para los expertos en la técnica que la invención incluye el ensayo de nucleosomas que contienen otras variantes de histonas y/o modificaciones de histonas y/o nucleótidos para discriminar adicionalmente o mejor entre nucleosomas libres de células circulantes de diferente origen tumoral específico o de otra enfermedad.

#### EJEMPLO 7

Se midieron los niveles de variantes de histonas asociadas a nucleosomas en muestras de suero tomadas de 4 sujetos sanos y 20 muestras de suero tomadas de sujetos con cáncer de páncreas usando el método de la invención como se ha descrito anteriormente. Utilizando un nivel de corte de 0,27 (media  $\pm$  2 desviaciones estándar de los niveles encontrados en pacientes sanos), los niveles de H2AZ asociados a nucleosomas fueron elevados en el 80% (16 de 20) de las muestras tomadas de pacientes con cáncer de páncreas y ninguno de los sujetos sanos. Se muestran los resultados en la Figura 21.

#### EJEMPLO 8

Se midieron los niveles de histona H2AZ asociados a nucleosomas de algunas muestras humanas tomadas de pacientes con cáncer usando un anticuerpo de detección anti-H2AZ biotinilado como se ha descrito en el Ejemplo 3. El método se realizó dos veces usando dos anticuerpos de captura anti-histona monoclonales clonales diferentes para determinar si los resultados de H2AZ fueron repetibles para diferentes anticuerpos de captura. Los resultados en la Figura 16 muestran que los niveles de histona H2AZ asociados a nucleosomas de los dos ensayos están linealmente relacionados con una línea del mejor ajuste que cruza aproximadamente a cero. Las unidades son simples lecturas de densidad óptica.

#### EJEMPLO 9

Se midieron los niveles de histona H2AZ asociados a nucleosomas de muestras de plasma con EDTA humano tomadas de pacientes con cáncer de pulmón como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los niveles detectados se correlacionaron con la progresión de la enfermedad de los pacientes. Los resultados que se muestran en la Figura 22 indican que los niveles de histona H2AZ asociados a nucleosomas aumentan con la gravedad de la enfermedad en términos de tamaño, estadio, diseminación ganglionar y diseminación metastásica distante, y los niveles de histona H2AZ asociados a nucleosomas pueden usarse en solitario o como parte de un panel de diagnóstico, como indicadores de enfermedad ganglionar, tamaño, estadio o progresión metastásica.

#### REFERENCIAS

- Allen et al, 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
- Bawden *et al*, Detection of histone modification in cell-free nucleosomes. WO 2005/019826, 2005
- Boulard et al, Histone variant macroH2A1 deletion in mice causes female-specific steatosis. *Epigenetics & Chromatin*: 3(8), 1-13, 2010 Cell Biolabs, Inc. Product Manual for "Global DNA Methylation ELISA Kit (5'-methyl-2'-deoxycytidine Quantitation)", 2011
- Dai et al, 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).
- Deligezer et al, Sequence-Specific Histone Methylation Is Detectable on Circulating Nucleosomes in Plasma. *Clinical Chemistry* 54(7), 1125-1131, 2008
- Epigentek Group Inc, Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit, User Guide, Version 2.0802, 2009
- Esteller, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps *Nature Reviews Genetics*: 8, 286-

- 298, 2007
- Feinberg and Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*: 301, 89-92, 1983
- Grutzmann et al, 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
- 5 Hervouet et al, 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
- Hua et al, Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Molecular Systems Biology* 4; Article number 188; doi:10.1038/msb.2008.25, 2008
- 10 Herranz and Esteller, DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. *Methods Mol Biol.*361:25-62, 2007
- Holdenrieder et al, Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*: 95, 114-120, 2001
- \*Holdenrieder et al, Nucleosomes in Serum as a Marker for Cell Death. *Clin Chem Lab Med*; 39(7), 596-605, 2001
- 15 Holdenrieder et al, Cell-Free DNA in Serum and Plasma: Comparison of ELISA and Quantitative PCR. *Clinical Chemistry*: 51(8), 1544-1546, 2005
- Holdenreider and Stieber, Clinical use of circulating nucleosomes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*; 46(1): 1-24, 2009
- Kapoor et al, The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature*: 20 468, 1105-1111, 2010
- Mansour et al, The Prognostic Significance of Whole Blood Global and Specific DNA Methylation Levels in Gastric Adenocarcinoma. *PLoS ONE* 5(12): e15585. doi:10.1371/journal.pone.0015585, 2010
- Moore et al, Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *The Lancet Oncology*: 9(4), 359 - 366, 2008
- 25 Ogoshi et al, Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells. *Genomics*: In Press, 2011
- Pennings et al, DNA methylation, nucleosome formation and positioning. *Briefings in functional genomics and proteomics*: 3(4), 351-361, 2005
- Rodriguez-Paredes and Esteller, Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature Medicine*: 17(3), 330-339, 2011
- 30 Salgame et al, An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 25(3), 680-681, 1997
- Sporn et al, Histone macroH2A isoforms predict the risk of lung cancer recurrence. *Oncogene*: 28(38), 3423-8, 2009
- Stroud et al, 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biology*: 12:R54, 2011
- Tachiwana et al, Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Cryst*: D67, 578-583, 35 2011
- Ting Hsiung et al, Global DNA Methylation Level in Whole Blood as a Biomarker in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*: 16(1), 108-114, 2007
- van Nieuwenhuijze et al, 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
- 40 Vasser et al, Measurement of Global DNA Methylation. *Genetic Engineering and Biotechnology News*: 29(7), 2009
- Whittle et al, The Genomic Distribution and Function of Histone Variant HTZ-1 during *C. elegans* Embryogenesis. *PLoS Genet* 4(9): 1-17, 2008
- Zee et al, Global turnover of histone post-translational modifications and variants in human cells *Epigenetics & Chromatin*. 3(22): 1-11, 2010
- 45 Zhang et al, Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra highpressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*: 413(2), 164-170, 2011

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células como biomarcador en una muestra de fluido corporal para el diagnóstico de cáncer.  
5
2. El uso como se define en la reivindicación 1, donde el nucleosoma libre de células es un mononucleosoma o un oligonucleosoma.
3. El uso como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células se mide en una muestra de sangre.  
10
4. El uso como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el cáncer es un cáncer de vejiga, mama, colon, cuello uterino, esófago, riñón, intestino grueso, pulmón, cavidad oral, ovario, páncreas, próstata, recto, piel o estómago.  
15
5. Un método para detectar la presencia de una isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células en una muestra de fluido corporal que comprende las etapas de:  
20
- (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un agente de unión que se une a la isoforma de histona;
  - (ii) detectar o cuantificar la unión de dicho agente de unión a la isoforma de histona en la muestra de fluido corporal;
  - y
  - (iii) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia de la isoforma de histona o nucleosomas que contienen la isoforma de histona en la muestra de fluido corporal.
- 25 6. Un método para detectar la presencia de una isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células en una muestra de fluido corporal que comprende las etapas de:
- (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un primer agente de unión que se une a los nucleosomas;
  - (ii) poner en contacto los nucleosomas o muestra de fluido corporal con un segundo agente de unión que se une a la isoforma de histona;
  - (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a la isoforma de histona en la muestra de fluido corporal; y
  - (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia de nucleosomas que contienen la isoforma de histona en la muestra de fluido corporal.  
35
7. Un método para detectar la presencia de una isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células en una muestra de fluido corporal que comprende las etapas de:  
40
- (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un primer agente de unión que se une a la isoforma de histona;
  - (ii) poner en contacto los nucleosomas o muestra de fluido corporal con un segundo agente de unión que se une a nucleosomas;
  - (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a nucleosomas en la muestra de fluido corporal;
  - y
  - (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia de nucleosomas que contienen la isoforma de histona en la muestra de fluido corporal.  
45
8. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde la isoforma de histona es una isoforma de histona común que se produce en todos o en la mayoría de los nucleosomas para analizar los nucleosomas *per se*.  
50
9. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, donde el agente de unión utilizado para unir una histona se dirige para unirse a una región de dicha histona que es común a todas o la mayoría de las isoformas de histona de dicho resto histona y se produce en todos o la mayoría de los nucleosomas para analizar los nucleosomas *per se*.  
55
10. Un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, donde el agente de unión es un anticuerpo.
11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, donde el fluido corporal se selecciona de sangre, suero o plasma.  
60

12. Un método in vitro para detectar o diagnosticar cáncer en un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

- 5 (i) detectar o medir una isoforma de histona asociada con un nucleosoma libre de células en un fluido corporal obtenido de un sujeto; y
- (ii) usar el nivel de isoforma de histona asociado al nucleosoma detectado para identificar el cáncer en el sujeto.

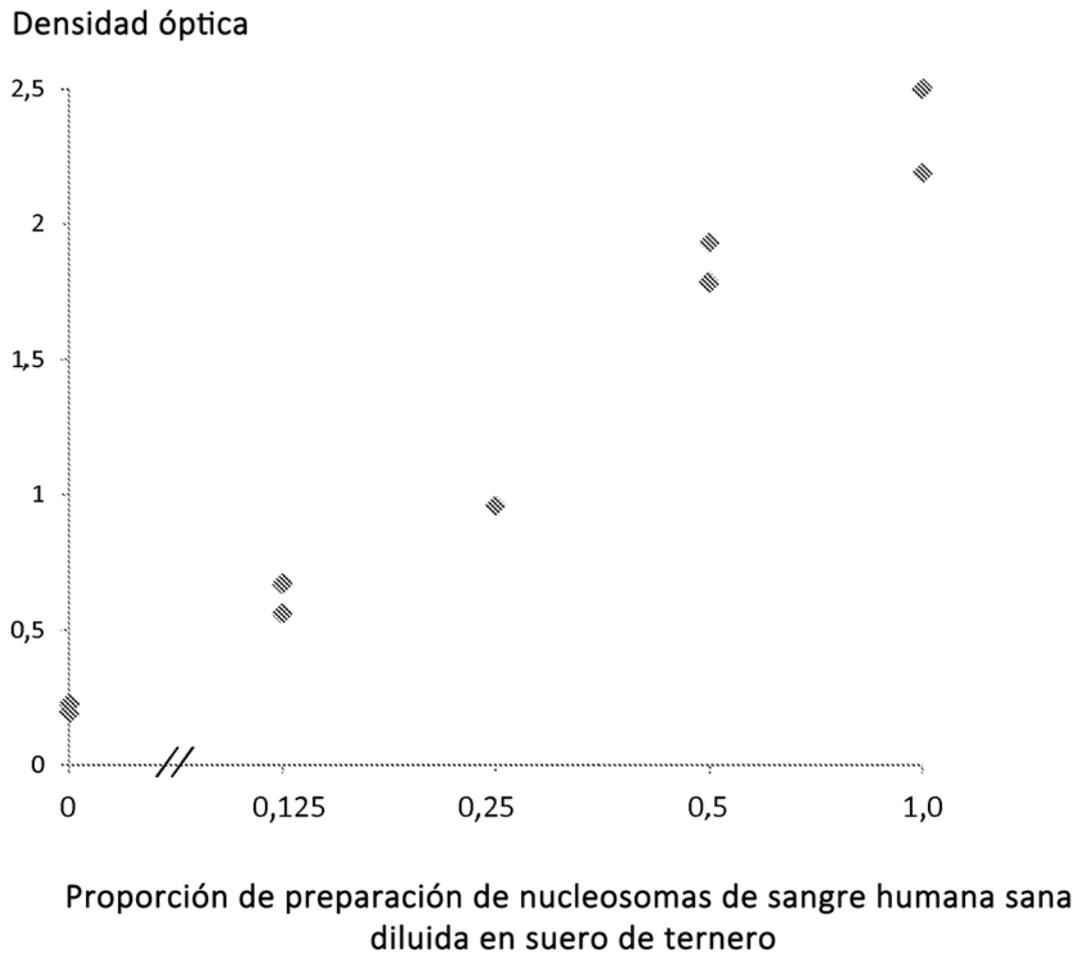


FIGURA 1

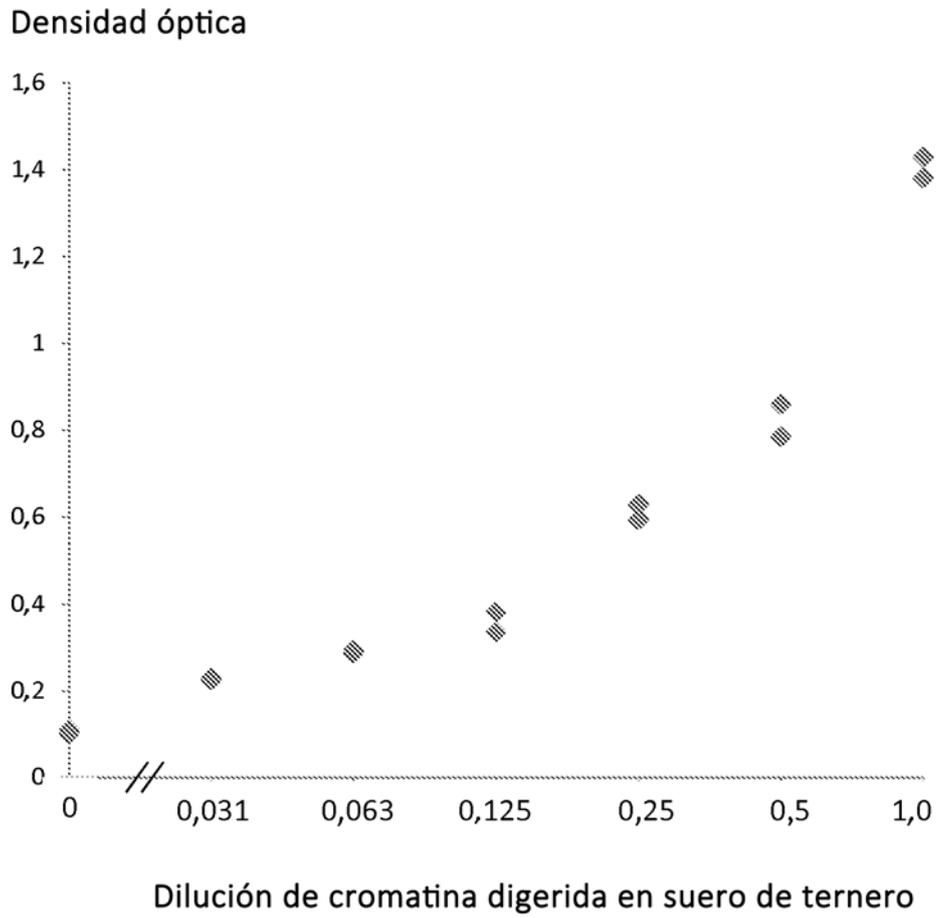


FIGURA 2

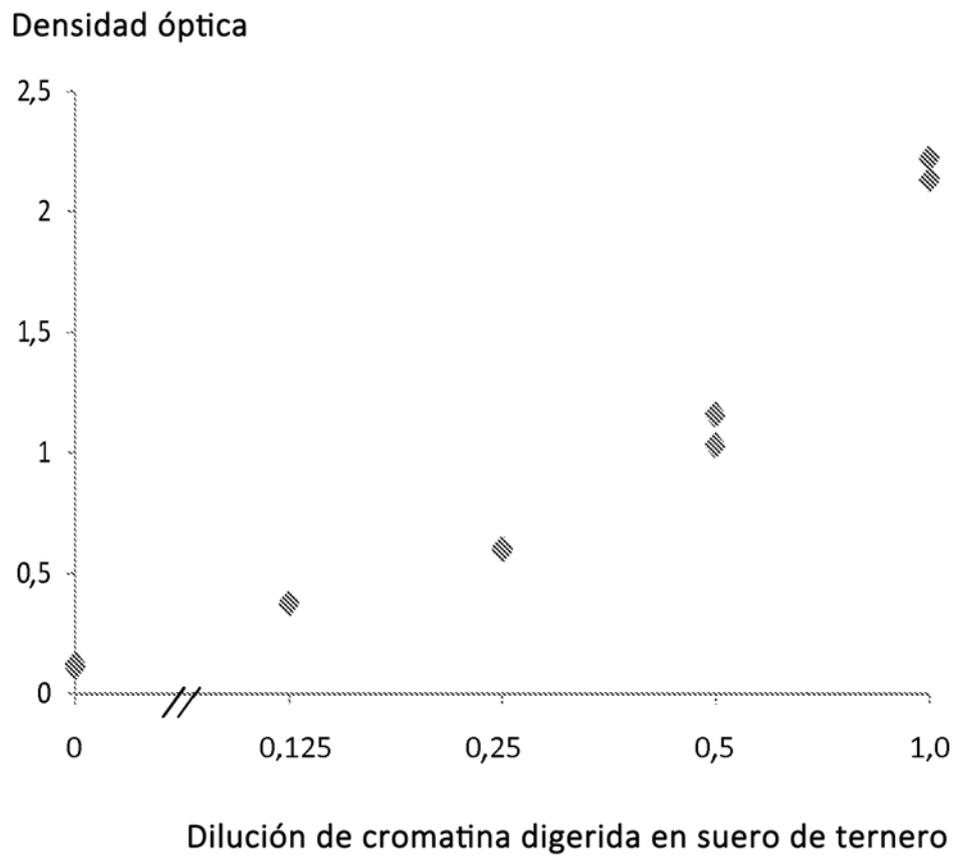


FIGURA 3

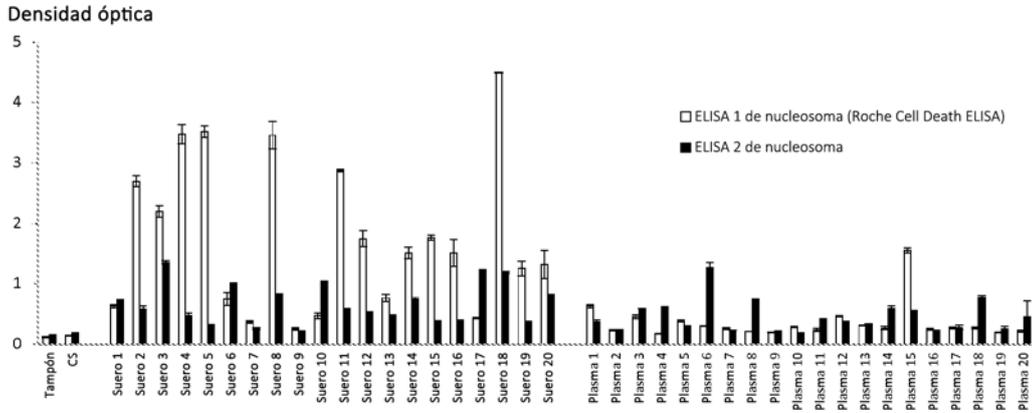


FIGURA 4

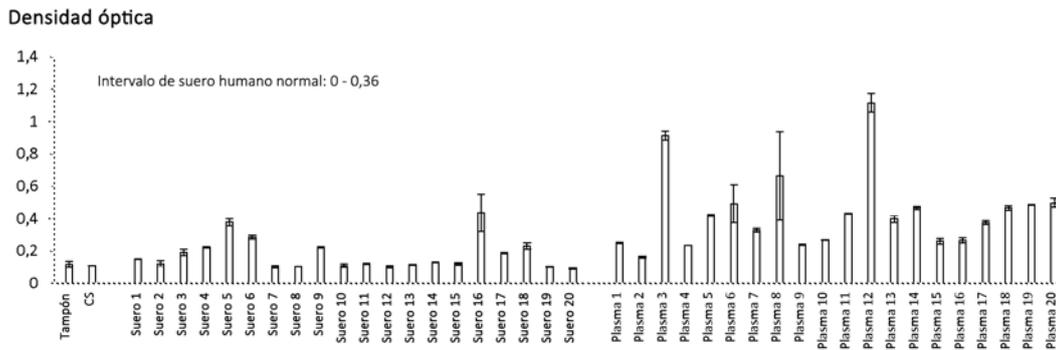


FIGURA 5

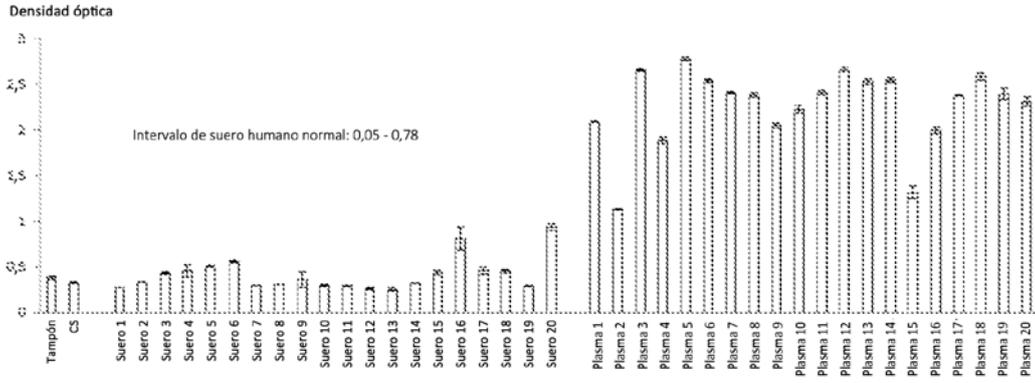


FIGURA 6

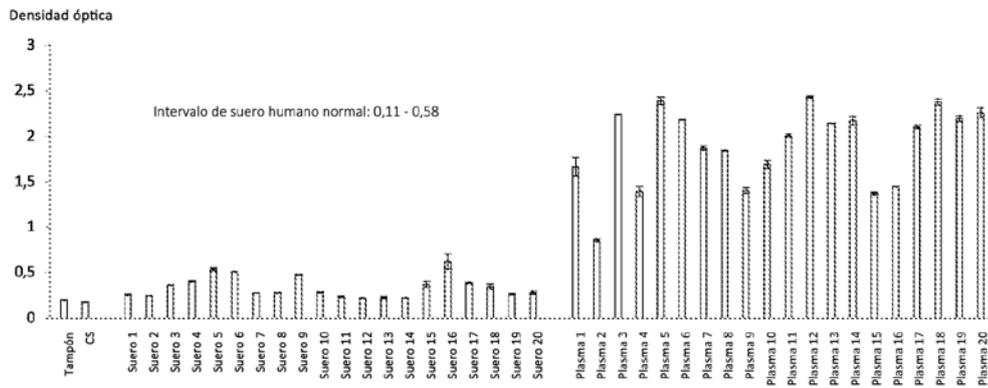


FIGURA 7

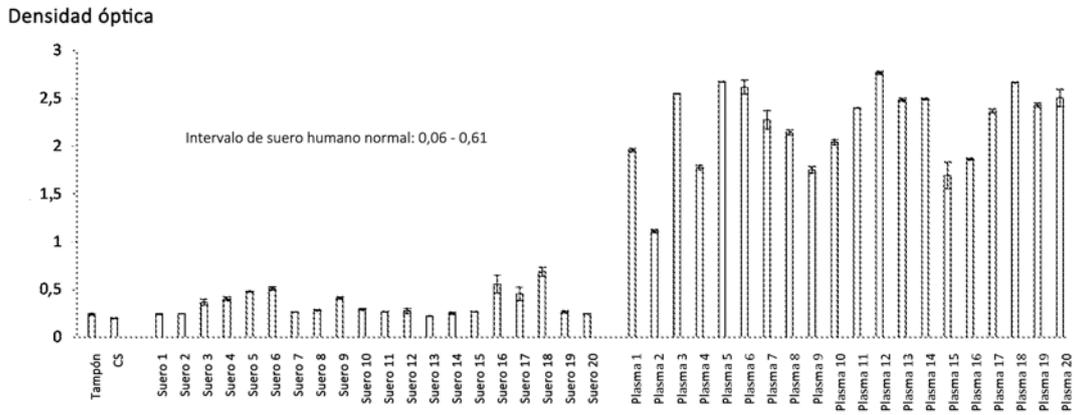


FIGURA 8

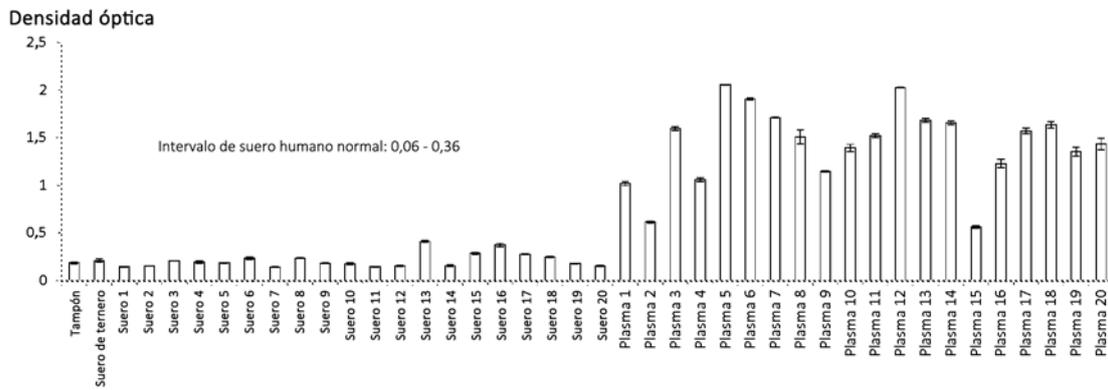


FIGURA 9

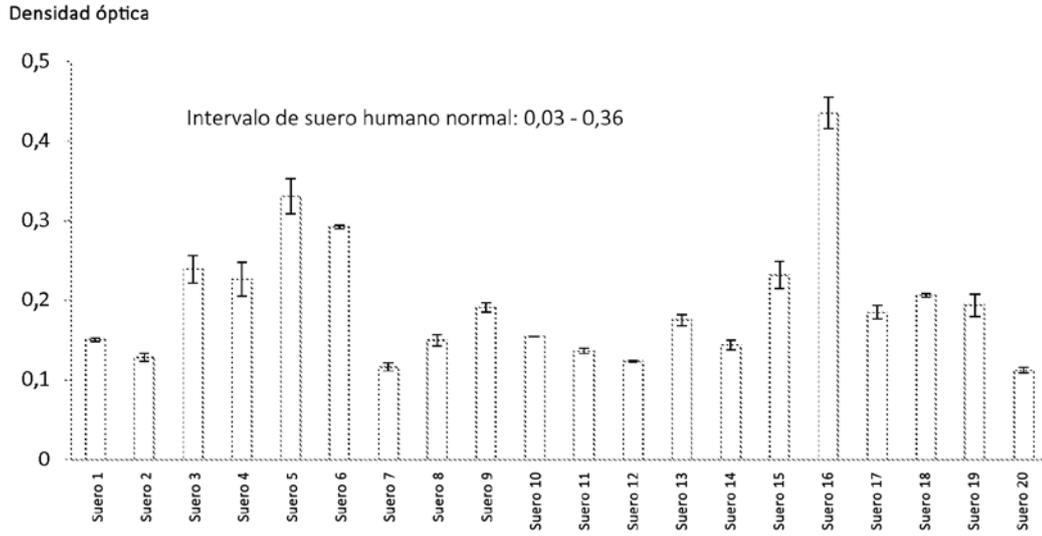


FIGURA 10

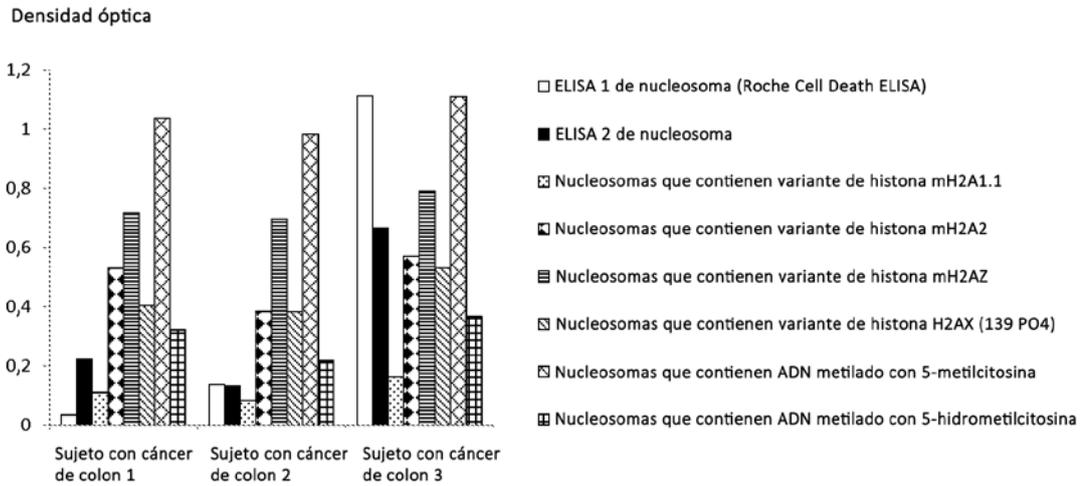


FIGURA 11

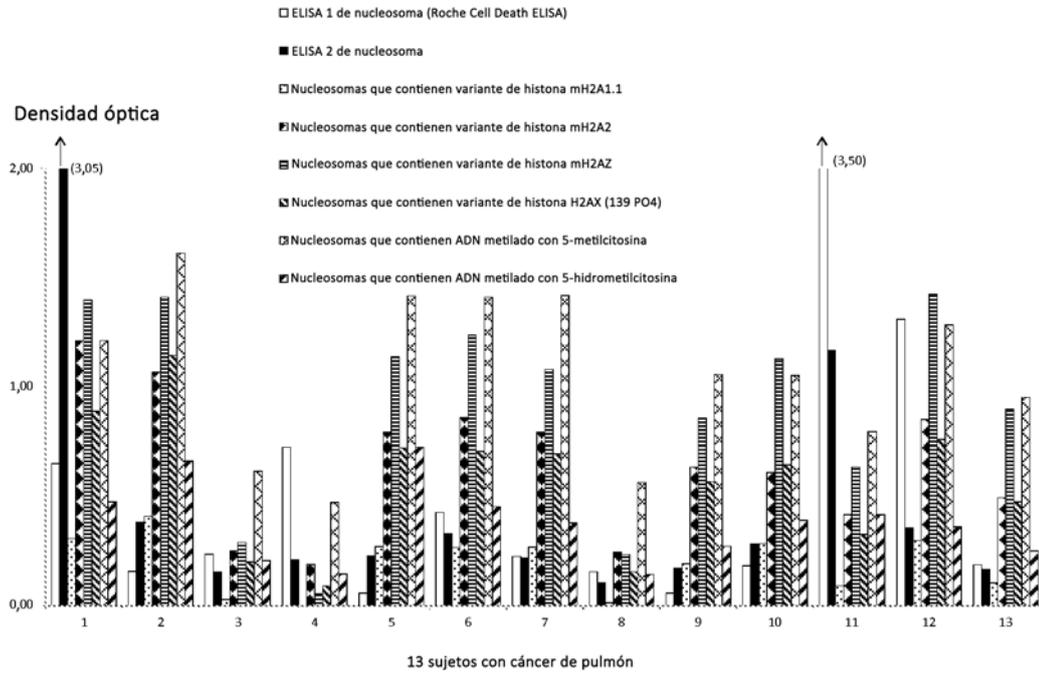


FIGURA 12

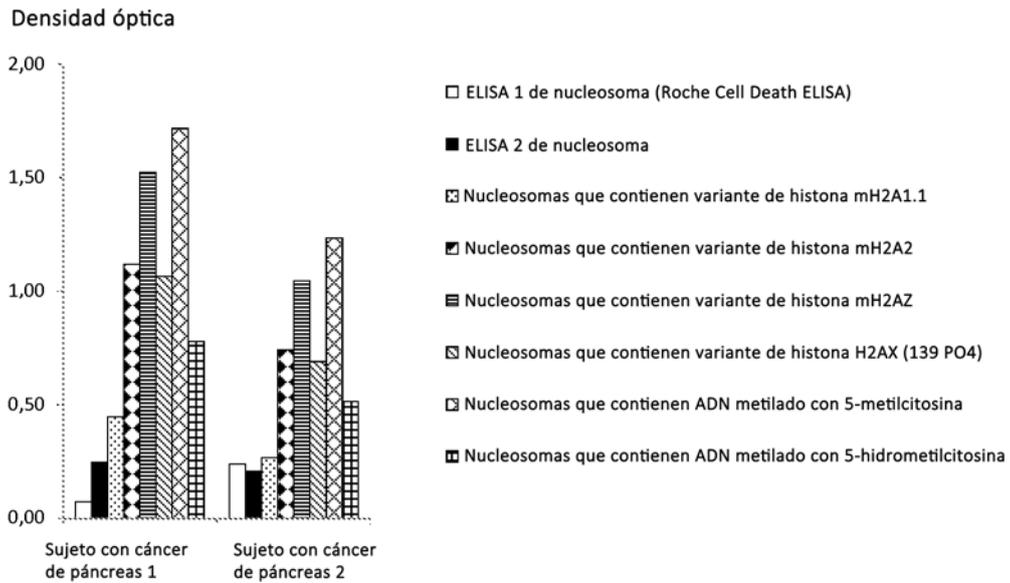


FIGURA 13

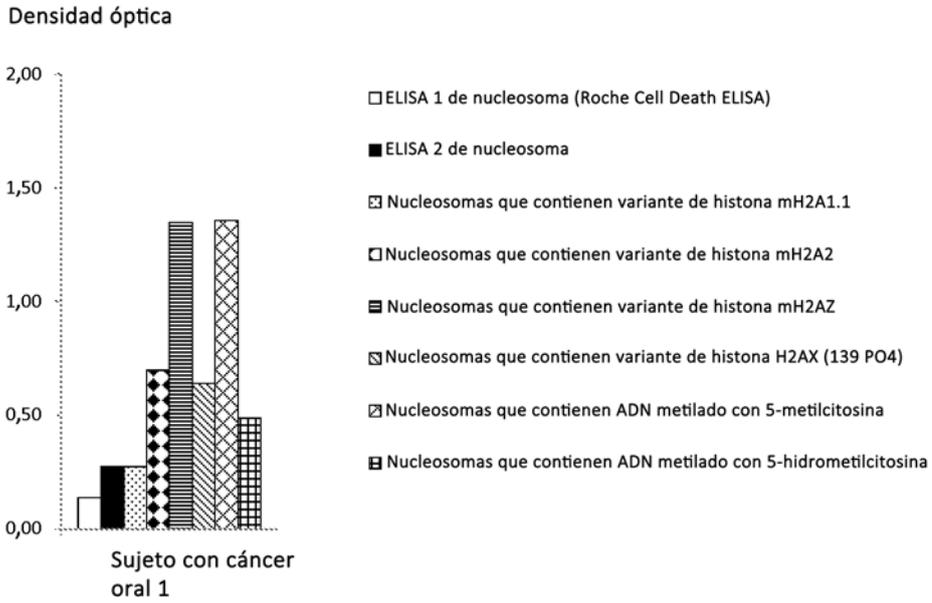


FIGURA 14

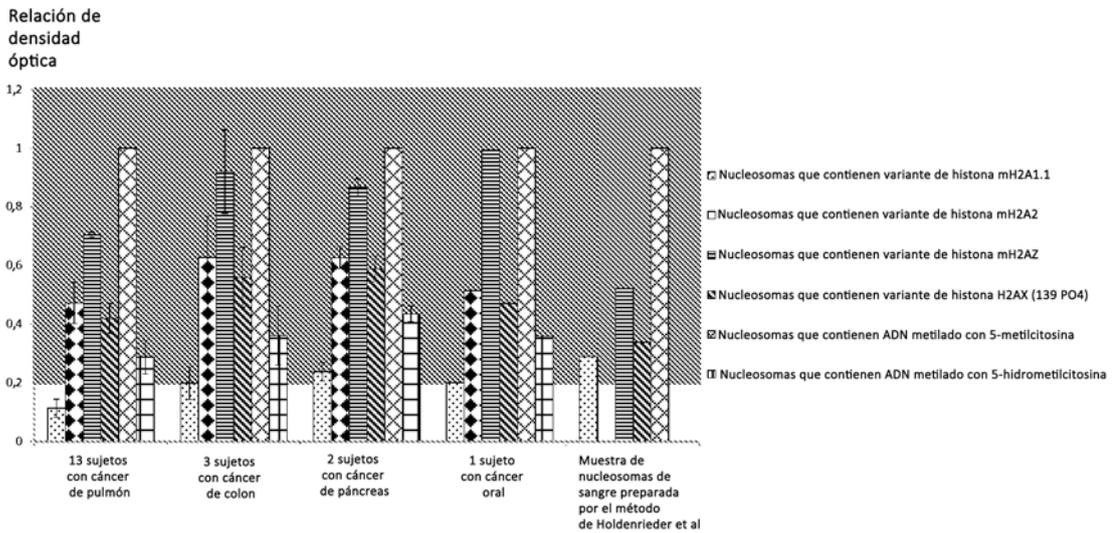


FIGURA 15

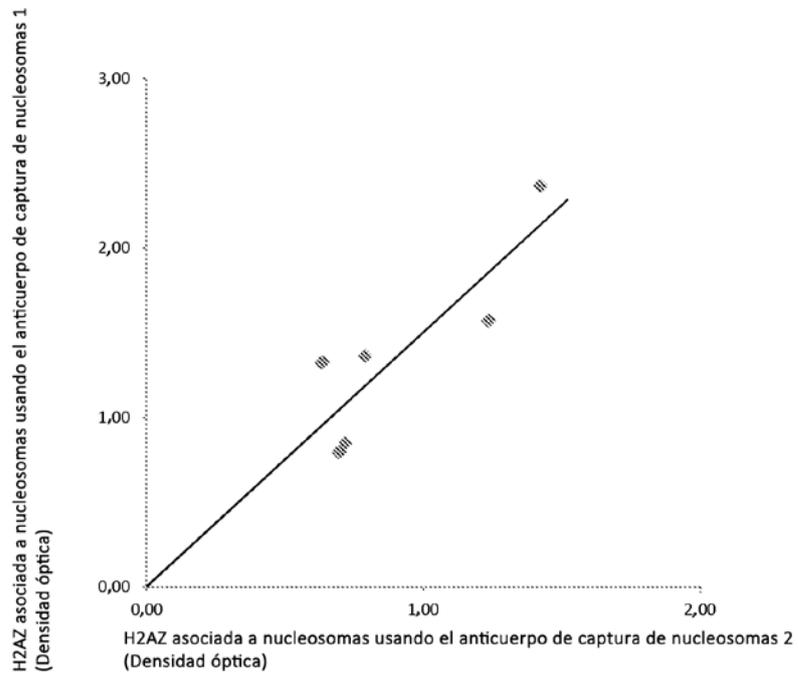


FIGURA 16

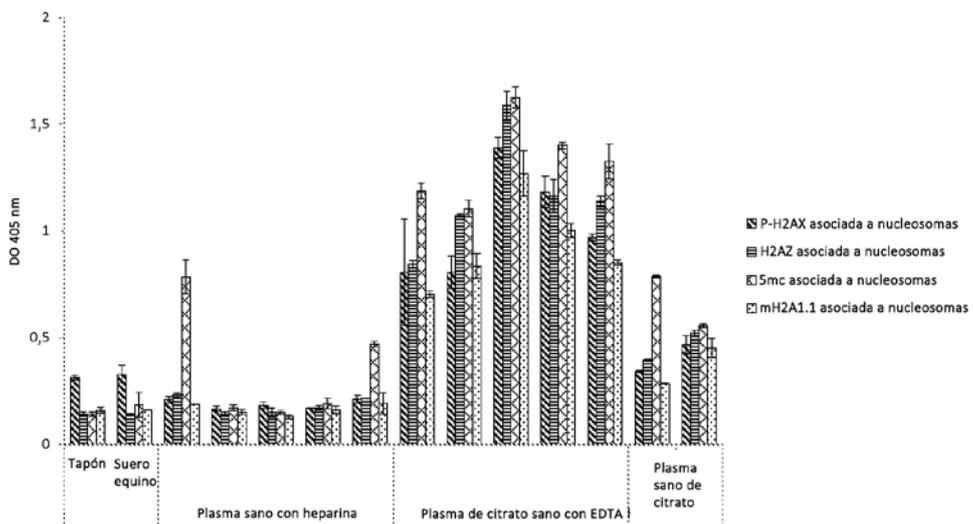


FIGURA 17

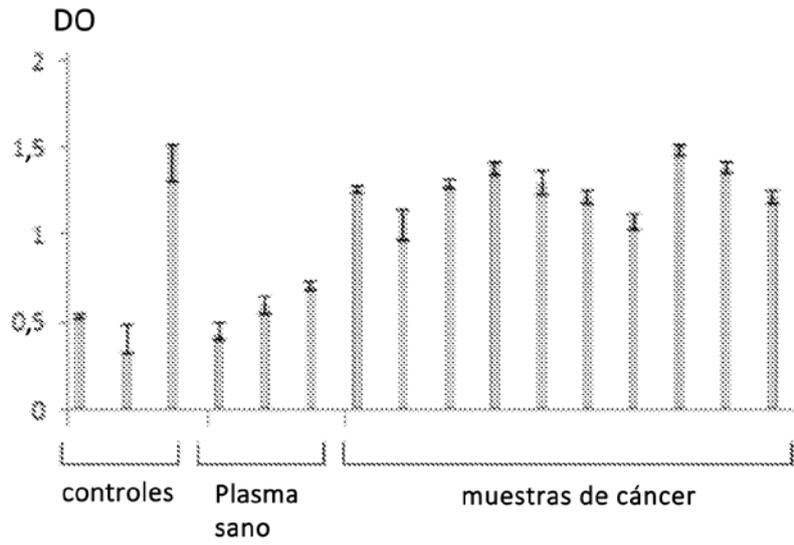


FIGURA 18

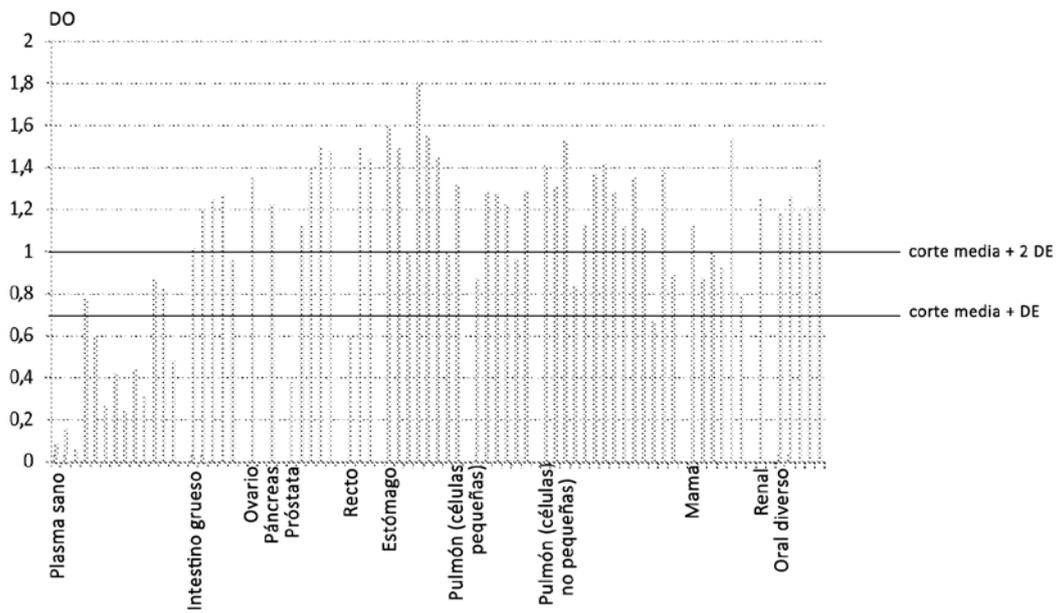


FIGURA 19

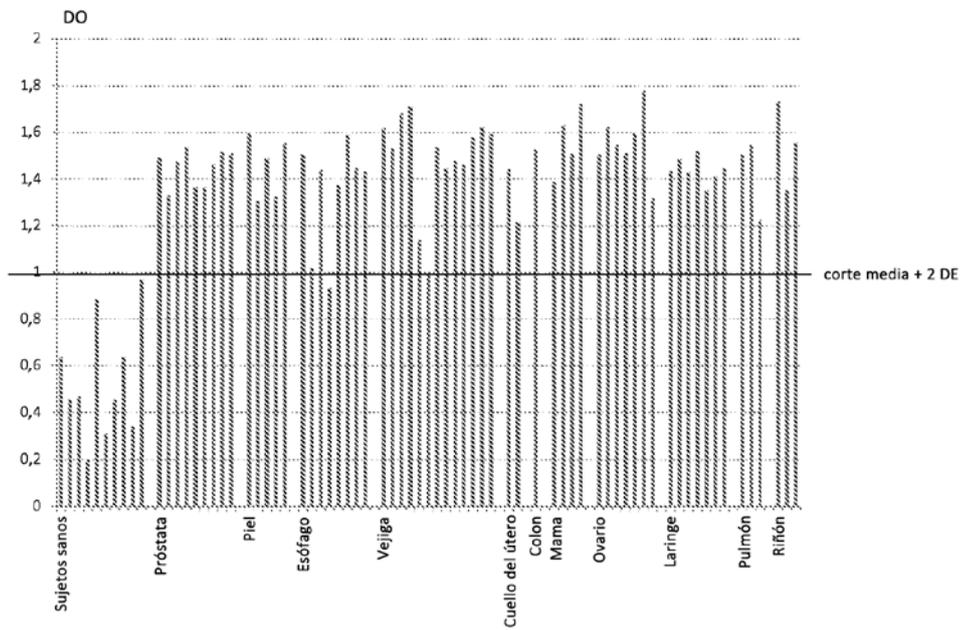


FIGURA 20

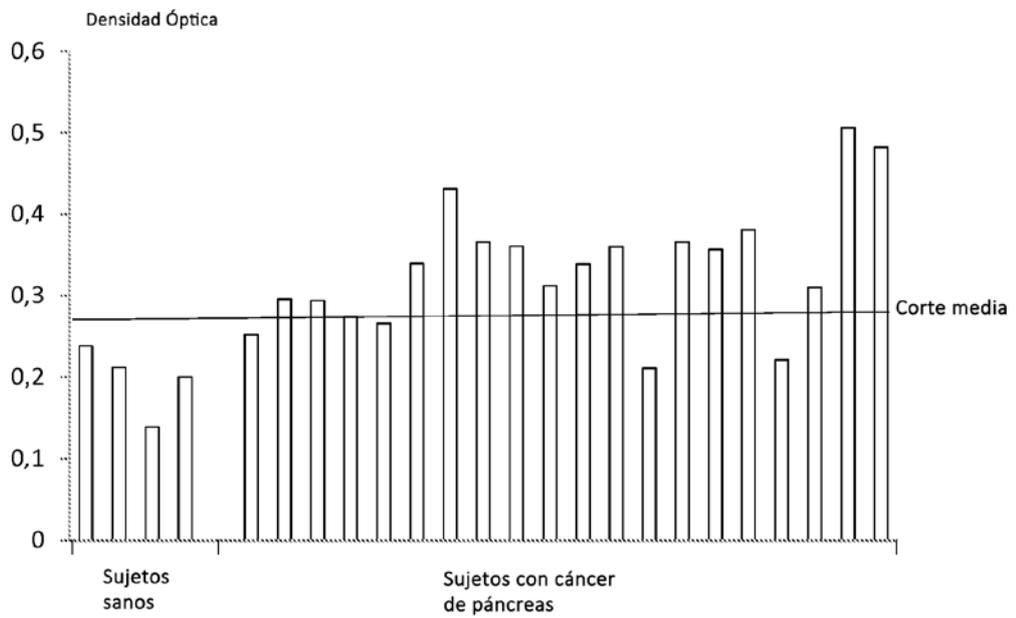


FIGURA 21

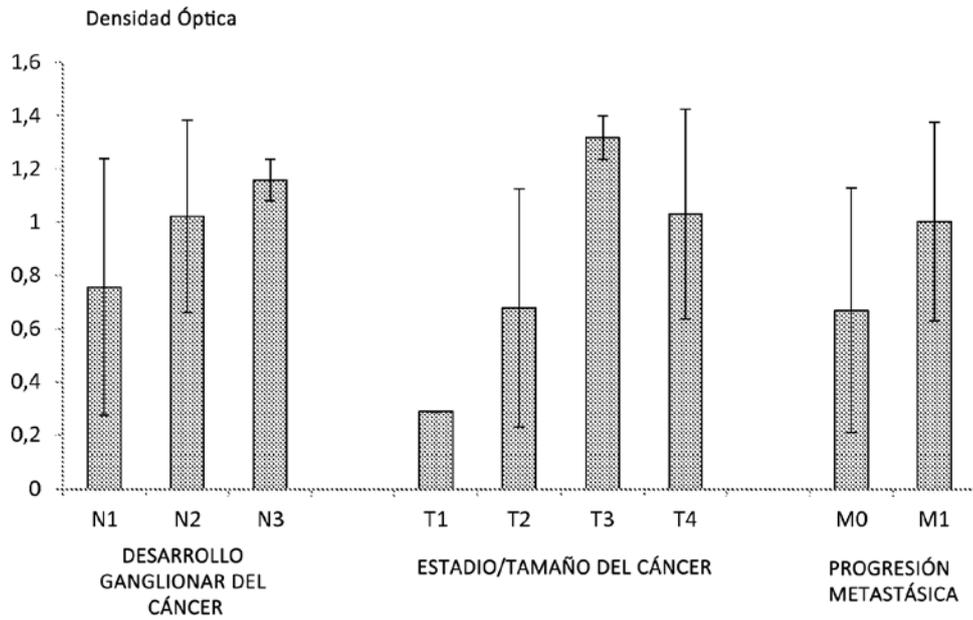


FIGURA 22

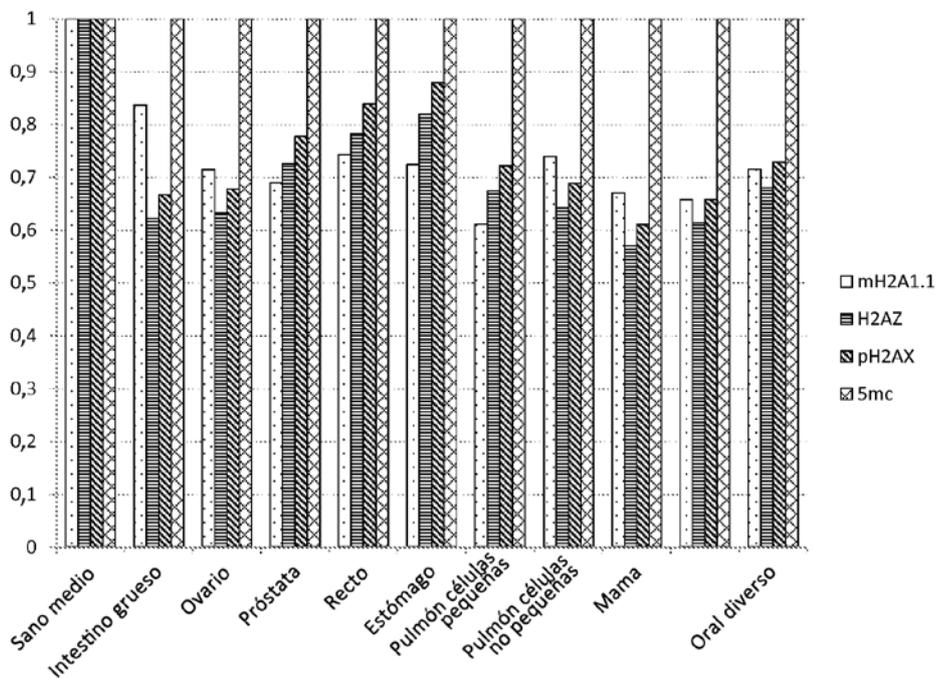


FIGURA 23

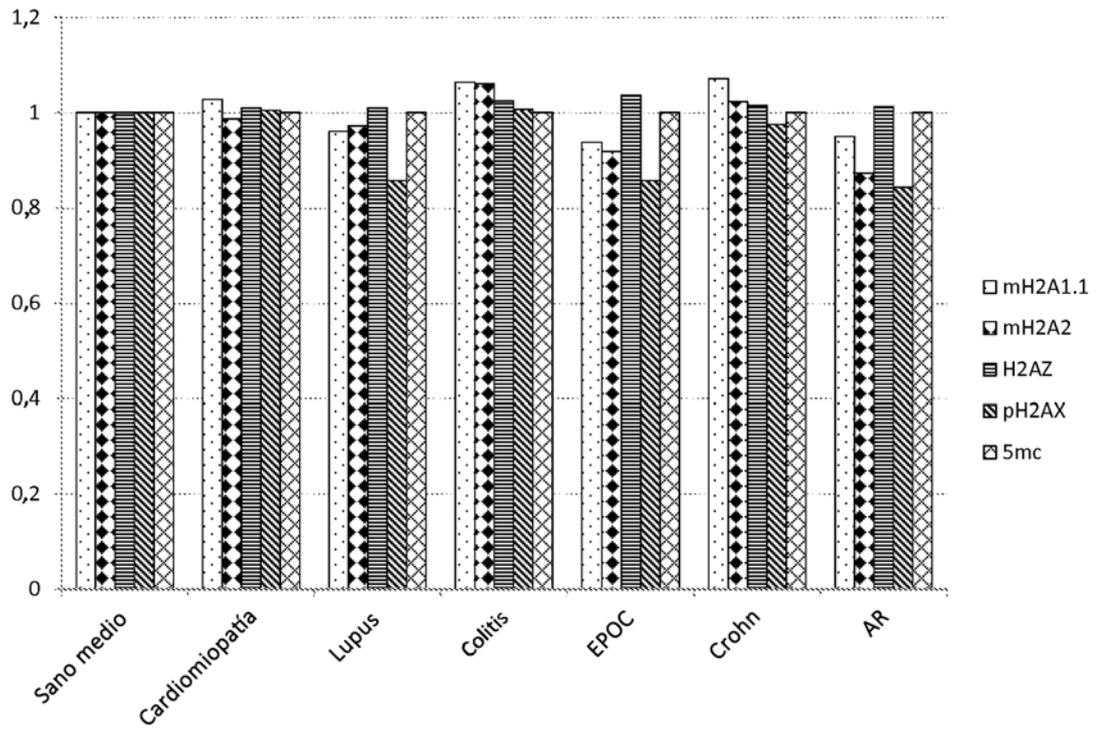


FIGURA 24