

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 603**

51 Int. Cl.:

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/GB2012/052130**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013** **WO13030578**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2012** **E 12762366 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017** **EP 2751572**

54 Título: **Procedimiento para detectar nucleosomas**

30 Prioridad:

01.09.2011 GB 201115099

01.09.2011 US 201161530300 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2018

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 2 663 603 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para detectar nucleosomas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un procedimiento para la detección y medida de la presencia de mononucleosomas y oligonucleosomas y al uso de tales medidas para la detección y el diagnóstico de enfermedades.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

La estructura de los nucleosomas puede variar por modificación postranscripcional (MPT) de proteínas histonas y por la inclusión de proteínas histonas variantes. La MPT de proteínas histonas aparece típicamente en las colas de las 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. 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 Base de datos de Histona del National Human Genome Research Institute NHGRI (Mariño-Ramírez, L., Levine, K.M., Morales, M., Zhang, S., Moreland, R.T., Baxevanis, A.D. y Landsman, D. The Histone Database: an integrated resource for histones and histone fold-containing proteins. Database Vol. 2011. (Remitido) y en <http://genome.nhgri.nih.gov/histones/complete.shtml>), la base de datos GenBank (secuencia genética NIH), la base de datos de secuencias nucleotídicas EMBL y el DNA Data Bank of Japan (DDBJ).

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

Se pueden detectar mononucleosomas y oligonucleosomas por ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA) y se han reseñado varios procedimientos (Salgame y col., 1997; Holdenrieder y col., 2001; van Nieuwenhuijze y col., 2003). Estos ensayos emplean típicamente un anticuerpo monoclonal antihistona (por ejemplo, anti-H2B, anti-H3 o anti-H1, H2A, H2B, H3 y H4) como anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal anti-ADN o anticomplejo de ADN de H2A-H2B como anticuerpo de detección. Usando estos ensayos, los trabajadores en el campo reseñan 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 realizadas por PCR (Holdenrieder y col., 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 ELISA de nucleosoma de la técnica actual no coinciden entre sí. Además, aunque la mayoría del ADN en circulación en suero o plasma se reseña que existe como mononucleosomas y oligonucleosomas

(Holdenrieder y col., 2001), los niveles medidos de nucleosomas y ADN en suero o plasma no coinciden bien. El coeficiente de correlación entre los resultados de ELISA para niveles de nucleosomas exentos de célula en circulación y los niveles de ADN en circulación medidos por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) instantánea se ha reseñado que es de $r = 0,531$ en suero y de $r = 0,350$ en plasma (Holdenrieder y col., 2005).

5

Se usan procedimientos ELISA de nucleosoma en cultivo celular, principalmente como procedimiento para detectar la apoptosis (Salgame y col., 1997; Holdenrieder y col., 2001; van Nieuwenhuijze y col., 2003) y se usan también para la medida de los nucleosomas exentos de célula en circulación en suero y plasma (Holdenrieder y col., 2001).

Se han medido los niveles sérico y plasmático de nucleosomas exentos de célula liberados en la circulación por células moribundas mediante procedimientos de ELISA en estudios de una serie de cánceres diferentes para evaluar su uso como biomarcador potencial (Holdenrieder y col., 2001). Se reseña que los niveles medios de nucleosomas en circulación son altos en la mayoría, pero no 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 reseña que los sujetos con tumores malignos tienen concentraciones séricas de nucleosomas que variaban considerablemente, y se encontró que algunos sujetos con enfermedad tumoral avanzada tenían bajos niveles de nucleosomas en circulación, dentro del intervalo medido para sujetos sanos (Holdenrieder y col., 2001). Debido a esto y a la variedad de causas no cancerosas de los niveles elevados de nucleosomas, los niveles de nucleosomas en circulación no se usan clínicamente como biomarcador de cáncer (Holdenrieder y Stieber, 2009). Sorprendentemente, se ha demostrado que muchos sujetos con cáncer cuyos niveles de nucleosomas en circulación son bajos o no detectables medidos mediante estos procedimientos ELISA de nucleosoma de la técnica actual, de hecho tienen niveles elevados de nucleosomas exentos de célula en circulación. Se han diseñado y demostrado procedimientos de ELISA novedosos que detectan los nucleosomas que no se detectaban mediante procedimientos de ELISA de la técnica actual.

25

Los procedimientos de ELISA para la detección de MPT de histona también se conocen en la técnica. Los procedimientos de ELISA para la detección de MPT en histonas libres (no en nucleosomas) se usan para la detección de MPT en histonas extraídas, generalmente por extracción ácida, de lisados celulares. Se han reseñado inmunoensayos para la detección de MPT en nucleosomas en circulación (Bawden y col., 2005). Recientemente, se ha reseñado un procedimiento de ELISA para la detección de MPT de histonas en nucleosomas purificados recubiertos directamente en pocillos de microvaloración (Dai y col., 2011). En este procedimiento, 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-MPT. Resultará evidente para los especialistas en la materia que este procedimiento requiere muestras de nucleosomas relativamente puras y no es adecuado para la medición directa de MPT de histona en medios biológicos complejos tales como sangre, plasma o suero. Se ha desarrollado un procedimiento de ELISA para nucleosomas intactos que contienen MPT de una histona específica y se usa para analizar muestras de sangre tomadas de sujetos sanos y enfermos. Sorprendentemente, se ha demostrado que los nucleosomas que contienen MPT de histona se pueden detectar en muestras de sangre en las que los nucleosomas no se detectan mediante los procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual.

40

En plasma, se ha reseñado un procedimiento de inmunoprecipitación de cromatina modificado para la detección de una MPT de histonas (H3K9Me, histona H3 monometilada en el residuo de lisina K9) en nucleosomas exentos de célula asociadas con una secuencia de ADN particular. Se reseñó que el nivel de metilación de la histona específica de la secuencia era independiente de la concentración de nucleosomas en circulación (Deligezer y col., 2008).

45

Las variantes de histona (también conocidas como isoformas de histona) son conocidas por estar implicadas en la regulación epigenética de la expresión génica (Herranz y Esteller, 2007). Las variantes de histona se han estudiado *in vivo* e *in vitro* con una variedad de técnicas incluyendo estudios de inactivación del gen que codifica una variante particular (por ejemplo, usando la inactivación por ARNi), inmunoprecipitación de cromatina, marcaje de aminoácidos con isótopos estables y proteómica cuantitativa mediante espectrometría de masas, inmunohistoquímica y transferencia Western (Whittle y col., 2008; Boulard y col., 2010; Sporn y col., 2009; Kapoor y col., 2010; Zee y col., 2010; Hua y col., 2008).

50

Se han reseñado estudios de inmunohistoquímica de la expresión de variantes de histona en muestras de tejido extirpadas en cirugía o mediante biopsia de sujetos diagnosticados con cáncer de pulmón, cáncer de mama y melanoma. Estos estudios de inmunohistoquímica reseñan 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 y col., 2009; Hua y col., 2008; Kapoor y col., 2010). Una desventaja de los procedimientos inmunohistoquímicos para uso clínico es que la recogida de muestra de tejido es invasiva al implicar cirugía o biopsia. Otra desventaja de los procedimientos de inmunohistoquímica es que no son aptos para el diagnóstico

60

precoz o para el diagnóstico de detección, ya que normalmente existe una expectativa razonable de la enfermedad antes de que se realice una biopsia o una resección del tejido. Las pruebas de ELISA en sangre mínimamente invasivas son adecuadas para una variedad 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 profesional médico.

Sin embargo, las variantes de histona exentos de célula en los nucleosomas no se han medido en sangre. No se han reseñado estudios sobre la presencia o ausencia de variantes de histona en nucleosomas exentos de célula en sangre ni si tienen valor como biomarcadores sanguíneos de la enfermedad. Actualmente no existen procedimientos para la detección o medición de variantes de histona en nucleosomas intactos exentos de célula. Se reseñan ahora procedimientos para dichas pruebas y su uso en muestras de sangre tomadas de sujetos sanos y enfermos. Sorprendentemente, se ha demostrado que los nucleosomas que comprenden variantes de histona específicas y modificaciones postraduccionales se pueden detectar en muestras de sangre en las que se detectan pocos o ningún nucleosoma mediante los procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual.

Además de la señalización epigenética mediada por la estructura y posición del nucleosoma, el control de la expresión génica en células está también mediado por el estado de metilación del ADN. 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 reseña que el ADN metilado en forma de 5-metilcitosina aparece en posiciones en la secuencia de ADN donde aparece un nucleótido de citosina junto a un nucleótido de guanina. Estas posiciones se denominan "CpG" para abreviar. Se reseña que más del 70 % de las posiciones CpG están metiladas en vertebrados (Pennings y col., 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 de los promotores de los genes humanos están asociadas con dichas islas CpG (Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011). Generalmente, estas islas CpG están hipometiladas en genes activos. La metilación de las secuencias del promotor del gen está asociada con la inactivación estable del gen. La metilación del ADN también se produce comúnmente en elementos repetitivos que incluyen elementos Alu repetitivos y elementos largos de nucleótidos intercalados (Herranz y Estellar, 2007; Allen y col., 2004).

Se reseñó la implicación de la metilación del ADN en el cáncer tan temprano como en 1983 (Feinberg y Vogelstein, 1983). Los patrones de metilación de ADN observados en células cancerosas difieren de aquellos de células sanas. Se reseña que los elementos repetitivos, particularmente alrededor de las áreas pericentroméricas, están hipometilados en las células cancerosas respecto a las sanas, pero se reseña que los promotores de genes específicos están hipermetilados en cáncer. Se reseña que el equilibrio de estos dos efectos da como resultado una hipometilación de ADN global en células cancerosas (Rodríguez-Paredes y Esteller, 2007).

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

La hipometilación de ADN global es un distintivo de las células cancerosas (Esteller 2007 y Hervouet y col., 2010). La metilación de ADN global puede estudiarse en células usando técnicas de inmunohistoquímica. Como alternativa, se extrae el ADN de las células para análisis. Se ha informado de varios procedimientos para la detección de la metilación global en ADN extraído de células incluyendo la digestión de restricción y el análisis del vecino más cercano, ensayos fluorescentes usando cloracetaldéhid, determinación inversa por metilación de todos los sitios CpG usando ADN metiltransferasa en conjunto con S-adenosil metionina marcada con tritio para calcular la cantidad de CpG no metilado y la digestión del ADN en nucleótidos individuales para el análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía en capa fina o cromatografía líquida seguida de espectroscopía de masas. Las desventajas de estos procedimientos son que requieren una labor intensiva y/o requieren grandes cantidades de ADN extraído de buena calidad (Allen y col. 2004). Los procedimientos 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 (Allen y col., 2004). Estos procedimientos para la medición de la metilación del ADN global han sido usado para estudiar el ADN extraído de una variedad de células y tejidos. Algunos trabajadores han estudiado el ADN extraído de glóbulos blancos en sangre entera, ya que es más fácil de obtener de una manera mínimamente invasiva. (Moore y col., 2008; Ting Hsiung y col., 2007; Mansour y col., 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 debe ser digerido al nivel de nucleótido único antes del análisis (Vasser y col., 2009).

Los procedimientos recientes para la estimación de la metilación del ADN global incluyen cromatografía líquida de ultra alta presión con espectrometría de masas de ADN hidrolizado extraído de tejido (Zhang y col., 2011) y un método de secuenciación digital específica de metilación (MSDS) (Ogoshi y col., 2011). Un inmunoensayo competitivo clásico se ha descrito para la metilación global del ADN (así como un ensayo similar para la metilación global a 5-hidroximetilcitosina). En este método, el ADN extraído de células o tejidos se agrega a un pocillo de microtitulación recubierto con un conjugado de 5-citidina metilado, se agrega un anticuerpo anti-5-metilcitidina y la distribución de la unión de anticuerpo entre el conjugado 5-metilcitidina recubierto y el ADN metilado en la muestra extraída se compara con la de los estándares conocidos para estimar el nivel global de metilación del ADN presente en la muestra (Cell Biolabs, 2011). En otro procedimiento de inmunoensayo, el ADN extraído de tejidos o de muestras de plasma o suero se recubre en un pocillo de microtitulación y se detecta el ADN metilado mediante un anticuerpo anti-5-metilcitosina (Vasser, y col., 2009; Epigentek, 2009). Una desventaja de estos procedimientos es que requieren extracción de ADN. No son adecuados, por ejemplo; para la medición directa de la metilación global del ADN en fluidos biológicos tales como lisados tisulares, sangre, plasma o suero.

También se ha informado sobre la modificación de 5-hidroximetilo de las bases de citosina en el ADN. El papel de la 5-hidroximetilación aún no se entiende bien, pero parece estar implicado en la regulación genética (Stroud y col., 2011). En el documento WO2005040814 se describe un método de detección de nucleosomas, dicho método comprende el uso de anticuerpos contra residuos de lisina metilada, anticuerpos contra residuos acetilados y anticuerpos anti-nucleosoma. Los procedimientos actuales para la detección de la metilación del ADN global implican la extracción o purificación del ADN y no son adecuados para procedimientos de diagnóstico rápidos, de alto rendimiento, bajo coste y mínimamente invasivos. De forma similar, el análisis de ADN para otras bases modificadas o inhabituales (por ejemplo, uracilo, inosina, xantina, hipoxantina) solo puede investigarse mediante el análisis de ADN sustancialmente puro o extraído. Dicho análisis no puede llevarse a cabo directamente en medios biológicos complejos tales como sangre, plasma o suero.

Ahora se reseñan procedimientos de inmunoensayo sencillos para la estimación directa de la metilación del ADN a 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina asociada al nucleosoma en muestras biológicas sin extracción. Sorprendentemente, se ha demostrado que los nucleosomas asociados al ADN metilado se pueden detectar en muestras en las que los nucleosomas no se detectan mediante los procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual.

Además, se reseña ahora un nuevo procedimiento de inmunoensayo diseñado para detectar múltiples epítomos de nucleosomas en un único ensayo, de modo que se detecta una gran variedad de estructuras de nucleosomas, con el fin de detectar nucleosomas que no se detectan mediante procedimientos de la técnica actual. El diseño implica además una selección óptima de epítomos de nucleosomas adecuados para maximizar la detección de nucleosomas presentes en una muestra.

RESUMEN DE LA INVENCION

En su sentido más amplio, la presente invención se refiere a la materia en cuestión tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar nucleosomas per se en una muestra que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra con un primer agente de unión que se une a nucleosomas;
- (ii) poner en contacto los nucleosomas o la muestra con dos o más segundos agentes de unión que se unen a epítomos de nucleosomas diferentes o separados, donde al menos uno de los segundos agentes de unión se une a un nucleótido y al menos uno de los segundos agentes de unión se une a una variante de histona
- (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión múltiple a nucleosomas; y
- (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas en la muestra.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar nucleosomas en una muestra que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra con dos o más primeros agentes de unión que se unen a epítomos de nucleosomas diferentes o separados, donde al menos uno de los primeros agentes de unión se une a un nucleótido y al menos uno de los segundos agentes de unión se une a una variante de histona
- (ii) poner en contacto los nucleosomas o la muestra 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; y
- (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas en la muestra.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento in vitro para detectar o
5 diagnosticar un estado patológico en animales o humanos que comprende las etapas de:

- (i) detectar o medir los nucleosomas en un fluido corporal de un sujeto de acuerdo con un procedimiento de la invención; y
- (ii) usar el nivel de nucleosomas detectado para identificar el estado patológico del sujeto.

10

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

- (i) detectar o medir los nucleosomas en un fluido corporal de un sujeto de acuerdo con un procedimiento de la invención; y
- (ii) usar el nivel de nucleosomas detectado como parámetro para la selección de un tratamiento adecuado para el sujeto.

15

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

20

- (i) detectar o medir los nucleosomas en un fluido corporal de un sujeto de acuerdo con un procedimiento de la invención;
- (ii) repetir la detección o medida de nucleosomas en un fluido corporal del sujeto en una o más ocasiones; y
- (iii) usar cualquier cambio en el nivel de nucleosomas detectado como parámetro para cualquier cambio en la afección del sujeto.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 Figura 1. Curva dosis-respuesta de ELISA para la detección de la variante de histona macroH2A1.1 en una preparación de nucleosomas humanos exentos de célula producida por el procedimiento de *Holdenrieder y col., 2001 diluida en suero de ternero.

Figura 2. Curva dosis-respuesta de ELISA para la detección de la variante de histona macroH2A2 en una
35 preparación de nucleosomas exentos de célula en cromatina reticulada y digerida, extraída de células MCF7 diluida en suero de ternero.

Figura 3. Curva dosis-respuesta de ELISA para la detección de la variante de histona H2AZ en una preparación de nucleosomas exentos de célula en cromatina reticulada y digerida, extraída de células MCF7 diluida en suero de
40 ternero.

Figura 4. Curva dosis-respuesta de ELISA para la detección de ADN metilado en 5-metilcitosina en nucleosomas exentos de célula en cromatina reticulada y digerida, extraída de células MCF7 diluida en suero de ternero.

45 Figura 5. Curva dosis-respuesta de ELISA para la detección de ADN metilado en 5-hidroximetilcitosina en nucleosomas exentos de célula en cromatina reticulada y digerida, extraída de células A375 diluida en suero de ternero.

Figura 6. Curva dosis-respuesta de ELISA para la detección de timina en nucleosomas exentos de célula en cromatina reticulada y digerida, extraída de células Hela diluida en suero de ternero.
50

Figura 7. Curva dosis-respuesta de ELISA para la detección para la detección de serina 139 H2AX fosforilada en nucleosomas exentos de célula en cromatina reticulada a digerida, extraída de células MCF7 diluida en suero de ternero.

55

Figura 8. Niveles de histona H2AZ asociados al nucleosoma de muestras de plasma humano tomadas de pacientes con cáncer medidos usando un anticuerpo de detección biotinilado anti-H2AZ con dos anticuerpos de captura monoclonales clonales anti-histonas diferentes.

60 Figura 9. Detección de nucleosomas mediante un procedimiento de ELISA de la invención dirigido a múltiples

epítomos en una muestra de nucleosoma de sangre preparada de sujetos sanos y 3 muestras de sangre tomadas de sujetos con cáncer de pulmón en los que los niveles de nucleosomas eran muy bajos o no detectables por los ensayos individuales. Los resultados para un procedimiento de ELISA de nucleosoma de la técnica actual (ELISA 2) se muestran para comparación.

5

Figura 10. Nucleosomas exentos de célula detectados mediante ensayo individual de una variedad de epítomos de histonas y nucleótidos en muestras de plasma con EDTA tomadas de 3 sujetos con cáncer de colon.

Figura 11. Nucleosomas exentos de célula detectados mediante ensayo individual de una variedad de epítomos de histonas y nucleótidos en muestras de plasma con EDTA tomadas de 13 sujetos con cáncer de pulmón.

10

Figura 12. Nucleosomas exentos de célula detectados mediante ensayo individual de una variedad de epítomos de histonas y nucleótidos en muestras de plasma con EDTA tomadas de 2 sujetos con cáncer de páncreas.

Figura 13. Nucleosomas exentos de célula detectados mediante ensayo individual de una variedad de epítomos de histonas y nucleótidos en muestras de plasma con EDTA tomadas de 1 sujeto con cáncer oral.

15

Figura 14. Nucleosomas exentos de célula detectados en 20 muestras de suero y 20 muestras de plasma con EDTA tomados de voluntarios sanos usando (A) dos procedimientos de ELISA de la técnica actual (B), un procedimiento individual de la invención para los niveles de la variante de histona mH2A1.1 asociados al nucleosoma, (C) un procedimiento individual de la invención para los niveles de la variante de histona mH2A2 asociados al nucleosoma, (D) un procedimiento individual de la invención para los niveles de la variante de histona H2AZ asociados al nucleosoma, (E) un procedimiento individual de la invención para los niveles de la modificación de histona P-H2AX(Ser139) asociados al nucleosoma, (F) un procedimiento individual de la invención para los niveles de ADN metilado a 5-hidroximetilcitosina asociados al nucleosoma.

20

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar nucleosomas en una muestra que comprende las etapas de:

30

(i) poner en contacto la muestra con dos o más agentes de unión que se unen a epítomos de nucleosoma diferentes o separados;

(ii) detectar o cuantificar la unión de dichos agentes de unión múltiples a nucleosomas en la muestra; y

(iii) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas en la muestra.

35

Se desarrollaron pruebas ELISA para la detección y medición individual de nucleosomas que contienen las variantes de histona macroH2A1.1 (mH2A1.1), macroH2A2 (mH2A2) y H2AZ. Para estos ensayos, se ha usado un anticuerpo antihistona como anticuerpo de captura en combinación con un anticuerpo específico y apropiado contra la variante de histona como anticuerpo de detección. Hemos demostrado que estos procedimientos de ELISA funcionan con anticuerpos de captura antinucleosoma alternativos.

40

Se desarrollaron pruebas ELISA para la detección y medición individual de nucleosomas que contienen las bases del ADN 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina. Para estos ensayos, se ha usado un anticuerpo antihistona como anticuerpo de captura en combinación con un anticuerpo antinucleótido específico y apropiado.

45

También se desarrolló un ELISA para la detección individual de nucleosomas que contienen la MPT de histona por fosforilación en serina 139 de la histona H2AX (P-H2AX (Ser139)).

Se usaron dos procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual para medir el contenido de nucleosomas exentos de célula en circulación de muestras de sangre en suero y plasma tomadas de 20 sujetos sanos. El primer procedimiento de ELISA actual (ELISA 1) fue el Roche Cell Death ELISA y el otro (ELISA 2) un ELISA que emplea un anticuerpo monoclonal de captura antihistona y un anticuerpo monoclonal de detección contra el complejo histona-ADN. Los niveles de nucleosomas detectados por los dos procedimientos de ELISA de nucleosoma actuales fueron más bajos en el plasma normal que en el suero normal. Se muestran los resultados en la Figura 14. Este descubrimiento es consistente con la bibliografía publicada (Holdenrieder y col., 2005).

50

También se midieron los niveles individuales de nucleosomas que contenían tres variantes de histonas asociadas a nucleosomas, una MPT de histona y un nucleótido en las mismas muestras. Los resultados mostraron que las muestras de suero tomadas de sujetos sanos tienen de manera uniforme niveles bajos de nucleosomas que

60

contienen variantes de histonas o MPT o nucleótidos. Sorprendentemente, los resultados del plasma medido fueron más altos para los 20 sujetos sanos. Por lo tanto, los resultados para el procedimiento de la invención (plasma más alto que el suero) son diferentes a los de los procedimientos de la técnica actual (suero más alto que el plasma) y este resultado es reproducible para múltiples procedimientos de la técnica actual y para múltiples ensayos (individuales) de la invención. Se muestran los resultados en la Figura 14.

Entonces se usaron dos procedimientos de ELISA de la técnica actual para medir los niveles de nucleosomas exentos de célula en circulación en 19 muestras de sangre 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. Los niveles de nucleosomas fueron bajos en la mayoría de las 19 muestras, como se muestra en las Figuras 10-13.

Se usaron procedimientos de ELISA para la detección individual de 3 isoformas de histona asociadas a nucleosomas, 2 nucleótidos asociados a nucleosomas y MPT de histona asociada a nucleosomas para medir los nucleosomas en las mismas 19 muestras. Sorprendentemente, los nucleosomas que contienen las isoformas de histona; macroH2A2 (mH2A2) y H2AZ fueron detectables en 16 de las 19 muestras. Además, los nucleosomas que contienen 5-metilcitosina fueron detectables en las 19 muestras tomadas de sujetos con cáncer. Por tanto, los procedimientos de ELISA individuales descritos proporcionan nuevos procedimientos de ELISA de nucleosoma capaces de detectar nucleosomas no detectados, o detectados en cantidades mucho más bajas, mediante ensayos de nucleosomas de la técnica actual (Figuras 10-13).

También se desarrolló un ensayo para la detección individual de nucleosomas que contienen el nucleótido timina común usando un anticuerpo contra dímeros de timina. Se probó este ensayo para detectar la presencia de nucleosomas que contienen timina en las tres muestras de cáncer en las que los nucleosomas no eran detectables mediante los procedimientos de ELISA para las variantes de histonas o una MPT de histona. Los resultados de este ensayo fueron que los nucleosomas que contenían timina tampoco fueron detectables en estas 3 muestras tomadas de sujetos con cáncer.

Se seleccionaron las 3 muestras para las que los procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual, el ensayo de timina asociado al nucleosoma individual así como los ensayos individuales para las variantes de histonas asociadas al nucleosoma y una MPT, no lograron detectar la presencia de ningún nivel significativo de nucleosomas. Sorprendentemente, cuando las mismas 3 muestras se ensayaron para los mismos epítomos de nucleosomas usando los mismos anticuerpos que los ensayos individuales para timina y las variantes de histonas mH2A2 y H2AZ, pero usando el procedimiento de la invención que implica el ensayo simultáneo de estos epítomos múltiples; se detectaron niveles significativos de nucleosomas (Figura 9). De este modo, el método de epítomos múltiples de la invención detecta nucleosomas en muestras en las que no se puede detectar ninguno mediante procedimientos de la técnica actual o mediante ensayos de epítomos individuales.

Se ha informado de múltiples isoformas o variantes para las histonas H2A, H2B y H3. Por otro lado, se reseña que la histona H4 existe como una forma única (Tachiwana y col., 2011). Resultará evidente para los especialistas en la materia que un procedimiento de ELISA de la invención que usa un anticuerpo o un ligador dirigido para unirse a la histona H4 se unirá a prácticamente todos los nucleosomas en una muestra. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un procedimiento novedoso 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 en realidad se detectan todos o la mayoría de los nucleótidos. Además, resultará evidente para los especialistas en la materia que los anticuerpos o ligandos adecuados producidos para esta aplicación pueden dirigirse a regiones de la histona H4 que no están sujetas a modificación de MTP. Esto aumentará aún más la universalidad del epítomo seleccionado como un epítomo común a todos o la mayoría de los nucleosomas. Por lo tanto, la presente invención descrita proporciona un medio para detectar todos o la mayoría de los nucleosomas en una muestra a pesar de la variación en las isoformas constitutivas de histonas y las MPT.

Además, resultará evidente que el procedimiento de la presente invención puede desarrollarse para detectar o medir cualquier ácido nucleico o base de ADN en nucleosomas. Dichas bases incluyen, sin limitación, adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina, xantina, hipoxantina, 7,8-dihidro-8-oxo-guanina y cualquiera de sus derivados. Resultará evidente para los especialistas en la materia que un nucleótido común (por ejemplo, sin limitación, guanina, citosina, timina o adenina), aparecerá en todos o en la mayoría de los nucleosomas y que el procedimiento de la invención que usa un anticuerpo para un nucleótido común proporcionará un procedimiento para unir y detectar virtualmente todos los nucleosomas en una muestra.

Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un procedimiento novedoso para la detección de nucleosomas *per se* en el que los nucleosomas que contienen un nucleótido común se miden como una forma de

asegurar que en realidad se detectan todos o la mayoría de los nucleótidos.

Resultará evidente para los especialistas en la materia que el término nucleótido de la presente invención pretende incluir, sin limitación, purinas, pirimidinas u otras bases de ácidos nucleicos y moléculas similares con o sin azúcares asociados y con o sin fosforilación.

Los procedimientos de ELISA presentados aquí se pueden usar de manera rápida y sencilla en múltiples muestras, por ejemplo, muestras de sangre. Los procedimientos de la invención se pueden usar para detectar y medir nucleosomas intactos en cualquier muestra en la que aparezcan dichos nucleosomas, incluyendo, por ejemplo, muestras obtenidas por digestión de cromatina extraída de células. Los procedimientos de ELISA son rápidos, de bajo coste y adecuados para uso en medios y fluidos biológicos complejos. Resultará evidente para los especialistas en la materia que un biomarcador presente en la sangre de pacientes con cáncer tiene valor para un amplio intervalo de fines de diagnóstico y cribado de enfermedades para cáncer y otras enfermedades que están asociadas a nucleosomas en circulación elevados (Holdenrieder y col.,2001).

Se midieron los nucleosomas que contenían las tres variantes de histonas, así como la MPT de histona P-H2AX (Ser139) y los nucleótidos 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina individualmente en los sueros de 20 sujetos sanos y en suero bovino sano. Los resultados del suero para las seis pruebas individuales de ELISA fueron todos bajos o no detectables. También se realizó una prueba similar en muestras de plasma, tomadas de los mismos 20 sujetos sanos, para cinco de los seis procedimientos de ELISA de la invención y, sorprendentemente, se observaron señales más altas. Este descubrimiento es inesperado y bastante diferente de los resultados que encontramos para los procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual.

El descubrimiento de que los nucleosomas están presentes en muestras de sangre tomadas de sujetos con cáncer en las que se encontró con los procedimientos de ELISA de nucleosoma actuales que no tienen nucleosomas puede indicar que los anticuerpos usados en los procedimientos actuales están dirigidos a epítomos que no están universalmente presentes en nucleosomas en circulación o están enmascarados o de otra manera no disponibles para la unión de anticuerpos. Para superar este problema y producir procedimientos de ELISA que detecten todos o la mayoría de los nucleosomas, se diseñó y se demostró un nuevo ELISA de nucleosoma en el que el anticuerpo de captura es un anticuerpo antihistona y el anticuerpo de detección usado es una mezcla de múltiples anticuerpos de detección incluyendo un anticuerpo anti-macroH2A2, un anticuerpo anti-h2AZ y un anticuerpo anti-timina. Mientras que los procedimientos de ELISA individuales para las variantes de histona detectan pocos o ningún nucleosoma en circulación en 3 sujetos con cáncer de pulmón que se ensayaron, este nuevo ELISA de nucleosoma detecta la presencia de nucleosomas en circulación en los 3 sujetos con cáncer. Resultará evidente para los especialistas en la materia que la combinación particular de anticuerpos empleados en este procedimiento de ELISA de la invención no es limitante y que se podrían emplear más o menos anticuerpos. En general, aumentar el número de anticuerpos empleados que se dirigen a diferentes epítomos de nucleosomas puede aumentar la variedad de nucleosomas que se detectan mediante el ensayo. Sin embargo, el uso óptimo de anticuerpos se verá limitado por el aumento de la señal de fondo, o efectos de unión no específicos, causados por el aumento de la concentración de anticuerpos de detección.

Resultará evidente para los especialistas en la materia que, mientras que un anticuerpo monoclonal es una única especie molecular de anticuerpo y se une a un epítipo único o a un grupo reducido de epítomos; los anticuerpos policlonales, por otro lado, representan una mezcla de moléculas de anticuerpo que se unen a una gama más amplia de epítomos en el inmunógeno diana usado para crear el anticuerpo. Los epítomos de nucleosomas detectados en un inmunoensayo de nucleosomas pueden, por lo tanto, aumentarse mediante el uso de un anticuerpo policlonal en lugar de uno o ambos anticuerpos monoclonales empleados en los procedimientos de ELISA de nucleosoma actuales.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un inmunoensayo de nucleosomas nuevo y novedoso en el que el anticuerpo de captura único y/o el anticuerpo de detección único, usados en los procedimientos de ELISA de la técnica actual, se reemplazan por dos o múltiples anticuerpos para uno o ambos reactivos del anticuerpo de captura y de detección, de modo que el ensayo detecta una mayor variedad de nucleosomas. Una realización preferida de la invención implica el uso de dos o más o múltiples anticuerpos de captura y/o dos o más o múltiples anticuerpos de detección donde uno o más de dichos anticuerpos son anticuerpos contra variantes de histona y/o anticuerpos contra modificaciones de histona y/o anticuerpos antinucleótidos para detectar nucleosomas no detectados por los procedimientos actuales.

Se desarrolló un ensayo dirigido a múltiples epítomos de nucleosomas usando un anticuerpo antihistona de captura y una mezcla de un anti-mH2A2 biotinilado, un anti-H2AZ biotinilado y un anticuerpo contra dímeros de timina

biotinilado como reactivo de anticuerpo de detección. Ninguno de estos anticuerpos logró detectar nucleosomas en las mismas 3 muestras tomadas de pacientes con cáncer. Se usó este procedimiento de ELISA de nucleosoma de epítomos múltiples para analizar las mismas 3 muestras. Sorprendentemente, los nucleosomas fueron detectables en las 3 muestras. Este resultado indica que los ensayos de nucleosomas de epítomos múltiples son más capaces de detectar nucleosomas que los ensayos de epítomos de nucleosomas individuales.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar y medir nucleosomas per se exentos de célula en una muestra mediante un inmunoensayo que comprende las etapas de:

- 10 (i) poner en contacto la muestra que puede contener nucleosomas con un primer agente de unión que se une a nucleosomas;
- (ii) poner en contacto los nucleosomas o la muestra con dos o más segundos agentes de unión que se unen a epítomos de nucleosomas diferentes o separados, donde al menos uno de los segundos agentes de unión se une a un nucleótido y al menos uno de los segundos agentes de unión se une a una variante de histona
- 15 (iii) detectar y/o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión múltiple a nucleosomas; y
- (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas en la muestra.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar y medir nucleosomas per se exentos de célula en una muestra mediante un inmunoensayo que comprende las etapas de:

- 20 (i) poner en contacto la muestra que puede contener nucleosomas con dos o más primeros agentes de unión que se unen a epítomos de nucleosomas diferentes o separados, donde al menos uno de los primeros agentes de unión se une a un nucleótido, y al menos uno de los primeros agentes de unión se une a una variante de histona
- 25 (ii) poner en contacto los nucleosomas o la muestra con un segundo agente de unión que se une a nucleosomas; y
- (iii) detectar y/o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a nucleosomas.

De acuerdo con otra realización de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar y medir nucleosomas exentos de célula en una muestra mediante un inmunoensayo que comprende las etapas de:

- 30 (i) poner en contacto la muestra que puede contener nucleosomas con dos o más primeros agentes de unión que se unen a epítomos de nucleosoma diferentes o separados;
- (ii) poner en contacto los nucleosomas o la muestra con dos o más segundos agentes de unión que se unen a epítomos de nucleosoma diferentes o separados;
- 35 (iii) detectar y/o cuantificar la unión de dichos segundos agentes de unión a nucleosomas; y
- (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas en la muestra.

En una realización, el agente de unión comprende un anticuerpo.

- 40 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un inmunoensayo de nucleosomas nuevo y novedoso en el que uno o ambos, el anticuerpo de captura único y/o el anticuerpo de detección único, usados actualmente en los procedimientos de ELISA de nucleosoma, se reemplazan por un anticuerpo policlonal antinucleosoma, de modo que el ensayo detecta una mayor variedad de nucleosomas. Resultará evidente para los especialistas en la materia que dichos anticuerpos antinucleosoma pueden producirse por una variedad de procedimientos que incluyen el uso
- 45 de modelos animales de enfermedad (Salgame y col., 1997) o inmunizar animales con nucleosomas intactos o conjugados de nucleosomas unidos a una sustancia fuertemente inmunogénica. Los antígenos de nucleosomas adecuados para usar directamente como inmunógenos o para la conjugación pueden producirse, por ejemplo, sin limitación, por extracción de cromatina de una célula o células y descomponer el extracto de cromatina para producir mononucleosomas y/o oligonucleosomas. Los procedimientos para producir mononucleosomas y/u
- 50 oligonucleosomas a partir de cromatina son bien conocidos en la materia e incluyen digestión enzimática y sonicación (Dai y col., 2011). Típicamente, los ensayos policlonales inmunométricos de la técnica implican la purificación de anticuerpos policlonales en suero o plasma para preparar fracciones de inmunoglobulina puras mediante, por ejemplo, precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio y/o métodos de purificación de inmunoglobulina de proteína A o proteína G. Además, las moléculas de anticuerpo dirigidas solo al antígeno de
- 55 interés se pueden aislar mediante purificación por afinidad. En una realización de la invención, se usa un anticuerpo policlonal marcado como el anticuerpo de detección. En otra realización de la invención, se usa un anticuerpo policlonal purificado como anticuerpo de captura en combinación con un anticuerpo de detección policlonal purificado marcado. En otra realización de la invención, se usa un anticuerpo policlonal purificado como anticuerpo de captura en combinación con dos o más o múltiples anticuerpos de detección (monoclonales o policlonales)
- 60 dirigido a diferentes epítomos de nucleosoma. En una realización particularmente preferida, uno o más de dichos

anticuerpos de detección son anticuerpos contra variantes de histona y/o contra nucleótidos y/o contra MPT de histona.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar y medir nucleosomas exentos de célula en una muestra mediante un inmunoensayo que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra con dos o más agentes de unión que se unen a diferentes epítomos de nucleosoma;
- (ii) detectar y/o cuantificar la unión de dichos agentes de unión a nucleosomas en la muestra; y
- (iii) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas en la muestra.

10

En una realización, el agente de unión comprende un anticuerpo.

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

15

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento in vitro para detectar o diagnosticar la presencia de una enfermedad midiendo o detectando la presencia y/o el nivel o concentración de nucleosomas exentos de célula en un fluido corporal, y usando el nivel detectado como biomarcador del estado patológico de un sujeto. 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.

20

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar o medir la presencia de nucleosomas en un extracto exento de células que comprende las etapas de:

25

- (i) aislar cromatina de una célula;
- (ii) digerir, sonicar o romper la cromatina para formar mononucleosomas y/u oligo-nucleosomas; y
- (iii) detectar o medir la presencia de nucleosomas en la digestión mediante un procedimiento de inmunoensayo de la invención.

30

Resultará evidente para los especialistas en la materia 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 entidades particulares y que puede usarse cualquier ligador adecuado en el procedimiento de la invención. Resultará también evidente que el término nucleosomas pretende incluir mononucleosomas y oligonucleosomas y cualquiera de tales fragmentos de cromatina que pueda analizarse en medios fluidos.

35

Según otro aspecto de la divulgación, se proporciona un kit para detectar o medir nucleosomas que comprende ligandos o ligadores múltiples de captura y/o detección específicos para una variante de nucleótido o histona o MPT de histona o una parte componente de los mismos, o una imitación de la estructura/forma del nucleosoma o parte del mismo, junto con las instrucciones para el uso del kit de acuerdo con cualquiera de los procedimientos definidos en la presente memoria.

40

Según otro aspecto de la divulgación, se proporciona un kit para detectar o medir nucleosomas que contienen dos o más epítomos que incluyen una variante de histona o MPT de histona o nucleótido que comprende dos o más ligandos o ligadores de captura y/o detección específicos para una variante de histona o MPT de histona o nucleótido o una parte del mismo, o un imitador de la estructura/forma del nucleosoma o parte del mismo, junto con instrucciones para el uso del kit de acuerdo con cualquiera de los procedimientos definidos en la presente memoria.

45

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona ligandos o ligadores, tales como compuestos de origen natural o sintetizados químicamente, capaces de unión específica al biomarcador. Un ligando o ligador puede comprender un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo, o un ligando sintético tal como un anticuerpo plástico, o un aptámero u oligonucleótido capaz de unión específica al biomarcador. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo capaz de unión específica al biomarcador. Un ligando puede marcarse con un marcador detectable, tal como un marcador luminiscente, fluorescente, enzimático o radiactivo; como alternativa o adicionalmente, un ligando de acuerdo con la divulgación puede marcarse con un marcaje de afinidad, p.ej., un marcaje de biotina, avidina, estreptavidina o His (p.ej., hexa-His). Como alternativa, la unión de ligando puede determinarse usando tecnología exenta de marcación, por ejemplo aquella de ForteBio Inc.

50

Un biosensor de acuerdo con la divulgación puede comprender el biomarcador o un mimético

60

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

Se proporciona también por la divulgación el uso de uno o más ligandos como se describen en la presente memoria, que pueden ser de origen natural o sintetizados químicamente, y es adecuadamente un péptido, anticuerpo o fragmento del mismo, aptámero u oligonucleótido, o el uso de un biosensor, 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.

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

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

Los biomarcadores para detectar la presencia de una enfermedad son dianas esenciales para el descubrimiento de dianas novedosas y moléculas farmacológicas que retarden o detengan la progresión del trastorno. Como el nivel de biomarcador es indicativo de enfermedad y de respuesta farmacológica, el biomarcador es útil para la identificación de compuestos terapéuticos novedosos 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 tanto, en un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona el uso de un ligador o ligando como se describe que puede ser un péptido, anticuerpo o fragmento del mismo o aptámero u oligonucleótido; o el uso de un biosensor, o una matriz; o un kit, para identificar una sustancia capaz de promover y/o suprimir la generación del biomarcador.

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

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

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

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

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

Es conocido que un recambio celular, muerte celular y apoptosis aumentados conducen a niveles circulatorios aumentados de nucleosomas exentos de célula (Holdenrieder y col., 2001). El nivel de nucleosomas exentos de célula en circulación es un indicador no específico y aparece en una variedad de afecciones incluyendo

enfermedades inflamatorias, una gran variedad de afecciones benignas y malignas, enfermedades autoinmunitarias así como después de traumatismo o isquemia (Holdenrieder y col.2001). Resultará evidente para los especialistas en la materia que la invención tendrá aplicación en una variedad de áreas de enfermedades donde se han encontrado nucleosomas en circulación en sujetos. Estas incluyen, sin limitación, traumatismo (por ejemplo, lesión

- 5 grave o cirugía), ejercicio extremo (por ejemplo, correr una maratón), apoplejía y ataque cardíaco, sepsis u otra afección grave y endometriosis. Como los procedimientos de la presente invención son capaces de detectar una variedad más amplia de nucleosomas que los procedimientos de ELISA de nucleosoma actuales, se pueden encontrar aplicaciones en otras áreas de enfermedades.
- 10 Los inmunoensayos de la divulgación incluyen ensayos inmunométricos que emplean procedimientos de detección enzimática (por ejemplo ELISA), ensayos inmunométricos marcados con fluorescencia, ensayos inmunométricos marcados con fluorescencia resueltos en el tiempo, ensayos inmunométricos quimioluminiscentes, ensayos inmunoturbidimétricos, ensayos inmunométricos marcados con partículas y ensayos inmunoradiométricos y procedimientos de inmunoensayo competitivo incluyendo procedimientos de inmunoensayo competitivo de antígeno
- 15 marcado y anticuerpo marcado con una variedad de tipos de marcación, incluyendo marcación radiactiva, enzimática, fluorescente, fluorescente resuelta en el tiempo y con partículas. Todos dichos procedimientos de inmunoensayo son bien conocidos en la materia, véanse por ejemplo Salgame y col., 1997 y van Nieuwenhuijze y col., 2003.
- 20 En una realización, dicha muestra biológica puede comprender un fluido corporal. Por ejemplo, las muestras biológicas que pueden ensayarse en un procedimiento de la invención incluyen líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre completa, suero sanguíneo, plasma, sangre menstrual, fluido endométrico, orina, saliva u otro fluido corporal (heces, líquido lagrimal, líquido sinovial, esputo), aliento, p.ej., como aliento condensado, o un extracto o purificación de las mismas o dilución de las mismas. Las muestras biológicas incluyen también especímenes de un sujeto vivo, o
- 25 tomados postmortem. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, cuando sea apropiado diluirse o concentrarse, y almacenarse de la manera habitual.

En una realización, el procedimiento de la invención se repite en múltiples ocasiones. Esta realización proporciona la ventaja de permitir monitorizar los resultados de la detección durante un periodo de tiempo. Tal disposición

- 30 proporcionará el beneficio de monitorizar o valorar la eficacia de tratamiento de un estado patológico. Pueden usarse tales procedimientos de monitorización de la invención para monitorizar el inicio, progresión, estabilización, mejora, recaída y/o remisión.
- Por tanto, la invención proporciona también un procedimiento in vitro de monitorización de la eficacia de una terapia
- 35 para un estado patológico en un sujeto sospechoso de tener tal enfermedad, que comprende detectar y/o cuantificar el biomarcador presente en una muestra biológica de dicho sujeto. En procedimientos de monitorización, pueden tomarse muestras de prueba en dos o más ocasiones. El procedimiento puede comprender además comparar el nivel del biomarcador o biomarcadores presentes en la muestra de prueba con 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
- 40 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.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento in vitro para

- 45 monitorizar la eficacia de la terapia para un estado patológico en un sujeto humano o animal que comprende:
- (i) cuantificar la cantidad de biomarcador como se define en la presente memoria; y
- (ii) comparar la cantidad de dicho biomarcador en una muestra de prueba con la cantidad presente en uno o más

- 50 controles y/o una o más muestras de prueba anteriores tomadas en un momento previo del mismo sujeto de prueba.
- Un cambio en el nivel del biomarcador en la muestra de prueba respecto al nivel en una muestra de prueba anterior tomada previamente del mismo sujeto de prueba puede ser indicativo de un efecto beneficioso, p.ej., estabilización o mejora, de dicha terapia sobre el trastorno o trastorno sospechado. Además, una vez se ha completado el tratamiento, puede repetirse el procedimiento de la invención periódicamente para monitorizar la recurrencia de una
- 55 enfermedad.

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

- 60 farmacológicas y combinaciones de sustancias.

En una realización adicional, la monitorización de cambios más rápidos debidos a terapias de acción rápida se realiza en intervalos más cortos de horas o días.

- 5 De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para identificar un biomarcador para detectar la presencia de un estado patológico. El término "identificar" como se usa en la presente memoria significa confirmar la presencia del biomarcador presente en la muestra biológica. Cuantificar 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
10 extracto de la misma, o en una dilución de la misma.

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

La identificación y/o cuantificación pueden practicarse mediante cualquier procedimiento 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 procedimientos de la invención, la cuantificación
20 puede practicarse midiendo la concentración del biomarcador en la muestra o muestras. Las muestras biológicas que pueden ensayarse en un procedimiento de la invención incluyen aquellas definidas anteriormente en la presente memoria. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, cuando sea apropiado diluirse o concentrarse, y almacenarse de la manera habitual.

25 La identificación y/o cuantificación de los biomarcadores puede practicarse mediante la detección del biomarcador o de un fragmento de mismo, p.ej., un fragmento con truncamiento C-terminal, o con truncamiento 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.

30 El biomarcador puede detectarse directamente, p.ej., 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
35 marcación luminiscente, fluorescente o radiactiva y/o un marcaje de afinidad.

Por ejemplo, la detección y/o cuantificación pueden practicarse mediante uno o más de los procedimientos seleccionados del grupo consistente en: SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), análisis basado en gel 1D, análisis basado en gel 2D, espectroscopía de masas (MS), LC en fase inversa (RP), permeación por tamaño (filtración en gel),
40 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).

45 Los procedimientos de diagnóstico o monitorización de acuerdo con la invención pueden comprender analizar una muestra por SELDI TOF o MALDI TOF para detectar la presencia o nivel del biomarcador. Estos procedimientos son también adecuados para cribado clínico, pronóstico, monitorización de los resultados de la terapia, identificación de los pacientes que es más probable que respondan a un tratamiento terapéutico particular, cribado y desarrollo de
50 fármacos e identificación de nuevas dianas para tratamiento farmacológico.

La identificación y/o cuantificación de los biomarcadores de analito pueden practicarse usando un procedimiento inmunológico, que implica un anticuerpo o fragmento del mismo capaz de unión específica al biomarcador. Los procedimientos inmunológicos adecuados incluyen inmunoensayos de sándwich, tales como ELISA de sándwich, en
55 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
60 practicarse, por ejemplo, en formato de placa de microvaloración o tira.

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

- 5 En una realización, uno o más de los biomarcadores pueden reemplazarse por una molécula, o un fragmento medible de la molécula, que se encuentra corriente arriba o corriente abajo del biomarcador en una ruta biológica.

La identificación de biomarcadores clave específicos de una enfermedad es esencial para la integración de los procedimientos de diagnóstico y regímenes terapéuticos. Usando biomarcadores predictivos pueden desarrollarse
10 herramientas de diagnóstico apropiadas tales como biosensores; por consiguiente, en procedimientos y usos de la divulgación, la identificación y cuantificación pueden practicarse usando un biosensor, sistema microanalítico, sistema micromanipulado, sistema de microseparación, sistema inmunocromatográfico 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
15 biosensores, es posible detectar el biomarcador o biomarcadores diana a la concentraciones previstas encontradas en muestras biológicas.

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

20 Los biosensores pueden comprender un ligador de ligandos o ligandos, como se describen en la presente memoria, capaces de unión específica al biomarcador. Tales biosensores son útiles en la detección y/o cuantificación de un biomarcador. El biomarcador o biomarcadores pueden detectarse usando un biosensor que incorpora tecnologías basadas en hologramas "inteligentes" o sistemas acústicos de alta frecuencia, tales sistemas son particularmente
25 susceptibles de configuraciones de "código de barras" o matriz.

En sensores de hologramas inteligentes (Smart Holograms Ltd, Cambridge, RU), se almacena una imagen holográfica en una película polimérica fina que se sensibiliza para reaccionar específicamente con el biomarcador. Tras la exposición, el biomarcador reacciona con el polímero conduciendo a una alteración de la imagen exhibida
30 por el holograma. La lectura resultado 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
35 sustancias. Pueden diseñarse sensores reversibles e irreversibles para satisfacer diferentes requisitos, y es factible una monitorización continua de un biomarcador particular de interés.

Adecuadamente, los biosensores para la detección de uno o más biomarcadores combinan el reconocimiento biomolecular con medios apropiados para convertir la detección de la presencia, o la cuantificación, del biomarcador
40 en la muestra en una señal. Los biosensores se pueden adaptar para pruebas diagnósticas de "sitios alternativos", p. ej., en la sala de hospital, departamento de pacientes ambulatorios, cirugía, hogar, campo y lugar de trabajo.

Los biosensores para detectar uno o más biomarcadores incluyen sensores acústicos, de resonancia de plasmón, holográficos, de interferometría de biocapa (BLI) y micromanipulados. Pueden emplearse elementos de
45 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 de la divulgación. Los procedimientos que implican la identificación y/o cuantificación de uno o más biomarcadores pueden practicarse en instrumentos de laboratorio o pueden incorporarse a plataformas de diagnóstico o monitorización desechables que pueden usarse en un entorno no de laboratorio, p.ej., en la consulta del médico o en
50 el lecho del paciente. Los biosensores adecuados para practicar los procedimientos de la invención incluyen tarjetas "de crédito" con lectores ópticos o acústicos. Los biosensores pueden configurarse para permitir transmitir electrónicamente los datos recogidos al médico para interpretación y, por tanto, pueden constituir la base de medicina a distancia.

55 Se describen en la presente memoria kits de diagnóstico para el diagnóstico y la monitorización de la presencia de un estado patológico. En una realización, los kits contienen adicionalmente un biosensor capaz de identificar y/o cuantificar un biomarcador. Adecuadamente, un kit de acuerdo con la divulgación puede contener uno o más componentes seleccionados del grupo de: un ligador de ligandos o ligandos específicos del biomarcador o un mimético estructural/conformacional del biomarcador, uno o más controles, uno o más reactivos y uno o más
60 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 un estado patológico permite la integración de los procedimientos de diagnóstico y regímenes terapéuticos. La detección de un biomarcador puede usarse para cribar sujetos antes de su participación en ensayos clínicos. Los biomarcadores proporcionan los medios para manifestar la respuesta terapéutica, falta de respuesta, perfil de efectos secundarios desfavorable, grado de cumplimiento de la medicación y consecución de niveles séricos de fármaco adecuados. Los biomarcadores pueden usarse para proporcionar avisos de respuesta adversa a fármacos. Los biomarcadores son útiles en el desarrollo de terapias personalizadas, como valoración de respuesta pueden usarse para ajuste fino de la dosificación, minimizar el número de medicaciones prescritas, reducir el retraso en el logro de una terapia efectiva y evitar reacciones farmacológicas adversas. Por tanto, al monitorizar un biomarcador, la asistencia al paciente puede adaptarse de manera precisa para satisfacer las necesidades determinadas por el trastorno y el perfil farmacogenómico del paciente, por tanto, el biomarcador puede usarse para titular la dosis óptima, predecir una respuesta terapéutica positiva e identificar aquellos sujetos con alto riesgo de efectos secundarios graves.

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

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

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

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

EJEMPLO 1

Una preparación de nucleosoma (producida por digestión de cromatina extraída de líneas celulares de cáncer o producida de acuerdo con el procedimiento de Holdenrieder y col., 2001) se diluyó en serie en suero fetal de ternero y se ensayó usando procedimientos de ELISA individuales para las variantes de histona mH2A1.1, mH2A2, H2AZ asociadas a nucleosomas y los nucleótidos 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina y timina asociados a nucleosomas y la MPT P-H2AX(Ser139) asociada a nucleosomas usando un anticuerpo de captura anti-histona en fase sólida que se une a los nucleosomas intactos y no se une a la histona H2 y un anticuerpo de detección biotinilado y apropiado contra variantes de histona o MPT de histona o contra nucleótidos. El suero fetal de ternero puro también se procesó en el ELISA como una muestra de control que no contenía nucleosomas exentos de célula. 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 seroalbúmina bovina (20 g/l) a los pocillos (200 µl/pocillo) y se incubó a temperatura ambiente para bloquear los sitios de unión a proteína en exceso en los pocillos. Se decantó la solución de seroalbúmina bovina en exceso y se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo, tampón TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contiene 1 % de Tween 20). Se añadieron muestra (10 µl/pocillo) y tampón de ensayo (50 µl/pocillo, TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contiene 0,9 % de NaCl, 0,05 % de desoxicolato de sodio y 1 % de sustituto de Nonidet P40) a los pocillos y se incubaron. Se decantó la mezcla de muestra y tampón de ensayo y se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de anticuerpo biotinilado contra la variante de histona o la MPT de histona o de detección de nucleótidos (50 µl/pocillo) y se incubó. Se decantó el anticuerpo de detección en exceso y se lavaron de nuevo los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución que contiene conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (50 µl/pocillo) y se incubó. Se decantó el conjugado en exceso y se lavaron de nuevo los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de sustrato coloreado (100 µl/pocillo, sal de diamonio del ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se midió la densidad óptica (DO) de los pocillos a una longitud de onda de 405 nm usando un lector de placas de microvaloración estándar. Se observó una curva dosis-respuesta de aumento de color con el aumento de la concentración de variantes de histona o MPT de histona o nucleótidos individuales asociados a nucleosomas con una baja señal de fondo en ausencia de variantes de histona,

de histona MPT o nucleótidos (suero fetal de ternero). Los resultados se muestran en las Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

EJEMPLO 2

5 Se utilizaron dos procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual para medir el contenido de nucleosomas exentos de célula en circulación de muestras de sangre en suero y plasma tomadas de 20 sujetos sanos. El primer procedimiento de ELISA actual (ELISA 1) fue el Roche Cell Death ELISA y el otro (ELISA 2) un ELISA que emplea un anticuerpo monoclonal de captura antihistona y un anticuerpo monoclonal de detección contra el complejo histona-ADN. Los niveles de nucleosomas detectados por los dos procedimientos de ELISA de
10 nucleosoma actuales fueron más bajos en el plasma normal que en el suero normal.

También se midieron los niveles individuales de nucleosomas que contenían tres variantes de histona asociadas a nucleosomas, una MPT de histona y un nucleótido en las mismas muestras. Los resultados mostraron que las muestras de suero tomadas de sujetos sanos tienen de manera uniforme niveles bajos de nucleosomas que
15 contienen variantes de histona o MPT o nucleótidos. Sorprendentemente, los resultados del plasma medido fueron más altos para los 20 sujetos sanos. Por lo tanto, los resultados para el procedimiento de la invención (plasma más alto que el suero) son diferentes a los de los procedimientos de la técnica actual (suero más alto que el plasma). Se muestran los resultados en la Figura 14.

20 EJEMPLO 3

Se usaron dos procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual para medir el contenido de nucleosoma exento de célula en circulación 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 producido a partir de sujetos sanos
25 según el procedimiento de Holdenrieder (*Holdenrieder y col., 2001). El primer procedimiento de ELISA actual (ELISA 1) fue el Roche Cell Death ELISA y el otro (ELISA 2) un ELISA que emplea un anticuerpo monoclonal de captura antihistona y un anticuerpo monoclonal de detección contra el complejo histona-ADN.

También se midieron individualmente los niveles de nucleosomas que contienen varias histonas variantes, una MPT
30 de histona y dos nucleótidos. Los resultados muestran que muchas muestras tomadas de sujetos con cáncer tienen niveles de nucleosomas bajos o no detectables según lo determinado por los procedimientos de ELISA de nucleosoma actuales. Sin embargo, la mayoría de estas muestras tienen niveles detectables de nucleosomas que contienen una o más histonas variantes asociadas al nucleosoma y 5-hidroximetilcitosina asociada al nucleosoma. Se encontró que todas las muestras contenían niveles detectables de 5-metilcitosina asociada al nucleosoma. Los
35 resultados se muestran en las Figuras 10-13.

EJEMPLO 4

Se midieron los niveles de histona H2AZ asociada al nucleosoma de algunas muestras de plasma humano tomadas
40 de pacientes con cáncer usando un anticuerpo de detección anti-H2AZ biotinilado. El procedimiento se realizó dos veces usando dos anticuerpos de captura monoclonales antihistona diferentes para determinar si los resultados de H2AZ eran repetibles para diferentes anticuerpos de captura. Los resultados en la Figura 8 muestran que los niveles de histona H2AZ asociados a nucleosomas de los dos ensayos están linealmente relacionados con una interceptación de aproximadamente cero. Las unidades son lecturas sencillas de densidad óptica.

45 EJEMPLO 5

Una muestra que contiene nucleosomas se analiza para determinar el contenido de nucleosomas usando el
procedimiento de la invención que usa una mezcla de anticuerpos de detección. Los anticuerpos de detección se
50 seleccionan para incluir anticuerpos dirigidos a una mezcla diversa de epítomos de nucleosoma; por ejemplo, para incluir al menos un anticuerpo anti-nucleótido dirigido a un nucleótido común y/o al menos un anticuerpo contra variantes de histona dirigido a una isoforma de histona que se produce comúnmente para dirigirse a una serie de epítomos de nucleosoma distintos que es probable que aparezcan en todos o la mayor parte de los nucleosomas para aumentar la variedad de nucleosomas detectados por el ensayo.

55 Se realizó un procedimiento de ELISA de nucleosoma de múltiples epítomos usando una mezcla de anticuerpos anti-mH2A2 biotinilados, anti-H2AZ biotinilados y anti-dímeros de timina biotinilados como una mezcla de reactivos de anticuerpos de detección siguiendo un procedimiento similar al que se describió anteriormente en el Ejemplo 1. Se midieron los niveles de nucleosomas de la muestra de sangre con nucleosomas preparada de sujetos sanos así
60 como las 3 muestras de sangre humana tomadas de pacientes con cáncer de pulmón en los que los niveles de

nucleosomas eran muy bajos o no detectables usando cada uno de los ensayos individuales. Sorprendentemente, se encontró que los nucleosomas fueron detectables en las 3 muestras con una relación señal/ruido significativa que era mayor que para los ensayos individuales o para un ELISA de nucleosoma de la técnica actual. Esto indica que el procedimiento de ELISA de nucleosoma de múltiples epítomos de la invención es un método de detección mejor para la presencia de cáncer que los procedimientos de la técnica actual. Se muestran los resultados en la Figura 9.

EJEMPLO 6

Una muestra que contiene nucleosomas se analiza para determinar el contenido de nucleosomas usando el procedimiento de la invención que usa una mezcla de dos o más anticuerpos de captura con uno o más anticuerpos de detección antinucleosoma. Los anticuerpos de captura se seleccionan para dirigirse a una selección diversa de epítomos de nucleosomas; por ejemplo, para incluir al menos un anticuerpo anti-nucleótido dirigido a un nucleótido común que probablemente esté presente en todos o en muchos o la mayoría de los nucleosomas y/o al menos un anticuerpo contra variantes de histona dirigido a una isoforma de histona común que es probable que esté presente en todos, en muchos o en la mayoría de los nucleosomas para dirigirse a una serie de epítomos de nucleosomas distintos que es probable que aparezcan en todos, en muchos o en la mayoría de los nucleosomas para aumentar el variedad de nucleosomas detectados por el ensayo.

EJEMPLO 7

Una muestra que contiene nucleosomas se analiza para determinar el contenido de nucleosomas usando el procedimiento de la invención que usa una mezcla de anticuerpos de detección. Los anticuerpos de detección se seleccionan para dirigirse a una selección diversa de epítomos de nucleosomas; por ejemplo, para incluir al menos un anticuerpo anti-nucleótido dirigido a un nucleótido común que probablemente esté presente en todos o en muchos o la mayoría de los nucleosomas y/o al menos un anticuerpo contra variantes de histona dirigido a una isoforma de histona común que es probable que esté presente en todos, en muchos o en la mayoría de los nucleosomas y/o al menos un anticuerpo contra modificaciones de histona dirigido a una modificación de histona común que probablemente esté presente en todos o en muchos o la mayoría de los nucleosomas para dirigirse a una serie de epítomos de nucleosomas distintos que es probable que aparezcan en todos, en muchos o en la mayoría de los nucleosomas para aumentar el variedad de nucleosomas detectados por el ensayo.

EJEMPLO 8

Una muestra que contiene nucleosomas se analiza para determinar el contenido de nucleosomas usando el procedimiento de la invención que usa una mezcla de 2 o más anticuerpos de captura y 2 o más anticuerpos de detección antinucleosoma seleccionados para dirigirse a una selección diversa de epítomos de nucleosomas. Los anticuerpos de captura se seleccionan para incluir al menos un anticuerpo antinucleótido dirigido a un nucleótido común que probablemente esté presente en todos o en muchos o la mayoría de los nucleosomas y/o al menos un anticuerpo contra variantes de histona dirigido a una isoforma de histona común que es probable que esté presente en todos, en muchos o en la mayoría de los nucleosomas y/o al menos un anticuerpo contra modificaciones de histona dirigido a una modificación de histona común que probablemente esté presente en todos o en muchos o la mayoría de los nucleosomas para dirigirse a una serie de epítomos de nucleosomas distintos que es probable que aparezcan en todos o en la mayoría de los nucleosomas para aumentar el variedad de nucleosomas detectados por el ensayo.

EJEMPLO 9

(no es parte de la invención)

Una muestra que contiene nucleosomas se analiza para determinar el contenido de nucleosomas usando el procedimiento de la invención que usa uno o más anticuerpos de captura policlonales antinucleosoma y/o uno o más anticuerpos de detección policlonales antinucleosoma para dirigirse a una serie de epítomos de nucleosoma distintos para ampliar la variedad de nucleosomas detectados por el ensayo.

55 REFERENCIAS

- Allen y col., A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. Nucleic Acids Research: 32(3) e38DOI: 10.1093/nar/gnh032
 Bawden y col., Detection of histone modification in cell-free nucleosomes.WO 2005/019826, 2005
 Boulard y col., 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 y col., Detection of Post-translational Modifications on Native Intact Nucleosomes by ELISA. <http://www.jove.com/details.php?id=2593> doi: 10.3791/2593. J Vis Exp. 50 (2011).
- 5 Deligezer y col., 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
- 10 Feinberg y Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*: 301, 89-92, 1983
- Grutzmann y col., Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. *PLoS ONE* 3(11): e3759. doi:10.1371/journal.pone.0003759, 2008
- Hervouet y col., Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 Interactions Promotes Tumorigenesis from Human and Mice Glial Cells *PLoS ONE* 5(6): e11333. doi:10.1371/journal.pone.0011333, 2010
- 15 Hua y col., Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Molecular Systems Biology* 4; artículo número 188; doi:10.1038/msb.2008.25, 2008
- Herranz y Esteller, DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. *Methods Mol Biol*.361:25-62, 2007
- 20 Holdenrieder y col., Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*: 95, 114-120, 2001
- *Holdenrieder y col, Nucleosomes in Serum as a Marker for Cell Death. *Clin Chem Lab Med*; 39(7), 596-605, 2001
- Holdenrieder y col., Cell-Free DNA in Serum and Plasma: Comparison of ELISA and Quantitative PCR. *Clinical Chemistry*: 51(8), 1544-1546, 2005
- 25 Holdenrieder y Stieber, Clinical use of circulating nucleosomes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*; 46(1): 1-24, 2009
- Kapoor y col., The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature*: 468, 1105-1111, 2010
- Mansour y col., 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
- 30 Moore y col., 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
- Ogoshi y col., Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells. *Genomics*: En prensa, 2011
- Pennings y col., DNA methylation, nucleosome formation and positioning. *Briefings in functional genomics and proteomics*: 3(4), 351-361, 2005
- 35 Rodríguez-Paredes y Esteller, Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature Medicine*: 17(3), 330-339, 2011
- Salgame y col., An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 25(3), 680-681, 1997
- Sporn y col., Histone macroH2A isoforms predict the risk of lung cancer recurrence. *Oncogene*: 28(38), 3423-8, 2009
- 40 Stroud y col., 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biology*: 12:R54, 2011
- Tachiwana y col., Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Cryst*: D67, 578-583, 2011
- Ting Hsiung y col., 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
- 45 van Nieuwenhuijze y col., Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*; 62: 10-14, 2003
- Vasser y col., Measurement of Global DNA Methylation. *Genetic Engineering and Biotechnology News*: 29(7), 2009
- Whittle y col., The Genomic Distribution and Function of Histone Variant HTZ-1 during *C. elegans* Embryogenesis. *PLoS Genet* 4(9): 1-17, 2008
- 50 Zee y col., Global turnover of histone post-translational modifications and variants in human cells *Epigenetics & Chromatin*. 3(22): 1-11, 2010
- Zhang y col., Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra highpressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*: 413(2), 164-170, 2011

55

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar nucleosomas *per se* en una muestra que comprende las etapas de:
 - 5 (i) poner en contacto la muestra con un primer agente de unión que se une a nucleosomas;
 - (ii) poner en contacto los nucleosomas o la muestra con dos o más segundos agentes de unión que se unen a epítomos de nucleosomas diferentes o separados, donde al menos uno de los segundos agentes de unión se une a un nucleótido y al menos uno de los segundos agentes de unión se une a una variante de histona;
 - (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión múltiple a nucleosomas; y
 - 10 (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas en la muestra.
2. Un procedimiento para detectar nucleosomas *per se* en una muestra que comprende las etapas de:
 - (i) poner en contacto la muestra con dos o más primeros agentes de unión que se unen a epítomos de nucleosomas
 - 15 diferentes o separados, donde al menos uno de los primeros agentes de unión se une a un nucleótido y al menos uno de los primeros agentes de unión se une a una variante de histona;
 - (ii) poner en contacto los nucleosomas o la muestra 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; y
 - 20 (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas en la muestra.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el agente de unión comprende un anticuerpo.
4. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la muestra es un
- 25 fluido biológico tal como sangre, suero o plasma.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el nucleótido es una base de ADN seleccionada de entre adenina, timina, guanina o citosina, o un derivado de las mismas.
- 30 6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el nucleótido se selecciona de entre timina, 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde variante de histona es una variante de histona H2A, H2B o H3.
- 35 8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde variante de histona es una variante de histona H2A seleccionada de entre: mH2A2 and H2AZ.
9. Un procedimiento *in vitro* para detectar o diagnosticar un estado patológico en animales o humanos
- 40 que comprende las etapas de:
 - (i) detectar o medir los nucleosomas en un fluido corporal de un sujeto de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de las reivindicaciones 1-8; y
 - (ii) usar el nivel de nucleosomas detectado para identificar el estado patológico del sujeto.
- 45 10. Un procedimiento *in vitro* para valoración en un sujeto animal o humano de la idoneidad de un tratamiento médico que comprende las etapas de:
 - (i) detectar o medir los nucleosomas en un fluido corporal de un sujeto de acuerdo con cualquiera de los
 - 50 procedimientos de las reivindicaciones 1-8; y
 - (ii) usar el nivel de nucleosomas detectado como parámetro para la selección de un tratamiento adecuado para el sujeto.
11. Un procedimiento *in vitro* para monitorizar un tratamiento de un sujeto animal o humano que
- 55 comprende las etapas de:
 - (i) detectar o medir los nucleosomas en un fluido corporal de un sujeto de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de las reivindicaciones 1-8; y
 - (ii) repetir la detección o medida de nucleosomas en un fluido corporal del sujeto en una o más ocasiones; y
 - 60 (iii) usar cualquier cambio en el nivel de nucleosomas detectado como parámetro para cualquier cambio en la

afección del sujeto.

12. Un procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde el nucleosoma se detecta o se mide como uno de un panel de medidas.

5

13. Un procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para uso en sujetos con cáncer real o sospechado, tumores benignos, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, endometriosis, enfermedad infecciosa, sepsis, apoplejía o infarto de miocardio.

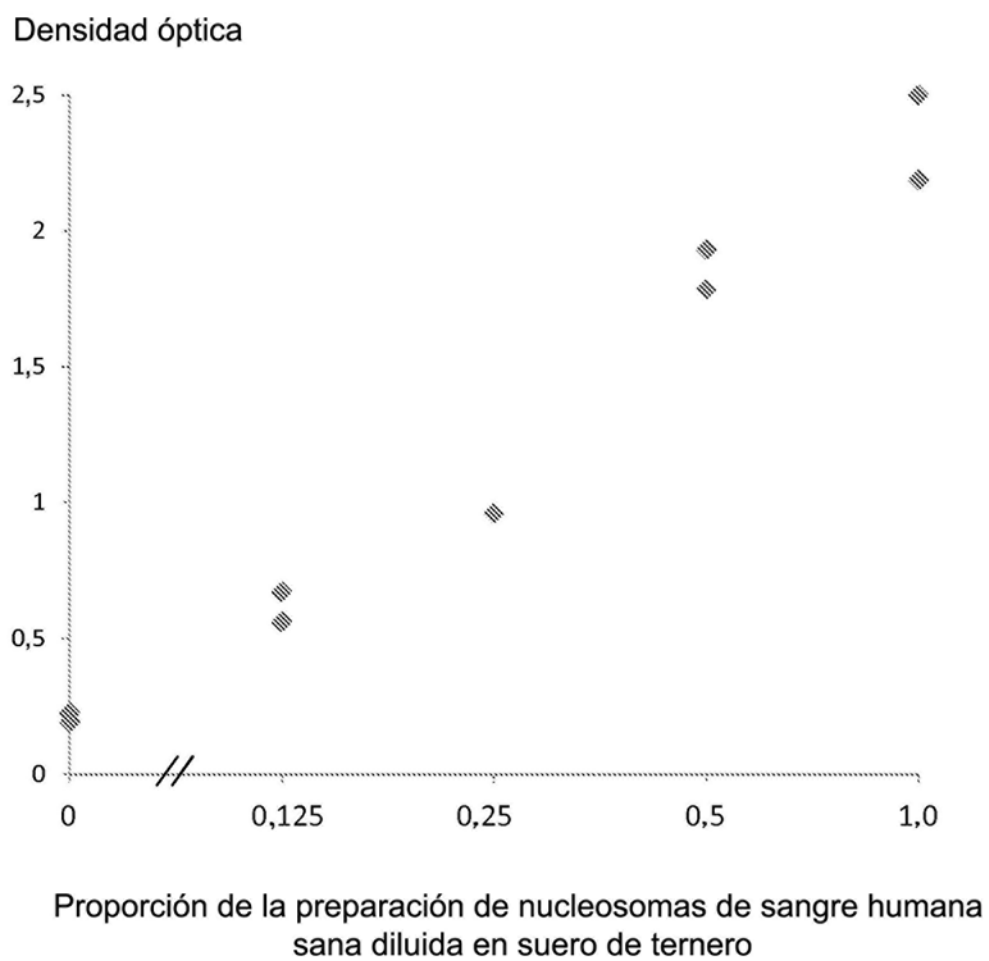


FIGURA 1

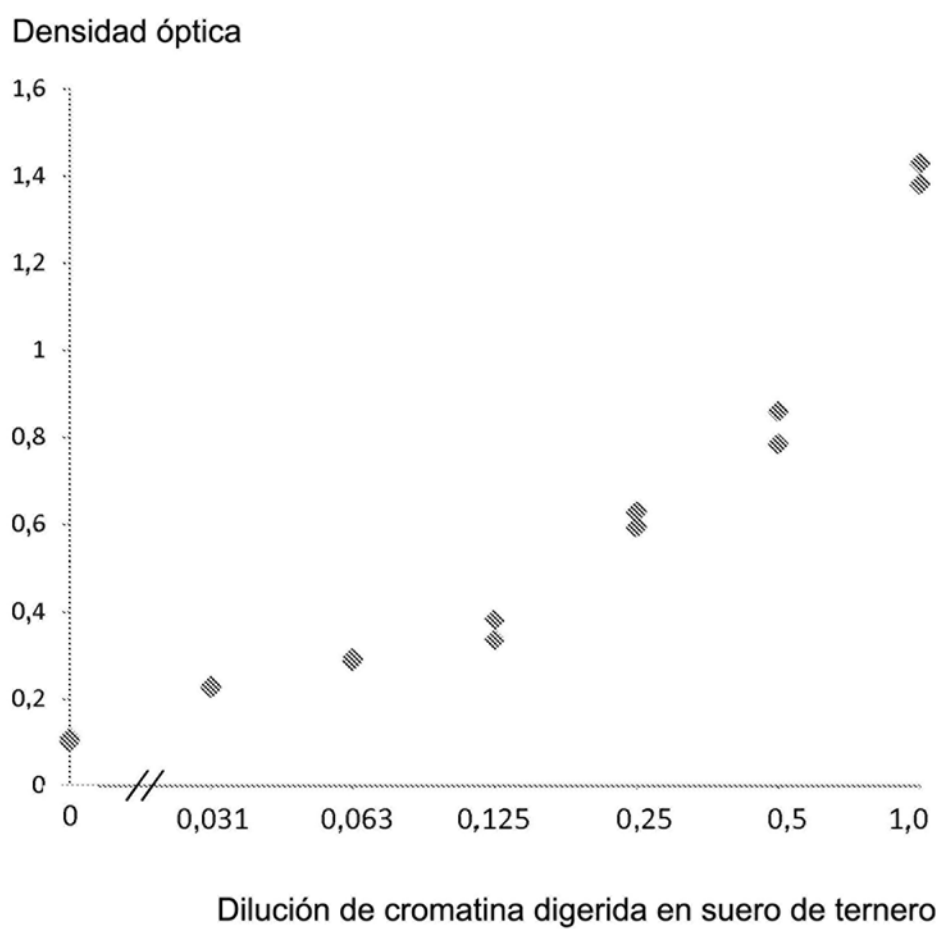


FIGURA 2

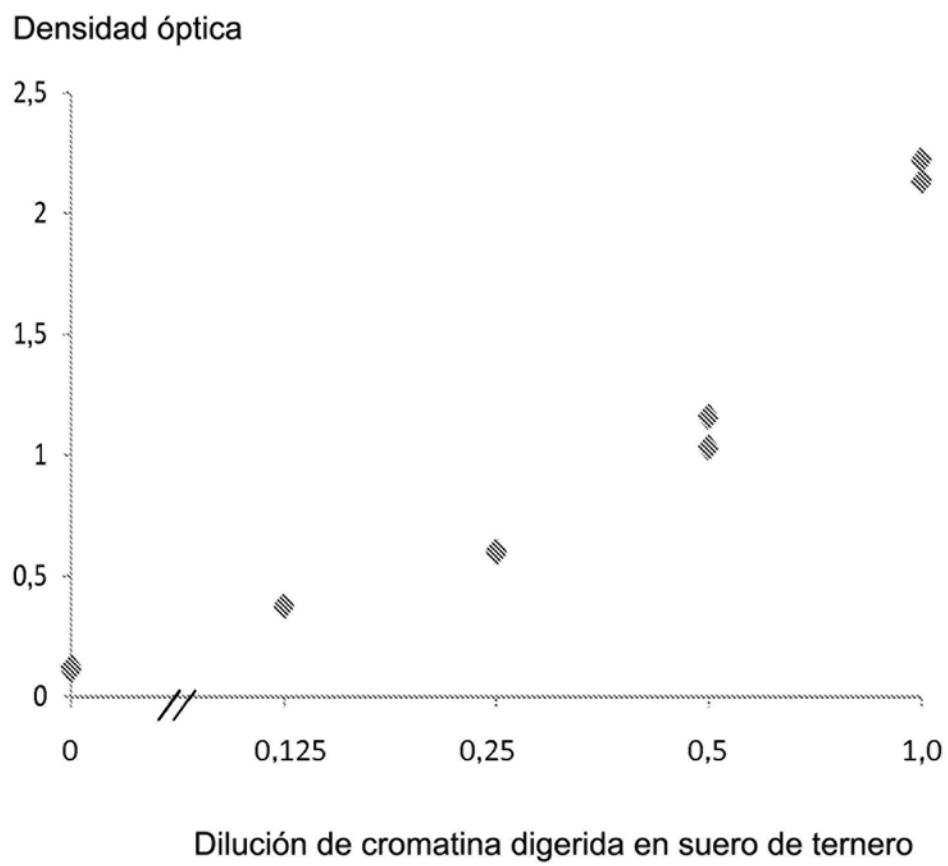


FIGURA 3

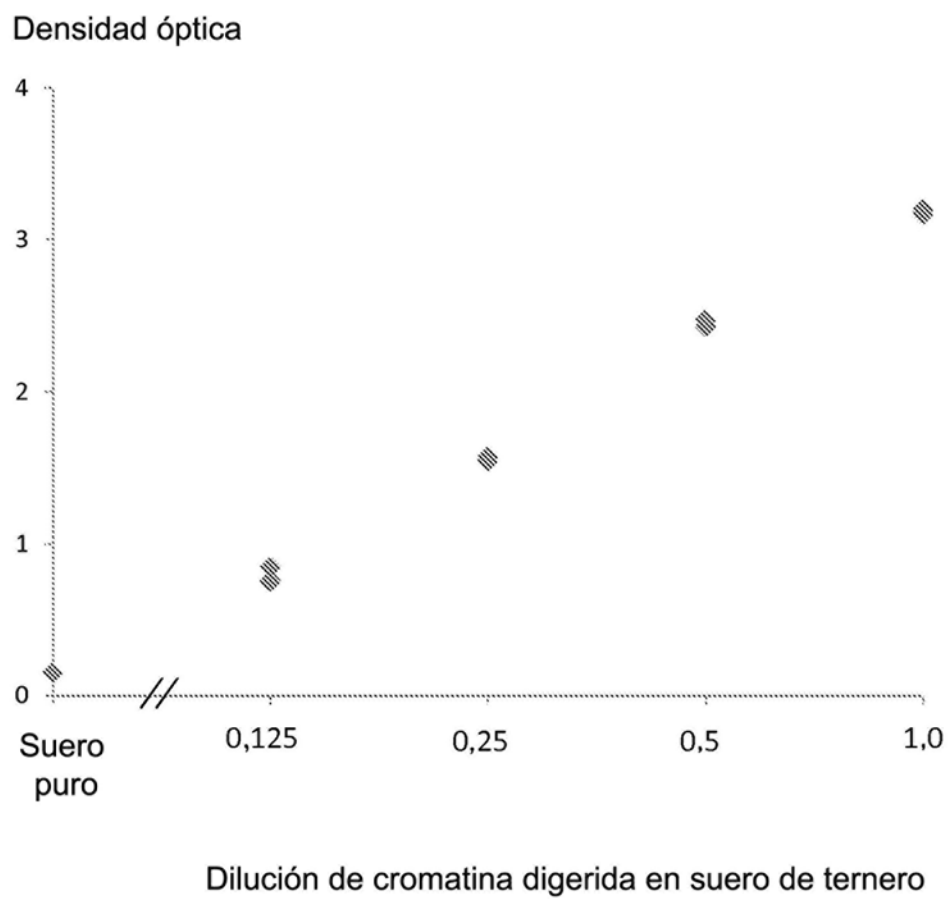


FIGURA 4

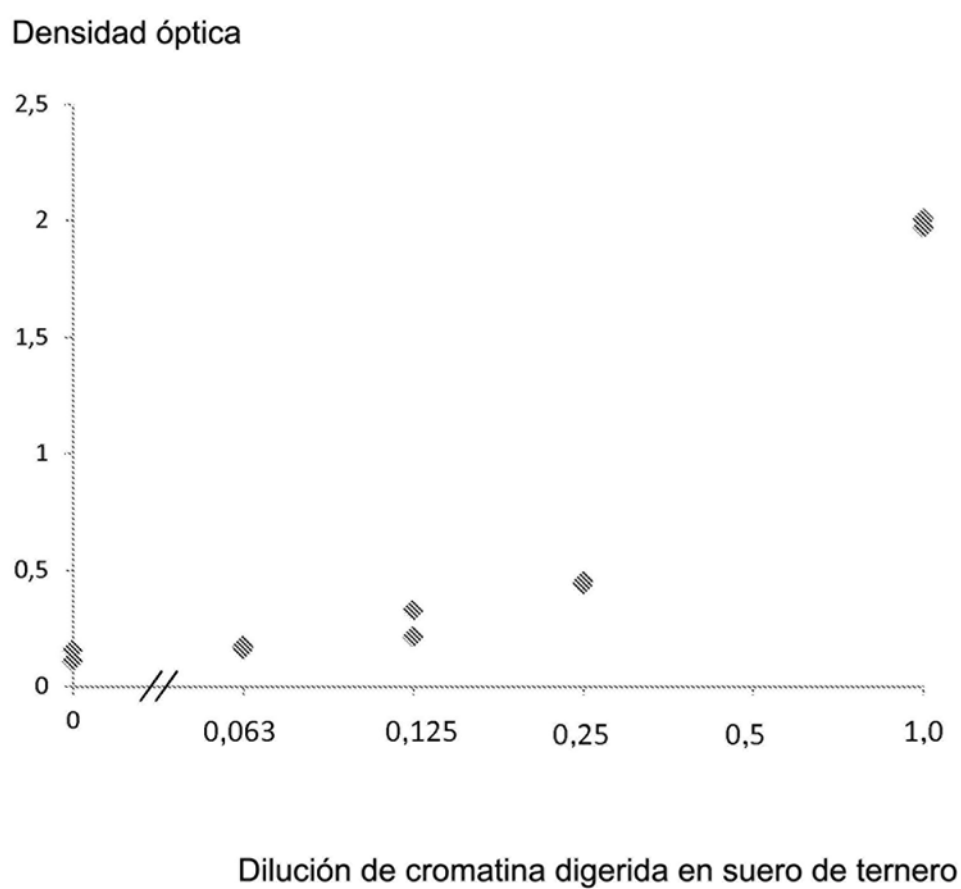


FIGURA 5

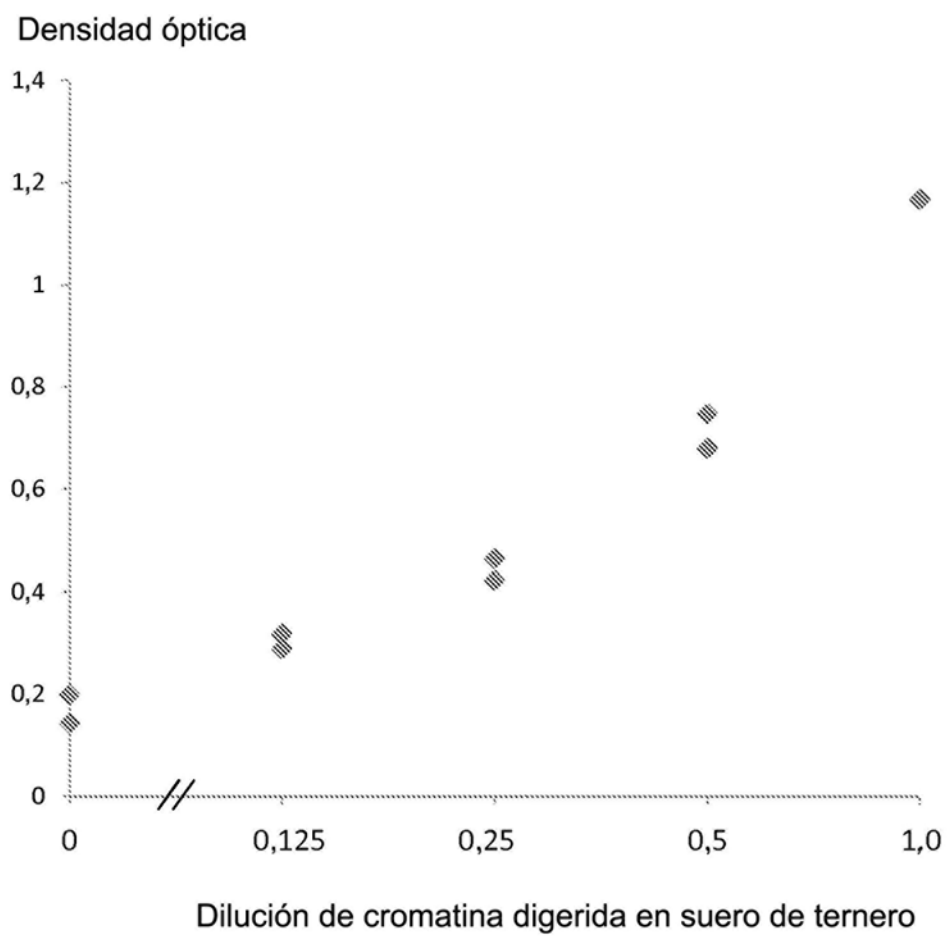


FIGURA 6

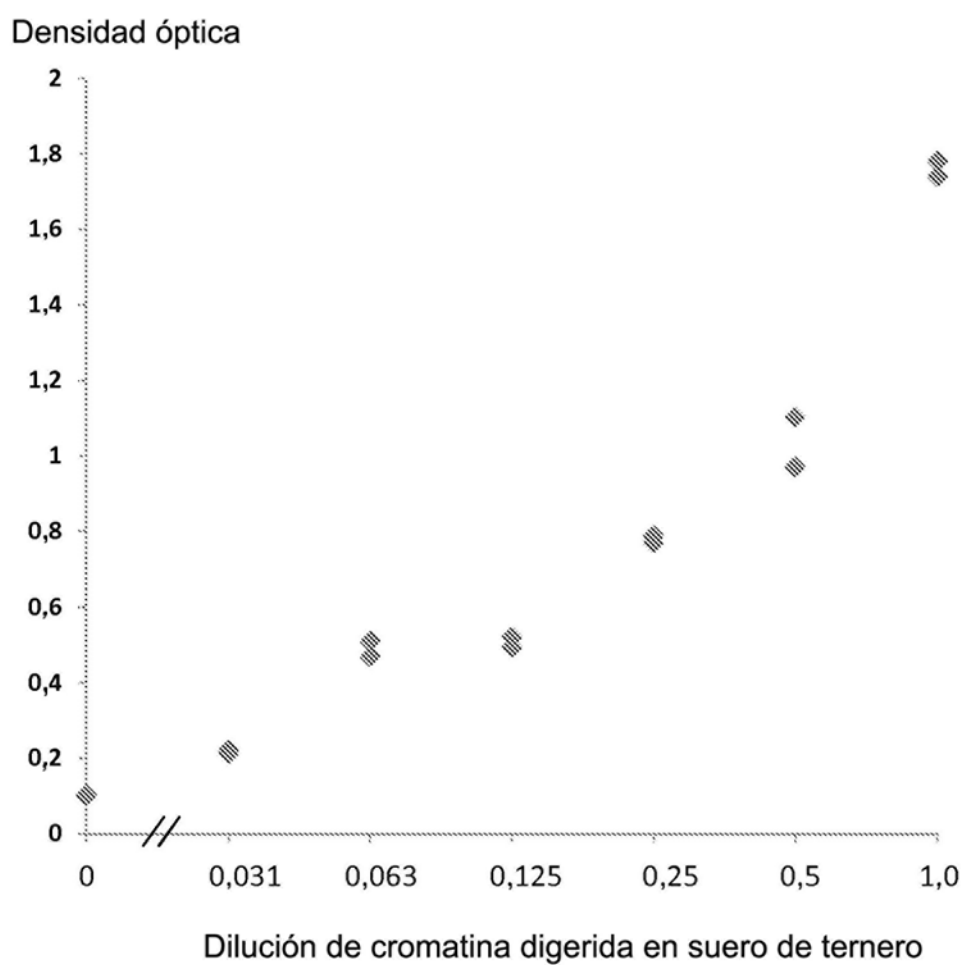


FIGURA 7

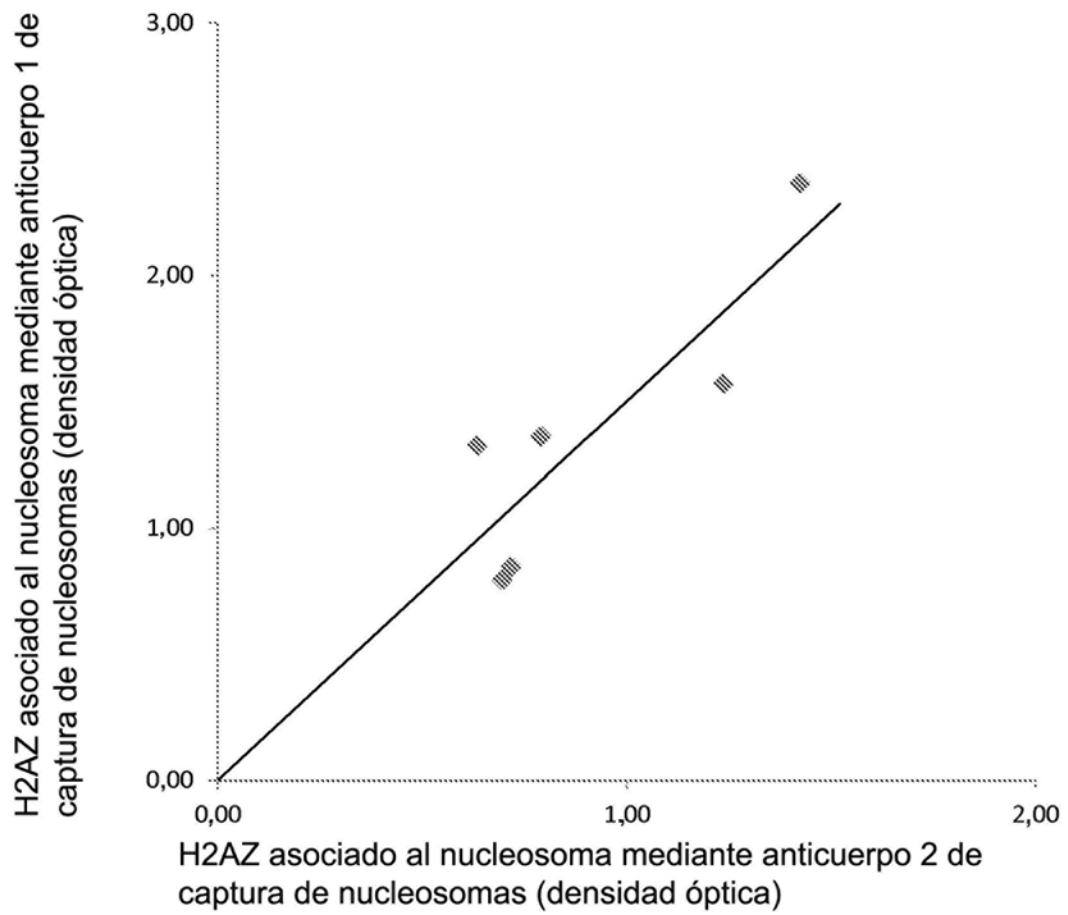


FIGURA 8

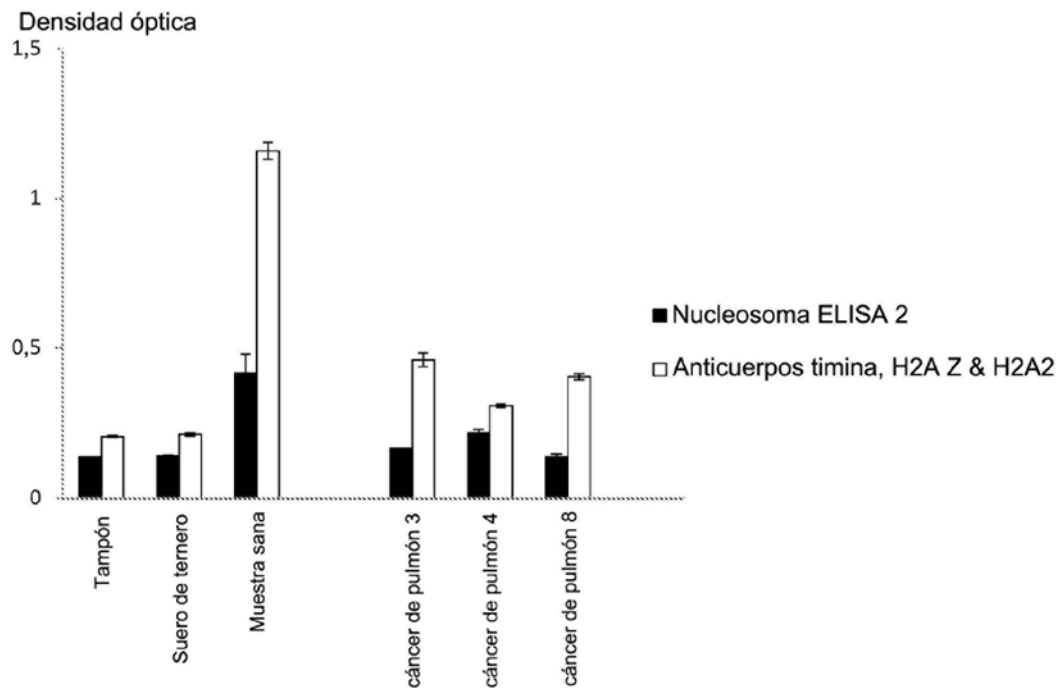


FIGURA 9

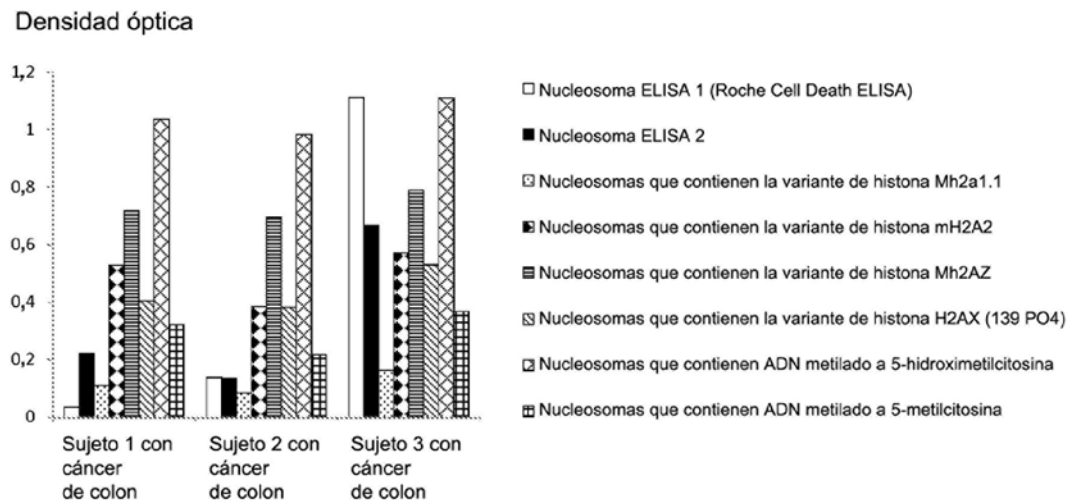


FIGURA 10

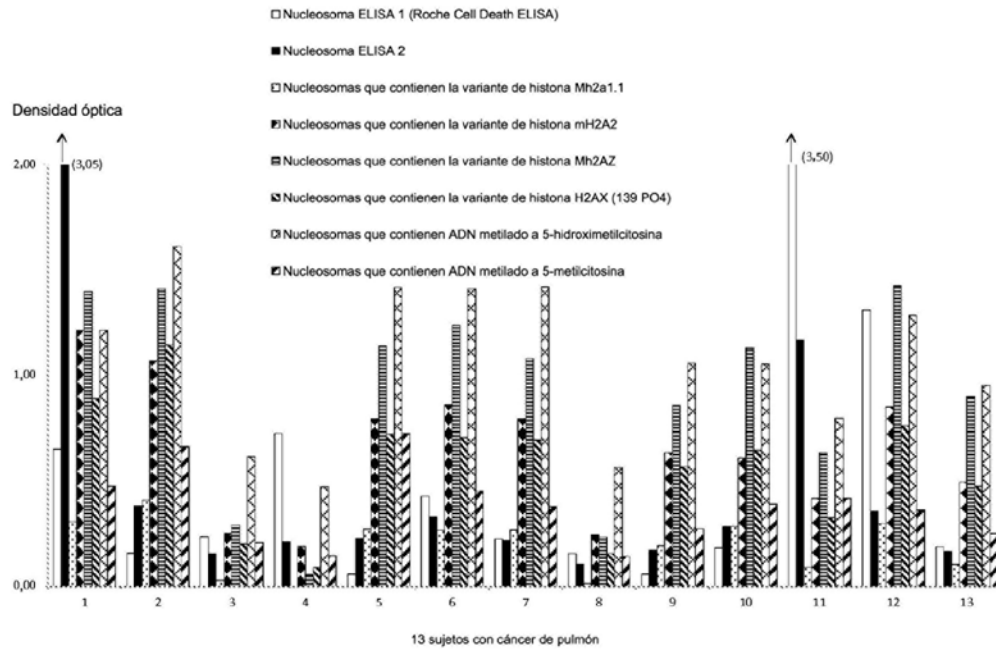


FIGURA 11

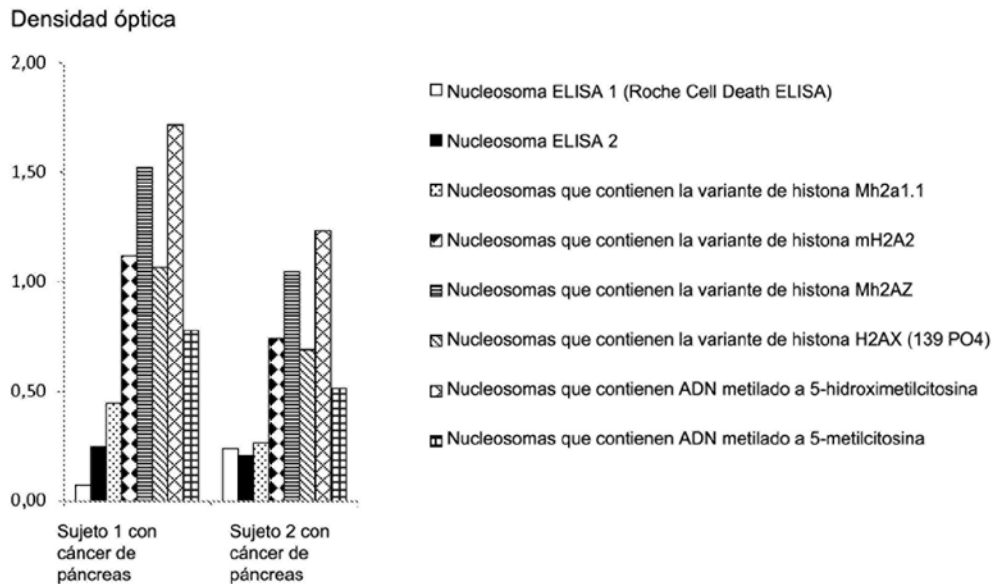


FIGURA 12

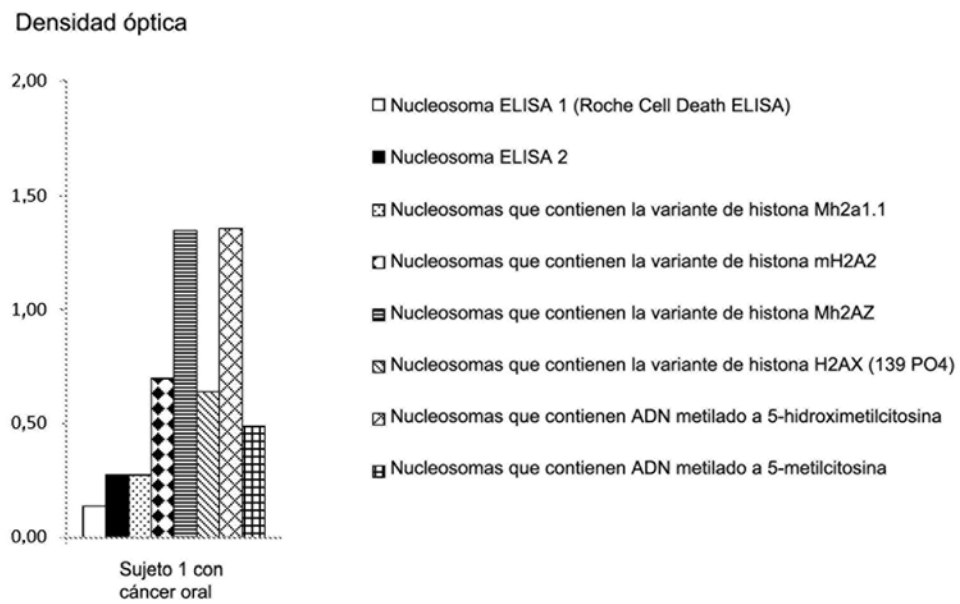


FIGURA 13

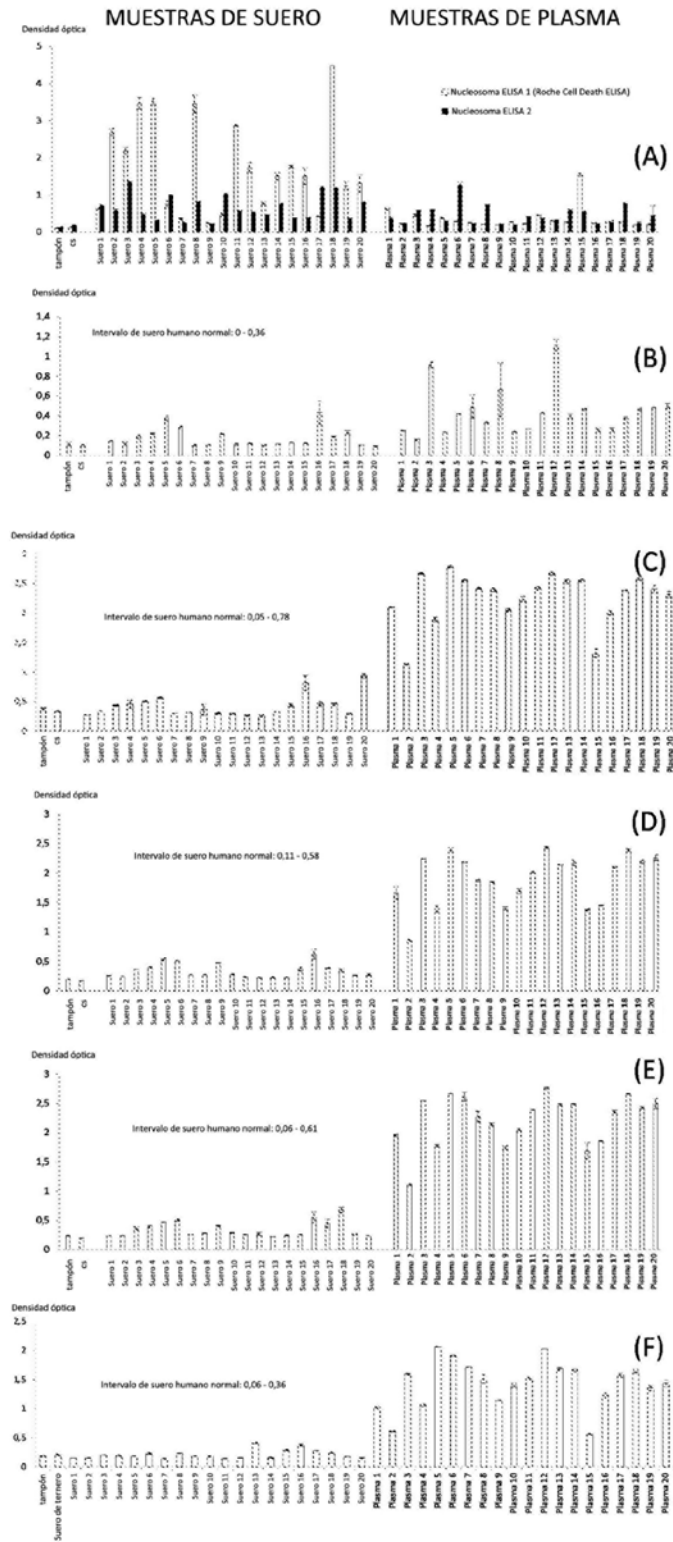


FIGURA 14