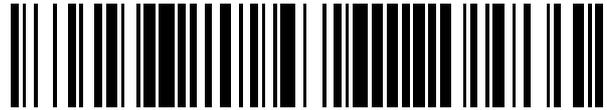


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 687**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2010 PCT/EP2010/004008**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11000573**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2010 E 10730098 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2449383**

54 Título: **Procedimiento de diagnóstico para predecir el riesgo de recurrencia del cáncer basado en isoformas macroH2A de la histona**

30 Prioridad:

02.07.2009 EP 09008679

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

14.09.2018

73 Titular/es:

**EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY
LABORATORY (EMBL) (50.0%)
Meyerhoferstrasse 1
69117 Heidelberg, DE y
THORAXKLINIK HEIDELBERG GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LADURNER, ANDREAS;
SPORN, JUDITH y
MULEY, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 681 687 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 de diagnóstico para predecir el riesgo de recurrencia del cáncer basado en isoformas macroH2A de la histona

5 La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de diagnóstico del riesgo de recurrencia del cáncer en un paciente mamífero, que comprende detectar la expresión de macroH2A1.1 y/o macroH2A2 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que una expresión baja o reducida de dicha macroH2A1.1 y/o macroH2A2 es indicativa de un aumento del riesgo de recurrencia del cáncer en dicho paciente.

Antecedentes de la invención

10 Entre los cánceres, el cáncer de pulmón es el segundo cáncer más común en nuevos casos (15% de todos los cánceres en EE. UU.) (Jemal et al., 2007) y es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo (31% en hombres y 26% mujeres en EE. UU.). Cuatro de cada cinco carcinomas de pulmón son cánceres de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y alrededor de un tercio de los pacientes con NSCLC se diagnostican con una enfermedad temprana. La cirugía es la mejor opción de tratamiento para estos pacientes, sin embargo, un alto porcentaje de pacientes recaen y la mayoría muere por su enfermedad. Los pacientes que se encuentran en etapas de cáncer idénticas a menudo muestran tasas de recurrencia diferentes (Zhu et al., 2006); por lo tanto, existe un interés en los marcadores moleculares, que podrían identificar a los pacientes con mayor probabilidad de recurrencia después de la cirugía (D'Amico, 2008). Se han probado varios marcadores potenciales para la recurrencia metastásica de NSCLC, pero ninguno de ellos ha demostrado ser suficientemente útil (Zhu et al., 2006).

20 Se supone a menudo que las histonas están presentes a niveles similares en distintos tipos de células. La variante heterocromática de histonas macroH2A es inusual en varias características moleculares y celulares. En el nivel estructural, tiene una gran extensión C-terminal, el macrodominio, un módulo globular de aprox. 25 kDa, que en el caso de macroH2A1.1 une ADP-ribosa con alta especificidad (Kustatscher et al., 2005). Además, hay dos genes para macro-H2A, conservados en todos los vertebrados, y una segunda variante de corte y empalme para macroH2A1, conocida como macroH2A1.2, que no puede unirse a moléculas pequeñas.

25 MacroH2A ha sido implicado en un arresto de crecimiento permanente conocido como senescencia (Pehrson and Fried, 1992; Zhang et al 2005). Este fenómeno ha sido descrito para cultivos celulares primarios *in vitro* (Hayflick, 1965) y es una respuesta a estreses como el acortamiento de los telómeros, la acumulación de daño en el ADN y la sobreexpresión de ciertos oncogenes (Serrano et al., 1991). Además, es interesante observar que la senescencia inducida por oncogenes ha surgido como un potente mecanismo antitumoral *in vivo* (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005).

30 Holdenrieder et al. (en: Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Fertig G, Fürst H, Schalhorn A, Schmeller N, Untch M, Seidel D. Los nucleosomas en suero de pacientes con enfermedades benignas y malignas. Int J Cancer 2001 Mar 20; 95 (2): 114-20.) observaron nucleosomas y la cinética de la concentración de nucleosomas en muestras de suero de 20 pacientes sometidos a quimioterapia y de 16 pacientes sometidos a radioterapia. Los sueros de pacientes con tumores malignos contenían concentraciones considerablemente mayores de nucleosomas en comparación con los de personas sanas y pacientes con enfermedades benignas. Proponen que la concentración de nucleosomas en el suero podría ser una herramienta útil para controlar la respuesta bioquímica durante la terapia antitumoral, especialmente para la estimación temprana de la eficacia terapéutica.

40 Kurdistani (en: Kurdistani SK. Histone modifications as markers of cancer prognosis: a cellular view. Br J Cancer. 2007 Jul 2;97(1):1-5. Epub 2007 Jun 26.) describe que las alteraciones en las modificaciones de las histonas se han relacionado con la expresión desregulada de muchos genes con funciones importantes en el desarrollo y la progresión del cáncer. Los efectos de estas alteraciones hasta ahora se han interpretado desde un punto de vista específico del promotor, centrándose en las diferencias gen-gen en los patrones de modificaciones de histonas. Además, se sugiere que los tejidos cancerosos también muestran diferencias de célula-célula en la cantidad total de modificaciones específicas de histonas. Esta nueva heterogeneidad epigenética celular está relacionada con el resultado clínico de pacientes con cáncer y puede servir como un valioso marcador de pronóstico.

45 Barlési et al. (en: Barlési F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, Loundou A, Span SW, Lefesvre P, Kruyt FA, Rodríguez JA. Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2007 Oct 1;25(28):4358-64.) describe un estudio que examina si las modificaciones epigenéticas pueden contribuir al desarrollo y progresión del cáncer. Se examinaron los cambios epigenéticos que implican múltiples histonas para influir en el pronóstico de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Se examinaron la dimetilación de histona 3 lisina 4 (H3K4diMe), y acetilación de histona 2A lisina 5 (H2AK5Ac), histona 2B lisina 12, histona 3 lisina 9 (H3K9Ac), e histona 4 lisina 8 en muestras tumorales resecaadas de 138 pacientes con NSCLC. Los grupos determinados por pacientes en etapa I (debajo del primer ganglio) mostraron diferencias dramáticas en la supervivencia (mediana, 10 meses en pacientes con adenocarcinoma con H3K9Ac 68% v 147 meses en pacientes con nonadenocarcinoma con H3K4diMe 85%). Se dijo que los datos descritos proporcionan una justificación para el uso de una combinación de quimioterapia estándar con fármacos que interactúan con modificaciones de histonas, tales como inhibidores de la histona deacetilasa.

Deligezer et al. (en: Deligezer U, Akisik EE, Erten N, Dalay N. Sequence-specific histone methylation is detectable on circulating nucleosomes in plasma. Clin Chem. 2008 Jul;54(7):1125-31. Epub 2008 May 16. describe que las alteraciones en la metilación del ADN y las modificaciones de histonas han sido implicadas en la carcinogénesis e investigaron si la metilación de histonas, como modelo de modificaciones de histonas, es detectable en plasma. Por lo tanto, se analizó H3K9 monometilado (H3K9me1) en plasma mediante inmunoprecipitación de cromatina. Se requirió una validación adicional para demostrar alteraciones específicas del cáncer en las modificaciones de histonas en la circulación.

Finalmente, Seligson et al. (en: Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, Mah V, Yu H, Tze S, Wang Q, Chia D, Goodglick L, Kurdistani SK. Global Levels of Histone Modifications Predict Prognosis in Different Cancers. Am J Pathol. 2009 Apr 6.) describen que las células cancerosas muestran alteraciones en los patrones de modificación de histonas en genes individuales y globalmente a nivel de núcleos individuales en células individuales. Los niveles globales/celulares más bajos de dimetilación de histonas H3 lisina 4 (H3K4me2) y acetilación de H3K18 (ac) se describen para predecir un mayor riesgo de recurrencia del cáncer de próstata, y se demostró que los niveles celulares de ambos H3K4me2 y H3K18ac también predicen el resultado clínico en pacientes con cáncer tanto de pulmón como de riñón, con niveles más bajos que predicen probabilidades de supervivencia significativamente más bajas en ambos grupos de cáncer. También muestran que los niveles celulares más bajos de H3K9me2, una modificación asociada tanto con la actividad del gen como con la represión, también es un pronóstico de peor resultado para individuos con cánceres ya sea de próstata o riñón. El poder predictivo de estas modificaciones de histonas fue independiente del marcador de proliferación Ki-67. Los experimentos de inmunoprecipitación con cromatina indicaron que los niveles celulares más bajos de modificaciones de histonas en líneas celulares de cáncer más agresivas se correlacionaban con niveles más bajos de modificaciones en elementos repetitivos de ADN pero no con promotores genéticos en todo el genoma. Los resultados sugirieron que los niveles globales más bajos de modificaciones de histonas son predictivos de un fenotipo de cáncer más agresivo, revelando una coincidencia sorprendente en los patrones epigenéticos de pronóstico de adenocarcinomas de diferentes orígenes de tejido. CHANGOLKAR LAKSHMI N ET AL ("Developmental changes in histone macroH2A1-mediated gene regulation", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, (200704), vol. 27, no. 7, ISSN 0270-7306, páginas 2758 - 2764) y PEHRSON JOHN R ET AL ("Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes", JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, (1997), vol. 65, no. 1, ISSN 0730-2312, páginas 107 - 113) describen anticuerpos específicos para las variantes macroH2A1.1, 1.2 y 2.

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer. A pesar del diagnóstico óptimo y el tratamiento precoz, muchos pacientes mueren por una enfermedad recurrente. No existen biomarcadores suficientemente útiles para predecir el riesgo de recurrencia tumoral en el cáncer, en particular los cánceres sólidos, tales como el cáncer de pulmón. Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo ensayo de diagnóstico para dicho cáncer recurrente, junto con herramientas adecuadas para realizar dicho ensayo. Otros objetos y ventajas serán evidentes para el experto en el arte al leer la siguiente descripción más detallada de la presente invención.

En un primer aspecto preferido de la presente invención, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de diagnóstico del riesgo de recurrencia del cáncer en un paciente mamífero, que comprende detectar la expresión de macroH2A1.1 y/o macroH2A2 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que una expresión baja o reducida de dicha macroH2A1.1 y/o macroH2A2 es indicativa de un aumento del riesgo de recurrencia del cáncer de pulmón en dicho paciente. Preferiblemente, el procedimiento según la presente invención comprende además una predicción de dicha recurrencia del cáncer en base a dicho diagnóstico, prefiriendo además una recurrencia metastásica.

En un segundo aspecto preferido de la presente invención, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de diagnóstico del riesgo de recurrencia del cáncer en un paciente mamífero como anteriormente, que además comprende un diagnóstico de células senescentes, en particular de células cancerosas, en el tumor basado en la expresión de macroH2A1.1.

La presente invención se basa generalmente en el descubrimiento de que la expresión de macroH2A1.1 y macroH2A2 de la histona predice la recurrencia del cáncer de pulmón, identificando estas variantes de histona como una nueva herramienta para una estratificación de riesgo mejorada de pacientes con cáncer. Las isoformas MacroH2A se regulan positivamente y se expresan altamente en células que experimentan senescencia, un mecanismo antitumoral conocido, que sugiere macro-H2A1.1 como un biomarcador útil para células senescentes en tumores. MacroH2A1.1 es más altamente expresado en tumores con mejor pronóstico.

Además, se encontró en el contexto de la presente invención que la correlación pronóstica de la expresión de macroH2A1.1 es superior al marcador de proliferación Ki-67, que se usa comúnmente para estimar el pronóstico del paciente con cáncer. Los inventores observan una fuerte correlación negativa entre la expresión de macroH2A1.1 y macroH2A2 y la tasa de proliferación tumoral. Los tumores que proliferan lentamente tienden a mostrar una alta expresión de macroH2A1.1 y macroH2A2, mientras que los tumores con un alto índice proliferativo, que a menudo son clínicamente más agresivos, tienen una expresión más baja o reducida o incluso nula.

De este modo, en un primer aspecto de la misma, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de diagnóstico del riesgo de recurrencia del cáncer en un paciente mamífero, que comprende detectar la expresión de

5 macroH2A1.1 y/o macroH2A2 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que una expresión baja o reducida de dicha macroH2A1.1 y/o macroH2A2 es indicativa de un aumento del riesgo de recurrencia del cáncer de pulmón en dicho paciente. Preferiblemente, el (los) resultado (s) del análisis de expresión se pueden mostrar en un dispositivo apropiado. En el contexto de la presente invención, una expresión "baja" o "reducida" de macroH2A1.1 y/o macroH2A2 significa que, en comparación con una muestra del mismo paciente antes de la recaída o un paciente diferente que no sufre un riesgo para la recaída, o un paciente sano o grupo de pacientes, la expresión de macroH2A1.1 y/o macroH2A2 se reduce. Otra estrategia para determinar una expresión baja o reducida es la falta de tinción en portaobjetos histológicos usando, preferiblemente, un anticuerpo específico de macroH2A1.1 y/o macroH2A2, como se describe más adelante. Otra estrategia más es comparar la expresión de macroH2A1.1 y/o macroH2A2 con la expresión de macroH2A1.2 en la (s) muestra (s), y en una realización preferida del procedimiento según la presente invención, la expresión se normaliza para la expresión de macroH2A1.2 en dicha muestra y/o una muestra de control. De nuevo, la muestra de control puede ser una muestra del mismo paciente antes de la recaída o un paciente diferente que no sufre un riesgo de recaída, o un paciente o grupo de pacientes sanos.

15 En una realización preferida de la misma, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de diagnóstico del riesgo de recurrencia del cáncer en un paciente mamífero, que comprende detectar la expresión de macroH2A1.1 y/o macroH2A2 en una muestra biológica obtenida de dicha paciente, y comparar dicha expresión de macroH2A1.1 y/o macroH2A2 con una muestra de control, en el que una expresión baja o reducida de dicha macroH2A1.1 y/o macroH2A2 es indicativa de un aumento del riesgo de recurrencia del cáncer de pulmón en dicho paciente. Preferiblemente, el (los) resultado (s) del análisis de expresión y/o comparación se pueden mostrar o poner en un dispositivo apropiado, tal como un ordenador de diagnóstico.

20 En una realización preferida adicional del procedimiento según la presente invención, la correlación entre la expresión de macroH2A1.1 o macroH2A2 y la supervivencia libre de enfermedad tiene una significación de $P < 0,05$, preferiblemente $P < 0,01$, y más preferiblemente $P < 0,006$.

25 Una realización preferida adicional del procedimiento según la presente invención, comprende además detectar la expresión de marcadores de cáncer adicionales, tales como Ki-67. Preferiblemente, la expresión de dicha macroH2A1.1 y/o macroH2A2 en dicha muestra biológica se correlaciona inversamente con la expresión de Ki-67.

30 Otro aspecto preferido más del procedimiento según la presente invención comprende además la etapa de una predicción de dicha recurrencia del cáncer en base a dicho diagnóstico según la presente invención. "Recurrencia", como se usa en este documento, se refiere a una manifestación clínica de los parámetros de los cánceres después de un tiempo de supervivencia libre de enfermedad del paciente, tal como, preferiblemente, la aparición de tejido tumoral y metástasis. La predicción (o probabilidad) también puede incluir parámetros adicionales, tales como, por ejemplo, parámetros clínicos del paciente o grupo de pacientes, el tipo de tumor, etc. El resultado de la predicción puede mostrarse preferiblemente en un dispositivo apropiado.

35 El procedimiento según la presente invención se puede usar para diagnosticar cualquier tipo de cáncer sólido. De este modo, se prefiere un procedimiento según la presente invención, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo de cáncer sólido, cáncer de pulmón, cáncer de mama., cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer de esófago y cáncer de cerebro. Más preferido es el procedimiento para el diagnóstico de cáncer de mama o cáncer de pulmón.

40 Se puede usar cualquier muestra biológica para el procedimiento según la presente invención, siempre que permita una detección directa o indirecta de la expresión de los marcadores según la invención. De este modo, la muestra biológica se puede seleccionar del grupo de células de un tumor de pulmón, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de hígado, tumor de cabeza y cuello, tumor de próstata, tumor de páncreas, tumor de estómago, tumor de colon, tumor de tiroides, tumor de esófago, y tumor de cerebro, sangre total, suero, plasma, orina, líquido linfático, licor de cerebro, muestras de tejido y muestras de tejido preparadas, tales como portaobjetos histológicos. Se prefiere un procedimiento según la invención, en el que dicha muestra se toma del paciente durante la cirugía o es una muestra de suero.

50 El hallazgo de que macroH2A1.1 está enriquecido en adenomas de pulmón de roedor conocidos por tener un alto número de células senescentes, pero está regulado negativamente o ausente en carcinomas de pulmón que han superado la senescencia y muestran proliferación descontrolada, también es consistente con estas conclusiones, subrayando la idea de la senescencia como un mecanismo antitumoral. De este modo, en este aspecto preferido del procedimiento según la presente invención, la expresión se puede usar para controlar en general la cantidad o proporción de células senescentes, en particular de células cancerosas, en el tumor basándose en la expresión del marcador macroH2A1.1. La cantidad o proporción de células senescentes es un indicador del crecimiento de las células tumorales se usa para controlar el éxito o el efecto de una terapia antitumoral, tal como la quimioterapia o la irradiación, o para ver si aumenta el número de células cancerosas, como una indicación para una recaída del paciente. También se pueden medir otros marcadores de senescencia, y los procedimientos para medir o detectar dichos marcadores son conocidos para el experto y se describen en este documento para los marcadores macroH2A1.1 y/o macroH2A2.

En el contexto de los procedimientos según la presente invención, se puede usar cualquier procedimiento conocido por la persona experta que permita medir la expresión de un marcador. La elección del procedimiento dependerá de si la expresión se mide a nivel de ácido nucleico y/o proteína, y en la muestra que se va a analizar. Se prefiere un procedimiento según la presente invención, en el que dicha detección de la expresión comprende la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esto es, amplificación de ácidos nucleicos, en particular rtPCR, o tinción inmunohistoquímica (esto es, en el nivel de proteínas), en particular usando un anticuerpo específico de macroH2A1.1 específico de macroH2A2, como se describe en este documento, y/o análisis de ARNm.

Se supone a menudo que las histonas están presentes a niveles similares en tipos de células distintas. La variante heterocromática de histonas macroH2A es inusual en varias características moleculares y celulares. En el nivel estructural, tiene una gran extensión C-terminal, el macrodominio, un módulo globular de aprox. 25 kDa, que en el caso de macroH2A1.1 une ADP-ribosa con alta especificidad (Kustatscher et al., 2005). Además, hay dos genes para macro-H2A, conservados en todos los vertebrados, y una segunda variante de corte y empalme para macroH2A1, conocida como macroH2A1.2, que no puede unirse a moléculas pequeñas. En este documento, los inventores han desarrollado anticuerpos policlonales y monoclonales contra todas las isoformas macroH2A (macroH2A1.1, macroH2A1.2 y macroH2A2) y han usado estos anticuerpos para estudiar la localización celular y la abundancia de histonas de macroH2A en células cultivadas e in vivo. Los inventores han descubierto que macroH2A está regulada positivamente en fibroblastos primarios que han experimentado senescencia replicativa. Además, existe una fuerte correlación negativa entre la expresión de macroH2A1.1 y Ki-67 en el cáncer humano. Los tumores que experimentan una división celular rápida (marcada por la alta expresión del marcador de proliferación Ki-67) expresan niveles bajos de macroH2A1.1, mientras que los tumores con un índice mitótico bajo están enriquecidos por la histona. Ambos hallazgos argumentan que macroH2A1.1 se correlaciona con el grado de diferenciación de las células y marca las células que han salido del ciclo celular.

El hallazgo de que macroH2A1.1 está enriquecido en adenomas de pulmón de roedor conocidos por tener un alto número de células senescentes, pero está regulado negativamente o ausente en los carcinomas de pulmón que han superado la senescencia y presentan proliferación descontrolada, también es consistente con estas conclusiones, subrayando la idea de la senescencia como un mecanismo antitumoral. Significativamente, los inventores encuentran que los niveles de macroH2A1.1 son un buen predictor del riesgo de recurrencia tumoral en el cáncer de pulmón. En el número definido de pacientes que los inventores pudieron analizar, resultó ser estadísticamente superior a la correlación con el marcador de proliferación común, Ki-67 ($P = 0,0058$ para macroH2A1.1 y $P = 0,07983$ para Ki-67).

La información del paciente actualmente disponible para el conjunto de tejidos de cáncer de mama es insuficiente para evaluar las correlaciones entre los niveles de macroH2A1.1 y el resultado clínico. Sobre la base de los datos de los tumores de pulmón, macroH2A1.1 parece ser un biomarcador de pronóstico útil también en el cáncer de mama. Pruebas adicionales revelarán su utilidad en otros cánceres.

Los mecanismos que sustentan la regulación positiva del producto del gen macroH2A1.1 durante la senescencia celular y su papel en la carcinogénesis aún no se han dilucidado. La evidencia preliminar sugiere que los niveles de ARNm no se alteran durante la senescencia, lo que sugiere que los procesos postranscripcionales pueden explicar la regulación positiva de macroH2A1.1.

La observación estadísticamente compatible de la expresión de macroH2A1.1 con la supervivencia libre de enfermedad abre la posibilidad de una estratificación mejorada del riesgo de recurrencia en cáncer y particularmente pacientes con cáncer de pulmón y se debe repetir con una mayor población de pacientes. Los estudios futuros proporcionarán aún más información sobre si la regulación positiva de macroH2A1.1 es una característica general de las células senescentes en tumores humanos y si la alta tinción de macroH2A1.1 generalmente refleja el grado de diferenciación celular en las células tumorales. La nueva herramienta de la invención mejorará la identificación de cáncer de alto riesgo y particularmente pacientes con cáncer de mama o pulmón, permitiendo de este modo una mejor selección de estrategias terapéuticas en cánceres de difícil pronóstico.

La invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras adjuntas, sin embargo, sin limitarse a ellas. En las figuras,

La figura 1 muestra que una expresión de isoformas de macroH2A se correlaciona con la proliferación. (a) El índice de proliferación y los niveles de variantes de histonas en un conjunto de 260 muestras de cáncer de mama se determinan mediante inmunohistoquímica con anticuerpos contra el marcador de proliferación Ki-67, macroH1A1.1, macroH2A1.2 y macroH2A2. Ki-67 se calificó como el porcentaje de células tumorales teñidas positivamente para todas las células tumorales dentro de un núcleo. Los niveles de expresión de macroH2A1.1 se determinaron de forma semicuantitativa (puntuación: 0-1, tinción negativa/débil, 1-2, tinción moderada, 2-3, positividad nuclear fuerte). (b) Diagramas de caja que muestran la expresión decreciente de macroH2A1.1 con índice de proliferación creciente ($P < 0,001$). (c) Se observa la misma correlación lejos macroH2A2. MacroH2A1.2 se expresa ubicuamente a un alto nivel en estas muestras.

La figura 2 muestra que la expresión de macroH2A1.1 predice cáncer, y preferiblemente cáncer de pulmón, recurrencia. (a) Los índices de proliferación de los tumores de pulmón se determinan mediante

inmunohistoquímica con anticuerpos contra Ki-67. (b) Los niveles de expresión de macroH2A1.1 disminuyen al aumentar los índices de proliferación ($P < 0,001$). (c) Los niveles de expresión muestran una correlación significativa con la supervivencia libre de enfermedad en muestras de tumores de pulmón ($p = 0,0058$).

5 La figura 3 muestra que las isoformas de macroH2A están reguladas positivamente durante la senescencia. (a) Expresión de isoformas de macroH2A1 en los pulmones de ratones knock-in K-Ras +/LSLC12Vgeo. La detección inmunohistoquímica de los niveles de macroH2A1.1 (panel superior) y macroH2A1.2 (panel inferior) se analizó en secciones consecutivas de tejido pulmonar embebido en parafina que contenía tanto adenomas de bajo grado (L) como adenocarcinomas de alto grado (H). La expresión de macroH2A1.1 está enriquecida durante la senescencia en adenomas de bajo grado (b) Inmuntinción de fibroblastos primarios W138 proliferantes (núcleos pequeños) y senescentes (núcleos agrandados). MacroH2A1.1 y macroH2A1.2 se localizan en focos heterocromáticos asociados a la senescencia (SAHF) y se expresan en niveles superiores en células senescentes. Por el contrario, la histona canónica H2A no cambia por la senescencia. (e) Transferencia de Western de la regulación positiva de macroH2A1 durante la senescencia de las células ITM son fibroblastos primarios diseñados para experimentar senescencia simultánea inducida por oncogenes con la adición del análogo de tamoxifeno 4OHT (Collado et al., 2005). Los inventores observan consistentemente niveles elevados de macroH2A1 en células senescentes. Los niveles de proteína de las histonas canónicas H2A y H3 se reducen ligeramente en las células senescentes.

20 La figura 4 muestra una transferencia de Western que muestra la especificidad de los anticuerpos purificados por afinidad para las tres isoformas de macroH2A. Las isoformas de macroH2A marcadas con HA se expresaron en células HEK293 y los extractos de células completas se cargaron para el análisis de transferencia de Western.

25 La figura 5 muestra la expresión de isoformas de macroH2A en un conjunto de 260 muestras de cáncer de mama. (a) El índice de proliferación y los niveles de variantes de histonas se determinan por inmunohistoquímica con anticuerpos contra Ki-67, macroH2A1.1, macroH2A1.2, macroH2A2. (b) Diagramas de caja que muestran que el nivel de expresión de macroH2A1.1 disminuye al aumentar el índice de proliferación ($P < 0,001$). (c) Se observa la misma correlación para la isoforma macroH2A2. Tener en cuenta que macroH2A1.2 se expresa ubicuamente en un nivel alto en estas muestras.

30 La figura 6 muestra los niveles de expresión de mH2A2 en cáncer de pulmón. (a) El índice de proliferación y los niveles de expresión de las variantes de histona se determinan mediante detección inmunohistoquímica de Ki-67 y macroH2A2. (b) Los niveles de expresión de macroH2A2 disminuyen al aumentar la proliferación ($P < 0,001$). (c) Los niveles de expresión de macroH2A2 se correlacionan con la recurrencia tumoral ($p = 0,04146$).

35 La figura 7 muestra que macroH2A1.2 se expresa a niveles elevados en la mayoría de los tumores pulmonares. El índice de proliferación, la expresión de variantes de histonas y las histonas centrales se determinan mediante la detección inmunohistoquímica de Ki-67, macroH2A1.2 y H3. No existe una correlación entre mH2A1.2 y la expresión de Ki-67, la histona H3 se expresa fuertemente en todas las células.

40 La SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 8 muestran las secuencias de oligonucleótidos usadas en los ejemplos, a continuación.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Extracción de histonas y ARNm, transferencia de Western y PCR en tiempo real

45 La generación de células ITM que expresan la proteína de fusión MEK1-ER conmutable se describió anteriormente. Después de la incubación con o sin 4OHT, las células se recogieron y se tomaron alícuotas. Una alícuota celular se resuspendió en HCl 0,4 M, se incubó durante 4 h para extraer las proteínas de histona, se centrifugó y se dializó en agua. El ARN se extrajo usando el kit RNeasy Mini Prep (Qi-agen). Las proteínas se precipitaron con acetona a partir del flujo de las columnas RNAeasy spin. Los extractos de proteína se normalizaron mediante el ensayo de Bradford antes de la carga. Las transferencias de Western se llevaron a cabo usando anticuerpos de macroH2A
50 específicos de isoforma, así como anticuerpos comerciales contra H2A (Abcam, ab15653; 1:3000) y H3 (Abcam; ab1791; 1:30000). La síntesis de ADNc de la primera cadena se llevó a cabo usando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). Los ADNc se analizaron posteriormente mediante PCR en tiempo real (Applied Biosystems) usando los siguientes oligos:

mH2A1.1 AAGTTGTACAGGCTGACATTGC (SEQ ID No. 1);

55 GTTCTTTTTCCGGAGTTCCA (SEQ ID No. 2),

mH2A1.2 CTTTGAGGTGGAGGCCATAA (SEQ ID No. 3);
 CACAAACTCCTTGCCACCTT (SEQ ID No. 4),
 mH2A2 GGACGTCCAAAAAGTCCAAA (SEQ ID No. 5);
 GCTTCTGTCCAGAACAAGG (SEQ ID No. 6),
 5 y GAPDH TGGGTGTGAACCATGAGAAGTA (SEQ ID No. 7);
 CCTTCCACGATACCAAAGTTGT (SEQ ID No. 8).

Las muestras se normalizaron a GAPDH, que los inventores identificaron previamente como control fiable para estos experimentos en ensayos de prueba.

Generación de anticuerpos

10 MacroH2A1.1 (aminoácidos 198-226) y macroH2A1.2 (aa 198-228) se expresaron y purificaron como proteínas de fusión-GST. El macrodominio de macroH2A2 (aa 162 - 372) se purificó como una proteína de fusión con etiqueta (His)₆. Los antígenos se inyectaron en conejos (Eurogentec). Los anticuerpos se recuperaron del suero de conejo usando columnas HiTrap Protein-G HP (GE Healthcare Life Sciences) según las instrucciones del fabricante. Los macrodominios etiquetados con (His)₆ recombinantes de las tres isoformas macroH2A se acoplaron a HP activada por HiTrap NHS (GE Healthcare). Estas columnas se usaron posteriormente para la purificación por afinidad de anticuerpos específicos de isoformas.

Micromatrices de tejido de cáncer de mama

15 Las TMA de cáncer de mama fueron proporcionadas por the National Center of Tumor Diseases (NCT), Heidelberg, Alemania. Contenían muestras incrustadas en parafina y fijadas en formalina de 260 pacientes, con dos muestras por paciente en cada portaobjetos, distribuidas en diferentes bloques. Todos los pacientes con cáncer de mama eran mujeres, con una edad media de 58 años (intervalo: 30-88 años). Los datos clínicos asociados con estos pacientes fueron insuficientes para un análisis posterior.

Pacientes con cáncer de pulmón y micromatrices de tejido pulmonar

25 Las TMA de cáncer de pulmón fueron proporcionadas por Thoraxklinik Heidelberg, Alemania, y el NCT. Los portaobjetos contenían muestras de 41 pacientes con NSCLC que se encontraron para ser reseccable y se sometieron a cirugía entre marzo y diciembre de 2004 (23 con adenoma y 18 con carcinoma de células escamosas).

30 Las muestras de estos pacientes, recogidas durante la cirugía se fijaron con formalina y se incrustaron en parafina y se usaron para construir una TMA, que también incluía muestras de control. Por razones de calidad, las muestras de dos pacientes no se pudieron analizar, de modo que se incluyeron 39 muestras de pacientes en el análisis. Véase la tabla 1 para conocer las características clínicas de la población de estudio. La recopilación y el uso de los materiales humanos fue aprobado por el comité de ética local (voto ético # 270/2001, actualizado en 2005). Los pacientes dieron su consentimiento informado.

Tabla 1: Características de la población de estudio de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Característica	Mediana (Rango)/Frecuencia
Sexo (hombre/mujer)	31/8
Edad en el momento del diagnóstico (años)	64 (43-80)
Estado de rendimiento ECOG (0/1/2)	28/11/0
Tipo de célula tumoral (AC/SCC)	22/17
Tipo de operación (LO-BI-PN)	26/2/11
Estado de resección (R0/R1/R2)	32/5/2
Etapas de la enfermedad (postoperatorio) (Ia/Ib/IIa/IIb/IIIa/IIIb/IV)	1/11/0/4/13/6/4
Recurrencia tumoral dentro de un año (año/n)	18/21
AC = adenocarcinoma; SCC = carcinoma de células escamosas; BI = bilobectomía; LO = lobectomía; PN = neumonectomía	

De los pacientes resecados con R2, 1 fue recurrente (metástasis a distancia), 1 vivió sin recurrencia; de los pacientes resecados con R1, 3 fueron recurrentes (2 recurrencia local, 1 metástasis a distancia), 2 vivieron sin recurrencia; de los pacientes resecados con R0 15 fueron recurrentes, 17 vivieron sin recurrencia.

Inmunohistoquímica

5 La tinción inmunohistoquímica para macroH2A1.1, macroH2A1.2, macroH2A2, Ki-67 (Dako-Cytomation, Ki-67 de ratón monoclonal anti-humano, clon MIB-1, 1: 100) e histona H3 (Abcam; ab1791; dilución 1:1000) se realizó usando portaobjetos de TMA sucesivos. Los portaobjetos se escanearon en el Departamento de Patología (Universidad de Heidelberg) usando el sistema Aperio Scanscope y el software ImageScope.

10 Los niveles de expresión de macroH2A se evaluaron semicuantitativamente usando la puntuación: 0-1, tinción negativa/débil; 1-2, tinción moderada; 2-3, positividad nuclear fuerte. Los índices de proliferación se determinaron con anticuerpos contra el marcador de proliferación Ki-67 y se calificaron como el porcentaje de comparación de tumores teñidos positivamente con todas las células tumorales dentro de un núcleo. Todas las diapositivas fueron evaluadas y anotadas a ciegas, y se repitieron dos veces.

15 Para el análisis de las isoformas de macroH2A en tumores de ratón, se disecaron los pulmones de ratones K-Ras P/G12Vgeo activados de 7-9 meses (Guerra et al., 2003), se fijaron en formalina regulada al 10% (Sigma) y se incrustaron en parafina. Se tiñeron secciones consecutivas de 3 a 5 mm de espesor con hematoxilina y eosina, y se procesaron para tinción inmunohistoquímica usando anticuerpos macroH2A1.1 y macroH2A1.2 (dilución 1:75). La clasificación de las lesiones pulmonares se realizó según los últimos criterios morfológicos aceptados para el cáncer de pulmón de ratón (Jackson et al., 2005) por un patólogo experto. Los neoplasmas de grado 1-3 se clasificaron como adenomas (lesiones benignas) y grado 4-5 como adenocarcinomas (lesiones malignas).

Análisis estadístico

La relación entre Ki-67 y mH2A1.1 se evaluó usando una prueba de asociación lineal condicional estratificada por matriz (Hothorn et al., 2006). La dependencia de la supervivencia libre de enfermedad se estableció mediante una prueba de rango logarítmico condicional, también estratificada por matriz (Hothorn et al., 2006).

25 Existen tres productos génicos para los dos genes macroH2A humanos, que contienen todos un pliegue N-terminal de H2A y un macrodominio C-terminal. MacroH2A1.1 y macroH2A1.2 se producen por empalme alternativo del producto del gen H2AFY, mientras que macroH2A2 está codificado por un segundo gen, H2AFY2. In vitro, el macrodominio de macroH2A1.1, pero no las otras isoformas, se une a la ADP-ribosa y a los metabolitos de NAD relacionados (Kustatscher et al., 2005). Los inventores generaron anticuerpos específicos para detectar y distinguir las diferentes isoformas de macroH2A (Figura 4).

35 Se ha sugerido que la expresión de macroH2A1.1 puede estar restringida a tejidos diferenciados no proliferativos (Pehrson et al., 1997). Con el fin de analizar cualquier correlación entre la expresión de la proteína macroH2A1.1 y la proliferación celular; los inventores realizaron tinciones inmunohistoquímicas en micromatrices de tejido (TMA) que contenían muestras de cáncer de mama de 260 pacientes (Figura 1). Los inventores evaluaron los niveles de expresión de macroH2A y el marcador de proliferación Ki-67 en todas las células tumorales dentro de un núcleo. La tinción con histona H3 sirvió como control positivo y mostró una fuerte tinción nuclear en cada célula dentro de los núcleos (Figura 5). Los inventores evaluaron la relación entre Ki-67 y la expresión de macroH2A1.1 usando una prueba de asociación lineal condicional estratificada por matriz. Los inventores encuentran que la expresión de macroH2A1.1 está altamente correlacionada con los niveles de Ki-67 ($P < 0,001$), mostrando una disminución en macroH2A1.1 con el aumento de células cancerosas positivas para Ki-67. Se observa una relación similar para mH2A2 ($P < 0,001$), mientras que macroH2A1.2 se expresa ubicuamente en estos tumores (Figura 1). Esto último podría deberse en parte a una mayor afinidad del anticuerpo contra macroH2A1.2, lo que podría dificultar la comparación de los cambios sutiles en los niveles de expresión. Sin embargo, hay claramente tejidos en los que los inventores pueden ver y discriminar niveles de expresión altamente variables para macroH2A1.2 (tales como el músculo esquelético).

Estos ensayos establecen que la expresión de la variante de empalme macroH2A1.1 está limitada a tumores que muestran índices de proliferación más bajos.

50 Para probar cómo la proliferación celular y los niveles de macroH2A1.1 se correlacionan en un conjunto de tumores humanos con parámetros clínicos completos, los inventores obtuvieron muestras de 39 pacientes con NSCLC, que se encontraron resecables y se sometieron a cirugía (22 adenocarcinomas y 17 carcinomas de células escamosas; tabla 1). Dentro de 1 año después de la cirugía, los tumores recurrieron en 18 pacientes, mientras que 21 pacientes permanecieron sin recurrencia. Similar a lo que los inventores observan en cáncer de mama y otras matrices de cáncer, el análisis estadístico del conjunto de tumores de pulmón revela que la expresión de macroH2A1.1 está fuertemente correlacionada con los niveles de Ki-67 ($P < 0,001$) y disminuye con el aumento de células cancerosas positivas de Ki-67 (Figuras 2a y b). Esto corrobora la evidencia de que macroH2A1.1 es un marcador para las células que han salido del ciclo celular.

Para probar más esta noción, los inventores analizaron secciones inmunohistoquímicas de un modelo de ratón de senescencia tumoral inducida por K-RasG12V (Guerra et al., 2003). Las tinciones revelan una mayor expresión de macroH2A1.1 en las lesiones de adenoma premalignas, en las que la marca distintiva es la abundancia de células senescentes (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005), en comparación con las correspondientes adenocarcinomas malignos (Figura 3a). Por el contrario, la variante de corte y empalme macroH2A1.2 se expresa a niveles similares en adenomas y adenocarcinomas. Este patrón de expresión define macroH2A1.1 como un marcador de senescencia inducido por oncogenes.

Para identificar si existe una dependencia de la supervivencia libre de enfermedad (recurrencia) con la expresión de macroH2A1.1, los inventores llevaron a cabo una prueba de rango logarítmico condicional, estratificada mediante matriz (Hothorn et al., 2006).

Interesantemente, revela una correlación significativa entre la expresión de macroH2A1.1 y la supervivencia libre de enfermedad ($P = 0,0058$). Los pacientes con niveles bajos de macroH2A1.1 en muestras de tumores pulmonares muy probablemente son recurrentes que aquellos con una fuerte tinción de macroH2A1.1 nuclear (Figura 2c). También se observó una correlación similar, pero más débil, para la expresión de macroH2A2 ($P = 0,04146$; Figura 6). A diferencia de; macroH2A1.2, que se expresa de manera ubicua (Figura 7), no muestra una correlación pronóstica con la recurrencia del tumor. Se observa que la expresión del marcador de proliferación común Ki-67 no muestra una correlación significativa con la supervivencia libre de enfermedad ($P = 0,07983$). De este modo, la inmunotinción y los datos clínicos de los inventores identifican la macroH2A1.1 de la histona como un biomarcador nuevo, superior y potencialmente útil de recurrencia del cáncer de pulmón.

Para caracterizar adicionalmente la histona heterocromática macroH2A durante la senescencia, los inventores realizaron tinciones inmunofluorescentes de fibroblastos primarios y observaron que las isoformas macroH2A1 se regulan positivamente durante la senescencia replicativa. MacroH2A1.1 se expresa en niveles más altos en células presenescentes y senescentes, así como en la localización de focos heterocromáticos asociados a la senescencia (SAHF) en células senescentes (Figura 3b). De manera similar, macroH2A1.2 también está regulado positivamente, a diferencia de las proteínas de control, tal como la histona canónica H2A. Además, el enriquecimiento de macroH2A en SAHF no es una mera consecuencia de la naturaleza condensada de la cromatina SAHF, ya que el enriquecimiento de macroH2A celular y la incorporación de SAHF siguen una cinética más lenta que la formación de estructuras heterocromáticas enriquecidas con DAPI, confirmando informes anteriores (Zhang et al. 2005). Este hallazgo está respaldado por transferencias de Western en fibroblastos diploides normales humanos IMR90, que expresan hTERT y MEK: ER (células ITM, Collado et al., 2005). Este sistema permite la activación conmutable de MEK quinasa, un efector aguas abajo de la senescencia inducida por Ras. Los resultados muestran la regulación positiva de la proteína histona macroH2A1.1 y macroH2A1.2 en células senescentes (Figura 3c). Por el contrario, la histona H2A canónica parece estar ligeramente regulada negativamente en la inducción de la senescencia.

Literatura según ha sido citada

Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B et al. (2005). Oncogene induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436: 660-665.

Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436: 725-730.

Collado M, Gil J, Efeyan A; Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436: 642.

Collado M, Serrano M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 6: 472-476.

D'Amico TA. (2008). Molecular biologic staging of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 85: S737-S742.

Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M et al. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogenes is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4: 111-120.

Hayflick L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636.

Hothorn, T., Hornik, K., Van de Wiel, M.A. & Zeileis, A. A Lego system for conditional inference. *American Statistician* 60, 257-263 (2006).

Jackson EL, Olive KP, Tuveson DA, Bronson R, Crowley D, Brown M et al. (2005). The differential effects of mutant p53 alleles on advanced murine lung cancer. *Cancer Res* 65: 10280-10288.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. (2007). Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57: 4366.

Kustatscher G, Hothorn M, Pugieux C, Scheffiek K, Ladurner AG. (2005). Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat Struct Mol Biol* 12: 624-625.

Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM et al. (2005). BRAFE600 associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436: 720-744.

Narita M, Nuner S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA et al. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113: 703-716.

5 Pehrson JR, Costanzi C, Dharia C. (1997) Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *J Cell Biochem* 65: 107-113.

Pehrson JR, Fried VA. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257: 1398-1400.

10 Serrano M, Lin AW; McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593-602.

Zhang R; Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA; Chen W; Daganzo SM et al. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* 8: 19-30.

15 Zhu CQ, Shih W, Ling CH; Tsao MS. (2006). Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol* 59: 790-800.

Lista de secuencias

<110> Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL)

<110> Thoraxklinik-Heidelberg gGmbH

20 <120> Procedimiento de diagnóstico para predecir el riesgo de recurrencia del cáncer en base a las isoformas macroH2A de histona

<130> E31352PCT

<150> EP09008679.4

<151> 2009-07-02

<160> 8

25 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30 <400> 1

aagttgtaca ggctgacatt gc 22

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

35 <213> Homo sapiens

<400> 2

gttcttttc cggagtcca 20

<210> 3

<211> 20

40 <212> ADN

ES 2 681 687 T3

<213> Homo sapiens
<400> 3
ctttgaggtg gaggccataa 20
<210> 4

5 <211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 4
cacaaactcc ttgccacctt 20

10 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 5

15 ggacgtccaa aaagtccaaa 20
<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 6
gcttctgtcc cagaacaagg 20
<210> 7
<211> 22
<212> ADN

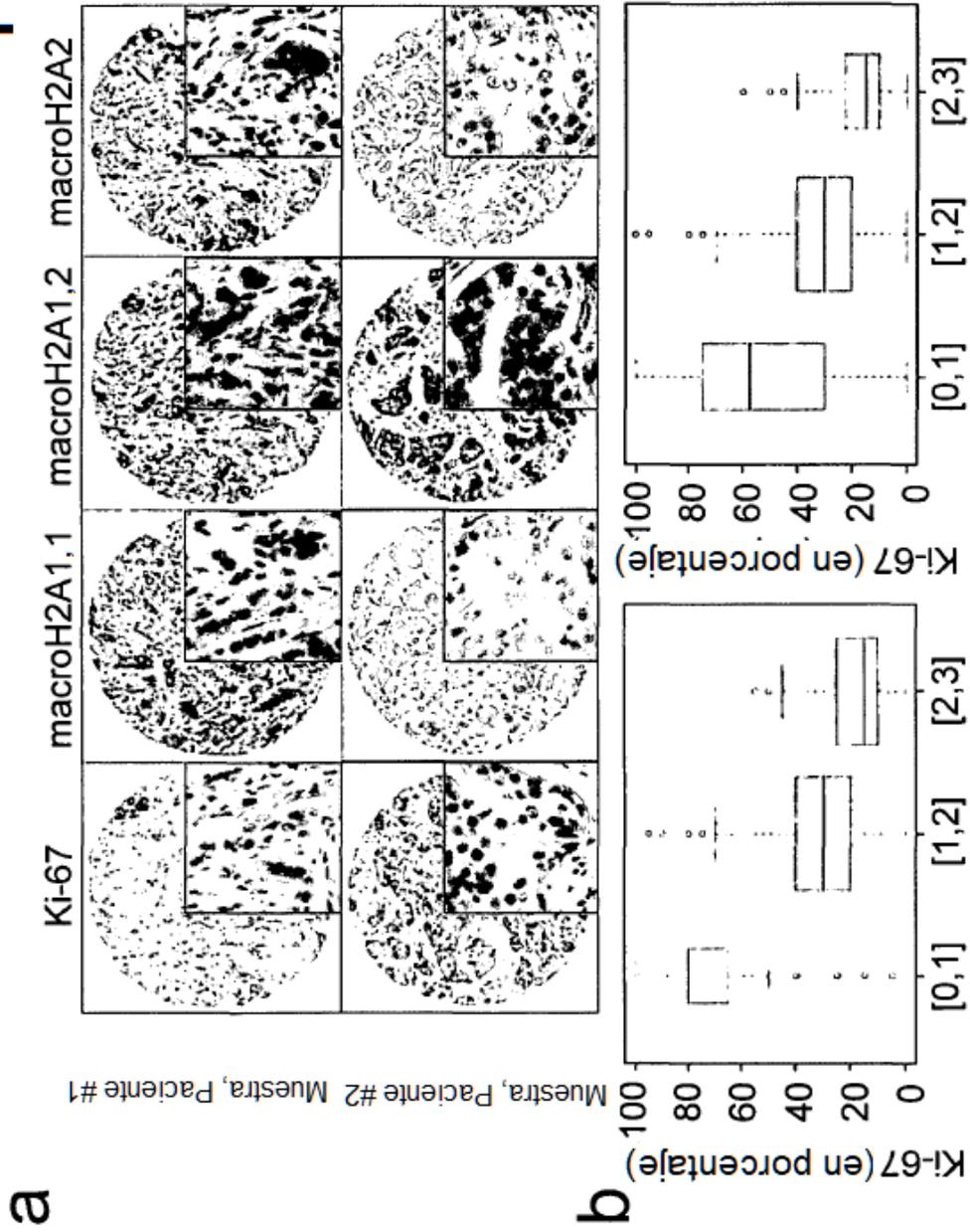
25 <213> Homo sapiens
<400> 7
tgggtgtgaa ccatgagaag ta 22
<210> 8
<211> 22

30 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 8
ccttccacga taccaaagtt gt 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento *in vitro* de diagnóstico del riesgo de recurrencia del cáncer en un paciente mamífero, que comprende detectar la expresión de macroH2A1.1 y/o macroH2A2 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que una expresión baja o reducida de dicha macroH2A1.1 y/o macroH2A2 es indicativa de un aumento del riesgo de recurrencia del cáncer en dicho paciente.
2. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1, en el que dicha expresión se normaliza para la expresión de macroH2A1.2 en dicha muestra y/o una muestra de control.
- 10 3. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que una correlación entre la expresión de macroH2A1.1 o macroH2A2 y la supervivencia libre de enfermedad es $P < 0,05$, preferiblemente $P < 0,01$, y más preferiblemente $P < 0,006$.
- 15 4. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo de cáncer sólido, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer de esófago y cáncer de cerebro.
- 20 5. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra biológica se selecciona del grupo de células de un tumor de pulmón, tumor de mama, tumor de riñón, tumor de hígado, tumor de cabeza y cuello, tumor de próstata, tumor de páncreas, tumor de estómago, tumor de colon, tumor de tiroides, tumor de esófago y tumor de cerebro, sangre total, suero, plasma, orina, líquido linfático, líquido pleural y licor cerebral.
6. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además detectar la expresión del marcador de cáncer adicional Ki-67.
7. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 6, en el que dicha expresión de dicha macroH2A1.1 y/o macroH2A2 en dicha muestra se correlaciona inversamente con la expresión de Ki-67.
8. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un diagnóstico de células senescentes, en particular de células cancerosas, en el tumor basado en la expresión de macroH2A1.1.
- 25 9. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una predicción de dicha recurrencia del cáncer en base a dicho diagnóstico.
10. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha muestra se toma del paciente durante la cirugía.
- 30 11. El procedimiento *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha detección de la expresión comprende PCR, en rtPCR particular, tinción inmunohistoquímica, en particular usando un anticuerpo específico de macroH2A1.1 o específico de macroH2A2, y/o análisis de ARNm.

Figura 1



mH2A1.1 (nivel de expresión de las proteínas) H2A2(nivel de expresión de las proteínas)

Figura 2

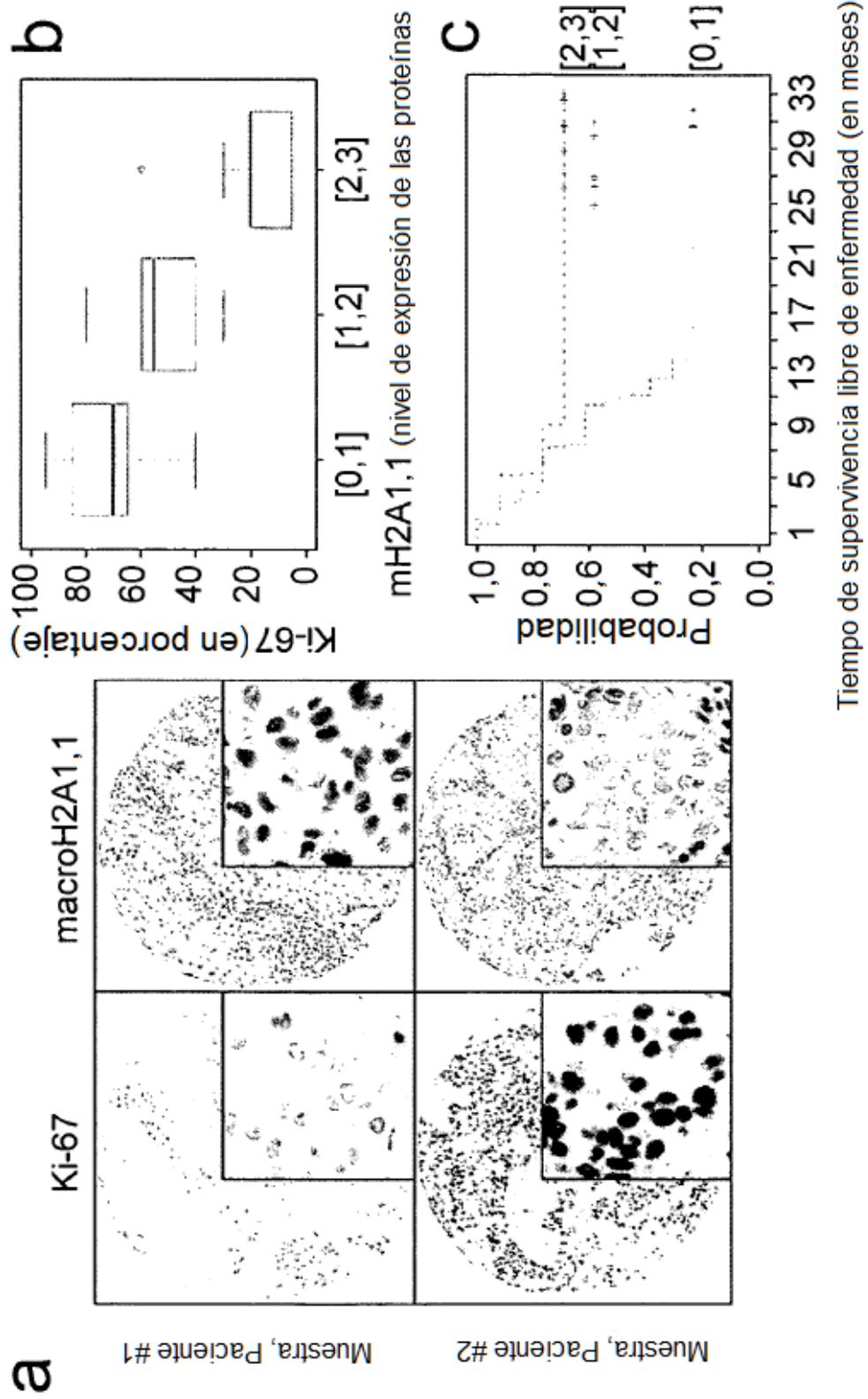


Figura 3

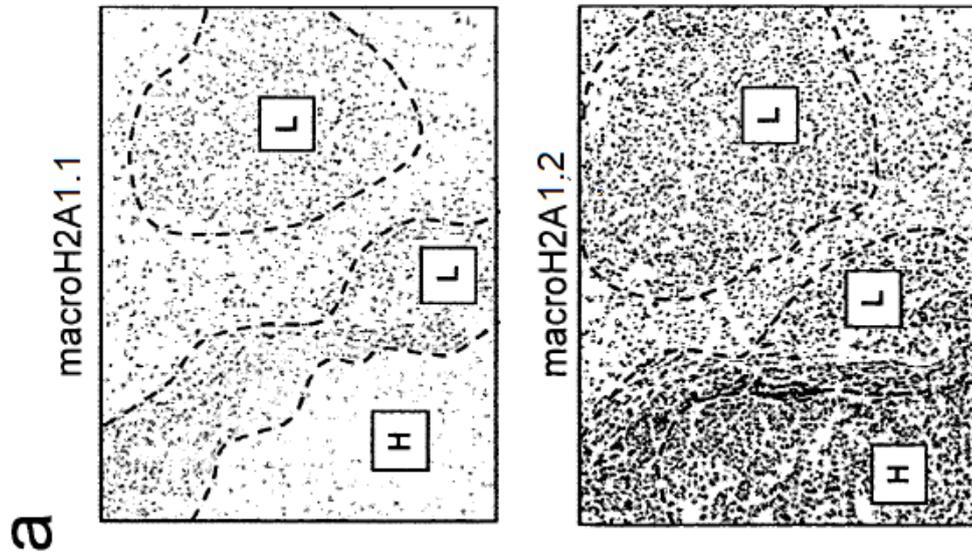
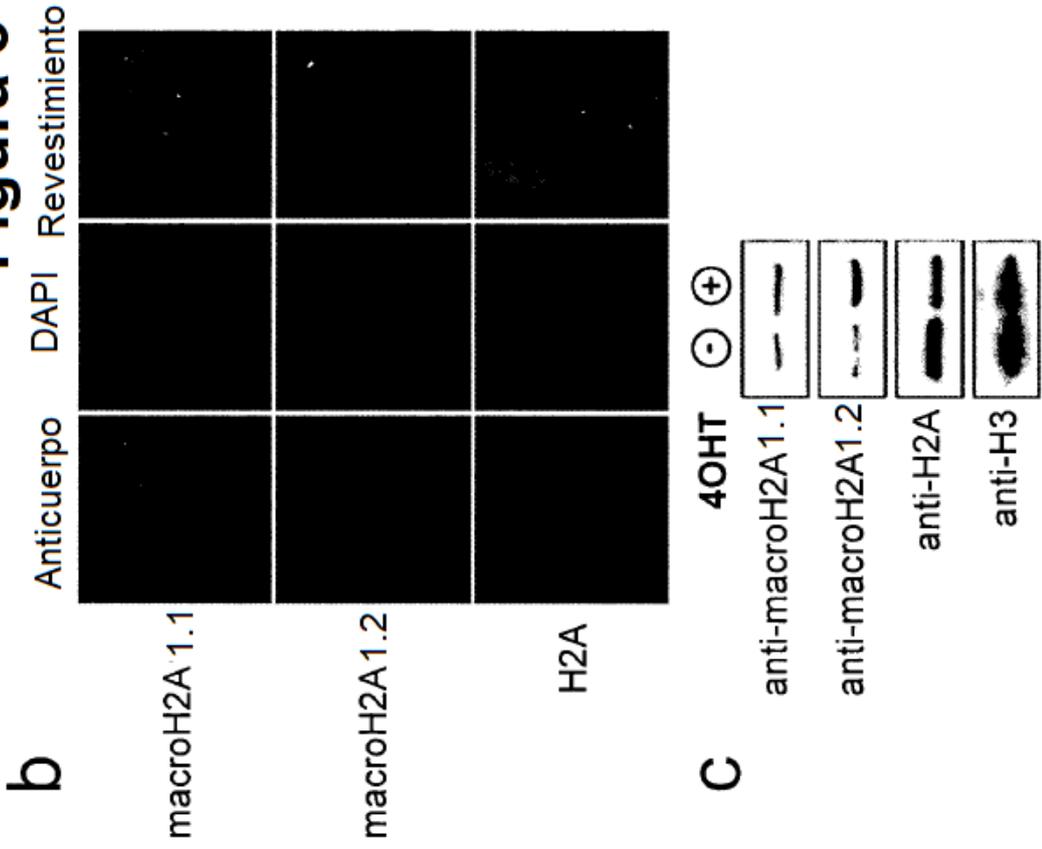


Figura 4

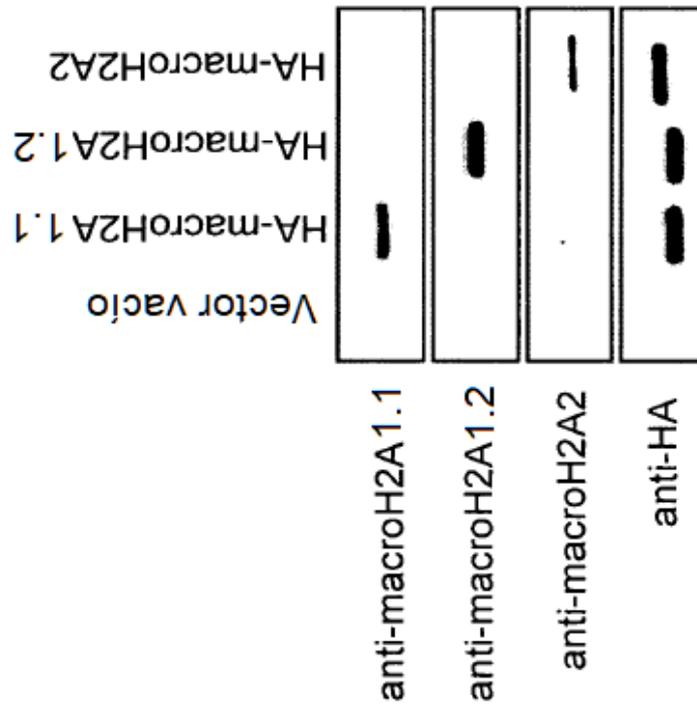


Figura 5

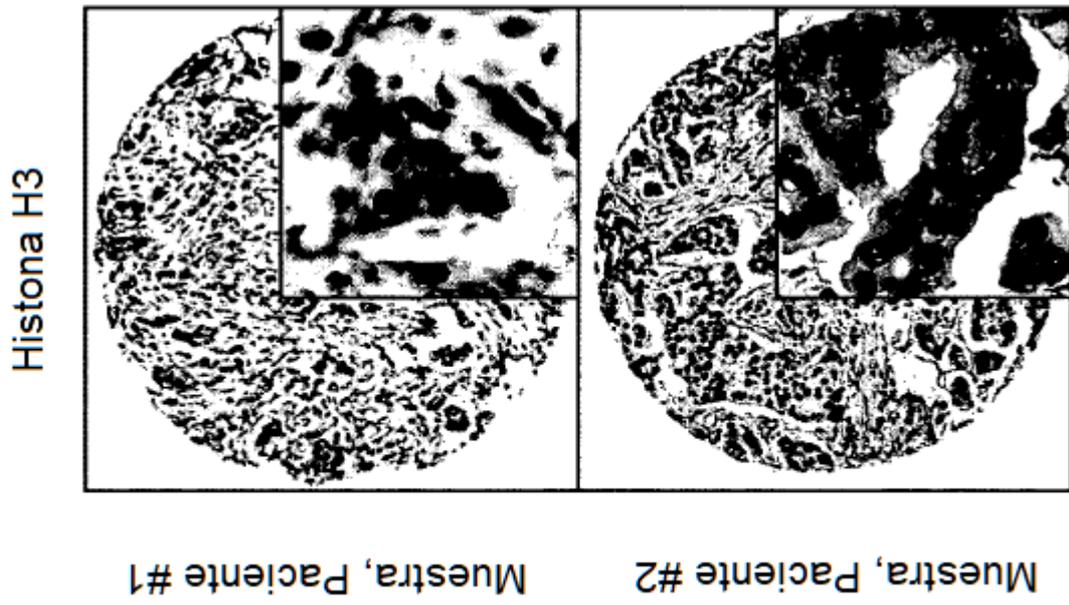


Figura 6

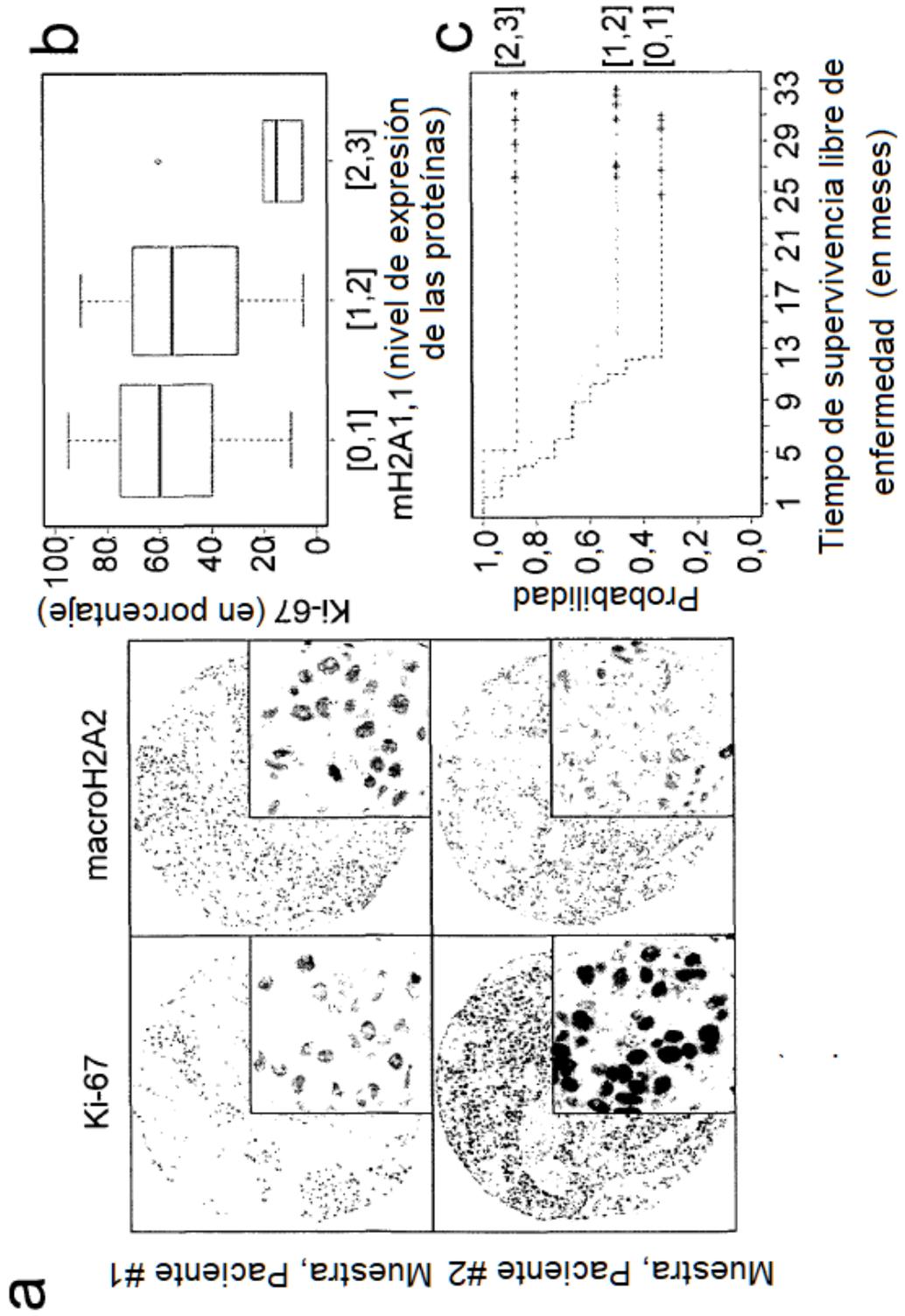
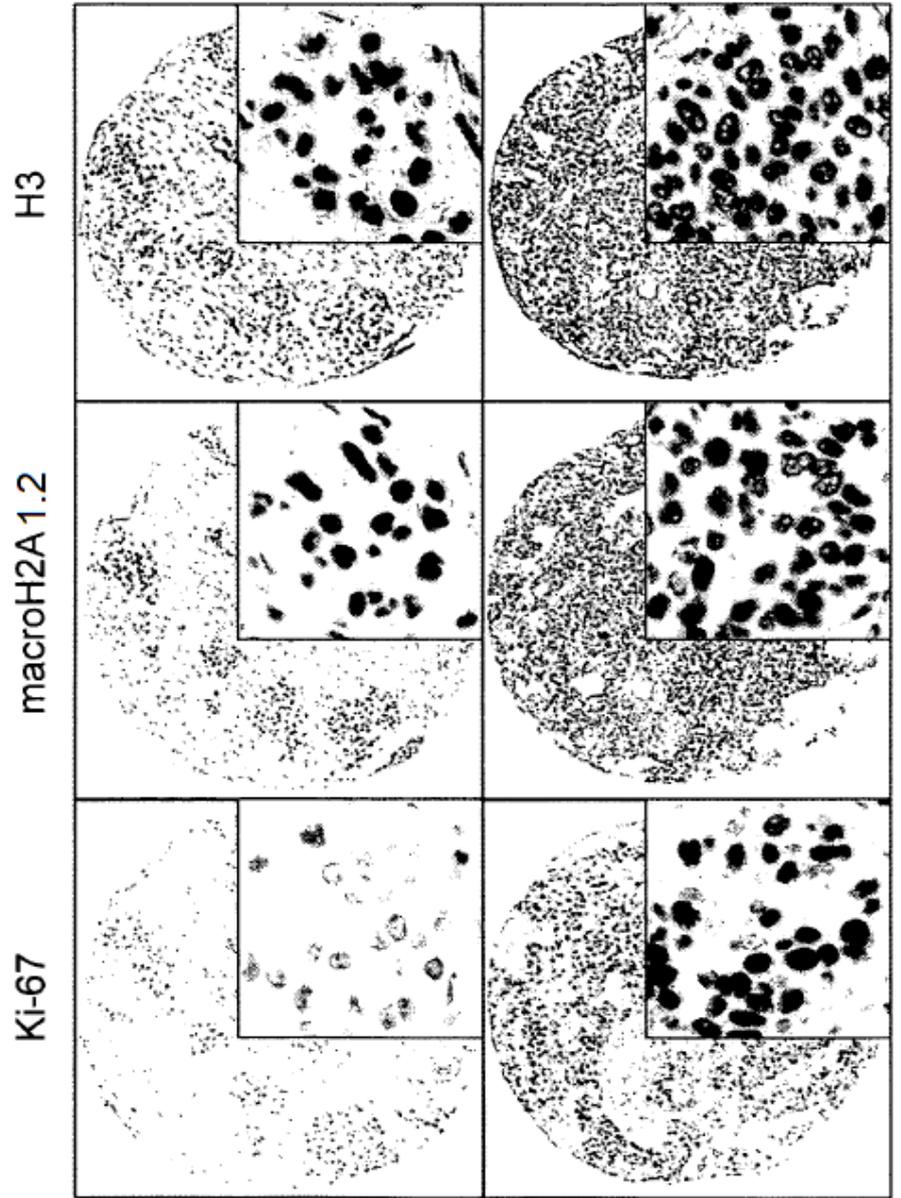


Figura 7



Muestra, Paciente #2 Muestra, Paciente #1