

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 926**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2011 PCT/GB2011/051354**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12013955**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2011 E 11736145 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2598880**

54 Título: **Procedimiento para detectar la presencia de un crecimiento ginecológico**

30 Prioridad:

28.07.2010 GB 201012662

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

20.02.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MICALLEF, JACOB, VINCENT y
ECCLESTON, MARK, EDWARD**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 700 926 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 la presencia de un crecimiento ginecológico

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un procedimiento para detectar la presencia de un crecimiento ginecológico, en particular para el diagnóstico de la endometriosis. La invención también se refiere a un procedimiento para identificar un biomarcador para detectar la presencia de un crecimiento ginecológico y a biomarcadores identificados por dicho procedimiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La incidencia de la endometriosis no se conoce con exactitud pero se estima que alcanza el 10 % en las mujeres. La endometriosis es una enfermedad significativamente poco diagnosticada y poco tratada. El diagnóstico normalmente se lleva a cabo por visualización de lesiones de endometriosis por cirugía invasiva mediante laparoscopia o laparotomía con confirmación histológica (Pasoto *et al*, 2008; Baldi *et al*, 2008).

La endometriosis es una enfermedad ginecológica benigna proliferativa e inflamatoria en la cual el tejido endometrial o de tipo endometrial, que normalmente forma el revestimiento uterino despedido en la menstruación, está presente fuera de su sitio habitual en el útero. Los crecimientos propios de la endometriosis se producen más comúnmente en la pelvis, alrededor del exterior del útero, sobre los ovarios, las trompas de Falopio, pero también se encuentran en el intestino, la vejiga, los intestinos, la vagina y el recto. El tejido endometrial también puede producirse en la capa muscular de la pared del útero (adenomiosis). Rara vez, el tejido de endometriosis puede crecer en otras zonas incluyendo la piel, los ojos, la columna vertebral, los pulmones y el cerebro. Aunque no es un tipo de cáncer, la endometriosis tiene ciertos rasgos en común con los tumores benignos, incluyendo crecimiento progresivo, crecimiento invasivo, crecimiento dependiente de estrógenos, recurrencia y tendencia a metastatizar (Van Gorp *et al*, 2004; Flores *et al*, 2007).

El revestimiento normal del endometrio del útero prolifera y se engrosa durante la fase lútea del ciclo menstrual en respuesta al aumento en los niveles circulatorios de progesterona y estradiol. Cuando los niveles de progesterona y estradiol disminuyen al final del ciclo (en ausencia de fecundación) el endometrio se rompe, sangra y se despiden en la menstruación, para volver a crecer cuando los niveles de progesterona y estradiol aumentan nuevamente en el siguiente ciclo. El tejido de endometriosis ectópico es influenciado de manera similar por las hormonas del ciclo menstrual y crece y se rompe con sangrado. Sin embargo, puesto que este tejido está ubicado fuera del útero, el sangrado es interno y no hay forma de que salga del cuerpo, lo cual produce inflamación, dolor y formación de tejido cicatricial (adhesiones).

Los síntomas de la endometriosis pueden incluir dolor, infertilidad, dismenorrea y fatiga (D'Hooghe y Hummelshoj, 2006; D'hooghe *et al*, 2006). La gravedad de los síntomas varía con la posición de los crecimientos de la endometriosis y la gravedad y etapa de la enfermedad. La gravedad también puede aumentar con la cantidad total de ciclos menstruales que experimenta una paciente en su vida. Por esta razón, el diagnóstico temprano y el tratamiento temprano para limitar los ciclos es importante. Se creía que la endometriosis era poco común en adolescentes pero en la actualidad se diagnostica más frecuentemente (Templeman, 2009). La falta de diagnóstico o el diagnóstico tardío es común porque los síntomas de la endometriosis son inespecíficos y porque muchas pacientes son asintomáticas. La endometriosis a menudo no se detecta durante varios años.

La etiología de la enfermedad no es conocida pero se han expuesto varias teorías. Una teoría implica aberraciones anatómicas o bioquímicas de la función uterina; por ejemplo la implantación de tejido menstrual en órganos pélvicos seguida de flujo retrógrado de este tejido dentro la pelvis posiblemente debido a bloqueo vaginal del flujo saliente. Otra teoría implica pequeños defectos de embriogénesis en el feto donde el tejido de tipo endometrial está mal ubicado en términos de desarrollo. Otras teorías implican el desplazamiento de tejido menstrual a través de las venas o vasos linfáticos a otros sitios o la diferenciación de células sanguíneas que se originan en la médula ósea en tejido endometrial en diversos sitios (Bulun, 2009; Signorile *et al*, 2009).

El tratamiento de la enfermedad consiste en eliminar el tejido de endometriosis mediante cirugía, a menudo en la misma operación en la cual se realiza el diagnóstico, o recurrir al uso de fármacos que incluyen andrógenos (tales como danazol), agonistas de la GnRH (tales como leuprorelina, buserelina, goserelina o nafarelina), progestágenos (tales como gestrinona o medroxiprogesterona) y anticonceptivos por vía oral.

En la actualidad, el diagnóstico de la endometriosis se lleva a cabo por inspección de la pelvis por laparoscopia. Si se identifican crecimientos, se puede llevar a cabo tratamiento de manera simultánea (Kennedy *et al.*, 2005). No obstante, muchas pacientes con enfermedad leve no son diagnosticadas. Existe la necesidad de desarrollar procedimientos no invasivos o mínimamente invasivos para el diagnóstico de la endometriosis con el fin de facilitar el tratamiento temprano y reducir la cantidad de laparoscopias innecesarias realizadas (D'Hooghe *et al.*, 2006; Kennedy, 2006).

Se han investigado muchos procedimientos para el diagnóstico de la endometriosis pero la visualización de las lesiones mediante cirugía invasiva por laparoscopia o laparotomía sigue siendo el procedimiento elegido con una sensibilidad clínica de aproximadamente 98 % y una especificidad clínica de aproximadamente 79 % (Baldi *et al.*, 2008; de Almeida Filho *et al.*, 2008).

Los biomarcadores investigados como herramientas de diagnóstico para la endometriosis incluyen ADN circulante, las citocinas inflamatorias interleucina (IL)-1, IL-6, y el factor α de necrosis tumoral, factores angiogénicos, tales como IL-8 y el factor de crecimiento endotelial vascular y los marcadores tumorales CA-125 y CA 19-9 (Seeber, 2009). A pesar de la investigación encaminada para identificar los biomarcadores circulatorios para endometriosis, en la actualidad no existe ningún análisis de sangre clínicamente aplicable para detectar la endometriosis (Zachariah *et al.*, 2009; Seeber *et al.*, 2009).

Puesto que, hasta la fecha, los biomarcadores sencillos han demostrado ser ineficaces como herramientas de diagnóstico de endometriosis, se han investigado combinaciones de biomarcadores que, en conjunto, podrían servir para diagnosticar la enfermedad. Se ha informado que las concentraciones en suero de proteína C reactiva y proteína C reactiva de alta sensibilidad son de poca utilidad como herramienta de diagnóstico para la endometriosis (Lermann *et al.*, 2009). Según se ha investigado, las mediciones de una combinación de CCR1, ARNm en leucocitos de sangre periférica y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y proteína CA125 en suero podrían ser una prueba de diagnóstico para la endometriosis. La expresión de CCR1, ARNm en leucocitos de sangre periférica se midió por el ensayo cuantitativo en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa. Los niveles de MCP-1 y CA125 en suero se determinaron por los ensayos ELISA y ECLIA. Se informó que el procedimiento tuvo una sensibilidad de 92 % y una especificidad de 82 % (Agic *et al.*, 2008).

Se ha utilizado espectrometría de masas para cribar proteínas expresadas de manera diferente en suero de pacientes con endometriosis contra controles normales. En un estudio reciente tres marcadores de proteínas identificados se midieron para producir una sensibilidad de 92 % y especificidad de 75 % (Zhang *et al.*, 2009). En otro estudio, se midieron seis proteínas para producir una prueba que identificó aproximadamente dos tercios de pacientes con endometriosis (Seeber, 2009).

Otros procedimientos mínimamente invasivos investigados para el diagnóstico de la endometriosis incluyen el análisis génico global del endometrio eutópico en la fase secretora tardía (Sherwin *et al.*, 2008) y respuesta de paciente a terapia hormonal pre-quirúrgica en términos de alivio de dolor pélvico crónico (Jenkins *et al.*, 2008), pero ninguno de estos enfoques ha resultado eficaz.

Se han detectado niveles elevados de nucleosomas circulantes en la sangre de algunas pacientes con endometriosis pero no discriminan entre sujetos sanos y enfermos (Holdenrieder *et al.*, 2001). También se han detectado niveles elevados de ADN circulante en la sangre de algunas pacientes con endometriosis y esto se ha investigado como una medición de diagnóstico para la detección de endometriosis y se ha descubierto que tienen una sensibilidad clínica de 70 % y una especificidad clínica de 87 % (Zachariah *et al.*, 2009, Zachariah *et al.*, 2008).

Dos problemas particulares en los ensayos de sangre de productos de muerte celular, incluyendo ADN (Zachariah *et al.*, 2009) y nucleosomas (Holdenrieder *et al.*, 2001), para uso como herramientas de diagnóstico para la detección de la endometriosis son los siguientes;

(i) que tienen poca sensibilidad clínica. Si bien se encuentran niveles elevados en algunas pacientes que sufren de endometriosis, otras pacientes con endometriosis no presentan niveles elevados. Esto produce el diagnóstico equivocado de ausencia de endometriosis en muchas pacientes que sí padecen la enfermedad.

(ii) que tienen poca especificidad clínica. Si bien se encuentran niveles elevados en algunas pacientes que sufren de endometriosis, también se dan niveles elevados en muchas otras afecciones clínicas incluyendo tumores malignos y benignos, afecciones autoinmunes, afecciones inflamatorias y traumatismo. Esto significa que no todos los resultados positivos se deben a endometriosis y las pruebas diagnostican la endometriosis, de manera equivocada en muchas pacientes que padecen otras afecciones.

De manera similar, ocurren problemas con el uso de marcadores de inflamación, tales como proteína C reactiva, proteína C reactiva de alta sensibilidad, fibrinógeno, amiloide A y citocinas inflamatorias tales como IL-1, IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral, molécula de adhesión intercelular soluble o recuento de glóbulos blancos (Lermann *et al*, 5 2009). CA-125 también se ha medido como un marcador de diagnóstico potencial para endometriosis y, si bien se utiliza más como marcador tumoral, se conoce por estar asociado con inflamación. Se ha descubierto que estos marcadores aumentan en muchas, pero no todas, las pacientes con endometriosis y pueden aumentar en otras afecciones y producir baja sensibilidad y especificidad clínica.

10 Debido a estos problemas, algunos especialistas en el área han intentado crear análisis de sangre para endometriosis con sensibilidad y especificidad clínica mejoradas siguiendo una de las dos estrategias amplias, o ambas:

(i) los especialistas han medido combinaciones de varios marcadores esperando que la medición de dos o varios de 15 los distintos marcadores en la misma paciente proporcione una discriminación mejorada entre pacientes con y sin endometriosis. Entre los ejemplos recientes de este enfoque se incluyen la medición de CCR1, ARNm en leucocitos de sangre periférica y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y proteína CA125 en suero (Agic *et al*, 2008), una combinación de tres biomarcadores de proteína (Zhang *et al*, 2009) y una combinación de seis biomarcadores de proteína (Seeber, 2009).

20 (ii) los especialistas han medido marcadores en muestras tomadas en distintas fases dentro del ciclo menstrual esperando que la discriminación proporcionada por el nivel de marcador entre pacientes con y sin endometriosis pueda mejorar al tomar las mediciones en muestras obtenidas durante una fase particular del ciclo menstrual, en vez de en muestras tomadas en otras fases o en muestras sin límite de tiempo. Un ejemplo reciente de este enfoque 25 incluía la medición del agonista del receptor IL-1 en suero y líquido peritoneal en pacientes con endometriosis durante las fases proliferativa y secretora del ciclo menstrual. Se descubrió que el agonista del receptor IL-1 era más bajo en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis que en las pacientes de control pero no se observó esta diferencia en suero. Además, no se observó diferencia en los niveles de agonista del receptor IL-1 en muestras tomadas durante la fase secretora o proliferativa del ciclo menstrual en muestras de o bien suero o líquido peritoneal 30 (Zhang *et al*, 2007). Esto indica que no se obtiene ninguna ventaja al medir el agonista del receptor IL-1 en muestras tomadas en un momento determinado durante una fase particular del ciclo menstrual.

De manera similar, se midieron los niveles en suero de IL-12 e IL-18 durante las fases folicular y lútea del ciclo menstrual. IL-12 aumentaba en endometriosis avanzada respecto de los sujetos de control pero no se observaba 35 diferencia para IL-18. Los niveles de IL-12 o IL-18 no variaban entre las fases folicular y lútea del ciclo menstrual, ya sea en pacientes con endometriosis o en sujetos de control (Fairbanks *et al*, 2009).

Se ha informado que los niveles en suero de CA-125, proteína C reactiva, amiloide A y anticuerpos anticardiolipina, en promedio, aumentan en pacientes con endometriosis durante los días 1-3 del ciclo menstrual (los primeros 3 días 40 de menstruación). Los niveles de estos marcadores también se midieron durante los días 8-10 del ciclo menstrual y también fueron elevados, pero en promedio menos elevados que durante los días 1-3. Se informó que de estas mediciones los niveles en suero de CA-125 durante los días 1-3 fueron el mejor indicador de endometriosis avanzada aunque no para los casos de enfermedad temprana. La especificidad clínica no se determinó puesto que se hizo una comparación con pacientes sanos y no se analizó en pacientes con sospecha de padecer endometriosis 45 pero se descubrió ausencia de la enfermedad con laparoscopia (Abrao *et al*, 1997). Posteriormente este estudio se amplió para incluir la medición de CA-15-3, CA-19-9, CEA, AFP y B2MG durante los días 1-3 y 8-10. Se descubrió que ninguno de estos marcadores adicionales eran discriminatorios para endometriosis (Abrao *et al*, 1999) ya sea durante los días 1-3 o durante los días 8-10.

50 (iii) algunos especialistas han combinado los dos enfoques anteriores y medido marcadores múltiples para endometriosis en distintas fases del ciclo menstrual, esperando que la medición de múltiples marcadores en la misma paciente proporcione una discriminación mejorada entre pacientes con y sin endometriosis y que esta discriminación se pueda mejorar aún más tomando dichas mediciones en muestras obtenidas en un momento determinado en una fase particular del ciclo menstrual. Un ejemplo reciente incluye la medición de seis citocinas 55 en suero como indicadores de endometriosis. Se descubrió que los niveles de tres de estas citocinas aumentaban en endometriosis respecto de los niveles hallados en pacientes sanas. Se descubrió que el mejor factor de discriminación era la medición de IL-6 con sensibilidad de 71 % y especificidad de 66 %. La discriminación no mejoró con la inclusión de otras mediciones de citocina. Las mediciones se tomaron durante las fases proliferativa y secretora del ciclo menstrual. No se observó diferencia en los niveles de citocina en suero de ninguno de los seis 60 marcadores cuando se midieron en distintas fases del ciclo menstrual. Esto indica que no se obtiene ninguna ventaja

al medir las múltiples citocinas sobre IL-6 sola y que la discriminación no mejora tomando las mediciones en muestras obtenidas durante una fase particular del ciclo menstrual (Othman *et al*, 2008).

Otro ejemplo de este enfoque incluyó la medición de una pluralidad de biomarcadores en muestras tomadas de 5 pacientes en una fase determinada del ciclo menstrual y el análisis de las concentraciones encontradas utilizando un modelo matemático para determinar la presencia o ausencia o grado de la enfermedad. En este enfoque los especialistas midieron múltiples biomarcadores en muestras tomadas durante distintas fases (en particular, las fases proliferativa y secretora) del ciclo menstrual. El objetivo de esto fue maximizar la discriminación de la enfermedad por inclusión de múltiples biomarcadores y medir dichos biomarcadores en la fase del ciclo donde su discriminación 10 individual y combinada se maximiza. La fase secretora se seleccionó como la fase donde se observó la mayor discriminación y se utilizó un programa informático para determinar múltiples puntos de corte interdependientes para maximizar la sensibilidad y especificidad clínica (WO 2008/049175).

La publicación internacional WO9947924 describe un procedimiento para la detección de nucleosomas como 15 productos apoptóticos para evaluar la eficacia de la terapia tumoral en pacientes con tumores.

La publicación internacional WO0162959 describe marcadores de endometriosis capaces de detectar pacientes con endometriosis y polinucleótidos, sondas, cebadores y kits para uso en la detección de estos marcadores.

20 El documento US2007/287676 describe biomarcadores para la identificación de pacientes con endometriosis, en particular del tipo que es resistente a la terapia con progestina y progesterona.

El documento US2004/220128 describe moléculas de ácido nucleico que regulan la expresión de FCEV y FCEVR para el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades asociadas con angiogénesis y trastornos reproductivos 25 femeninos.

Abrao *et al.* (1997) *Hum. Reprod.*, Vol. 12, páginas 2523-2527, describen niveles elevados de CA125 II, proteína C reactiva (PCR) y amiloide sérico tipo A (AAS) y anticuerpo anticardiolipina (aCL) en muestras de sangre tomadas de 30 pacientes con endometriosis en comparación con pacientes de control sanas.

Zachariah *et al.* (2009) *Reprod. Biomed. Online*, Vol. 18(3), páginas 407-411, muestran niveles elevados de ADN nuclear libre de células en el suero de pacientes con endometriosis y que dichos niveles podrían utilizarse para discriminar entre casos leves y controles.

35 PathScan Pan-Methyl-Histone H3 (Lys9) Sandwich ELISA Kit, páginas 1-2 (2008), describe un procedimiento de ELISA en sándwich para la detección de histona H3 metilada en lisina 9.

Ninguno de estos procedimientos se ha adoptado en la práctica clínica y todavía existe una clara necesidad médica no satisfecha de desarrollar un análisis de sangre no invasivo para la endometriosis (Zachariah *et al*, 2009; Seeber 40 *et al*, 2009).

Resumen de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la 45 presencia de endometriosis en un sujeto humano o animal que comprende las etapas de:

- (i) determinar el día o fase del ciclo menstrual;
- (ii) medir un nucleosoma intacto en muestras de sangre, suero o plasma que se han obtenido de dicho sujeto en dos momentos diferentes durante el ciclo menstrual, caracterizado porque una primera muestra se toma durante la fase 50 menstrual del ciclo menstrual y una segunda muestra se toma durante la fase folicular o lútea del ciclo menstrual; y
- (iii) utilizar los niveles del nucleosoma intacto en, y la diferencia en niveles de biomarcadores entre, las dos muestras como indicador de la presencia de endometriosis en el sujeto humano o animal.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la 55 presencia de endometriosis en un sujeto humano o animal que comprende las etapas de:

- (i) medir un nucleosoma intacto en una muestra de sangre, suero o plasma que se ha obtenido de un sujeto en el que dicho sujeto ha recibido una hormona exógena, o análogo de hormona, o agonista de hormona, o antagonista de hormona, o un fármaco o un esteroide anticonceptivo u otra sustancia prevista para inducir una respuesta 60 ginecológica en una prueba de estimulación o represión; y

(iii) determinar si la cantidad del nucleosoma intacto presente en la muestra de sangre, suero o plasma del sujeto se altera con la administración de dicha sustancia exógena de forma que cualquier muerte celular detectada por la liberación de un nucleosoma intacto se asocie con endometriosis.

- 5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de un kit para diagnosticar o monitorizar endometriosis que comprende un ligando o aglutinante específico para un nucleosoma intacto junto con instrucciones para el uso del kit de acuerdo con cualquiera de los procedimientos definidos en el presente documento.
- 10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento *in vitro* para identificar un biomarcador de componente de nucleosoma para detectar la presencia de endometriosis en un sujeto humano o animal que comprende las etapas de:
- (i) determinar el día o fase del ciclo menstrual;
- 15 (ii) medir un nucleosoma intacto en una primera y una segunda muestra que se han obtenido de dicho sujeto en dos momentos diferentes durante el ciclo menstrual, caracterizado porque una primera muestra se toma durante la fase menstrual del ciclo menstrual y una segunda muestra se toma durante o bien la fase folicular o lútea del ciclo menstrual, donde la primera y la segunda muestra son una muestra de sangre, suero o plasma; y
- (iii) determinar si la cantidad del nucleosoma intacto es controlada o influenciada por el ciclo menstrual, de modo que
- 20 el control o influencia indican la identidad del biomarcador.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1:** Variación en niveles de nucleosomas circulantes durante el ciclo menstrual en (a) mujeres con endometriosis y (b) mujeres sin endometriosis detectable (unidades arbitrarias). Las leyendas se refieren a: M=fase menstrual, F=fase folicular, P=fase peri-ovulatoria, L=fase lútea.

Descripción detallada de la invención

- 30 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de endometriosis en un sujeto humano o animal que comprende las etapas de:
- (i) determinar el día o fase del ciclo menstrual;
- (ii) medir un nucleosoma intacto en muestras de sangre, suero o plasma que se han obtenido de dicho sujeto en dos
- 35 momentos diferentes durante el ciclo menstrual, caracterizado porque una primera muestra se toma durante la fase menstrual del ciclo menstrual y una segunda muestra se toma durante la fase folicular o lútea del ciclo menstrual; y
- (iii) utilizar los niveles del nucleosoma intacto en, y la diferencia en niveles de biomarcadores entre, las dos muestras como indicador de la presencia de endometriosis en el sujeto humano o animal.
- 40 Los nucleosomas circulantes son un biomarcador de muerte celular (Holdenrieder y Stieber, 2009). Previamente se ha informado que algunas mujeres con endometriosis tienen niveles elevados de nucleosomas circulantes (Holdenrieder *et al* 2001). No se ha investigado si estos nucleosomas varían en nivel durante las distintas fases del ciclo menstrual. Los inventores han tomado mediciones en suero de los niveles circulantes de nucleosomas intactos en mujeres con endometriosis que no tomaban fármacos esteroideos durante las fases menstrual, folicular, peri-
- 45 ovulatoria y lútea del ciclo menstrual y comparado estas con mediciones similares en mujeres con endometriosis no detectada por laparoscopia. Sorprendentemente, los niveles de nucleosomas alcanzan el punto máximo durante la fase lútea del ciclo menstrual y son bajos durante el menstuo cuando las células endometriales mueren y se despiden y la inflamación alcanza su punto máximo (Abrao *et al*,1997). Se resumen los resultados en la Tabla 1 y la Figura 1.
- 50 De acuerdo con un aspecto particular de la invención que se puede mencionar, se proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de endometriosis en un sujeto humano o animal que comprende las etapas de:
- (i) determinar el día o fase del ciclo menstrual;
- 55 (ii) medir un nucleosoma intacto en muestras de sangre, suero o plasma que se han obtenido de dicho sujeto en dos momentos diferentes durante el ciclo menstrual, caracterizado porque una primera muestra se toma durante la fase menstrual del ciclo menstrual y una segunda muestra se toma durante o bien la fase secretora o la fase proliferativa tardía del ciclo menstrual; y
- (iii) utilizar los niveles del nucleosoma intacto en, y la diferencia en niveles de biomarcadores entre, las dos muestras
- 60 como indicador de la presencia de endometriosis en el sujeto humano o animal.

Los informes previos sobre el uso de biomarcadores para detectar endometriosis se han centrado en la discriminación de estos biomarcadores para endometriosis en muestras tomadas de forma aleatoria, o en muestras de un momento determinado tomadas en una fase particular del ciclo. En la mayor parte de los casos, se informa que los niveles de biomarcadores no varían significativamente cuando se miden durante distintas fases del ciclo menstrual, si bien se ha informado sobre cierta variación en los niveles de CA-125 y proteína C reactiva en muestras tomadas durante los días 1-3 y los días 8-10 del ciclo menstrual (Abrao *et al*, 1997). Los datos expuestos en el presente documento muestran que ciertos biomarcadores para muerte celular e inflamación no se producen de forma continua durante el ciclo menstrual en la endometriosis pero sí se encuentran en la sangre durante la fase lútea y están ausentes o presentes a niveles inferiores durante otras fases del ciclo menstrual.

En una realización, dicha primera muestra se toma durante los días 1-5 del ciclo menstrual y dicha segunda muestra se toma durante el periodo que comienza el día 18 del ciclo menstrual y que termina con el inicio del menstuo en el posterior ciclo menstrual.

También se describe un procedimiento para detectar la presencia de un crecimiento ginecológico que comprende las etapas de (i) medir un biomarcador de muerte celular, apoptosis o inflamación en una muestra biológica y (ii) demostrar que el marcador está asociado a, provocado por o emana del crecimiento ginecológico donde sea que esté ubicado en el cuerpo.

También se describe un procedimiento para detectar la presencia de un crecimiento ginecológico que comprende las etapas de (i) medir un biomarcador en una muestra biológica y (ii) demostrar que dicho marcador se produce durante una fase particular del ciclo menstrual pero no en otros momentos durante el ciclo, de modo que un crecimiento ginecológico se indica como el origen de dicho biomarcador.

También se describe un procedimiento para detectar la presencia de un crecimiento ginecológico que comprende las etapas de (i) medir un biomarcador de muerte celular, apoptosis o inflamación en una muestra biológica y (ii) demostrar que dicho marcador se produce durante la fase lútea pero no en otros momentos durante el ciclo, de modo que un crecimiento ginecológico que se degenera causando muerte celular y/o inflamación durante el menstuo se indica como el origen de dicho biomarcador.

Apreciarán los expertos en la técnica que los biomarcadores de muerte celular, apoptosis o inflamación son biomarcadores no específicos y que los niveles en circulación elevados de dichos biomarcadores pueden indicar la presencia de varias otras afecciones (incluyendo, por ejemplo, muchos tipos de cáncer, trastornos autoinmunes u otras afecciones inflamatorias). La presente invención discrimina entre sujetos con niveles elevados de estos biomarcadores debido a endometriosis y sujetos con niveles elevados debido a otros trastornos donde los niveles de biomarcadores no están asociados con un crecimiento ginecológico y no varían en mayor medida durante las distintas fases del ciclo menstrual. Este aspecto proporciona a la presente invención mayor especificidad clínica para la endometriosis y, por ende, supera una de las principales desventajas de procedimientos previos para la detección de endometriosis: que muchas pacientes que padecen otras condiciones son diagnosticadas equivocadamente con endometriosis.

Puesto que los datos expuestos en el presente documento muestran que estos marcadores son producidos por pacientes con endometriosis durante determinados momentos del ciclo menstrual y no en otros, los expertos en la técnica apreciarán que la medición de biomarcadores en muestras tomadas en momentos cuando los biomarcadores no se producen, o bien en muestras tomadas de manera aleatoria o en muestras tomadas en un momento específico, no servirá para detectar muchas pacientes con endometriosis. Este aspecto proporciona a la presente invención mayor sensibilidad clínica para la endometriosis y, por ende, supera otra de las principales desventajas de procedimientos previos para la detección de endometriosis (que muchas pacientes que padecen endometriosis son diagnosticadas equivocadamente con ausencia de la enfermedad).

También apreciarán los expertos en la técnica que la medición dual en momentos cuando los marcadores están presentes a niveles máximos y mínimos también aumenta la sensibilidad clínica de la presente invención adicionalmente mediante la detección de endometriosis en pacientes con niveles de biomarcadores ligeramente elevados o normales, disminuyendo estos niveles drásticamente durante el día 10 y a partir del día 10. Este aspecto proporciona a la presente invención sensibilidad clínica mejorada (además de especificidad clínica mejorada) respecto de otros procedimientos que contemplan la medición los días 1-3 cuando no es posible detectar la endometriosis leve (Abrao *et al*, 1997).

También se describe un procedimiento para detectar la presencia de un crecimiento ginecológico que comprende las

etapas de (i) medir un biomarcador de muerte celular, apoptosis o inflamación en una muestra biológica y (ii) demostrar que la cantidad o naturaleza de dicho biomarcador varía drásticamente durante dos o más fases distintas del ciclo menstrual, de modo que la diferencia en los niveles de dicho biomarcador indica la presencia de un crecimiento ginecológico que es susceptible de muerte celular y/o inflamación durante el menstruo.

5

En una realización de dicho primer aspecto de la invención, dicha primera muestra se toma durante los días 1-5 del ciclo menstrual y dicha segunda muestra se toma durante el periodo que comienza el día 18 del ciclo menstrual y que termina con el inicio del menstruo en el posterior ciclo menstrual. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de endometriosis que comprende las etapas de (i) medir un nucleosoma intacto en una muestra de sangre, suero o plasma tomada de un sujeto durante los días 1 a 5 del ciclo menstrual y (ii) medir la diferencia entre los niveles del nucleosoma intacto observado en esta muestra y el observado en otra muestra tomada del sujeto durante los días 18 a 28, de modo que la variación en los niveles de dichos nucleosomas intactos indica la presencia de endometriosis que es susceptible de muerte celular y/o inflamación durante el menstruo.

10

15

En una realización de dicho primer aspecto de la invención, dicha primera muestra se toma durante el tiempo que el sujeto está sangrando debido a la menstruación y dicha segunda muestra se toma cuando la paciente no está sangrando debido a la menstruación. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de endometriosis que comprende las etapas de (i) medir un nucleosoma intacto en una muestra de sangre, suero o plasma tomada de un sujeto cuando está menstruando o sangrando y (ii) medir la diferencia entre los niveles del nucleosoma intacto observado en esta muestra y el observado en otra muestra tomada del sujeto cuando no está sangrando o menstruando, de modo que la variación en los niveles de dichos nucleosomas intactos indica la presencia de endometriosis que es susceptible de muerte celular y/o inflamación durante el menstruo.

20

25

En una realización, dicho nucleosoma comprende un nucleosoma intacto.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de endometriosis que comprende las etapas de medir un nucleosoma intacto en muestras de sangre, suero o plasma tomadas durante dos fases distintas del ciclo menstrual y utilizar la diferencia en las dos mediciones, ya sea absoluta o relativa (por ejemplo, un cambio de porcentaje) como indicador de la presencia de endometriosis. Por ende, por ejemplo, la presencia de un nucleosoma intacto durante el menstruo que continúa a un nivel aproximadamente continuo durante las distintas fases del ciclo menstrual indica la ausencia de endometriosis, mientras que un nivel cambiante de biomarcador durante las distintas fases del ciclo menstrual más allá de cierto umbral indica la presencia de endometriosis en la paciente.

30

35

De acuerdo con un aspecto adicional la invención comprende la demostración de que el nucleosoma intacto está asociado a la endometriosis determinando si la cantidad de nucleosoma intacto está influenciada por la administración de hormona exógena, análogo de hormona exógena, agonistas de hormona, antagonistas de hormona o un fármaco o esteroide anticonceptivo u otra sustancia prevista para modificar la actividad hormonal en una prueba de estimulación o represión. En dicha prueba las mediciones del biomarcador se toman normalmente en una muestra que se obtiene inmediatamente antes de la administración de la sustancia exógena y a continuación se toman mediciones adicionales en muestras obtenidas en un momento o momentos determinados después de la administración para detectar un efecto. En un aspecto la administración de la sustancia exógena tendría como objetivo estimular un evento de menstruo y medir un nucleosoma intacto obtenido de una muestra antes y después de la administración para determinar si la estimulación del menstruo iba acompañada de un aumento en el nucleosoma intacto. En otro aspecto la administración de las sustancias exógenas tendrían como objetivo la prevención o mejora de un evento de menstruo y la medición de un nucleosoma intacto tomada de una muestra antes y después de la administración para determinar si la prevención o mejora del menstruo iba acompañada de una disminución en el nivel de, o ausencia de, un nucleosoma intacto en comparación con menstruos anteriores o niveles esperados. Resultará evidente para los expertos en la técnica que una ventaja de este aspecto es que la detección de la endometriosis podría llevarse a cabo en paralelo con un tratamiento para prevenir o mejorar los síntomas del crecimiento ginecológico durante el menstruo.

40

45

50

55

Dichas hormonas y fármacos son conocidos en la técnica y algunos se utilizan para el tratamiento de endometriosis (Jenkins *et al*, 2008). En este aspecto una diferencia en el nivel de nucleosoma intacto antes y después de la administración de la sustancia exógena indica control menstrual del nucleosoma intacto y presencia de endometriosis en la paciente.

60

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento *in vitro* para identificar un

biomarcador de componente de nucleosoma para detectar la presencia de endometriosis en un sujeto humano o animal que comprende las etapas de (i) determinar el día o fase del ciclo menstrual; (ii) medir un nucleosoma intacto en una primera y segunda muestra que se han obtenido de dicho sujeto en dos o más momentos distintos durante el ciclo menstrual, caracterizado porque una primera muestra se toma durante la fase folicular o lútea del ciclo menstrual y una segunda muestra se toma durante o bien la fase folicular o lútea del ciclo menstrual, donde la primera y segunda muestra son una muestra de sangre, suero o plasma; y (ii) determinar si la cantidad de dicho nucleosoma intacto está controlada o influenciada por el ciclo menstrual, de modo que el control o la influencia de dicho biomarcador indica la identidad de un biomarcador.

10 También se describen ligandos, tales como compuestos de origen natural o sintetizados químicamente, capaces de unión específica al biomarcador. Un ligando 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 unirse de manera específica al biomarcador. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo capaz de unirse de manera específica al biomarcador. Un ligando puede marcarse con un marcador detectable, tal como un
15 marcador luminiscente, fluorescente, enzimático o radioactivo; como alternativa o adicionalmente, un ligando puede marcarse con un marcaje de afinidad, p. ej., un marcaje de biotina, avidina, estreptavidina o His (p. ej., hexa-His).

Un biosensor puede comprender el biomarcador o un mimético estructural/conformacional del mismo capaz de unirse de manera específica a un anticuerpo contra el biomarcador. Se proporciona también una matriz que
20 comprende un ligando o mimético como se describe en el presente documento.

También se describe el uso de uno o más ligandos como se describen en el presente documento, 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 de la invención para detectar y/o
25 cuantificar el biomarcador. En estos usos, la detección y/o cuantificación pueden practicarse en una muestra de sangre, suero o plasma como se define en el presente documento.

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

También se describe un kit para detectar la presencia de un crecimiento ginecológico, que comprende un biosensor capaz de detectar y/o cuantificar uno o más de los biomarcadores definidos en el presente documento.

35 Los biomarcadores para detectar la presencia de un crecimiento ginecológico son dianas esenciales para el descubrimiento de dianas novedosas y moléculas farmacológicas que retrasan o detienen el avance del trastorno. Como el nivel del biomarcador es indicativo del trastorno y de la 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 modulan la actividad del biomarcador.

40 También se describe el uso de un ligando, 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.

45 También se describe un procedimiento para identificar 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 singular de un proceso, evento o afección. Los biomarcadores pueden usarse en procedimientos de diagnóstico, p. ej., cribado clínico y en evaluación de pronóstico y en monitorización de los resultados de la terapia, identificación de las pacientes 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.

55 Se apreciará que un crecimiento ginecológico puede comprender cualquier enfermedad ginecológica proliferativa ectópica en un sujeto humano o animal. El crecimiento ginecológico puede comprender un crecimiento ginecológico benigno o maligno. El crecimiento ginecológico puede comprender endometriosis en un sujeto humano o animal.

60 También se describe un procedimiento para diagnosticar endometriosis en un sujeto humano o animal que

comprende las etapas de (i) medir un biomarcador de muerte celular, apoptosis, crecimiento celular o inflamación en una muestra biológica y (ii) determinar si la cantidad o naturaleza de dicho biomarcador varía durante el ciclo menstrual de forma que la variación de dicho biomarcador indica el diagnóstico de endometriosis.

- 5 Los términos «detectar» y «diagnosticar» como se usan en la presente memoria engloban identificación, confirmación y/o caracterización de un crecimiento ginecológico. Los procedimientos de detección y diagnóstico de acuerdo con la invención son útiles para confirmar la existencia de un crecimiento, para monitorizar el desarrollo del crecimiento evaluando el inicio y el avance, o para evaluar la mejora o regresión del crecimiento. Los procedimientos de detección, monitorización y diagnóstico son también útiles en procedimientos para la valoración de cribado
10 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
15 tratamiento más apropiado (por lo tanto, rebajando la exposición innecesaria a los efectos secundarios farmacológicos dañinos) y reducir las tasas de recaída.

El biomarcador puede liberarse a partir de las células de un crecimiento ginecológico. Por lo tanto, también se describe un procedimiento para la detección de un crecimiento ginecológico que comprende las etapas de (i) medir
20 un biomarcador en una muestra biológica que está asociado a, o que se libera de, las células de un crecimiento ginecológico y (ii) demostrar que dicho biomarcador está asociado a la menstruación, de modo que dicho marcador indica la presencia de un crecimiento ginecológico.

La etapa (ii) puede comprender determinar si la cantidad o naturaleza del biomarcador está influenciada por la
25 administración de una sustancia exógena, por ejemplo una hormona exógena, análogo de hormona, agonista de hormona, antagonista de hormona o un fármaco u otras sustancias previstas para modificar la actividad hormonal en una prueba de estimulación o represión. Dicha hormona exógena puede comprender un anticonceptivo u otro esteroide. Se pueden tomar múltiples mediciones del biomarcador. Las mediciones múltiples pueden comprender mediciones antes, en o cerca del momento de la administración de dicha sustancia exógena.

30 En una realización, la medición del nucleosoma intacto se lleva a cabo en el día o fase del ciclo menstrual en el cual los niveles bajos o elevados en la muestra de sangre, suero o plasma de dicho nucleosoma intacto están asociados con la presencia de endometriosis. En una realización adicional, se toman múltiples mediciones del nucleosoma intacto el mismo día o en la misma fase de los múltiples ciclos menstruales. Se pueden hacer comparaciones entre
35 la cantidad del nucleosoma intacto en muestras tomadas en dos o más ocasiones. Se puede llevar a cabo la evaluación de cualquier cambio en la cantidad del nucleosoma intacto en muestras tomadas en dos o más ocasiones. La modulación del nivel de nucleosoma intacto es útil como indicador del estado de la endometriosis. Un aumento en el nivel del nucleosoma intacto en el tiempo es indicativo del inicio o avance, es decir, empeoramiento del crecimiento, mientras que una disminución en el nivel del nucleosoma intacto indica mejora o remisión del
40 crecimiento, o viceversa. Dicha realización proporciona la ventaja de permitir predecir el pronóstico de la endometriosis

Una realización particular que se puede mencionar es aquella donde la etapa (ii) comprende determinar el día o fase del ciclo menstrual en el momento de medir el nucleosoma intacto y tomar múltiples mediciones del nucleosoma
45 intacto en dos o más días o fases del ciclo menstrual. Se pueden hacer comparaciones entre las muestras tomadas en dos o más ocasiones para evaluar si se han producido cambios en la cantidad del nucleosoma intacto durante las fases menstruales que indican que la endometriosis es el origen o la causa del nucleosoma intacto.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un procedimiento para la detección de la
50 endometriosis que comprende las etapas de (i) determinar los días o fase del ciclo menstrual y (ii) medir un nucleosoma intacto en una muestra de sangre, suero o plasma tomada durante los días 18-28, y eliminar otras posibles causas de la presencia del nucleosoma intacto para concluir que la endometriosis es el origen o causa probable de dicho nucleosoma intacto. Sorprendentemente esto se puede llevar a cabo según la presentación de la paciente y la historia clínica para muchos sujetos. Por ejemplo, las causas de los niveles elevados de biomarcadores
55 de muerte celular que no sean endometriosis se pueden considerar improbables según la edad, historia clínica y presentación de la paciente. La eliminación del traumatismo (por ejemplo; lesión severa o cirugía) se puede eliminar con la presentación de la paciente y la historia clínica. El ejercicio extremo (por ejemplo correr una maratón) se puede eliminar con la historia clínica del paciente. El accidente cerebrovascular y el ataque cardíaco se pueden eliminar con la presentación de la paciente y la historia clínica. La septicemia u otras infecciones serias se pueden
60 eliminar con la presentación de la paciente y otras causas menos comunes se pueden eliminar de manera similar

- como causas improbables de niveles de biomarcador elevados de muerte celular en una paciente que se sospecha padece de endometriosis. Por lo tanto resultará evidente para los expertos en la técnica que la medición de un biomarcador durante el menstruado, seguida de eliminación activa de otras posibles causas de la presencia de dicho biomarcador pueden indicar que la endometriosis es la causa más probable del biomarcador. En otro aspecto de la invención, se miden nucleosomas intactos durante el menstruado y se eliminan otras causas de aumento de biomarcadores de muerte celular e inflamación según la edad de la paciente, presentación de la paciente e historia clínica, para concluir que la endometriosis es la causa probable. En un aspecto adicional, la invención comprende las etapas de (i) medir un nucleosoma intacto en una muestra de sangre, suero o plasma tomada durante el menstruado, (ii) eliminar otras posibles causas de la presencia de dicho nucleosoma intacto indicando que la endometriosis es el origen probable y (iii) confirmar la endometriosis como el origen por laparoscopia. Los expertos en la técnica apreciarán que la ventaja de este procedimiento será reducir la práctica de cirugías laparoscópicas innecesarias y que esto solo es posible cuando la sensibilidad clínica del procedimiento sea elevada, es decir, que la proporción de mujeres con endometriosis mal diagnosticadas con ausencia de la enfermedad sea bajo.
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
- Se apreciará que el día o fase del ciclo menstrual se puede determinar de diversas formas conocidas en la técnica. En una realización, la etapa de determinar el día o fase del ciclo menstrual se determina por referencia a los síntomas de la paciente en relación con el ciclo menstrual, tales como temperatura, dolor e inicio o finalización del sangrado menstrual.
- En una realización alternativa, la etapa de determinar el día o fase del ciclo menstrual se determina por la medición de las hormonas o metabolitos menstruales. Se apreciará que dichas hormonas o metabolitos se pueden medir en un fluido corporal, tal como sangre u orina. Dichas mediciones son conocidas en la técnica e incluyen mediciones de estradiol y otros estrógenos, progesterona, hormona luteinizante, hormona de estimulación folicular, y metabolitos hormonales tales como glucurónidos esteroides.
- Es sabido que un recambio celular, muerte celular y apoptosis aumentados conducen a niveles circulatorios aumentados de marcadores tales como nucleosomas libres de células y ADN libre de células (Holdenrieder *et al*, 2001; Swaminathan *et al*, 2006). En la sangre de pacientes con endometriosis se observan niveles aumentados de ADN circulante y nucleosomas (Holdenrieder *et al*, 2001; Zachariah *et al* 2009). No obstante, los nucleosomas o ADN libres de células circulantes son indicadores no específicos y aparecen en una amplia variedad de otras enfermedades que incluyen enfermedades inflamatorias, una gran variedad de afecciones benignas y malignas, enfermedades autoinmunes así como después de traumatismo o isquemia (Holdenrieder *et al* 2001, Swaminathan *et al*, 2006).
- En la endometriosis el tejido endometrial fuera del útero sigue respondiendo al ciclo menstrual y prolifera y luego se rompe produciendo una respuesta inflamatoria cíclica. Los datos expuestos en el presente documento muestran que el crecimiento y la degeneración cíclicos del tejido de endometriosis está asociado a una variación en los niveles de nucleosomas en sangre que resultan del recambio tisular y/o de la respuesta inflamatoria asociada. Este aspecto no se ha investigado previamente como un procedimiento para detectar la endometriosis. El crecimiento y la degeneración cíclicos del tejido de endometriosis también están asociados a una variación en los niveles de biomarcadores de inflamación en sangre que resultan del recambio tisular y/o de la respuesta inflamatoria asociada. Este fenómeno ha sido observado previamente (Abrao *et al*, 1997), pero la diferencia en los niveles no fue utilizada previamente como procedimiento para la detección de la endometriosis.
- Los marcadores de la respuesta inflamatoria son conocidos en la técnica e incluyen, sin carácter restrictivo, proteína C reactiva, proteína C reactiva de alta sensibilidad, fibrinógeno, amiloide A, CA-125 y citocinas inflamatorias tales como IL-1, IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral, molécula de adhesión intercelular soluble, CA 125 o recuento de glóbulos blancos.
- Los nucleosomas forman las unidades repetitivas fundamentales de la cromatina eucariota, que se utiliza para agrupar los grandes genomas eucariotas en el núcleo. La estructura básica del nucleosoma incluye ácido nucleico unido a un complejo de proteínas histona que incluye histonas 1, 2, 3 y 4. Las referencias en el presente documento a nucleosomas incluyen referencias a nucleosomas intactas, cualquier parte o partes de componente de nucleosomas, nucleosomas alterados epigenéticamente que contienen una histona con una modificación postraduccional o nucleosomas que contienen una variante de histona. En una realización, dicho biomarcador comprende un nucleosoma intacto.

También se describe cuando dicho biomarcador comprende una histona, histona modificada postraduccionalmente o variante de histona. Las histonas son los componentes proteicos más importantes de la cromatina. Las referencias a histonas en el presente documento incluyen referencias a una histona que contiene una modificación

postraduccional. Esta comprende una histona que contiene una modificación postraduccional o un nucleosoma alterado epigenéticamente que contiene una histona con una modificación postraduccional. Esta también puede comprender una variante de histona o un nucleosoma que contiene una variante de histona.

- 5 También se describe cuando dicho biomarcador comprende un ácido nucleico. Esto incluye cuando dicho ácido nucleico es un ácido nucleico de una secuencia específica. También se describe cuando dicho ácido nucleico comprende ADN o ARN. Esto incluye cuando dicho ácido nucleico comprende ADN metilado. También se describe cuando dicho ADN metilado es ADN metilado circulante de una secuencia específica.
- 10 En una realización la invención implica la medición de nucleosomas circulantes en la sangre, suero o plasma en una etapa en particular del ciclo menstrual en la cual se predice que los niveles son altos o bajos. En una realización preferida la invención implica la medición de nucleosomas circulantes en sangre, suero o plasma tomada durante la fase del ciclo menstrual que coincide con un pico en la muerte celular. Estas mediciones no se llevaron a cabo anteriormente en momentos determinados.
- 15 También se describe una medición de ácidos nucleicos circulantes, tales como ADN o ARN, en la sangre, suero o plasma en una etapa en particular del ciclo menstrual en la cual se predice que los niveles son altos o bajos. Esto conlleva la medición de ácidos nucleicos circulantes en sangre, suero o plasma tomada durante la fase del ciclo menstrual que coincide con un pico en la muerte celular. Estas mediciones no se llevaron a cabo anteriormente en
- 20 momentos determinados.
- También se describe la medición de ácidos nucleicos circulantes, tales como ADN o ARN, de secuencias específicas, en sangre, suero o plasma en una etapa en particular del ciclo menstrual en la cual se predice que los niveles son altos o bajos. Esto conlleva la medición de ácidos nucleicos circulantes de secuencias específicas en
- 25 sangre, suero o plasma tomada durante la fase del ciclo menstrual que coincide con un pico en la muerte celular. Estas mediciones no se llevaron a cabo anteriormente en momentos determinados.
- También se describe la medición de ácidos nucleicos circulantes que se han alterado epigenéticamente, tales como ADN metilado, en la sangre, suero o plasma en una etapa en particular del ciclo menstrual en la cual se predice que
- 30 los niveles son altos o bajos. Esto conlleva la medición de ácidos nucleicos alterados epigenéticamente circulantes en sangre, suero o plasma tomada durante la fase del ciclo menstrual que coincide con un pico en la muerte celular. Estas mediciones no se llevaron a cabo anteriormente en momentos determinados.
- También se describe la medición de ácidos nucleicos circulantes que se han alterado epigenéticamente, tales como
- 35 ADN metilado, de secuencias específicas en sangre, suero o plasma en una etapa en particular del ciclo menstrual en la cual se predice que los niveles son altos o bajos, o que la modificación epigenética del ácido nucleico difiere. Esto conlleva la medición de ácidos nucleicos alterados epigenéticamente circulantes de secuencias específicas en sangre, suero o plasma tomada durante la fase del ciclo menstrual que coincide con un pico en la muerte celular. Estas mediciones no se llevaron a cabo anteriormente en momentos determinados.
- 40 También se describe la medición de histonas circulantes que se han alterado epigenéticamente mediante modificaciones postraduccionales, o la medición de nucleosomas que contienen dichas histonas modificadas, en la sangre, suero o plasma en una etapa en particular del ciclo menstrual en la cual se predice que los niveles son altos o bajos o bien en términos absolutos o como una proporción de nucleosomas totales. Esto conlleva la medición de
- 45 histonas o nucleosomas alterados epigenéticamente circulantes en sangre, suero o plasma tomada durante la fase del ciclo menstrual que coincide con un pico en la muerte celular. Estas mediciones no se llevaron a cabo anteriormente en momentos determinados.
- En una realización preferida la invención implica la medición de nucleosomas intactos en la sangre, suero o plasma
- 50 en dos o más etapas del ciclo menstrual en las cuales se predice que los niveles son altos o bajos, demostrando de este modo que los niveles de nucleosomas en sangre, suero o plasma son variables durante el ciclo menstrual. En una realización particularmente preferida se miden los nucleosomas intactos en dos muestras tomadas durante la fase menstrual (días 1-5) y durante la fase lútea (días 18-28) del ciclo menstrual, o en dos muestras tomadas durante la fase folicular (días 6-12) y durante la fase lútea (días 18-28) del ciclo menstrual. La diferencia en niveles
- 55 de nucleosoma intacto entre las dos muestras que refleja el pico de muerte celular que luego remite se toma como un indicador de la presencia de endometriosis en la paciente.
- También se describe la medición de un biomarcador de inflamación circulante, tal como proteína C reactiva u otros marcadores de inflamación como se definen anteriormente, en la sangre, suero o plasma en dos o más etapas del
- 60 ciclo menstrual en las cuales se predice que los niveles son altos o bajos. Por lo tanto, dicha realización demostrará

que los niveles de biomarcador de inflamación en sangre, suero o plasma son variables durante el ciclo menstrual. Esto incluye cuando un marcador circulante de inflamación se mide en dos muestras tomadas durante el menstuo y durante la fase lútea del ciclo menstrual. La diferencia en niveles de marcador entre las dos muestras se toma como un indicador de la presencia de endometriosis en la paciente.

5

También se describe la medición de ácidos nucleicos circulantes, tales como ADN o ARN, en la sangre, suero o plasma en dos o más etapas del ciclo menstrual en las cuales se predice que los niveles son altos o bajos, demostrando de este modo que los niveles de ácido nucleico en sangre, suero o plasma son variables bajo la influencia del ciclo menstrual. Esto conlleva la medición de ácido nucleico circulante en dos muestras tomadas durante el menstuo y durante la fase lútea del ciclo menstrual, o en dos muestras tomadas durante la fase folicular y durante la fase lútea del ciclo menstrual. La diferencia en niveles de ácidos nucleicos circulantes entre las dos muestras se toma como un indicador de la presencia de endometriosis en la paciente.

10

También se describe la medición de tanto un biomarcador de muerte celular como un biomarcador de inflamación, en la sangre, suero o plasma en dos o más etapas del ciclo menstrual en las cuales se predice que los niveles son altos o bajos, demostrando de este modo que los niveles de biomarcador son variables bajo la influencia del ciclo menstrual. Esto incluye cuando se miden biomarcadores circulantes en dos muestras tomadas durante el menstuo y durante la fase lútea del ciclo menstrual, o en dos muestras tomadas durante la fase folicular y durante la fase lútea del ciclo menstrual. La diferencia en niveles de biomarcadores circulantes entre las dos muestras se toma como un indicador de la presencia de endometriosis en la paciente. La medición de un biomarcador de tanto inflamación como muerte celular en muestras de sangre, suero o plasma para la detección de endometriosis no ha sido investigada anteriormente. Aprenderán los expertos en la técnica que una ventaja de la presente descripción es la sensibilidad clínica aumentada respecto de procedimientos previos debido a la facilidad para detectar crecimientos asociados a un aumento en marcadores circulatorios de muerte celular pero no asociados a un aumento en marcadores circulatorios de inflamación y viceversa. Esto puede suceder por ejemplo para un crecimiento que muestra muerte celular pero que está ubicado en una posición donde esta muerte celular provoca inflamación mínima o para un crecimiento que muestra inflamación considerable para una cantidad mínima de muerte celular debido a su ubicación.

15

20

25

También se describe la medición de ácidos nucleicos circulantes, tales como ADN o ARN, de secuencias específicas en la sangre, suero o plasma en dos o más etapas del ciclo menstrual en las cuales se predice que los niveles son altos o bajos, demostrando de este modo que los niveles de ácido nucleico en sangre, suero o plasma son variables bajo la influencia del ciclo menstrual. Esto incluye cuando se mide ácido nucleico circulante de una secuencia específica en dos muestras tomadas durante el menstuo y durante la fase lútea del ciclo menstrual, o en dos muestras tomadas durante la fase folicular y durante la fase lútea del ciclo menstrual. La diferencia en niveles de ácidos nucleicos circulantes de secuencia específica entre las dos muestras se toma como un indicador de la presencia de endometriosis en la paciente.

30

35

40

45

50

55

60

También se describe la medición de ácidos nucleicos circulantes, que han sido alterados epigenéticamente, tales como ADN metilado, en la sangre, suero o plasma en dos o más etapas del ciclo menstrual en las cuales se predice que los niveles son altos o bajos ya sea en términos absolutos o respecto de otros niveles de ácido nucleico, demostrando de este modo que los niveles de ácido nucleico en sangre, suero o plasma son variables bajo la influencia del ciclo menstrual. Esto conlleva la medición de ácido nucleico circulante en dos muestras tomadas durante el menstuo y durante la fase lútea del ciclo menstrual, o en dos muestras tomadas durante la fase folicular y durante la fase lútea del ciclo menstrual. La diferencia en niveles de ácidos nucleicos alterados epigenéticamente de secuencia específica entre las dos muestras se toma como un indicador de la presencia de endometriosis en la paciente.

También se describe la medición de ácidos nucleicos circulantes que han sido alterados epigenéticamente, tales como ADN metilado, de secuencias específicas en la sangre, suero o plasma en dos o más etapas del ciclo menstrual en las cuales se predice que los niveles son altos o bajos ya sea en términos absolutos o respecto de otros niveles de ácido nucleico, demostrando de este modo que los niveles de ácido nucleico en sangre, suero o plasma, o la modificación epigenética del ácido nucleico, son variables bajo la influencia del ciclo menstrual. Esto incluye la medición de ácido nucleico circulante de secuencia específica en dos muestras tomadas durante el menstuo y durante la fase lútea del ciclo menstrual, o en dos muestras tomadas durante la fase folicular y durante la fase lútea del ciclo menstrual. La diferencia en niveles de ácidos nucleicos alterados epigenéticamente de secuencia específica entre las dos muestras se toma como un indicador de la presencia de endometriosis en la paciente.

También se describe la medición de histonas circulantes que han sido alteradas epigenéticamente mediante modificaciones postraduccionales de histonas componentes, o la medición de nucleosomas que contienen dichas

- histonas modificadas, en la sangre, suero o plasma en dos o más etapas del ciclo menstrual en las cuales se predice que los niveles son altos o bajos ya sea en términos absolutos o como una proporción de los nucleosomas totales, demostrando de este modo que el nucleosoma modificado o los niveles de histona modificada en sangre, suero o plasma, o la naturaleza de las modificaciones, son variables bajo la influencia del ciclo menstrual. Las histonas o nucleosomas modificados epigenéticamente pueden medirse en dos muestras tomadas durante el menstru
- 5 durante la fase lútea del ciclo menstrual, o en dos muestras tomadas durante la fase folicular y durante la fase lútea del ciclo menstrual. La diferencia en niveles o naturaleza de histonas o nucleosomas modificados epigenéticamente entre las dos muestras se toma como un indicador de la presencia de endometriosis en la paciente.
- 10 En una realización, se miden los niveles de nucleosoma en sangre, suero o plasma después del tratamiento con una hormona u otra sustancia que produce un aumento o disminución en los niveles de nucleosomas en sangre, suero o plasma en pacientes con crecimientos ginecológicos. Dichas hormonas son conocidas en la técnica y algunas se utilizan para el tratamiento de endometriosis (Jenkins *et al*, 2008).
- 15 En una realización adicional, se miden los niveles de nucleosomas en sangre, suero o plasma antes y después del tratamiento con una hormona que produce un aumento o disminución de los niveles de nucleosomas en sangre, suero o plasma, demostrando de este modo que los niveles de nucleosomas en sangre, suero o plasma son variables bajo la influencia de las hormonas. Dichas hormonas son conocidas en la materia y algunas se utilizan para el tratamiento de endometriosis (Jenkins *et al*, 2008).
- 20 En una realización, la medición de los nucleosomas intactos comprende un inmunoensayo. Dicho inmunoensayo incluye ensayos inmunométricos tales como el ensayo enzimático-inmunométrico (ELISA), ensayo inmunométrico marcado con fluorescencia, ensayo inmunométrico marcado con fluorescencia resuelto en el tiempo, ensayo inmunométrico quimioluminiscente, ensayo inmuturbidimétrico, ensayo inmunométrico marcado con partículas y
- 25 ensayo inmuturbidimétrico y procedimientos de inmunoensayo competitivo que incluyen procedimientos de inmunoensayo competitivo de antígeno marcado y anticuerpo marcado con una variedad de tipos de marcación, incluyendo marcación radioactiva, enzimática, fluorescente, fluorescente resuelta en el tiempo y con partículas, Western blots y otros ensayos inmunológicos. Todos dichos procedimientos de inmunoensayo son bien conocidos en la técnica, véanse por ejemplo Salgame *et al*, 1997 y van Nieuwenhuijze *et al*, 2003. Un kit comercial para la medición inmunométrica (ELISA) de nucleosomas se ha utilizado para la medición de nucleosomas en sangre
- 30 (Holdenrieder *et al*, 2001).
- Los procedimientos para la medición de ácidos nucleicos circulantes en fluidos corporales son bien conocidos en la técnica e incluyen procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véanse por ejemplo Swaminathan
- 35 *et al*, 2006 y Zachariah *et al*, 2009.
- En una realización, el fluido corporal es sangre, sangre menstrual o un derivado de sangre que incluye suero y plasma. En una realización adicional, el fluido corporal es sangre. Incluso en una realización adicional, dicho fluido corporal es sangre menstrual. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, cuando sea apropiado diluirse o
- 40 concentrarse, y almacenarse de la manera habitual.
- En una realización, el procedimiento de la invención se repite en múltiples ciclos menstruales. Esta realización proporciona la ventaja de permitir la detección de los resultados que se han de monitorizar durante un periodo de tiempo determinado. Tal disposición proporcionará el beneficio de monitorizar o valorar la eficacia de tratamiento del
- 45 crecimiento ginecológico. Pueden usarse tales procedimientos de monitorización de la invención para monitorizar el inicio, avance, estabilización, mejora, recaída y/o remisión.
- Por lo tanto, también se describe un procedimiento de monitorización de la eficacia de una terapia para un crecimiento ginecológico, que comprende detectar y/o cuantificar el biomarcador presente en una muestra de
- 50 sangre, suero o plasma de dicho sujeto. En procedimientos de monitorización, pueden tomarse muestras de prueba en dos o más ocasiones. El procedimiento puede comprender además comparar el nivel del biomarcador o biomarcadores presentes en la muestra de prueba con uno o más controles y/o con una o más muestras de prueba anteriores tomadas previamente del mismo sujeto de prueba, p. ej. antes del comienzo de la terapia, y/o del mismo sujeto de prueba en una fase previa de la terapia. El procedimiento puede comprender detectar un cambio en la
- 55 naturaleza o la cantidad de biomarcador o biomarcadores en muestras de prueba tomadas en diferentes ocasiones.
- Por lo tanto, también se describe un procedimiento para monitorizar la eficacia de una terapia para endometriosis en un sujeto humano o animal que comprende:
- 60 (a) cuantificar la cantidad de biomarcador como se define en la presente memoria; y

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

5 Una disminución en el nivel del biomarcador en la muestra de prueba respecto del nivel en una muestra de prueba anterior tomada previamente del mismo sujeto de prueba es indicativo de un efecto beneficioso, p. ej., estabilización o mejora, de dicha terapia sobre el trastorno o trastorno sospechado. En una realización preferida el biomarcador se medirá en muestras de repetición tomadas durante la fase lútea (días 18-28) de una pluralidad de ciclos menstruales.

10 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 farmacológicas y combinaciones de sustancias.

15 De manera apropiada, el tiempo transcurrido entre la toma de muestras de un sujeto sometido a detección o monitorización puede ser la longitud del ciclo menstrual del sujeto o cualquier múltiplo de la misma. Para sujetos con una longitud de ciclo típica de 4 semanas (28 días) puede ser cualquiera de 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 semanas o más. Apreciarán los expertos en la técnica que la medición durante el menstuo también se puede llevar a cabo tomando muestras durante la menstruación o sangrado del sujeto y que este puede ser el mejor
20 procedimiento para pacientes con endometriosis que tienen ciclos menstruales irregulares. Las muestras se pueden tomar antes y/o durante y/o después de terapia de endometriosis. Las muestras se pueden tomar en intervalos durante el periodo de vida restante, o parte de dicho periodo, de un sujeto.

Además, una vez que se ha completado el tratamiento, puede repetirse el procedimiento de la invención
25 periódicamente para monitorizar la recurrencia del crecimiento ginecológico.

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

30 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para identificar un biomarcador de componente de nucleosoma para detectar la presencia de endometriosis en un sujeto humano o animal que comprende las etapas de (i) determinar el día o fase del ciclo menstrual; (ii) medir un biomarcador de muerte celular, apoptosis, crecimiento celular o inflamación en una primera y segunda muestra que se han obtenido de dicho sujeto en dos o más momentos distintos durante el ciclo menstrual, caracterizado porque una primera
35 muestra se toma durante la fase menstrual del ciclo menstrual y una segunda muestra se toma durante o bien la fase folicular o lútea del ciclo menstrual, donde la primera y segunda muestra son una muestra de sangre, suero o plasma; y (iii) determinar si la cantidad de dicho biomarcador varía durante el ciclo menstrual, de modo que el control o la influencia de dicho biomarcador indica la identidad de un biomarcador.

40 El término «identificar» como se usa en el presente documento significa confirmar la presencia del biomarcador presente en la muestra de sangre, suero o plasma. Cuantificar la cantidad de biomarcador presente en una muestra puede incluir determinar la concentración del biomarcador presente en la muestra. La identificación y/o cuantificación puede practicarse directamente en la muestra, o indirectamente en un extracto de la misma, o en una dilución de la misma.

45 En aspectos alternativos de la invención, se evalúa la presencia del biomarcador detectando y/o cuantificando el anticuerpo o fragmentos del mismo capaces de unirse de manera específica al biomarcador que se generan por el cuerpo del sujeto en respuesta al biomarcador y, por lo tanto, están presentes en una muestra de sangre, suero o plasma de un sujeto que padece endometriosis.

50 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 de sangre, suero o plasma de una paciente o una purificación o extracto de una muestra de sangre, suero o plasma o una dilución de la misma. En procedimientos de la invención, la cuantificación puede practicarse midiendo la concentración del biomarcador en la muestra o
55 muestras. Las muestras de sangre, suero o plasma que pueden analizarse en un procedimiento de la invención incluyen aquellas definidas anteriormente en el presente documento. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, cuando sea apropiado diluirse o concentrarse, y almacenarse de la manera habitual.

La identificación y/o cuantificación de los biomarcadores puede practicarse mediante la detección del biomarcador o
60 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.

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

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

20 muestra de fluido endometrial 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 las pacientes que es más probable que respondan a un tratamiento terapéutico particular, cribado y desarrollo de fármacos e identificación de nuevas dianas para tratamiento farmacológico.

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

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

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

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

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

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

50 biomarcador.

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

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

60 posición de la imagen. Para aplicaciones cualitativas y semicuantitativas, puede leerse un holograma sensor a

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

Adecuadamente, los biosensores para la detección de uno o más biomarcadores combinan el reconocimiento biomolecular con medios apropiados para convertir la detección de la presencia, o la cuantificación, del biomarcador en la muestra en una señal. Los biosensores 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, holográfico y micromanipulados. Pueden emplearse elementos de reconocimiento grabados, tecnología de transistor de película fina, dispositivos resonadores acústicos magnéticos y otros sistemas acusticoeléctricos novedosos en biosensores para la detección de uno o más biomarcadores.

Los procedimientos que implican la identificación y/o cuantificación de uno o más biomarcadores pueden practicarse en instrumentos de laboratorio o pueden incorporarse a plataformas de diagnóstico o monitorización desechables que pueden usarse en un entorno no de laboratorio, p. ej., en la consulta del médico o en el lecho del 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 lo tanto, pueden constituir la base de medicina a distancia.

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

La identificación de biomarcadores de endometriosis 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 lo 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 lo tanto, el biomarcador puede usarse para titular la dosis óptima, predecir una respuesta terapéutica positiva e identificar aquellos sujetos con alto riesgo de desarrollar 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 endometriosis leve o asintomática o que puedan tener alto riesgo de desarrollar endometriosis 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 de la 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.

Un ciclo menstrual regular de una persona sana por lo general se describe como de duración aproximadamente mensual empezando el día 0 con el inicio del menstruado cuando el revestimiento endometrial del útero se despid

junto con algo de sangre. La fase menstrual normalmente dura hasta el día 5 que marca el inicio de la fase proliferativa. La fase proliferativa implica un engrosamiento del revestimiento endometrial del útero y continúa hasta que los niveles en sangre de estrógenos, y hormonas LH y FSH llegan a su punto máximo y se produce la ovulación aproximadamente el día 14. La formación del cuerpo lúteo marca el comienzo de la fase secretora cuando los niveles de progesterona aumentan y caen nuevamente el día 28 en un ciclo de una persona sana, seguida (en ausencia de embarazo) por el inicio del menstruado posterior.

El ciclo menstrual también se describe de manera alternativa como que comprende una fase menstrual, una fase folicular, una fase peri-ovulatoria y una fase lútea. La fase menstrual se produce aproximadamente entre los días 1-5. La fase folicular implica la maduración de folículos en el ovario. Comienza con el inicio del menstruado y continúa hasta que los niveles de estrógenos y hormonas LH y FSH alcanzan su punto máximo y se produce la ovulación aproximadamente el día 14. La fase peri-ovulatoria se produce aproximadamente entre los días 14-17. La formación del cuerpo lúteo aproximadamente el día 14 marca el comienzo de la fase lútea con un aumento en los niveles de progesterona y (en ausencia de embarazo) finaliza con la luteólisis con una disminución en los niveles de progesterona normalmente el día 28 en un ciclo de una persona sana, seguida del inicio del menstruado posterior. Aprenderán los expertos en la técnica que la nomenclatura particular utilizada para el ciclo menstrual no afectará la implementación de la invención. En la presente invención se considera que la fase menstrual comienza con el inicio de la menstruación, normalmente considerada el día 0 del ciclo menstrual, y continúa por lo general en una persona sana hasta aproximadamente el día 5. En un aspecto de la invención la medición de un marcador de muerte celular o inflamación producida en pacientes con endometriosis durante el periodo del menstruado se llevará a cabo en muestras de pacientes obtenidas durante el periodo que transcurre entre el día 0 y el día 5. Aprenderán los expertos en la técnica que (i) la longitud del menstruado puede variar en pacientes individuales y (ii) que el biomarcador en la muestra de sangre, suero o plasma, producido por pacientes con endometriosis, puede no desaparecer de manera inmediata después de la finalización de la fase, pero puede disminuir lentamente durante uno, dos o unos pocos días. Por lo tanto en algunas pacientes con ciclos menstruales irregulares o ciclos particularmente largos o cortos, las fases pueden no corresponder exactamente con estos días.

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

30 Ejemplo 1

Se toman muestras de suero o plasma en serie de una paciente con endometriosis confirmada y con ausencia de endometriosis algunos días durante el ciclo menstrual y se analizan para determinar niveles de nucleosomas utilizando un ensayo ELISA de nucleosomas como el descrito por Salgame *et al*, 1997, Holdenrieder *et al*, 2001 o van Nieuwenhuijze *et al*, 2003. El día del ciclo menstrual en el cual se toma cada muestra de sangre se determina con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual o midiendo las hormonas menstruales. La diferencia en los niveles de nucleosomas que se produce entre las muestras tomadas durante el menstruado y durante la fase lútea para la paciente que dio positivo para endometriosis, pero que no se produce en la paciente que dio negativo para endometriosis se utiliza como indicador de la enfermedad.

40

Ejemplo 2

Las muestras de suero o plasma en serie se toman de una paciente con endometriosis confirmada y de una paciente con ausencia de endometriosis en algunos días durante el ciclo menstrual y se analizan para determinar niveles de ADN por PCR mediante el procedimiento de Zachariah *et al*, 2009. El día del ciclo menstrual en el cual se toma cada muestra de sangre se determina con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual o midiendo las hormonas menstruales. La diferencia en los niveles de ADN que se produce entre las muestras tomadas durante el menstruado y durante las fases lúteas para la paciente que dio positivo para endometriosis, pero que no se produce en la paciente que dio negativo para endometriosis se utiliza como indicador de la enfermedad.

50 Ejemplo 3

Las muestras de suero o plasma en serie se toman de una paciente con endometriosis confirmada y de una paciente con ausencia de endometriosis en algunos días durante el ciclo menstrual y se analizan para determinar niveles de proteína C reactiva mediante un procedimiento ELISA. El día del ciclo menstrual en el cual se toma cada muestra de sangre se determina con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual o midiendo las hormonas menstruales. La diferencia en los niveles de proteína C reactiva que se produce entre las muestras tomadas durante el menstruado y durante las fases lúteas para la paciente que dio positivo para endometriosis, pero que no se produce en la paciente que dio negativo para endometriosis se utiliza como indicador de la enfermedad.

60

EJEMPLO 4

Las muestras de suero o plasma en serie se toman de una paciente con endometriosis confirmada y de una paciente con ausencia de endometriosis en algunos días durante el ciclo menstrual y se analizan para determinar niveles de CA-125 mediante un procedimiento ELISA. El día del ciclo menstrual en el cual se toma cada muestra de sangre se determina con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual o midiendo las hormonas menstruales. La diferencia en los niveles de CA-125 que se produce entre las muestras tomadas durante el menstuo y durante las fases lúteas para la paciente que dio positivo para endometriosis, pero que no se produce en la paciente que dio negativo para endometriosis se utiliza como indicador de la enfermedad.

EJEMPLO 5

Se toma suero o plasma en serie de varias pacientes con endometriosis confirmada y con ausencia de endometriosis y se analiza para determinar niveles de nucleosomas utilizando un ensayo ELISA de nucleosomas como el descrito por Salgame *et al*, 1997, Holdenrieder *et al*, 2001 o van Nieuwenhuijze *et al*, 2003. El día del ciclo menstrual en el cual se estudia a la paciente se determina con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual. Aprenderán los expertos en la técnica que esto representa un estudio transversal, más que un estudio longitudinal, donde una única muestra tomada en una variedad de fases del ciclo menstrual se analiza en varias pacientes. Para las muestras de endometriosis positiva hay un aumento en los niveles de nucleosomas medios para muestras tomadas cerca del momento de la fase lútea y niveles inferiores para muestras tomadas durante otras fases del ciclo menstrual. Esta diferencia no se produce o es mucho menos pronunciada para muestras con ausencia de endometriosis.

Los inventores revistieron placas de microvaloración (Nunc F8 Maxisorp) con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-nucleosoma en 100ul de tampón fosfato 0,1M pH 7,4 durante 18 horas a 4 °C. Se retiró el exceso de anticuerpo lavando dos veces con tampón fosfato 0,1M pH 7,4 y los pocillos se bloquearon añadiendo 200ul de albúmina de suero bovino al 2 % en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 y dejando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se retiró el exceso de seroalbúmina bovina lavando tres veces con 200ul de tampón fosfato 0,1M pH 7,4. A cada pocillo se le añadieron 10ul de una muestra de suero de una fase definida del ciclo menstrual de una mujer con o sin endometriosis y 50ul de tampón de ensayo (TRIS/HCl 0,05M pH 7,5 con NaCl al 0,9 % p/v, desoxicolato sódico al 0,05 % p/v y Tween 20 al 1 % v/v). Los pocillos se incubaron durante 18 horas a 4 °C. A continuación se decantó el suero y se eliminó lavando tres veces con 200ul de tampón de lavado (TRIS/HCl 0,05M pH 7,5 con Tween 20 al 1 % v/v). Se añadió anticuerpo anti-nucleosoma biotinilado en tampón de ensayo y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación. El exceso de anticuerpo biotinilado no unido se decantó y los pocillos se lavaron nuevamente tres veces. Se añadió conjugado de peroxidasa de estreptavidina-rábano picante en tampón de ensayo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. El exceso de conjugado de estreptavidina no unido se decantó y los pocillos se lavaron nuevamente tres veces. Se añadió sustrato enzimático (100ul de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y se incubó durante aproximadamente 15 minutos con agitación y el color producido se leyó en un lector de placas a una longitud de onda de 405nm. La intensidad de color se utilizó como una medida del nivel de nucleosomas presente en la muestra de suero (unidades de densidad óptica arbitrarias). Los resultados se resumen en la Tabla 1 y la Figura 1 y muestran que el nivel de nucleosomas circulantes presentes durante la fase lútea es superior que durante el menstuo y este efecto es mayor en mujeres con endometriosis que en mujeres sin endometriosis. Por lo tanto, un gran aumento en los niveles de nucleosomas en la fase lútea respecto de los presentes en el menstuo es indicador de endometriosis.

Tabla 1

| Niveles medios de nucleosomas circulantes detectados en mujeres con y sin endometriosis durante las fases menstrual o lútea (unidades arbitrarias) | | |
|---|------------------------|------------------------|
| Fase | Endometriosis positiva | Endometriosis negativa |
| Menstruo | No detectable | 0,12 |
| Fase lútea | 0,24 | 0,04 |

EJEMPLO 6

Se toma suero o plasma de varias pacientes con endometriosis confirmada y con ausencia de endometriosis y se analiza para determinar niveles de ADN por PCR mediante el procedimiento de Zachariah *et al*, 2009. El día del ciclo menstrual en el cual se estudia cada paciente se determina con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual o midiendo las hormonas menstruales. Aprenderán los expertos en la técnica que esto representa un estudio transversal, donde una única muestra tomada en una variedad de fases del ciclo menstrual se analiza en varias pacientes. Para las muestras de endometriosis positiva hay un aumento en los niveles medios de ADN para

muestras tomadas cerca del momento de la fase lútea y niveles inferiores para muestras tomadas durante otras fases del ciclo menstrual. Esta diferencia no se produce o es mucho menos pronunciada para muestras con ausencia de endometriosis.

5 EJEMPLO 7

Se toma suero o plasma de varias pacientes con endometriosis confirmada o con ausencia de endometriosis y se analiza para determinar niveles de proteína C reactiva mediante el procedimiento ELISA. El día del ciclo menstrual en el cual se estudia cada paciente se determina con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual o
10 midiendo las hormonas menstruales. Aprenderán los expertos en la técnica que esto representa un estudio transversal, donde una única muestra tomada en una variedad de fases del ciclo menstrual se analiza en varias pacientes. Para las muestras de endometriosis positiva hay un aumento en los niveles medios de proteína C reactiva para muestras tomadas cerca del momento del menstruio y niveles inferiores para muestras tomadas durante las fases lúteas del ciclo menstrual. Esta diferencia no se produce o es mucho menos pronunciada para muestras con
15 ausencia de endometriosis.

EJEMPLO 8

Se toma suero o plasma de un sujeto en días de dos etapas distintas del ciclo menstrual y se analiza para
20 determinar niveles de nucleosomas utilizando un ensayo ELISA de nucleosomas.

Los días del ciclo menstrual en los cuales se estudia la paciente se determinan con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual o midiendo las hormonas menstruales. Una de las muestras se toma durante el menstruio y la otra se toma durante la fase lútea del ciclo menstrual. Si la diferencia en niveles de nucleosomas que se produce
25 entre las muestras tomadas durante el menstruio y durante las fases lúteas excede un valor de corte predeterminado el sujeto se considera positivo para endometriosis. Si los niveles de nucleosomas son insuficientemente distintos entre las fases menstrual y lútea y esta diferencia no excede el valor de corte, el sujeto se considera negativo para endometriosis.

30 EJEMPLO 9

Se toma suero o plasma de una paciente en días de dos etapas distintas del ciclo menstrual y se analiza para determinar niveles de ADN por PCR mediante el procedimiento de Zachariah *et al*, 2009. Los días del ciclo menstrual en los cuales se estudia la paciente se determinan con referencia al inicio o finalización del sangrado
35 menstrual o midiendo las hormonas menstruales. Una de las muestras se toma durante el menstruio y la otra se toma durante la fase lútea del ciclo menstrual. Si la diferencia en niveles de ADN que se produce entre las muestras tomadas durante el menstruio y durante las fases proliferativa o secretora tardías excede un valor de corte predeterminado el sujeto se considera positivo para endometriosis. Si los niveles de ADN medidos son insuficientemente distintos entre las fases menstrual y lútea y esta diferencia no excede el valor de corte, el sujeto se
40 considera negativo para endometriosis.

EJEMPLO 10

Se toma suero o plasma de un sujeto en días de dos etapas distintas del ciclo menstrual y se analiza para
45 determinar niveles de proteína C reactiva utilizando un procedimiento ELISA. Los días del ciclo menstrual en los cuales se estudia la paciente se determinan con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual o midiendo las hormonas menstruales. Una de las muestras se toma durante el menstruio y la otra se toma durante la fase lútea del ciclo menstrual. Si la diferencia en niveles de proteína C reactiva que se produce entre las muestras tomadas durante el menstruio y durante las fases lúteas excede un valor de corte predeterminado el sujeto se considera
50 positivo para endometriosis. Si los niveles de proteína C reactiva medidos son insuficientes y esta diferencia no excede el valor de corte, el sujeto se considera negativo para endometriosis.

EJEMPLO 11

55 Se toma suero o plasma de un sujeto previamente diagnosticado con endometriosis en un día del ciclo menstrual durante el menstruio que se predice tiene niveles de nucleosomas elevados y se analiza para determinar niveles de nucleosomas utilizando un ensayo ELISA de nucleosomas tal como el que describen Salgame *et al*, 1997, Holdenrieder *et al*, 2001 o van Nieuwenhuijze *et al*, 2003. El proceso se repite el mismo día del ciclo menstrual de ciclos menstruales posteriores durante el tratamiento para la enfermedad. Los días del ciclo menstrual en los cuales
60 se estudia la paciente se determinan con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual o midiendo las

hormonas menstruales. El nivel de nucleosomas en el suero o plasma en el tiempo se utiliza para monitorizar la eficacia del tratamiento. Aprenderán los expertos en la técnica que otros biomarcadores de muerte celular o inflamación incluyendo, sin carácter restrictivo, ácidos nucleicos o proteína C reactiva se pueden utilizar de la misma manera para monitorizar la eficacia del tratamiento.

5

EJEMPLO 12

Se toma suero o plasma de un sujeto previamente diagnosticado con endometriosis en un día del ciclo menstrual durante el menstruado que se predice tiene niveles de nucleosomas elevados y se analiza para determinar niveles de nucleosomas utilizando un ensayo ELISA de nucleosomas. El proceso se repite el mismo día del ciclo menstrual de ciclos menstruales posteriores. Los días del ciclo menstrual en los cuales se estudia la paciente se determinan con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual o midiendo las hormonas menstruales. El nivel de nucleosomas en el suero o plasma en el tiempo se utiliza para monitorizar a la paciente en cuanto al retorno de la enfermedad. Aprenderán los expertos en la técnica que otros biomarcadores de muerte celular o inflamación incluyendo, sin carácter restrictivo, ácidos nucleicos o proteína C reactiva se pueden utilizar de la misma manera para monitorizar el retorno de la enfermedad.

EJEMPLO 13

Se toma suero o plasma de una paciente con endometriosis confirmada y de una paciente sana un día durante la fase lútea del ciclo menstrual y se analiza para determinar niveles de nucleosomas utilizando un ensayo ELISA de nucleosomas como el descrito por Salgame *et al*, 1997, Holdenrieder *et al*, 2001 o van Nieuwenhuijze *et al*, 2003. El día del ciclo menstrual en el cual se toma cada muestra de sangre se determina con referencia al inicio o finalización del sangrado menstrual o midiendo las hormonas menstruales. Se observa un nivel elevado de nucleosomas en la paciente positiva para endometriosis y un nivel inferior en la paciente sana. Aprenderán los expertos en la técnica que otros biomarcadores de muerte celular o inflamación incluyendo, sin carácter restrictivo, ácidos nucleicos y proteína C reactiva se pueden utilizar de la misma manera como un indicador de endometriosis siempre y cuando las muestras se tomen en un momento apropiado durante el ciclo menstrual cuando se estén produciendo inflamación y muerte celular en pacientes positivos para endometriosis.

30

REFERENCIAS

- Abrao *et al* Euro Soc Human Repro and Embry. 1997 12(11): 2523-2527
 Abrao *et al* Int J Gyn & Obs 1999 66:19-22
- 35 Agic *et al* Reprod Sci. 2008 Nov;15(9):906-11;
 Baldi *et al* Oncology Reports 2008 19: 843-846;
 Bulun N Engl J Med 2009; 360: 268-79;
 de Almeida Filho *et al* Sao Paulo Med J. 2008 Nov;126(6):305-8;
 D'Hooghe and Hummelshoj Human Reproduction 2006 Vol.21, No.11 pp. 2743-2748;
- 40 D'Hooghe *et al* Gynecol Obstet Invest. 2006;62(3):139-47;
 Fairbanks *et al* Fertility and Sterility 2009 19(2) 320-324
 Flores *et al* Fertil Steril. 2007 May;87(5):1180-99;
 Gao *et al* Curr Med Res Opin. 2006 Sep;22(9):1787-97;
 Holdenrieder and Stieber Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 2009; 46(1): 1-24;
- 45 Holdenrieder *et al* Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 2001; 95, 114-120 (2001);
 Jenkins *et al* J Minim Invasive Gynecol. 2008 Jan-Feb;15(1):82-6;
 Kennedy Fertil Steril. 2006 Nov;86(5):1296-301;
 Kennedy *et al* Hum Reprod. 2005 Oct;20(10):2698-704;
 Lermann *et al* Fertil Steril. 2009 Feb 14. [Epub ahead of print];
- 50 Othman *et al* European J Obstet & Gynecol and Reprod Biology, 2008, Vol. 137, 240-246
 Pasoto *et al* 2008 Handbook of Systemic Autoimmune Diseases Vol.9: 103-111
 Salgame *et al* Nucleic Acids Research, 1997, Vol. 25, No. 3, 680-681;
 Seeber *et al* Fertil Steril. 2009 Feb 19. [Epub ahead of print];
 Sherwin *et al* Hum Reprod. 2008 May;23(5):1063-8;
- 55 Signorile *et al* J Exp & Clin Cancer Res. 2009 28:49;
 Swaminathan and Butt Ann N Y Acad Sci. 2006 Sep;1075:1-9;
 Templeman C. Obstet Gynecol Clin North Am. 2009 Mar;36(1):177-85;
 Van Gorp *et al* Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2004 Apr;18(2):349-71;
 van Nieuwenhuijze *et al* Ann Rheum Dis 2003;62:10-14;
- 60 Zachariah *et al* Reproductive BioMedicine Online; 2009;Vol 18 No 3. 407-411;

Zachariah et al *Obstetrics & Gynaecology*; 2008:Vol 112 No 4. 843-850
Zhang et al *Chin Med J (Engl)*. 2009 Feb 20;122(4):373-6.
Zhang et al *Fertility and Sterility*, 2007, Vol. 88, No.3, 594-599

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de endometriosis en un sujeto humano o animal que comprende las etapas de:
- 5
- (i) determinar el día o fase del ciclo menstrual;
 - (ii) medir un nucleosoma intacto en muestras de sangre, suero o plasma que se han obtenido de dicho sujeto en dos momentos diferentes durante el ciclo menstrual, **caracterizado porque** una primera muestra se toma durante la fase menstrual del ciclo menstrual y una segunda muestra se toma durante la fase folicular o lútea del ciclo menstrual; y
 - 10 (iii) utilizar los niveles del nucleosoma intacto en, y la diferencia en niveles de biomarcadores entre, las dos muestras como indicador de la presencia de endometriosis en el sujeto humano o animal.
2. Un procedimiento *in vitro* como se define en la reivindicación 1, en el que dicha primera muestra se toma durante los días 1-5 del ciclo menstrual y dicha segunda muestra se toma durante el periodo que comienza el
- 15 día 18 del ciclo menstrual y que termina con el inicio del menstruado en el posterior ciclo menstrual.
3. Un procedimiento *in vitro* como se define en la reivindicación 1, en el que dicha primera muestra se toma durante el tiempo que la sujeto está sangrando debido a la menstruación y dicha segunda muestra se toma cuando la paciente no está sangrando debido a la menstruación.
- 20
4. Un procedimiento *in vitro* como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de determinar el día o fase del ciclo menstrual se determina por referencia a los síntomas de la paciente en relación con el ciclo menstrual, tales como temperatura, dolor e inicio o finalización del sangrado menstrual.
- 25
5. Un procedimiento *in vitro* como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de determinar el día o fase del ciclo menstrual se determina por la medición de las hormonas o metabolitos menstruales.
6. Un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de endometriosis en un sujeto humano o animal
- 30 que comprende las etapas de:
- (i) medir un nucleosoma intacto en una muestra de sangre, suero o plasma que se ha obtenido de un sujeto en el que dicho sujeto ha recibido una hormona exógena, o análogo de hormona, o agonista de hormona, o antagonista de hormona, o un fármaco o un esteroide anticonceptivo u otra sustancia prevista para inducir una respuesta
 - 35 ginecológica en una prueba de estimulación o represión; y
 - (ii) determinar si la cantidad del nucleosoma intacto presente en la muestra de sangre, suero o plasma del sujeto se altera con la administración de dicha sustancia exógena de forma que cualquier muerte celular detectada por la liberación de un nucleosoma intacto se asocie con endometriosis.
- 40
7. Un procedimiento *in vitro* como se define en la reivindicación 6, en el que dicha hormona exógena comprende un anticonceptivo u otro esteroide.
8. Un procedimiento *in vitro* como se define en la reivindicación 6 o reivindicación 7, en el que dicha
- 45 medición comprende mediciones antes de, en o cerca del momento de administración.
9. Un procedimiento *in vitro* como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que se repite en múltiples ciclos menstruales.
- 50
10. Uso de un kit para diagnosticar o monitorizar endometriosis que comprende un ligando o aglutinante específico para un nucleosoma intacto junto con instrucciones para uso del kit de acuerdo con cualquiera de los procedimientos definidos en las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un procedimiento *in vitro* para identificar un biomarcador de componente de nucleosoma para detectar
- 55 la presencia de endometriosis en un sujeto humano o animal que comprende las etapas de:
- (i) determinar el día o fase del ciclo menstrual;
 - (ii) medir un nucleosoma intacto en una primera y una segunda muestra que se han obtenido de dicho sujeto en dos momentos diferentes durante el ciclo menstrual, **caracterizado porque** una primera muestra se toma durante la fase
 - 60 menstrual del ciclo menstrual y una segunda muestra se toma durante o bien la fase folicular o lútea del ciclo

menstrual, donde la primera y la segunda muestra son una muestra de sangre, suero o plasma; y
(iii) determinar si la cantidad del nucleosoma intacto es controlada o influenciada por el ciclo menstrual, de modo que el control o influencia indican la identidad del biomarcador.

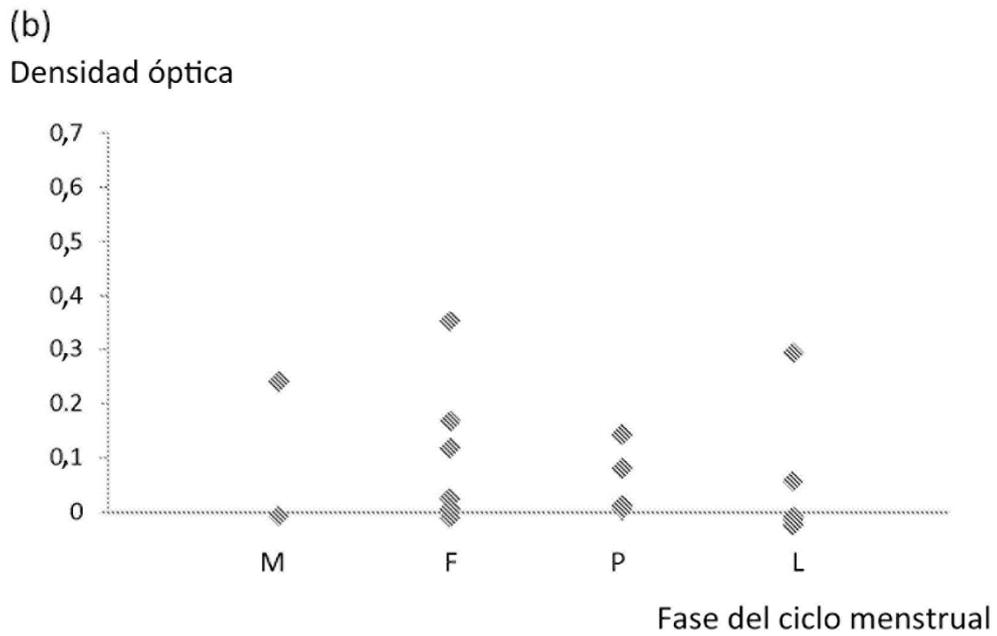
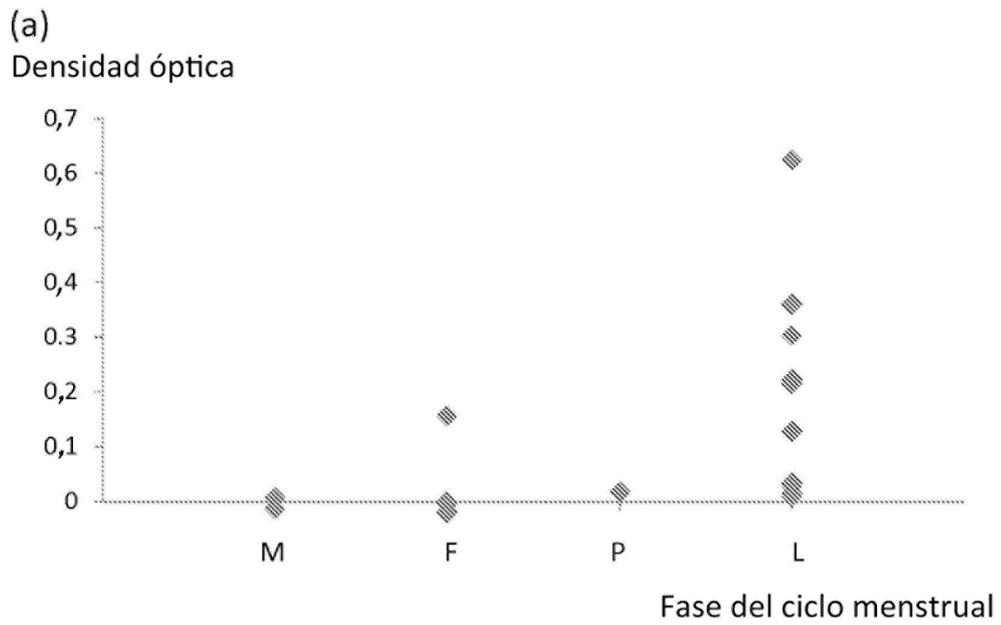


FIGURA 1