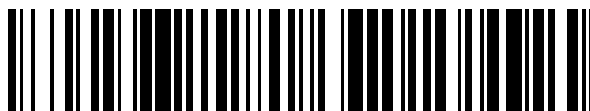


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 659**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2012 PCT/GB2012/052128**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13030577**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2012 E 12756549 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2751568**

54 Título: **Procedimiento para la detección de nucleosomas que contienen nucleótidos**

30 Prioridad:

**01.09.2011 GB 201115095**  
**01.09.2011 US 201161530295 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.06.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MICALLEF, JACOB VINCENT**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 717 659 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 la detección de nucleosomas que contienen nucleótidos

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un procedimiento para la detección y medida de la presencia de mononucleosomas y oligonucleosomas y nucleosomas que contienen nucleótidos particulares y al uso de tales medidas para la detección y el diagnóstico de enfermedades. La invención también se refiere a un procedimiento para la identificación de nucleosomas asociados con biomarcadores nucleótidos para la detección y el diagnóstico de una enfermedad y de los biomarcadores identificados por dicho procedimiento.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

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

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

Se pueden detectar mononucleosomas y oligonucleosomas por ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA) y se han reseñado varios procedimientos (Salgame y col., 1997; Holdenrieder y col., 2001; van Nieuwenhuijze y col., 2003). Estos ensayos emplean típicamente un anticuerpo antihistona (por ejemplo, anti-H2B, anti-H3 o anti-H1, H2A, H2B, H3 y H4) como anticuerpo de captura y un anticuerpo anti-ADN o anticomplejo de ADN de H2A-H2B como anticuerpo de detección. Usando estos ensayos, los trabajadores en el campo reseñan que el nivel de nucleosomas en el suero es más alto (hasta en un orden de magnitud) que en las muestras de plasma tomadas de los mismos pacientes. Esto también es cierto para las mediciones de ADN en suero y plasma realizadas por PCR (Holdenrieder y

col., 2005). Se desconoce el motivo, pero los autores especulan que puede deberse a una liberación adicional de ADN durante el proceso de coagulación. Sin embargo, se ha encontrado que los resultados de los ensayos ELISA de nucleosoma de la técnica actual no coinciden entre sí. Además, aunque la mayoría del ADN en circulación en suero o plasma se reseña que existe como mononucleosomas y oligonucleosomas (Holdenrieder y col., 2001), los niveles

- 5 medidos de nucleosomas y ADN en suero o plasma no coinciden bien. El coeficiente de correlación entre los resultados de ELISA para niveles de nucleosomas exentos de célula en circulación y los niveles de ADN en circulación medidos por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) instantánea se ha reseñado que es de  $r = 0,531$  en suero y de  $r = 0,350$  en plasma (Holdenrieder y col., 2005).
- 10 Se usan procedimientos ELISA de nucleosoma en cultivo celular, principalmente como procedimiento para detectar la apoptosis (Salgame y col., 1997; Holdenrieder y col., 2001; van Nieuwenhuijze y col., 2003) y se usan también para la medida de los nucleosomas exentos de célula en circulación en suero y plasma (Holdenrieder y col., 2001). Se han medido los niveles sérico y plasmático de nucleosomas exentos de célula liberados en la circulación por células moribundas mediante procedimientos de ELISA en estudios de una serie de cánceres diferentes para evaluar su uso
- 15 como biomarcador potencial (Holdenrieder y col., 2001). Se reseña que los niveles medios de nucleosomas en circulación son altos en la mayoría, pero no en todos, los cánceres estudiados. Se observaron los niveles de nucleosomas en circulación máximos en sujetos de cáncer de pulmón. Se observaron los niveles mínimos en cáncer de próstata, que estaban dentro del intervalo normal de sujetos sanos. Sin embargo, se reseña que los sujetos con tumores malignos tienen concentraciones séricas de nucleosomas que variaban considerablemente, y se encontró
- 20 que algunos sujetos con enfermedad tumoral avanzada tenían bajos niveles de nucleosomas en circulación, dentro del intervalo medido para sujetos sanos (Holdenrieder y col., 2001). Debido a esto y a la variedad de causas no cancerosas de los niveles elevados de nucleosomas, los niveles de nucleosomas en circulación no se usan clínicamente como biomarcador de cáncer (Holdenrieber y Stieber, 2009). Sorprendentemente, se ha demostrado que muchos sujetos con cáncer cuyos niveles de nucleosomas en circulación son bajos o no detectables medidos mediante
- 25 estos procedimientos ELISA de nucleosoma de la técnica actual, de hecho tienen niveles elevados de nucleosomas exentos de célula en circulación. Se han diseñado y demostrado procedimientos de ELISA novedosos que detectan los nucleosomas que no se detectaban mediante procedimientos de ELISA de la técnica actual.

Los procedimientos de ELISA para la detección de MPT de histona también se conocen en la técnica. Los

30 procedimientos de ELISA para la detección de MPT en proteínas de histonas libres (no unidas a otras histonas y ADN en complejo de nucleosomas) se usan para la detección de MPT en histonas extraídas, generalmente por extracción ácida, de lisados celulares. Se ha reseñado un inmunoensayo para la detección de MPT en nucleosomas exentos de célula en circulación (Bawden y col., 2005). Recientemente, se ha reseñado un procedimiento de ELISA para la detección de MPT de histonas en nucleosomas purificados recubiertos directamente en pocillos de microvaloración

35 (Dai y col., 2011). En este procedimiento, los nucleosomas obtenidos por digestión de extractos de cromatina de células cultivadas se recubren directamente en pocillos de microtitulación y se hacen reaccionar con anticuerpos anti-MPT. Resultará evidente para los especialistas en la materia que este procedimiento requiere muestras de nucleosomas relativamente puras y no es adecuado para la medición directa de MPT de histona en medios biológicos complejos tales como sangre, plasma o suero.

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

45 Las variantes de histona (también conocidas como isoformas de histona) son conocidas por estar implicadas en la regulación epigenética de la expresión génica (Herranz y Esteller, 2007). Las variantes de histona se han estudiado *in vivo* e *in vitro* con una variedad de técnicas incluyendo estudios de inactivación del gen que codifica una variante particular (por ejemplo, usando la inactivación por ARNi), inmunoprecipitación de cromatina, marcaje de aminoácidos

50 con isótopos estables y proteómica cuantitativa mediante espectrometría de masas, inmunohistoquímica y transferencia Western (Whittle y col., 2008; Boulard y col., 2010; Sporn y col., 2009; Kapoor y col., 2010; Zee y col., 2010; Hua y col., 2008).

Se han reseñado estudios de inmunohistoquímica de la expresión de variantes de histona en muestras de tejido

55 extirpadas en cirugía o mediante biopsia de sujetos diagnosticados con cáncer de pulmón, cáncer de mama y melanoma. Estos estudios de inmunohistoquímica reseñan que la tinción de las variantes de histona macroH2A (mH2A) y H2AZ en muestras de tejido de cáncer resecado puede tener aplicación pronóstica en estos cánceres (Sporn y col., 2009, Hua y col., 2008, Kapoor y col., 2010). Una desventaja de los procedimientos inmunohistoquímicos para uso clínico es que la recogida de muestra de tejido es invasiva al implicar cirugía o biopsia. Otra desventaja de los

60 procedimientos de inmunohistoquímica es que no son aptos para el diagnóstico precoz o para el diagnóstico de

detección, ya que normalmente existe una expectativa razonable de la enfermedad antes de que se realice una biopsia o una resección del tejido. Las pruebas de ELISA en sangre mínimamente invasivas son adecuadas para una variedad más amplia de aplicaciones y superarían estas desventajas y serían preferibles para el paciente, así como también más rápidas, de menor coste y de mayor rendimiento para el profesional médico.

5

Sin embargo, las variantes de histona exentas de célula en los nucleosomas exentos de célula no se han medido en sangre o en otros medios. No se han informado estudios sobre la presencia o la ausencia de variantes de histonas en nucleosomas exentos de célula en la sangre. Actualmente no existen procedimientos para la detección o la medición de variantes de histonas en nucleosomas exentos de célula intactos ni se ha sugerido o contemplado ninguna medición de este tipo.

10

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

15

20

25

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

30

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

35

40

La hipometilación de ADN global es un distintivo de las células cancerosas (Esteller 2007 y Hervouet y col., 2010). La metilación de ADN global puede estudiarse en células usando técnicas de inmunohistoquímica (IHC). Como alternativa, se extrae el ADN de las células para análisis. Se ha informado de varios procedimientos para la detección de la metilación global en ADN extraído de células u otros medios incluyendo la digestión de restricción y el análisis del vecino más cercano, ensayos fluorescentes usando cloracetaldéhid, determinación inversa por metilación de todos los sitios CpG usando ADN metiltransferasa en conjunto con S-adenosil metionina marcada con tritio para calcular la cantidad de CpG no metilado y la digestión del ADN en nucleótidos individuales para el análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía en capa fina o cromatografía líquida seguida de espectroscopía de masas. Las desventajas de estos procedimientos son que requieren una labor intensiva y/o requieren grandes cantidades de ADN extraído de buena calidad (Allen y col. 2004). Los procedimientos basados en PCR que implican la desaminación de bisulfitos superan la necesidad de grandes cantidades de ADN, pero deben amplificar regiones específicas del genoma, típicamente secuencias repetitivas, como indicativo del contenido total de genoma de la 5-metilcitosina (Allen y col., 2004). Estos procedimientos para la medición de la metilación global del ADN se han utilizado para estudiar el ADN extraído de diversas células y tejidos. Algunos trabajadores han estudiado el ADN extraído de glóbulos blancos en sangre entera, ya que es más fácil de obtener de una manera mínimamente invasiva. (Moore y col., 2008; Ting Hsiung y col., 2007; Mansour y col., 2010). La cromatografía líquida con espectrometría de masas se considera el estándar de oro para la medición de la metilación del ADN global, pero es costosa, y el ADN debe ser digerido al nivel de nucleótido único antes del análisis (Vasser y col., 2009).

45

50

55

60

Los procedimientos recientes para la estimación de la metilación global del ADN incluyen la cromatografía líquida a presión ultra alta con espectrometría de masas del ADN hidrolizado extraído de tejidos (Zhang y col., 2011) y un procedimiento de secuenciación digital específica de metilación (MSDS) (Ogoshi y col., 2011). Se ha descrito un inmunoensayo competitivo clásico para la metilación global del ADN (así como un ensayo similar para la metilación global de 5-hidroximetilcitosina). En este procedimiento, el ADN extraído de células o tejidos se agrega a un pocillo de microtitulación recubierto con un conjugado de 5-citidina metilado, se agrega un anticuerpo anti-5-metilcitosina y la distribución de la unión de anticuerpo entre el conjugado 5-metilcitosina recubierto y el ADN metilado en la muestra extraída se compara con la de los estándares conocidos para estimar el nivel global de metilación del ADN presente en la muestra (Cell Biolabs, 2011). En otro procedimiento de inmunoensayo, el ADN extraído de tejidos o de muestras de plasma o suero se recubre en un pocillo de microtitulación y se detecta el ADN metilado mediante un anticuerpo anti-5-metilcitosina (Vasser, y col., 2009; Epigentek, 2009). Una desventaja de estos procedimientos es que requieren la extracción de ADN que implica la desnaturalización y la eliminación de toda la estructura de los nucleosomas y la cromatina del ADN. Por lo tanto, no pueden medir nucleótidos unidos a nucleosomas y no son adecuados, por ejemplo, para la medición directa de la metilación global del ADN en fluidos biológicos como el lisado de tejidos, la sangre, el plasma o el suero sin una etapa de extracción de ADN.

También se ha informado sobre la modificación de 5-hidroximetilo de las bases de citosina en el ADN. El papel de la 5-hidroximetilación aún no se entiende bien, pero parece estar implicado en la regulación de los genes (Stroud y col., 2011).

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

Los nucleosomas exentos de célula que contienen 5-metilcitosina o cualquier otro nucleótido en particular o nucleótidos modificados no han sido medidos en sangre ni en ningún otro medio. No se han informado estudios sobre la presencia o la ausencia de nucleosomas exentos de célula que contengan nucleótidos particulares en la sangre. No se han sugerido ni contemplado ensayos para nucleosomas exentos de célula que contengan nucleótidos particulares. Actualmente no existen procedimientos para la detección o la medición de nucleótidos asociados con nucleosomas exentos de célula.

Ahora se reseñan procedimientos de inmunoensayo sencillos para la estimación directa de los nucleótidos asociados a nucleosomas incluidos, por ejemplo, 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina, en muestras biológicas sin extracción. Sorprendentemente, se ha demostrado que los nucleosomas asociados a los nucleótidos se pueden detectar en muestras de sangre en las que los nucleosomas no se detectan mediante los procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual.

WO2005/019826 describe el análisis de nucleosomas exentos de célula utilizando un anticuerpo que se une específicamente con una proteína de histona modificada para diagnosticar una enfermedad. WO99/047924 describe la medición de productos apoptóticos en el suero para determinar la efectividad de la terapia tumoral.

WO2005/040814 describe la medición de modificaciones postraduccionales de residuos dentro de secuencias de histona para evaluar una enfermedad oncológica.

## RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un uso de una base de ADN asociada con un nucleosoma exento de célula como biomarcador en una muestra de fluido corporal para el diagnóstico de cáncer, cardiomiopatía, lupus eritematoso sistémico, colitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide, donde la base de ADN se selecciona de: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de una base de ADN asociada con un nucleosoma exento de célula en una muestra de fluido corporal que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un primer agente de unión que se une a nucleosomas;
- (ii) poner en contacto los nucleosomas unidos en la etapa (i) con un segundo agente de unión que se une a la base

de ADN;

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

(iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas que contienen la base de ADN en la muestra de fluido corporal.

donde la base de ADN se selecciona de entre: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de una base de ADN asociada con un nucleosoma exento de célula en una muestra de fluido corporal que comprende las etapas de:

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

(ii) poner en contacto la base de ADN unida en la etapa (i) con un segundo agente de unión que se une a nucleosomas;

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

(iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas que contienen la base de ADN en la muestra de fluido corporal.

donde la base de ADN se selecciona de entre: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina.

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

(i) detectar o medir una base de ADN asociada con un nucleosoma exento de célula en un fluido corporal obtenido de un sujeto; y

(ii) usar el nivel de base de ADN asociada con un nucleosoma detectado para identificar el estado patológico del sujeto,

donde la base de ADN se selecciona de entre: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina,

donde la enfermedad se selecciona de: cáncer, cardiomiopatía, lupus eritematoso sistémico, colitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide.

### 35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Curva dosis-respuesta de ELISA para la detección de ADN metilado en 5-metilcitosina en nucleosomas exentos de célula en cromatina reticulada y digerida, extraída de células MCF7 diluida en suero de ternero.

Figura 2. Curva dosis-respuesta de ELISA para la detección de ADN metilado en 5-hidroximetilcitosina en nucleosomas exentos de célula en cromatina reticulada y digerida, extraída de células A375 diluida en suero de ternero.

Figura 3. Niveles de nucleosomas detectados para muestras de suero y plasma de EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos utilizando los procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual.

Figura 4. Niveles de la variante de histona mH2A1.1 asociados con un nucleosoma exento de célula detectados para muestras de suero y plasma de EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos.

Figura 5. Niveles de la variante de histona mH2A2 asociados con un nucleosoma exento de célula detectados para muestras de suero y plasma de EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos.

Figura 6. Niveles de la variante de histona H2AZ asociados con un nucleosoma exento de célula detectados para muestras de suero y plasma de EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos.

Figura 7. Niveles de la modificación de histona P-H2AX(Ser139) asociados con un nucleosoma exento de célula detectados para muestras de suero y plasma de EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos.

Figura 8. Niveles de ADN metilado con 5-metilcitosina asociados con un nucleosoma exento de célula detectados para muestras de suero y plasma de EDTA tomadas de 20 voluntarios sanos usando el ELISA de la invención.

Figura 9. Niveles de ADN metilado con 5-hidroximetilcitosina asociados con un nucleosoma exento de célula detectados para muestras de suero tomadas de 20 voluntarios sanos usando el ELISA de la invención.

Figura 10. Niveles de nucleótidos asociados con un nucleosoma exento de célula y tipos de histonas detectados para muestras de plasma de EDTA tomadas de 3 sujetos con cáncer de colon.

Figura 11. Niveles de nucleótidos asociados con un nucleosoma exento de célula y tipos de histonas detectados para muestras de plasma de EDTA tomadas de 13 sujetos con cáncer de pulmón.

Figura 12. Niveles de nucleótidos asociados con un nucleosoma exento de célula y tipos de histonas detectados para

muestras de plasma de EDTA tomadas de 2 sujetos con cáncer de páncreas.

Figura 13. Niveles de nucleótidos asociados con un nucleosoma exento de célula y tipos de histonas detectados para muestras de plasma de EDTA tomadas de 1 sujeto con cáncer oral.

Figura 14. Niveles de nucleótidos asociados con un nucleosoma exento de célula y tipos de histonas detectados para 5 muestras de plasma de EDTA tomadas de 4 enfermedades oncológicas diferentes normalizados como una proporción de niveles de ADN metilado de 5-metilcitosina asociada con el nucleosoma detectados utilizando los procedimientos de ELISA de la invención. Se muestran los niveles normalizados para una muestra que contiene nucleosomas de voluntarios sanos producidos por el procedimiento de \*Holdenrieder y col. 2001 para su comparación (mH2A2 y 5-hidroximetilcitosina no se midieron para esta muestra).

10 Figura 15. Niveles de 5-metilcitosina (5mc), mH2A1.1, H2AZ y P-H2AX(Ser139) asociados con un nucleosoma exento de célula detectados en muestras de plasma de EDTA, plasma de citrato y plasma de heparina tomadas de voluntarios sanos usando el ELISA de la invención.

Figura 16. Niveles de 5-metilcitosina asociados con un nucleosoma exento de célula detectados para muestras de suero tomadas de 3 voluntarios sanos y 10 sujetos con cáncer de colon detectados usando el procedimiento de ELISA 15 de la invención.

Figura 17. Niveles de 5-metilcitosina asociados con un nucleosoma exento de célula detectados para muestras de plasma de EDTA tomadas de 13 voluntarios sanos y 55 pacientes con cáncer. Se muestran los puntos de corte definidos como el valor medio de las muestras sanas más una o dos desviaciones estándar de la media.

Figura 18. Niveles de 5-metilcitosina asociados con un nucleosoma exento de célula detectados para muestras de 20 plasma de EDTA tomadas de 10 voluntarios sanos y 61 pacientes con cáncer. Se muestra el punto de corte definido como el valor medio de las muestras sanas más dos desviaciones estándar de la media.

Figura 19. Niveles de 5-metilcitosina asociados con un nucleosoma exento de célula detectados para muestras de plasma de EDTA tomadas de pacientes de cáncer de pulmón y colon con aumento del tamaño del tumor, estadio y desarrollo ganglionar de la enfermedad.

25 Figura 20. Niveles medios de nucleótidos asociados con un nucleosoma exento de célula y tipos de histonas detectados usando los procedimientos de ELISA de la invención para muestras de plasma de EDTA tomadas de 10 enfermedades oncológicas diferentes normalizadas como una proporción de niveles de ADN metilado de 5-metilcitosina (5mc) asociados a nucleosoma y expresados con respecto a las proporciones medias encontradas en 11 sujetos sanos.

30 Figura 21. Niveles medios de nucleótidos asociados con un nucleosoma exento de célula y tipos de histonas detectados usando los procedimientos de ELISA de la invención para muestras de plasma de EDTA tomadas de 2 pacientes de cardiomiopatía, 10 pacientes de lupus eritematoso sistémico (lupus), 12 pacientes de colitis ulcerosa, 10 pacientes de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), 8 pacientes de enfermedad de Crohn y 10 pacientes de artritis reumatoide (RA) normalizados como una proporción de niveles de ADN metilado de 5-metilcitosina (5mc) 35 asociados a nucleosoma y expresados con respecto a las proporciones medias encontradas en 11 sujetos sanos.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un uso de una base de ADN asociada con un nucleosoma exento de célula como biomarcador para el diagnóstico de cáncer, cardiomiopatía, lupus eritematoso 40 sistémico, colitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide, donde la base de ADN se selecciona de: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina.

En una realización, el nucleosoma es un mononucleosoma u oligonucleosoma.

45 De acuerdo con un aspecto particular de la invención que se puede mencionar, se proporciona el uso de una base de ADN asociada con un nucleosoma exento de célula, donde la base de ADN se selecciona de: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina como un biomarcador para el diagnóstico del cáncer.

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

Se desarrollaron pruebas ELISA para la detección y medición de nucleosomas que contienen las bases del ADN 5- 55 metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina. Para estos ensayos, se ha usado un anticuerpo antihistona como anticuerpo de captura en combinación con un anticuerpo antinucleótido específico y apropiado. Se han usado los ensayos para mostrar que pueden medirse nucleosomas que contienen nucleótidos específicos en muestras de sangre tomadas de sujetos con cáncer y son discriminativos para uso como biomarcadores no invasivos o mínimamente invasivos. Los niveles de 5-metilcitosina de ADN asociados con un nucleosoma, con respecto a los niveles de otros epítomos de 60 nucleosomas, detectados en muestras de suero y plasma tomados de sujetos enfermos difieren de los detectados en

muestras de sujetos sanos. Además, se halló que el patrón de niveles de los nucleótidos detectados en nucleosomas en muestras tomadas de sujetos con diferentes enfermedades difería, de modo que era posible realizar un diagnóstico diferencial de la enfermedad, en particular cuando los patrones de nucleótidos asociados con un nucleosoma se analizaron combinados con los patrones determinados para nucleosomas que contenían diferentes variantes de histona y modificaciones de histona. Resultará evidente para los expertos en la técnica que la inclusión de pruebas para nucleosomas que contienen nucleótidos diferentes o adicionales probablemente mejore la discriminación de un diagnóstico diferencial usando dichos patrones.

Para investigar los niveles de nucleosomas encontrados en sujetos sanos usando los procedimientos de la técnica actual se midieron nucleosomas en muestras de suero y plasma, tomadas de 20 sujetos sanos. Ambos procedimientos de la técnica actual produjeron señales superiores en las muestras de suero tomadas de sujetos sanos que en las muestras de plasma. Se muestran los resultados en la Figura 3. Esto coincide con los datos publicados sobre que los niveles de nucleosoma son mayores en el suero que en el plasma (\*Holdenrieder y col., 2001).

Para investigar los niveles de nucleosomas encontrados en sujetos sanos usando los procedimientos de la invención medimos nucleosomas que contenían el nucleótido modificado 5-metilcitosina en los sueros de 20 sujetos sanos y en suero bovino sano. Los resultados de suero fueron bajos o indetectables para los 20 sujetos sanos. También medimos nucleosomas que contenían el nucleótido modificado 5-metilcitosina en muestras de plasma de EDTA, obtenidas de los 20 sujetos sanos y, sorprendentemente, se observaron señales mayores. Se detectaron niveles altos de nucleosomas exentos de célula que contenían el nucleótido modificado 5-metilcitosina a través de los procedimientos de la presente invención en plasma EDTA de humanos sanos, pero se detectaron niveles inferiores en suero humano sano tal como se muestra en la figura 8. Las figuras 4-9 muestran que se obtuvieron resultados similares para otras estructuras de nucleosoma. Este resultado es inesperado y diferente de ambos resultados publicados (\*Holdenrieder y col., 2001) y los resultados que encontramos para los procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual. Por lo tanto, sorprendentemente, los procedimientos de la invención producen resultados opuestos a los procedimientos de la técnica actual para los niveles relativos de nucleosomas que se producen en el suero y las muestras de plasma de EDTA.

Se investigó si las estructuras de los nucleosomas son detectables en todos los diversos tipos comunes de plasma que se pueden recolectar. Se descubrió que niveles altos de 5-metilcitosina asociados con un nucleosoma exento de célula se podían detectar a través del procedimiento de la invención en plasma de EDTA y, en menor medida, en el plasma de citrato obtenido de sujetos sanos, pero que la 5-metilcitosina asociada con un nucleosoma era baja o indetectable en señales de fondo de tampón o suero de caballo en la mayoría (3 de 5) de las muestras de plasma de heparina tomadas de sujetos sanos. Se muestran los resultados en la Figura 15. En resumen, los nucleosomas exentos de célula se encuentran en concentraciones relativamente altas en la mayoría o en todas las muestras de plasma de EDTA y plasma de citrato tomadas de sujetos sanos usando el procedimiento de la invención, pero son bajas o están ausentes en la mayoría de las muestras de plasma o suero de heparina tomadas de sujetos sanos. Por lo tanto, es evidente que la elección precisa del tipo de muestra será fundamental para las diferentes aplicaciones.

Hemos demostrado que la selección de muestras para la detección de nucleosomas exentos de célula que contienen estructuras particulares de nucleótidos implica diversos parámetros. Estos incluyen los niveles bajos de nucleosomas exentos de célula que están presentes generalmente en las muestras de suero y plasma de heparina tomadas de sujetos sanos, los niveles más altos que se encuentran presentes en general en EDTA y las muestras de plasma de citrato tomadas de sujetos sanos, la recomendación de que las muestras de suero que contienen nucleosomas exentos de célula se deben estabilizar mediante el agregado de EDTA después de la separación del suero del coágulo (\*Holdenreider y col., 2001) y el protocolo de muestreo del suero. También se pueden usar otros agentes estabilizantes (por ejemplo, inhibidores de proteasa). Cuando fue posible, se utilizaron muestras de suero centrifugadas dentro de 1 hora de la venopunción, después de lo cual, se agregaron 10 mM de EDTA y se congeló la muestra.

La elección del tipo de muestra de sangre para las muestras clínicas se debe hacer basándose en una discriminación clínica óptima para cada prueba en particular. Después de nuestro hallazgo de niveles consistentemente bajos de nucleosomas a través del procedimiento de la invención en el suero de sujetos sanos, se midieron los nucleosomas que contenían el nucleótido 5-metilcitosina en muestras de suero tomadas de sujetos con cáncer. Se observó una sensibilidad clínica de hasta el 100 %, como se muestra en la figura 16 para las muestras de cáncer de colon.

También se midieron los niveles relativos de nucleosomas exentos de célula que contenían los nucleótidos 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina y otras estructuras nucleosómicas en muestras de plasma de EDTA tomadas de sujetos con diversas enfermedades. Los niveles de nucleosomas exentos de célula son altos en las muestras de plasma de EDTA tomadas de sujetos sanos y sujetos enfermos y las muestras de plasma de EDTA por lo tanto no parecen ser la mejor opción de muestra para un discriminador sensible de sujetos enfermos y sanos. Sin embargo, se



ha demostrado que los niveles y la composición de los nucleosomas exentos de célula en circulación, en términos de los niveles relativos de nucleosomas que contienen nucleótidos diferentes (así como otras estructuras de nucleosoma), varían entre individuos enfermos y sanos y también entre las diferentes enfermedades. Por lo tanto, somos los primeros en informar que (i) hay niveles altos de nucleosomas en circulación presentes en todas o la mayoría de las muestras de plasma de EDTA tomadas de sujetos sanos y sujetos enfermos, pero esto no es cierto de todos los tipos de muestras de sangre; y también que (ii) sorprendentemente, la detección de la enfermedad y la discriminación del tipo de enfermedad, sin embargo, se pueden realizar mediante análisis de estos nucleosomas de plasma de EDTA basándose en los niveles y el perfil estructural de uno o más de los tipos relativos de estructuras de nucleosoma presentes en el plasma de sujetos enfermos y sanos.

10

Se midieron los nucleosomas exentos de célula en el plasma de EDTA tomado de sujetos sanos y 117 sujetos con diversos tipos de cáncer en dos experimentos que consistían en 55 y 62 sujetos con cáncer respectivamente. En total, se identificaron correctamente el 78 % (91 de 117) de las muestras de cáncer como positivas para el cáncer utilizando el procedimiento de la invención para la 5-metilcitosina asociada con el nucleosoma utilizando un nivel de corte del resultado medio para los sujetos sanos + 2 desviaciones estándar de la media.

15

En el primero de estos 2 experimentos, se midieron los nucleosomas exentos de célula en plasma de EDTA tomado de 13 sujetos sanos y 55 sujetos con cáncer de estómago, intestino grueso, recto, pulmón (carcinoma de células pequeñas y diversos carcinomas de células no pequeñas), mama, ovario, páncreas, próstata, riñón y diversos cánceres orales (cavidad oral, paladar, faringe y laringe). Las 13 muestras de sujetos sanos y pacientes con cáncer resultaron positivas para los nucleosomas. Sin embargo, los niveles detectados en las muestras tomadas de sujetos con cáncer fueron más altos que los encontrados en las muestras de sujetos sanos y los resultados mostraron que los sujetos sanos y con cáncer se pueden discriminar. Por ejemplo, el intervalo normal calculado en términos de OD como la media  $\pm$  2 desviaciones estándar de la media para la 5-metilcitosina asociada con el nucleosoma fue 0-1,41. Utilizando este valor de corte, las 13 muestras sanas fueron negativas y 30 de las 55 muestras de cáncer fueron positivas. (una sensibilidad clínica global de 55 %) incluido 38 % (3 de 8) de muestras de cáncer de estómago, 60 % (3 de 5) de intestino grueso, 33 % (1 de 3) de recto, 33 % (2 de 6) pulmón de célula pequeña, 64 % (9 de 14) de pulmón de célula no pequeña, 33 % (2 de 6) de mama, 100 % (1 de 1) de ovario, 100 % (1 de 1) de páncreas, 33 % (2 de 6) de próstata, 100 % (1 de 1) de riñón y 60 % (3 de 5) oral. Se muestran los resultados en la Figura 17.

20

De modo similar, el intervalo normal para el ensayo de H2AZ asociado con el nucleosoma fue de 0 - 0,95. Utilizando este nivel de corte de 0,95; los 13 sujetos sanos resultaron negativos para niveles de H2AZ en nucleosoma elevados. Por el contrario, se encontró un resultado positivo para niveles de H2AZ en nucleosoma elevados para 84 % (46 de 55) de muestras de cáncer (una sensibilidad clínica global de 84 %) incluido 100 % (8 de 8) de muestras de cáncer de estómago, 100 % (5 de 5) de intestino grueso, 67 % (2 de 3) de recto, 83 % (5 de 6) pulmón de célula pequeña, 79 % (11 de 14) de pulmón de célula no pequeña, 50 % (3 de 6) de mama, 100 % (1 de 1) de ovario, 100 % (1 de 1) de páncreas, 80 % (4 de 5) de próstata, 100 % (1 de 1) de riñón y 100 % (5 de 5) oral.

25

En una realización de la invención, se proporciona una muestra de control y el nivel de corte para el ensayo para distinguir entre resultados positivos o negativos se define con relación al resultado para la muestra de control. Esto puede ser cualquier proporción igual o superior o inferior al nivel del resultado de la muestra de control. Los resultados de los pacientes por debajo de este nivel se consideran negativos y los resultados de los pacientes por encima de este nivel se consideran positivos. También puede haber un intervalo de "zona gris" de resultados de los pacientes muy próximo al nivel de corte para el que la decisión se considera indeterminada y/o la prueba se debe repetir.

30

De modo similar, para el ensayo de mH2A1.1 asociado con el nucleosoma, el intervalo normal fue de 0 - 0,91. Utilizando este valor de corte, las 13 muestras sanas fueron negativas y 64 % (35 de 55) de las muestras de cáncer fueron positivas. Para el ensayo de P-H2AX(Ser139) asociado con el nucleosoma, el intervalo normal fue de 0 - 1,08. Utilizando este valor de corte, las 13 muestras sanas fueron negativas y 60% (33 de 55) de las muestras de cáncer fueron positivas. Por lo tanto, algunos ensayos de nucleosomas muestran una mejor sensibilidad clínica que otros.

35

Además, es posible utilizar el patrón de estructuras de nucleosomas para mejorar la utilidad clínica de la invención. Esto se puede hacer, por ejemplo, reduciendo el punto de corte del ensayo de 5-metilcitosina asociada con el nucleosoma a la media + 1 desviación estándar que proporciona un intervalo de hasta 1,01. En este caso, la cantidad de falsos negativos se reduce a 4, lo que proporciona una sensibilidad clínica mejorada del 93 % (51 de 55) a expensas de un aumento en los resultados falsos positivos para las muestras tomadas de sujetos sanos del 0 % al 23 % (3 de 13). Se muestran los resultados en la Figura 17.

40

Las muestras que resultaron positivas para los nucleosomas asociados con la 5-metilcitosina, o cualquier nucleosoma, se pueden indagar con respecto al perfil de estructura de nucleosoma. El perfil de nucleosoma se puede usar para

45

50

distinguir entre pacientes sanos y enfermos como se ilustra en las Figuras 20 y 21, donde las proporciones relativas de las diversas estructuras de nucleosomas en pacientes enfermos se expresan en relación con las que se encuentran en pacientes sanos y en pacientes con otras enfermedades no cancerosas. Esto muestra que la investigación de estructuras de nucleosomas múltiples en un panel de prueba puede facilitar una mejor discriminación clínica.

5

De modo similar, la especificidad diagnóstica y/o la sensibilidad de la invención se pueden aumentar mediante la combinación de datos de más de una prueba en forma de proporciones. Por ejemplo, el uso de la proporción de P-H2AX:5-metilcitosina asociada con un nucleosoma aumenta la detección de casos de cáncer positivos verdaderos del 55 % (30 de 55) para la 5-metilcitosina asociada con el nucleosoma sola, al 67 % (37 de 55) en el nivel de corte de 2 desviaciones estándar mientras se mantienen el 100 % (13 de 13) de los resultados negativos para las muestras tomadas de sujetos sanos.

10

Se midieron los niveles de nucleosomas exentos de célula en circulación que contenían dos nucleótidos diferentes en muestras de plasma de EDTA tomadas de 3 pacientes con cáncer de colon, 13 pacientes con cáncer de pulmón, 2 pacientes con cáncer de páncreas y 1 paciente con cáncer oral y se compararon con los niveles presentes en las muestras de sangre de 20 sujetos sanos, así como con una preparación producida artificialmente de nucleosomas en suero de sujetos sanos preparados como se describe en la bibliografía (\*Holdenreider y col., 2001). También se expresaron los niveles observados en una forma normalizada como proporciones del nivel de nucleosomas que contenían un nucleótido particular y se mostró que dichas proporciones o patrones de proporciones son útiles para el diagnóstico del cáncer en general y para el diagnóstico diferencial de tipos específicos de cáncer. También se investigó si el nivel de 5-metilcitosina asociada con el nucleosoma varía con el avance de la enfermedad. Se observó que el nivel medio de nucleosomas exentos de célula que contenían 5-metilcitosina aumenta con la gravedad de la enfermedad y se eleva con el aumento de la diseminación de la enfermedad a los ganglios linfáticos. Esto proporciona pruebas de que los nucleosomas detectados están asociados con tumores.

25

También se midieron los nucleosomas presentes en estas 19 muestras de cáncer usando dos procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual. De los 19 sujetos con cáncer estudiados la mayoría resultó tener niveles bajos de nucleosoma de plasma de EDTA según lo determinado por el ELISA de nucleosoma 1 y 2 de la técnica actual. Este resultado ilustra un motivo por el cual los ensayos de la técnica actual no se utilizan para fines clínicos de rutina.

30

Se usaron procedimientos ELISA de la presente invención para medir los nucleosomas que contenían nucleótidos de 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina en las mismas 19 muestras. Sorprendentemente, se pudieron detectar niveles altos de nucleosomas que contenían 5-metilcitosina en las 19 muestras. Por lo tanto, en una realización la invención proporciona un procedimiento de ELISA de nucleosoma novedoso capaz de detectar nucleosomas no detectados por los ensayos de nucleosoma de la técnica actual.

35

También se midieron los niveles de nucleosomas que contenían 3 variantes de histona diferentes y una MPT de histona en las mismas 19 muestras tomadas de sujetos con cáncer, así como una muestra de nucleosomas generada de sujetos sanos a través de un procedimiento descrito en la bibliografía (\*Holdenrieder y col., 2001). Se utilizaron estas mediciones junto con las mediciones de nucleótidos asociados con un nucleosoma descritas en la presente, como un panel de la variedad de nucleosomas exentos de célula presentes en fluidos biológicos tomados de sujetos con 4 tipos de cánceres diferentes y con nucleosomas generados de sujetos sanos. Sorprendentemente, el patrón de los nucleosomas que se encuentran en los 4 tipos de cáncer investigados (pulmón, colon, páncreas y oral) fue distinguible del que se encuentra en la muestra de nucleosoma generada de sujetos sanos. Además, los tipos de cáncer diferentes también se pueden distinguir entre sí basándose en el patrón de nucleosomas exentos de célula detectables en la sangre de los sujetos. Por lo tanto, en una realización de la invención se proporciona un procedimiento para detectar o diagnosticar la presencia, el tipo, la recurrencia o la gravedad de una enfermedad mediante la evaluación de una muestra para un panel de epítomos de nucleosomas diferentes que consisten en dos o más mediciones de nucleosomas que contienen bases de ADN diferentes o una combinación de una o más bases de ADN seleccionadas de al menos 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina, y una o más variantes de histona y/o una o más modificaciones de histona y/o mediciones de nucleosomas *per se*, o cualquier combinación o proporción de cualquiera de estos, como un indicador del estado de salud o enfermedad de un sujeto.

50

De modo similar, se usaron procedimientos ELISA de la invención para detectar la variabilidad en las estructuras de nucleótidos e histonas de los nucleosomas exentos de célula en circulación en diversas enfermedades oncológicas y no oncológicas y se compararon con la estructura de los nucleosomas que se encuentran en sujetos sanos. Los nucleosomas resultaron estar presentes en todas las enfermedades oncológicas y no oncológicas investigadas y resultó que tenían perfiles que diferían de los perfiles de los sujetos sanos.

55

60

Se estudiaron muestras de plasma de EDTA tomadas de 2 pacientes de cardiomiopatía, 10 pacientes de lupus eritematoso sistémico (lupus), 12 pacientes de colitis ulcerosa, 10 pacientes de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), 8 pacientes de enfermedad de Crohn y 10 pacientes de artritis reumatoide (RA) y se normalizaron los niveles de diversas estructuras de nucleosoma detectadas como una proporción de los niveles de 5-metilcitosina asociados con el nucleosoma medio y se expresaron los resultados con respecto a los que se encontraron en 11 sujetos sanos. Se observó que las enfermedades estaban asociadas con perfiles de estructura de nucleosoma que diferían de los perfiles de sujetos sanos o con cáncer. Por lo tanto, los perfiles de estructura de nucleosoma se pueden usar como una herramienta de diagnóstico para la detección, la predicción del pronóstico, la monitorización y la predicción de la eficacia terapéutica en una amplia variedad de enfermedades no oncológicas. Se muestran los resultados en la Figura 21.

También se estudió la variabilidad en la estructura de los nucleosomas exentos de célula en términos de nucleótidos y los tipos de histonas detectados usando los procedimientos de ELISA de la invención para las muestras de plasma de EDTA tomadas de 55 pacientes con 10 enfermedades oncológicas diferentes. Los niveles de diversas estructuras de nucleosomas detectados se normalizaron como una proporción de los niveles de ADN metilado de 5-metilcitosina (5mc) asociados a nucleosoma y se expresaron con respecto a las proporciones medias encontradas en 11 sujetos sanos. Se encontraron nucleosomas presentes en todos los sujetos y perfiles de estructura de nucleosoma que variaron entre enfermedades oncológicas, enfermedades no oncológicas y sujetos sanos. Por lo tanto, los perfiles de estructura de nucleosoma se pueden usar como una herramienta de diagnóstico para la detección, la predicción del pronóstico, la monitorización y la predicción de la eficacia terapéutica en el cáncer y otras enfermedades. Se muestran los resultados en las Figuras 20 y 21.

Como la mayoría del ADN en circulación en el suero o el plasma se informa que existe como mononucleosomas y oligonucleosomas (Holdenrieder y col., 2001), resultará evidente para los expertos en la técnica que los procedimientos de la invención actual también se pueden emplear para detectar o medir el ADN metilado exento de célula *per se* (como ADN asociado con un nucleosoma que contiene, por ejemplo; 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina) directamente en fluidos biológicos incluidos la sangre, el suero y el plasma. Los procedimientos de la invención empleados tienen ventajas de simplicidad y velocidad con respecto a los métodos para medir ADN metilado de la técnica actual, en particular porque no se requiere ni implica extracción del ADN.

Además, resultará evidente que el procedimiento de la presente descripción puede usarse para detectar o medir cualquier ácido nucleico o base de ADN o análogo o derivado de ácido nucleico en nucleosomas. Dichas bases incluyen, sin limitación, adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina, xantina, hipoxantina, 7,8-dihidro-8-oxo-guanina y cualquiera de sus derivados o análogos. Resultará evidente para los especialistas en la materia que un nucleótido común (por ejemplo, sin limitación, guanina, citosina, timina o adenina), aparecerá en todos o en la mayoría de los nucleosomas y que el procedimiento de la descripción que usa un anticuerpo para un nucleótido común proporcionará un procedimiento para unir y detectar virtualmente todos los nucleosomas en una muestra. Por lo tanto, también se describe un procedimiento novedoso para la detección de nucleosomas *per se* en el que los nucleosomas que contienen un nucleótido común se miden como una forma de asegurar que se detectan todos o la mayoría de los nucleosomas.

Otro aspecto de la descripción proporciona un procedimiento novedoso para la detección de todo el ADN asociado con el nucleosoma en el que los nucleosomas que contienen un nucleótido común se miden como una forma de asegurar que se detectan todos o la mayoría del ADN unido al nucleosoma. Además, la medición de dos o más bases de ADN proporcionará la base para la medición de una proporción del contenido de ADN relativo de estas bases de ADN. Se ilustran dichas proporciones para los niveles relativos de 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina en las muestras en las figuras 10-14. Nuestros datos muestran que los niveles relativos de 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina detectables difieren en los diferentes tipos de cánceres y se pueden usar para distinguir dichos cánceres. Otras proporciones similares también resultarán útiles en la técnica. Por ejemplo, al usar la presente invención para medir una base (o bases) de ADN adecuada como una medida para el ADN unido a nucleosoma total y determinar el nivel relativo de otra base (por ejemplo, 5-metilcitosina), quedará claro que el procedimiento de la invención se puede usar para detectar la proporción del ADN que comprende cualquier base particular (por ejemplo, el porcentaje de ADN que está metilado en una muestra). Por lo tanto, los procedimientos de la presente invención proporcionan un procedimiento simple y rápido para la medición del contenido de ADN del porcentaje de cualquier base en una muestra. El procedimiento se puede usar de manera rápida y sencilla en múltiples muestras, por ejemplo, muestras de sangre. Los procedimientos de la invención se pueden usar para detectar y medir bases de ADN en nucleosomas en cualquier muestra en la que aparezcan dichos nucleosomas, incluyendo, por ejemplo, muestras obtenidas por digestión de cromatina extraída de células. Resultará evidente para los especialistas en la materia que el término nucleótido de la presente invención pretende incluir, sin limitación, purinas, pirimidinas o cualquier otra base de ácidos nucleicos y moléculas similares con o sin azúcares asociados y con o sin fosforilación e incluido cualquier

análogo, derivado o imitación de estos.

Se concluye que el procedimiento de la presente invención es un procedimiento exitoso para la detección y la medición de ADN asociado con un nucleosoma que contiene nucleótidos particulares, que este procedimiento también se puede usar con éxito como un procedimiento para la detección de nucleosomas *per se* y que es un procedimiento superior para la detección de nucleosomas *per se* con respecto a los procedimientos de la técnica actual y que este procedimiento también se puede usar con éxito como un procedimiento para la detección directa de ADN exento de célula *per se* y para la composición de nucleótidos de ADN exento de célula *per se* y que es un procedimiento superior para la detección de ADN asociado con el nucleosoma y su composición de nucleótidos con respecto a los procedimientos de la técnica actual. El procedimiento es rápido, de bajo coste y adecuado para uso en medios y fluidos biológicos complejos. Se ha demostrado que el procedimiento de la presente invención puede usarse para detectar nucleosomas y nucleosomas que contienen ADN metilado en la sangre, y que este puede usarse como un biomarcador para el cáncer. Resultará evidente para los especialistas en la materia que un biomarcador presente en la sangre de pacientes con cáncer tiene valor para un amplio intervalo de fines de diagnóstico y cribado de enfermedades para cáncer y otras enfermedades que están asociadas a nucleosomas en circulación elevados (Holdenrieder y col.,2001).

Para confirmar que no se encuentran niveles elevados de nucleosomas en sujetos sanos usando los procedimientos de la invención medimos nucleosomas que contenían los nucleótidos 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina en los sueros de 20 sujetos sanos y en suero bovino sano. Los resultados de nucleosoma en circulación en suero para las pruebas ELISA de la invención fueron bajos o indetectables para los 20 sujetos sanos. También se realizó una prueba similar en muestras de plasma tomadas de los mismos 20 sujetos sanos y, sorprendentemente, se observaron señales mayores. Este descubrimiento es inesperado y bastante diferente de los resultados que encontramos para los procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual.

La invención se ha evaluado en muchas enfermedades oncológicas y no oncológicas y ha resultado efectiva en la detección de todas las enfermedades evaluadas. Esto incluye la detección de casos de cáncer de próstata que no es detectable por las pruebas ELISA de nucleosoma de la técnica actual (Holdenrieder, 2001). Está claro que la invención es efectiva para la detección de todos o la mayoría de los cánceres. Resultará evidente para los expertos en la técnica que el rendimiento clínico de la invención se puede mejorar más mediante la inclusión de otras pruebas de estructura de nucleosoma y por análisis de las proporciones de las diferentes estructuras de nucleosoma presentes.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de anticuerpo doble, inmunométrico o de inmunoensayo en sándwich para detectar y medir nucleosomas exentos de célula que contienen nucleótidos en una muestra. Es una realización de este aspecto un inmunoensayo que comprende las etapas de:

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

donde el nucleótido se selecciona de: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina.

De acuerdo con una segunda realización, se proporciona un procedimiento para detectar y medir nucleosomas exentos de célula que contienen nucleótidos en una muestra mediante un inmunoensayo inmunométrico que comprende las etapas de:

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

donde el nucleótido se selecciona de: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina.

Se pueden usar diversos anticuerpos u otros ligadores en la invención como un ligador que se une a nucleosomas.

Estos incluyen ligadores dirigidos a unirse a epítomos que están presentes en nucleosomas intactos y no en histonas libres (por ejemplo, un epítomo que se encuentra en la unión entre dos histonas en un nucleosoma) y también ligadores dirigidos a cualquier componente de nucleosoma incluido epítomos de ácido nucleico, histona o proteína de nucleosoma común.

5

Resultará evidente para los especialistas en la materia que los procedimientos de la invención descritos incluyen una variedad de realizaciones, incluyendo ensayos de tipo biosensor y ensayos exentos de marcación del tipo comercializado, por ejemplo, por ForteBio Incorporated de EE.UU. Los inmunoensayos inmunométricos emplean un anticuerpo (u otro ligador) para unir el analito. El analito así ligado se detecta como medida directa de su nivel o concentración en la muestra de ensayo original. Por el contrario, los inmunoensayos "competitivos" suelen utilizar una cantidad mucho más pequeña de anticuerpo (u otro ligador) para unir una proporción del analito y se emplea una preparación de analito etiquetado (o análogo de analito) para distribuir entre las fracciones de analito unida y libre (con el analito de muestra). La cantidad de analito etiquetado unido se mide como una medida indirecta de la concentración del analito en la muestra original. En una variación de diseño de inmunoensayo "competitivo", se emplea un anticuerpo etiquetado, junto con una preparación de analito de fase sólida (o análogo de analito). La unión del anticuerpo etiquetado se distribuye entre el analito de muestra y el analito de fase sólida (o análogo de analito). La cantidad de anticuerpo unido a la preparación de analito de fase sólida (o análogo de analito) se utiliza como una medida indirecta de la concentración del analito de la muestra.

10

15

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para detectar y medir un nucleótido, incluido un nucleótido asociado a nucleosoma, en una muestra mediante un inmunoensayo inmunométrico exento de marcación que comprende las siguientes etapas:

(i) poner en contacto la muestra con un anticuerpo u otro ligador que se une a un nucleótido;

25

(ii) detectar y/o cuantificar la unión de dicho anticuerpo u otro ligador a un nucleótido en la muestra; y

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

De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para detectar y medir un nucleótido, incluido un nucleótido asociado a nucleosoma, en una muestra mediante un inmunoensayo competitivo que comprende las siguientes etapas:

30

(i) poner en contacto la muestra con un anticuerpo u otro ligador que se une a un nucleótido;

(ii) detectar y/o cuantificar la unión de dicho anticuerpo u otro ligador a un nucleótido en la muestra; y

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

35

Será evidente para los expertos en la técnica que estos procedimientos de inmunoensayo de la invención miden nucleótidos y nucleótidos asociados a nucleosoma directamente sin ningún requisito de extracción de ADN. Por el contrario, los procedimientos de inmunoensayo de nucleótidos de la técnica actual detectan nucleótidos (no asociados a nucleosoma) después de la extracción de ADN de una muestra. Los procedimientos de la invención tienen ventajas de velocidad, simplicidad y adecuación para mediciones directas en muestras biológicas complejas que incluyen sangre o sus derivados.

40

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar la proporción de ADN exento de célula que comprende un nucleótido particular en una muestra que comprende las siguientes etapas:

45

(i) detectar o medir el nivel de ADN exento de célula en una muestra;

(ii) detectar o medir el nivel de un nucleótido asociado a nucleosoma de acuerdo con un procedimiento de la invención;

y

(iii) usar las dos medidas para determinar la proporción de ADN que comprende el nucleótido.

50

De acuerdo con una realización de este aspecto de la invención, tanto el nivel de ADN exento de célula en la muestra como el nucleótido de interés se miden utilizando el procedimiento de la invención. De acuerdo con la invención, el nucleótido de interés es un nucleótido de citosina metilado, por lo tanto, la proporción del ADN que comprende el nucleótido proporciona una medida de metilación de ADN global.

55

Se ha mostrado que la detección y la medida de nucleosomas que contienen nucleótidos en la sangre tomada de sujetos puede usarse como procedimiento de diagnóstico para identificar sujetos con cáncer y para diferenciarlos de los sujetos sanos. Además, hemos demostrado que los patrones de nucleosomas que contienen un panel de diferentes nucleótidos, variantes de histona y MPT de histona se pueden utilizar para distinguir entre diferentes cánceres. Será evidente para los expertos en la técnica que esto proporciona una prueba de sangre para el cáncer que detectará

60

cáncer en sujetos y se puede utilizar para distinguir entre tipos de cáncer en sujetos positivos para el cáncer. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar o diagnosticar la presencia de una enfermedad al medir o detectar la presencia y/o el nivel o concentración de nucleosomas exentos de célula que contienen un nucleótido seleccionado de: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina, en un fluido corporal, y utilizando el nivel detectado como un biomarcador del estado patológico de un sujeto que incluye, sin limitación, un diagnóstico clínico de una enfermedad, un diagnóstico diferencial del tipo o subtipo de enfermedad, un pronóstico de la enfermedad, una recaída de la enfermedad o un diagnóstico de la susceptibilidad del sujeto a los regímenes de tratamiento. Se apreciará por los especialistas en la materia que los fluidos corporales usados para ensayo de diagnóstico incluyen, sin limitación, sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y otros fluidos. En una realización preferida, el fluido corporal seleccionado como muestra es sangre, suero o plasma. La respuesta al ensayo, nivel, concentración o cantidad de un nucleótido asociado a nucleosoma en un fluido corporal pueden expresarse en términos absolutos o términos relativos, por ejemplo sin limitación como la proporción del nivel de nucleosoma total presente o como la relación del nivel de nucleosomas que contienen otro nucleótido o variante de histona o MPT de histona o con el nivel de ADN total.

En una realización de la invención, la medición de nucleótido asociado a nucleosoma se utiliza como miembro de un panel de diagnóstico de pruebas o medidas para la detección o el diagnóstico del estado patológico de un sujeto incluyendo, sin limitación, un diagnóstico clínico de una enfermedad, un diagnóstico diferencial de un tipo o subtipo de enfermedad o un pronóstico de enfermedad o una recaída de enfermedad o un diagnóstico de la susceptibilidad del sujeto a regímenes de tratamiento.

Como todo o la mayoría del ADN exento de célula en circulación se informa que existe como ADN asociado a nucleosoma, resultará evidente para los expertos en la técnica que el diagnóstico o detección del estado patológico se puede lograr mediante la detección o medición de nucleótidos *per se* utilizando un inmunoensayo de nucleótido directo de la invención sin etapa de extracción de ADN en un fluido biológico, en lugar de, o además de, un inmunoensayo para nucleótidos asociados a nucleosoma. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento de inmunoensayo de nucleótido sin extracción para detectar o diagnosticar la presencia de una enfermedad al medir o detectar la presencia y/o el nivel o concentración de un nucleótido seleccionado de: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina, en un fluido corporal, y utilizando el nivel detectado como un biomarcador (ya sea solo o como miembro de un panel de pruebas) del estado patológico de un sujeto que incluye, sin limitación, un diagnóstico clínico de una enfermedad, un diagnóstico diferencial del tipo o subtipo de enfermedad, un pronóstico de la enfermedad, una recaída de la enfermedad o un diagnóstico de la susceptibilidad del sujeto a los regímenes de tratamiento. Se apreciará por los especialistas en la materia que los fluidos corporales usados para ensayo de diagnóstico incluyen, sin limitación, sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y otros fluidos. En una realización preferida, el fluido corporal seleccionado como muestra es sangre, suero o plasma. La respuesta al ensayo, nivel, concentración o cantidad de un nucleótido en un fluido corporal pueden expresarse en términos absolutos o términos relativos, por ejemplo sin limitación, como la proporción del nivel de nucleosoma total presente o como la relación del nivel de otro nucleótido o variante de histona o MPT de histona o con el nivel de ADN total.

De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para detectar o medir la presencia y/o el nivel de nucleosomas que contienen un nucleótido en una célula que comprende las siguientes etapas:

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

Los procedimientos para producir mononucleosomas y/u oligonucleosomas a partir de cromatina son bien conocidos en la materia e incluyen digestión enzimática y sonicación (Dai y col., 2011).

Los expertos en la técnica apreciarán que el procedimiento descrito para detectar nucleótidos asociados con nucleosoma en células o tejidos tiene ventajas sobre los procedimientos utilizados en la actualidad que incluyen IHC, detección de nucleótidos en ADN extraído de células mediante la digestión de restricción y el análisis del cebino más cercano, mediante ensayos fluorescentes usando cloracetaldéhid, mediante determinación inversa por metilación de todos los sitios CpG usando ADN metiltransferasa en conjunto con S-adenosil metionina marcada con tritio para calcular la cantidad de CpG no metilado, mediante la digestión del ADN en nucleótidos individuales para el análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía en capa fina o cromatografía líquida seguida de espectroscopía de masas. El nivel, concentración o cantidad de un nucleótido asociado a nucleosoma particular puede expresarse en términos absolutos o términos relativos, por ejemplo, como una proporción de los nucleosomas totales presentes o una relación con el nivel total de nucleosomas o con el nivel de nucleosomas que contienen otro nucleótido

o variante de histona o MPT de histona, o con el nivel total de ADN.

Resultará evidente para los especialistas en la materia que los términos anticuerpo, ligador o ligando con respecto a cualquier aspecto de la invención no son limitantes, sino que pretenden incluir cualquier ligador capaz de unirse a moléculas o entidades específicas y que puede usarse cualquier ligador adecuado en el procedimiento de la invención. Resultará también evidente que el término nucleosomas pretende incluir mononucleosomas y oligonucleosomas y cualquiera de tales fragmentos de cromatina que pueda analizarse en medios fluidos.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un kit para detectar o medir nucleosomas que comprende un ligando o ligador específico para el nucleótido o una parte componente de este, o una imitación de la estructura/forma del nucleosoma o parte componente del mismo, junto con las instrucciones para el uso del kit de acuerdo con cualquiera de los procedimientos definidos en la presente memoria.

De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un kit para detectar o medir nucleosomas que contienen un nucleótido que comprende un ligando o ligador específico para el nucleótido o una parte componente de este, o una imitación de la estructura/forma del nucleótido o parte componente del mismo, junto con las instrucciones para el uso del kit de acuerdo con cualquiera de los procedimientos definidos en la presente memoria.

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

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

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

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

- (i) detectar o medir el nivel de nucleosomas exentos de célula que contienen un nucleótido en un fluido corporal de sujetos enfermos; y
- (ii) correlacionar el nivel de nucleosomas exentos de célula que contienen un nucleótido detectado en un fluido corporal de sujetos enfermos con el resultado clínico de la enfermedad de los sujetos.

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

- (i) detectar o medir el nivel de nucleosomas exentos de célula que contienen un nucleótido en un fluido corporal de sujetos enfermos; y
- (ii) correlacionar el nivel de nucleosomas exentos de célula que contienen un nucleótido detectado en un fluido corporal de sujetos enfermos con la eficacia observada de un régimen de tratamiento en esos sujetos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento para identificar un biomarcador de nucleótido asociado a nucleosoma o un biomarcador de nucleótido que se utilizará para monitorizar el tratamiento de un animal o sujeto humano enfermo que comprende las siguientes etapas:

- (i) detectar o medir el nivel de nucleosomas exentos de célula que contienen un nucleótido en un fluido corporal de un sujeto enfermo;
- (ii) repetir dicha detección o medida en una o más ocasiones durante la progresión de la enfermedad del sujeto; y
- (ii) correlacionar el nivel de nucleosomas exentos de célula que contienen un nucleótido detectado en un fluido corporal de un sujeto enfermo con la progresión de la enfermedad en el sujeto.

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

5 Se sabe en la técnica que se puede detectar la presencia de un resto que está compuesto como parte de un complejo que contiene otros restos mediante procedimientos de inmunoensayo. Resultará evidente para los expertos en la técnica que los nucleosomas exentos de célula que contienen un nucleótido se pueden detectar en un fluido biológico incluido sangre, plasma, suero y orina a través de un procedimiento que comprende el inmunoensayo directo del nucleótido mismo en el fluido. En este procedimiento, un inmunoensayo de anticuerpo único, utilizando un anticuerpo  
10 dirigido a un epítipo presente en un nucleótido, o un inmunoensayo de 2 sitios, utilizando dos anticuerpos dirigidos a dos epítipos presentes en un nucleótido, se utilizan para detectar la presencia de un nucleótido dentro de un nucleosoma. Por lo tanto, en otra realización de la invención, un nucleótido presente dentro de un nucleosoma se detecta directamente en un fluido biológico que incluye sangre, plasma, suero y orina mediante el uso de un procedimiento de inmunoensayo para un nucleótido.

15 Por lo tanto, en una realización de la invención, un nucleótido asociado a un nucleosoma seleccionado de: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina, se detecta directamente sin extracción anterior en un fluido biológico incluido sangre, plasma, suero y orina utilizando un inmunoensayo para el nucleótido.

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

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

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

40 Se describen 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 una matriz como se describe en la presente memoria, opcionalmente junto con instrucciones para el uso del kit.

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

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

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

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



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

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

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

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

Es conocido que un recambio celular, muerte celular y apoptosis aumentados conducen a niveles circulatorios aumentados de nucleosomas exentos de célula (Holdenrieder y col., 2001). El nivel de nucleosomas exentos de célula en circulación es un indicador no específico y aparece en una variedad de afecciones incluyendo enfermedades inflamatorias, una gran variedad de afecciones benignas y malignas, enfermedades autoinmunitarias así como después de traumatismo o isquemia (Holdenrieder y col.2001). Resultará evidente para los especialistas en la materia que la invención tendrá aplicación en una variedad de áreas de enfermedades donde se han encontrado nucleosomas en circulación en sujetos. Estas incluyen, sin limitación, traumatismo (por ejemplo, lesión grave o cirugía), ejercicio extremo (por ejemplo, correr una maratón), apoplejía y ataque cardíaco, sepsis u otra afección grave y endometriosis. Se ha utilizado el procedimiento de inmunoensayo de la invención para medir los niveles de nucleosoma e investigar su variabilidad de estructura de nucleótidos e histona en diversas de dichas enfermedades, incluidas cardiomiopatía, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide y se compararon con los resultados de sujetos sanos. Se pueden detectar nucleosomas y determinar sus estructuras relativas (en términos de composición de histona y nucleótidos) en todas estas enfermedades. Como los procedimientos de la presente invención son capaces de detectar un intervalo más amplio de nucleosomas que los procedimientos de ELISA de nucleosoma actuales, los procedimientos de la invención tienen aplicaciones en una amplia gama de áreas de enfermedades oncológicas y no oncológicas.

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

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

En una realización, el procedimiento de la invención se repite en múltiples ocasiones. Esta realización proporciona la ventaja de permitir monitorizar los resultados de la detección durante un periodo de tiempo. Tal disposición proporcionará el beneficio de monitorizar o valorar la eficacia de tratamiento de un estado patológico. Pueden usarse tales procedimientos de monitorización de la invención para monitorizar el inicio, progresión, estabilización, mejora, recaída y/o remisión.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El biomarcador puede detectarse directamente, p.ej., por SELDI o MALDI-TOF. Como alternativa, el biomarcador puede detectarse directa o indirectamente mediante interacción con un ligando o ligandos tales como un anticuerpo o fragmento de unión a biomarcador del mismo, u otro péptido o ligando, p.ej. aptámero, u oligonucleótido, capaz de unirse específicamente al biomarcador. El ligando o ligador puede poseer una marcación detectable, tal como una marcación luminiscente, fluorescente o radiactiva y/o un marcaje de afinidad.

Por ejemplo, la detección y/o cuantificación pueden practicarse mediante uno o más de los procedimientos seleccionados del grupo consistente en: SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), análisis basado en gel 1D, análisis basado en gel 2D, espectroscopía de masas (MS), LC en fase inversa (RP), permeación por tamaño (filtración en gel), intercambio iónico, afinidad, HPLC, UPLC u otras técnicas basadas en LC o LC MS. Las técnicas de LC MS apropiadas incluyen ICAT® (Applied Biosystems, CA, EE.UU.), o iTRAQ® (Applied Biosystems, CA, EE.UU.). Podrían usarse también cromatografía líquida (p.ej., cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía líquida de baja presión (LPLC)), cromatografía en capa fina y espectroscopía de RMN (resonancia magnética nuclear).

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

La identificación y/o cuantificación de los biomarcadores de analito pueden practicarse usando un procedimiento inmunológico, que implica un anticuerpo o fragmento del mismo capaz de unión específica al biomarcador. Los procedimientos inmunológicos adecuados incluyen inmunoensayos de sándwich, tales como ELISA de sándwich, en que la detección de los biomarcadores de analito se practica usando dos anticuerpos que reconocen diferentes epítopos en un biomarcador de analito; radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) directa, indirecta o competitiva, inmunoensayos enzimáticos (EIA), inmunoensayos de fluorescencia (FIA), transferencia Western, inmunoprecipitación y cualquier inmunoensayo basado en partículas (p.ej., que usa partículas de oro, plata o látex, partículas magnéticas o puntos cuánticos). Los procedimientos inmunológicos pueden practicarse, por ejemplo, en formato de placa de microvaloración o tira.

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 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 biológicas.

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

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

El biomarcador o biomarcadores de la invención 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.

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 del resultado de la prueba puede ser un cambio en el brillo óptico, imagen, color y/o posición de la imagen. Para aplicaciones cualitativas y semicuantitativas, puede leerse un holograma sensor a simple vista, eliminando por tanto la necesidad de un equipo de detección. Puede usarse un sensor de color sencillo para leer la señal cuando se requieren medidas cuantitativas. La opacidad del color de la muestra no interfiere con la operación

del sensor. El formato del sensor permite la multiplexación para detección simultánea de varias sustancias. Pueden diseñarse sensores reversibles e irreversibles para satisfacer diferentes requisitos, y es factible una monitorización continua de un biomarcador particular de interés.

5 Adecuadamente, los biosensores para la detección de uno o más biomarcadores de la invención 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.

10

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

15 invención.

Los procedimientos que implican la identificación y/o cuantificación de uno o más biomarcadores de la invención 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 tanto, pueden constituir la base de medicina a distancia.

20

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

30

La identificación de biomarcadores un estado patológico permite la integración de los procedimientos de diagnóstico y regímenes terapéuticos. La detección de un biomarcador de la invención puede usarse para cribar sujetos antes de su participación en ensayos clínicos. Los biomarcadores proporcionan los medios para manifestar la respuesta

35 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 presencia, o la cuantificación, del biomarcador en la muestra en una señal. Los biosensores se pueden adaptar para pruebas

40 diagnósticas de "sitios alternativos", p. ej., en la sala de hospital, departamento de pacientes ambulatorios, cirugía, hogar, campo y lugar de trabajo.

40

Los biosensores para detectar uno o más biomarcadores de la invención incluyen sensores acústicos, de resonancia de plasmón, holográficos, de interferometría de biocapa (BLI) y micromanipulados. Pueden emplearse elementos de

45 reconocimiento grabados, tecnología de transistor de película fina, dispositivos resonadores acústicos magnéticos y otros sistemas acusticoeléctricos novedosos en biosensores para la detección de uno o más biomarcadores de la invención.

45

Los procedimientos que implican la identificación y/o cuantificación de uno o más biomarcadores de la invención pueden practicarse en instrumentos de laboratorio o pueden incorporarse a plataformas de diagnóstico o

50 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 tanto, pueden constituir la base de medicina

55 a distancia.

55

Se describen en la presente memoria kits de diagnóstico para el diagnóstico y la monitorización de la presencia de un estado patológico. En una realización, los kits contienen adicionalmente un biosensor capaz de identificar y/o

60 cuantificar un biomarcador. Adecuadamente, un kit de acuerdo con la invención puede contener uno o más componentes seleccionados del grupo de: un ligador de ligandos o ligandos específicos del biomarcador o un mimético

60

estructural/conformacional del biomarcador, uno o más controles, uno o más reactivos y uno o más consumibles; opcionalmente junto con instrucciones para el uso del kit de acuerdo con cualquiera de los procedimientos definidos en la presente memoria.

- 5 La identificación de biomarcadores un estado patológico permite la integración de los procedimientos de diagnóstico y regímenes terapéuticos. La detección de un biomarcador de la invención 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
- 10 de respuesta adversa a fármacos. Los biomarcadores son útiles en el desarrollo de terapias personalizadas, como valoración de respuesta pueden usarse para ajuste fino de la dosificación, minimizar el número de medicaciones prescritas, reducir el retraso en el logro de una terapia efectiva y evitar reacciones farmacológicas adversas. Por tanto, al monitorizar un biomarcador de la invención, la asistencia al paciente puede adaptarse de manera precisa para satisfacer las necesidades determinadas por el trastorno y el perfil farmacogenómico del paciente, por tanto, el
- 15 biomarcador puede usarse para titular la dosis óptima, predecir una respuesta terapéutica positiva e identificar aquellos sujetos con alto riesgo de efectos secundarios graves.

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

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

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

30 trastorno, proporcionan una indicación del impacto de la terapia farmacológica.

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

#### EJEMPLO 1

35 Una preparación de nucleosoma disponible a nivel comercial producida mediante digestión de cromatina extraída de células MCF7 en donde el ADN y las proteínas en el nucleosoma se reticular para detectar la estabilidad (asegurando que todas las histonas presentes en la preparación se incorporan en nucleosomas intactos) se analizó para ADN metilado utilizando un procedimiento ELISA para el nucleótido asociado a nucleosoma 5-metilcitosina utilizando un

40 anticuerpo de captura anti-histona de fase sólida que une nucleosomas intactos y un anticuerpo de detección anti-5-metilcitosina monoclonal biotinilado. La muestra de nucleosoma se diluyó de forma serial en suero fetal de ternero y se evaluó en duplicado en el ELISA. El suero fetal de ternero puro también se procesó en el ELISA como una muestra de control que no contenía nucleosomas exentos de célula. El método de ensayo fue el siguiente: Se añadió una solución de anticuerpo antihistona en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 a pocillos de microvaloración (100 µl/pocillo) y se

45 incubó durante una noche a 4 °C para recubrir los pocillos con anticuerpo de captura. Se decantó el anticuerpo antihistona en exceso. Se añadió una solución de seroalbúmina bovina (20 g/l) a los pocillos (200 µl/pocillo) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los sitios de unión a proteína en exceso en los pocillos. Se decantó la solución de seroalbúmina bovina en exceso y se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo, tampón TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contiene 1 % de Tween 20). Se añadieron muestra (10 µl/pocillo) y tampón de

50 ensayo (50 µl/pocillo, TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contiene 0,9 % de NaCl, 0,05 % de desoxicolato de sodio y 1 % de sustituto de Nonidet P40) a los pocillos incubados 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó la mezcla de muestra y tampón de ensayo y se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de anticuerpo de detección anti-5-metilcitosina biotinilado (50 µl/pocillo) y se incubó 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el anticuerpo de detección en exceso y se lavaron de nuevo

55 los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución que contiene conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (50 µl/pocillo) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el conjugado en exceso y se lavaron de nuevo los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de sustrato coloreado (100 µl/pocillo, sal de diamonio del ácido 2,2'-azino[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.

60 Se midió la densidad óptica (DO) de los pocillos a una longitud de onda de 405 nm usando un lector de placas de

microvaloración estándar. Se observó una curva de dosis-respuesta de color creciente con una concentración creciente de anti-5-metilcitosina asociada a nucleosoma, con una baja señal de fondo observada en ausencia de 5-metilcitosina (suero fetal de ternero). La señal de ELISA positiva indica que la 5-metilcitosina detectada por ELISA está incorporada a nucleosoma intacto que comprende tanto proteína histona como ADN ya que (i) el anticuerpo de captura se une a las histonas de la muestra y (ii) el anticuerpo de detección se une al componente 5-metilcitosina de ADN. Se muestran los resultados en la Figura 1.

## EJEMPLO 2

10 Una preparación de nucleosoma disponible a nivel comercial producida mediante digestión de cromatina extraída de células A375 en donde el ADN y las proteínas en el nucleosoma se reticulan para detectar la estabilidad (asegurando que todas las histonas presentes en la preparación se incorporan en nucleosomas intactos) se analizó para ADN 5-hidroximetilado utilizando un procedimiento ELISA para el nucleótido asociado a nucleosoma 5-hidroximetilcitosina utilizando un anticuerpo de captura anti-histona de fase sólida que une nucleosomas intactos y un anticuerpo de  
 15 detección anti-5-hidroximetilcitosina monoclonal biotinilado. La muestra de nucleosoma se diluyó de forma serial en suero fetal de ternero y se evaluó en duplicado en el ELISA. El suero fetal de ternero puro también se procesó en el ELISA como una muestra de control que no contenía nucleosomas exentos de célula. El método de ensayo fue el siguiente: Se añadió una solución de anticuerpo antihistona en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 a pocillos de microvaloración (100 µl/pocillo) y se incubó durante una noche a 4 °C para recubrir los pocillos con anticuerpo de  
 20 captura. Se decantó el anticuerpo antihistona en exceso. Se añadió una solución de seroalbúmina bovina (20 g/l) a los pocillos (200 µl/pocillo) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los sitios de unión a proteína en exceso en los pocillos. Se decantó la solución de seroalbúmina bovina en exceso y se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo, tampón TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contiene 1 % de Tween 20). Se añadieron muestra (10 µl/pocillo) y tampón de ensayo (50 µl/pocillo, TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contiene 0,9 % de  
 25 NaCl, 0,05 % de desoxicolato de sodio y 1 % de sustituto de Nonidet P40) a los pocillos incubados 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó la mezcla de muestra y tampón de ensayo y se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de anticuerpo de detección anti-5-hidroximetilcitosina biotinilado (50 µl/pocillo) y se incubó 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el anticuerpo de detección en exceso y se lavaron de nuevo los pocillos tres veces con tampón de lavado  
 30 (200 µl/pocillo). Se añadió una solución que contiene conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (50 µl/pocillo) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el conjugado en exceso y se lavaron de nuevo los pocillos tres veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo). Se añadió una solución de sustrato coloreado (100 µl/pocillo, sal de diamonio del ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se midió la densidad óptica (DO) de los pocillos a una longitud  
 35 de onda de 405 nm usando un lector de placas de microvaloración estándar. Se observó una curva de dosis-respuesta de color creciente con una concentración creciente de 5-hidroximetilcitosina asociada a nucleosoma, con una baja señal de fondo observada en ausencia de 5-hidroximetilcitosina (suero fetal de ternero). La señal de ELISA positiva indica que la 5-hidroximetilcitosina detectada por ELISA está incorporada a nucleosoma intacto que comprende tanto proteína histona como ADN ya que (i) el anticuerpo de captura se une a las histonas de la muestra y (ii) el anticuerpo  
 40 de detección se une al componente 5-hidroximetilcitosina de ADN. Se muestran los resultados en la Figura 2.

## EJEMPLO 3

Se usaron dos procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual para medir el contenido de nucleosomas exentos de célula en circulación de muestras de sangre en suero y plasma tomadas de 20 sujetos sanos. El primer  
 45 procedimiento de ELISA actual (ELISA 1) fue el Roche Cell Death ELISA y el otro (ELISA 2) un ELISA que emplea un anticuerpo de captura antihistona y un anticuerpo de detección contra el complejo histona-ADN. Los niveles de nucleosomas detectados por los dos procedimientos de ELISA de nucleosoma actuales fueron más bajos en el plasma normal que en el suero normal. Se calculó que el intervalo normal (expresado en unidades de densidad óptica) para  
 50 el nivel en suero de nucleosomas (media  $\pm$  2 desviaciones estándar de la media de los resultados en suero de 20 sujetos sanos) eran de 0 - 4,3 unidades de OD para ELISA 1 y 0 - 1,4 para ELISA 2. Los intervalos respectivos para plasma fueron 0 - 0,95 y 0 - 0,96. Se muestran los resultados en la Figura 3.

También medimos los niveles de nucleosomas que contenían los dos nucleótidos asociados a nucleosoma así como  
 55 3 variantes de histona asociadas a nucleosoma y un MPT de histona en las mismas 20 muestras tomadas de sujetos sanos. Los resultados muestran que las muestras de suero sano tienen de manera uniforme niveles bajos de nucleosomas que contienen variantes de histona o MPT o nucleótidos. Los intervalos normales (expresados como densidad óptica) para el nivel en suero de nucleosomas que contenían variantes de histona, MPT o nucleótidos eran:  
 60 (a) 0 - 0,36 para mH2A1.1, (b) 0,05 - 0,78 para mH2A2, (c) 0,11 - 0,58 para H2AZ, (d) 0,06 - 0,61 para P-H2AX(Ser139), (e) 0,06-0,36 para 5-metilcitosina y (f) 0,03-0,36 para 5-hidroximetilcitosina. Los resultados de plasma de EDTA

medidos fueron más altos para los 20 sujetos sanos. Los resultados se muestran en las figuras 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

#### EJEMPLO 4

- 5 Medimos nucleosomas exentos de célula que contenían 5-metilcitosina en plasma de EDTA tomado de 13 sujetos sanos y 55 sujetos con cáncer de estómago, intestino grueso, recto, pulmón (carcinoma de células pequeñas y diversos carcinomas de células no pequeñas), mama, ovario, páncreas, próstata, riñón y diversos cánceres orales (cavidad oral, paladar, faringe y laringe). Las 13 muestras de sujetos sanos fueron positivas para uno o más tipos de nucleosoma exento de célula. Las 55 muestras de pacientes con cáncer fueron positivas para todos los tipos de
- 10 nucleosoma exento de célula evaluados. Sin embargo, los niveles detectados en las muestras tomadas de sujetos con cáncer fueron más altos que los encontrados en las muestras de sujetos sanos y los resultados mostraron que los sujetos sanos y con cáncer se pueden discriminar. Por ejemplo, el intervalo normal calculado en términos de OD como la media  $\pm$  2 desviaciones estándar de la media para la 5-metilcitosina asociada con el nucleosoma 0 - 1,41. Utilizando este valor de corte, las 13 muestras sanas fueron negativas y 30 de las 55 muestras de cáncer fueron positivas (una
- 15 sensibilidad clínica global de 55 %) incluido 38 % (3 de 8) de muestras de cáncer de estómago, 60 % (3 de 5) de intestino grueso, 33 % (1 de 3) de recto, 33 % (2 de 6) de pulmón de célula pequeña, 64 % (9 de 14) de pulmón de célula no pequeña, 33 % (2 de 6) de mama, 100 % (1 de 1) de ovario, 100 % (1 de 1) de páncreas, 33 % (2 de 6) de próstata, 100 % (1 de 1) de riñón y 60 % (3 de 5) oral. Se muestran los resultados en la Figura 17.
- 20 También utilizamos los procedimientos de la invención para medir una variedad de otras estructuras asociadas a nucleosoma en las mismas muestras. Los resultados de estos inmunoensayos se compilaron para proporcionar un perfil de estructuras de nucleosoma en muestras tomadas de pacientes con cáncer normalizadas con respecto a los niveles detectados de nucleosomas que contienen 5-metilcitosina. Comparamos los perfiles resultantes con la estructura de nucleosoma de muestras tomadas de sujetos sanos. Se descubrió que el perfil de estructura de
- 25 nucleosoma de nucleosomas exentos de célula era diferente al de los sujetos sanos. Se muestran los resultados en la Figura 20. De forma similar, compilamos perfiles de estructura de nucleosoma de muestras tomadas de una variedad de enfermedades distintas de cáncer y los comparamos con el perfil de nucleosomas en muestras tomadas de pacientes con cáncer y de sujetos sanos. Se muestran los resultados en la Figura 21.
- 30 Luego, realizamos otro experimento similar que incluía muestras de 10 sujetos sanos y un adicional de 62 pacientes con cáncer de diversos tipos. Los resultados fueron similares al primer experimento. Por ejemplo, utilizando los resultados de 5-metilcitosina asociada con nucleosoma y un corte de media + 2 desviaciones estándar de la media de los resultados de sujetos sanos, se obtuvieron resultados negativos para los 10 sujetos sanos y se obtuvieron resultados positivos para el 95 % (61 de 62) de los pacientes con cáncer que incluyen 9 de 9 pacientes con cáncer de
- 35 próstata, 5 de 5 pacientes con cáncer de piel, 8 de 8 pacientes con cáncer de esófago, 12 de 13 pacientes con cáncer de vejiga, 2 de 2 pacientes con cáncer de cuello uterino y 1 de 1 pacientes con cáncer de colon, 4 de 4 pacientes con cáncer de mama, 7 de 7 pacientes con cáncer de ovario, 7 de 7 pacientes con cáncer de laringe, 3 de 3 pacientes con cáncer de pulmón y 3 de 3 pacientes con cáncer renal. Se muestran los resultados en la Figura 18. Este resultado indica que los niveles de nucleótido en suero y los niveles de nucleótidos asociados con nucleosoma, incluida
- 40 particularmente 5-metilcitosina, son biomarcadores clínicamente sensibles para el cáncer.

#### EJEMPLO 5

- Se usaron dos procedimientos de ELISA de nucleosoma de la técnica actual para medir el contenido de nucleosoma exento de célula en circulación de muestras de 3 sujetos con cáncer de colon, 13 sujetos con cáncer de pulmón, 2
- 45 sujetos con cáncer de páncreas, 1 sujeto con cáncer oral y una muestra de nucleosoma producido a partir de sujetos sanos según el procedimiento de Holdenrieder (\*Holdenrieder et al., 2001). El primer procedimiento de ELISA actual (ELISA 1) fue el Roche Cell Death ELISA y el otro (ELISA 2) un ELISA que emplea un anticuerpo de captura antihistona y un anticuerpo de detección contra el complejo histona-ADN.
- 50 También medimos los niveles de nucleosomas que contienen los nucleótidos 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina así como tres variantes de histona y una MPT de histona en las mismas 19 muestras tomadas de sujetos con cáncer. Los resultados muestran que, aunque se detectaron resultados de nucleosoma bajos para procedimientos ELISA de la técnica actual para la mayoría de los sujetos, específicamente para pacientes con cáncer pancreático y oral, la
- 55 mayoría de estas muestras tienen mayores niveles detectables de nucleosomas que contienen uno o más nucleótidos asociados con nucleosoma o variantes de histona. Los resultados para las muestras tomadas de 3 sujetos con cáncer de colon, 13 sujetos con cáncer de pulmón, 2 sujetos con cáncer pancreático y 1 sujeto con cáncer oral se muestran en las figuras 10, 11, 12 y 13, respectivamente. Se detectaron niveles de variante de histona asociada con nucleosoma y niveles de MPT de histona significativos en 16 de las 19 muestras de cáncer (todas menos 3 muestras de cáncer de
- 60 pulmón). Además, se detectaron niveles significativos de 5-hidroximetilcitosina asociada con nucleosoma en 12 de las

19 muestras de cáncer. Además, se detectaron niveles significativos de 5-metilcitosina asociada con nucleosoma en todas las 19 muestras de cáncer.

Además, el patrón de niveles de nucleosoma que contienen diferentes niveles de nucleótidos, variante de histona y MPT de histona no es uniforme para todos los sujetos sino que muestra diferentes patrones para diferentes cánceres evaluados. Para facilitar la comparación entre los resultados de sujetos con los mismos cánceres o cánceres diferentes, los resultados de las pruebas de nucleosoma (de nucleosomas que contenían macroH2A1.1, macroH2A2, H2AZ, P-H2AX(Ser139), 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina) se normalizaron como una proporción de la señal OD observada para nucleosomas que contenían 5-metilcitosina. Los resultados normalizados (con barras de error que muestran la desviación estándar en resultados donde se evaluaron las muestras de más de un sujeto) se muestran para cada cáncer en la figura 14 así como los mismos resultados para la muestra de nucleosoma producida a partir de sujetos sanos (no se midieron mH2A2 y 5-hidroximetilcitosina para esta muestra). La figura 14 muestra que el patrón de distribución de nucleosomas que contienen los diferentes nucleótidos normalizados, variantes o MPT de histona en los cuatro cánceres investigados difiere bastante marcadamente de la distribución de nucleosomas en la muestra preparada a partir de sujetos sanos. Por ejemplo, el nivel relativo de nucleosomas que contienen macroH2A1.1 en la muestra de nucleosoma sana difiere del detectado en las muestras de cualquiera de los tipos de cáncer. Por ende, la presente invención se puede utilizar como un procedimiento para la detección de cáncer en una prueba de selección basada en sangre simple. Resultará evidente para los expertos en la técnica que la invención incluye la evaluación de nucleosomas que contienen otros nucleótidos, variantes de histona y/o modificaciones de histona adicionales para discriminar mejor o adicionalmente entre los nucleosomas exentos de célula circulantes de origen tumoral u otro origen patológico.

Además, el patrón de tipos de nucleosoma observado difiere para diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, las muestras tomadas de sujetos con cáncer de colon, pancreático y oral se pueden distinguir por diferentes niveles normalizados de H2AZ y 5-hidroximetilcitosina asociadas con nucleosoma. De modo similar, el cáncer oral tiene diferentes niveles normalizados de nucleosomas que contienen mH2A2 o P-H2AX(Ser139) que cualquiera de los otros tres tipos de cáncer y las muestras de sujetos con cáncer pancreático se pueden distinguir de las muestras de sujetos con cáncer de colon sobre la base de un nivel relativo diferente de nucleosomas que contienen variante macroH2A1.1. Por ende, la presente invención se puede utilizar generalmente para diagnosticar cáncer y para distinguir un tipo de cáncer particular. Resultará evidente para los expertos en la técnica que la invención incluye la evaluación de nucleosomas que contienen otras variantes de histona, modificaciones de histona y/o nucleótidos adicionales para discriminar mejor o adicionalmente entre los nucleosomas exentos de célula circulantes de diferente origen tumoral específico u otro origen patológico.

### 35 EJEMPLO 6

Evaluamos el procedimiento de la invención en muestras de suero tomadas de 3 sujetos sanos y de 10 pacientes con cáncer de colon. Medimos los nucleosomas que contenían 5-metilcitosina en estas muestras y los resultados de cáncer se elevaron uniformemente sobre los resultados obtenidos a partir de sujetos sanos como se muestra en la figura 16.

### 40 EJEMPLO 7

Medimos los niveles de 5-metilcitosina asociada con nucleosoma de muestras de plasma de EDTA humano tomadas de pacientes con cáncer de pulmón y colon. Los niveles detectados se correlacionaron con el avance de la enfermedad de los pacientes. Los resultados que se muestran en la figura 19 indican que los niveles de 5-metilcitosina asociada con nucleosoma aumentan con la gravedad de la enfermedad en términos de tamaño, etapa, propagación nodal, y los niveles de 5-metilcitosina asociada con nucleosoma se pueden utilizar, juntos o como parte de un panel diagnóstico, como indicadores del avance de la enfermedad,

### 50 REFERENCIAS

- Allen y col., A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research*: 32(3) e38DOI: 10.1093/nar/gnh032
- Bawden y col., Detection of histone modification in cell-free nucleosomes. WO 2005/019826, 2005
- 55 Boulard y col., Histone variant macroH2A1 deletion in mice causes female-specific steatosis. *Epigenetics & Chromatin*: 3(8), 1-13, 2010 Cell Biolabs, Inc. Product Manual for "Global DNA Methylation ELISA Kit (5'-methyl-2'-deoxycytidine Quantitation)", 2011
- Dai y col., Detection of Post-translational Modifications on Native Intact Nucleosomes by ELISA. <http://www.jove.com/details.php?id=2593> doi: 10.3791/2593. *J Vis Exp*. 50 (2011).
- 60 Deligezer y col., Sequence-Specific Histone Methylation Is Detectable on Circulating Nucleosomes in Plasma. *Clinical*



- Chemistry 54(7), 1125-1131, 2008  
 Epigentek Group Inc, MethyLamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit, User Guide, Version 2.0802, 2009  
 Esteller, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps *Nature Reviews Genetics*: 8, 286-298, 2007
- 5 Feinberg y Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*: 301, 89-92, 1983  
 Grutzmann y col., Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. *PLoS ONE* 3(11): e3759. doi:10.1371/journal.pone.0003759, 2008  
 Hervouet y col., Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 Interactions Promotes Tumorigenesis from Human and Mice Glial  
 10 Cells *PLoS ONE* 5(6): e11333. doi:10.1371/journal.pone.0011333, 2010  
 Hua y col., Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Molecular Systems Biology* 4; artículo número 188; doi:10.1038/msb.2008.25, 2008  
 Herranz y Esteller, DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. *Methods Mol Biol.*361:25-62, 2007
- 15 Holdenrieder y col., Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*: 95, 114-120, 2001  
 \*Holdenrieder y col, Nucleosomes in Serum as a Marker for Cell Death. *Clin Chem Lab Med*; 39(7), 596-605, 2001  
 Holdenrieder y col., Cell-Free DNA in Serum and Plasma: Comparison of ELISA and Quantitative PCR. *Clinical Chemistry*: 51(8), 1544-1546, 2005
- 20 Holdenreider y Stieber, Clinical use of circulating nucleosomes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*; 46(1): 1-24, 2009  
 Kapoor y col., The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature*: 468, 1105-1111, 2010  
 Mansour y col., The Prognostic Significance of Whole Blood Global and Specific DNA Methylation Levels in Gastric  
 25 Adenocarcinoma. *PLoS ONE* 5(12): e15585. doi:10.1371/journal.pone.0015585, 2010  
 Moore y col., Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *The Lancet Oncology*: 9(4), 359 - 366, 2008  
 Ogoshi y col., Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells. *Genomics*: En prensa, 2011  
 Pennings y col., DNA methylation, nucleosome formation and positioning. *Briefings in functional genomics and proteomics*: 3(4), 351-361, 2005  
 30 Rodríguez-Paredes y Esteller, Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature Medicine*: 17(3), 330-339, 2011  
 Salgame y col., An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 25(3), 680-681, 1997  
 Sporn y col., Histone macroH2A isoforms predict the risk of lung cancer recurrence. *Oncogene*: 28(38), 3423-8, 2009
- 35 Stroud y col., 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biology*: 12:R54, 2011  
 Tachiwana y col., Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Cryst*: D67, 578-583, 2011  
 Ting Hsiung y col., Global DNA Methylation Level in Whole Blood as a Biomarker in Head and Neck Squamous Cell  
 40 Carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*: 16(1), 108-114, 2007  
 van Nieuwenhuijze y col., Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*; 62: 10-14, 2003  
 Vasser y col., Measurement of Global DNA Methylation. *Genetic Engineering and Biotechnology News*: 29(7), 2009  
 Whittle y col., The Genomic Distribution and Function of Histone Variant HTZ-1 during *C. elegans* Embryogenesis.  
 45 *PLoS Genet* 4(9): 1-17, 2008  
 Zee y col., Global turnover of histone post-translational modifications and variants in human cells *Epigenetics & Chromatin*. 3(22): 1-11, 2010  
 Zhang y col., Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra highpressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*: 413(2), 164-170, 2011
- 50

**REIVINDICACIONES**

1. El uso de una base de ADN asociada con un nucleosoma exento de célula como biomarcador en una muestra de fluido corporal para el diagnóstico de cáncer, cardiomiopatía, lupus eritematoso sistémico, colitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide, donde la base de ADN se selecciona de entre: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina.
2. El uso tal como se define en la reivindicación 1, donde el nucleosoma exento de célula es un mononucleosoma o un oligonucleosoma.
3. El uso tal como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la base de ADN asociada con un nucleosoma exento de célula se mide en una muestra de sangre.
4. El uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el cáncer es un cáncer de vejiga, de mama, de colon, de cuello uterino, de esófago, de riñón, de intestino grueso, de pulmón, de cavidad oral, de ovario, de páncreas, de próstata, de recto, de piel o de estómago.
5. Un procedimiento para detectar la presencia de una base de ADN asociada con un nucleosoma exento de célula en una muestra de fluido corporal que comprende las etapas de:
- (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un primer agente de unión que se une a nucleosomas;
  - (ii) poner en contacto los nucleosomas unidos en la etapa (i) con un segundo agente de unión que se une a la base de ADN;
  - (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a la base de ADN en la muestra de fluido corporal
  - (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas que contienen la base de ADN en la muestra de fluido corporal.
- donde la base de ADN se selecciona de entre: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina.
6. Un procedimiento para detectar la presencia de una base de ADN asociada con un nucleosoma exento de célula en una muestra de fluido corporal que comprende las etapas de:
- (i) poner en contacto la muestra de fluido corporal con un primer agente de unión que se une a la base de ADN;
  - (ii) poner en contacto la base de ADN unida en la etapa (i) con un segundo agente de unión que se une a nucleosomas;
  - (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a nucleosomas en la muestra de fluido corporal;
  - y
  - (iv) usar la presencia o el grado de dicha unión como medida de la presencia de nucleosomas que contienen la base de ADN en la muestra de fluido corporal.
- donde la base de ADN se selecciona de entre: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina.
7. Un procedimiento tal como se define en la reivindicación 5 o la reivindicación 6, donde el agente de unión es un anticuerpo.
8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la muestra de fluido corporal es sangre o suero o plasma.
9. Un procedimiento *in vitro* para detectar o diagnosticar un estado patológico en un sujeto animal o humano que comprende las etapas de:
- (i) detectar o medir una base de ADN asociada con un nucleosoma exento de célula en un fluido corporal obtenido de un sujeto; y
  - (ii) usar el nivel de base de ADN asociada con un nucleosoma detectado para identificar el estado patológico del sujeto,
- donde la base de ADN se selecciona de entre: 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina,
- donde la enfermedad se selecciona de: cáncer, cardiomiopatía, lupus eritematoso sistémico, colitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide.

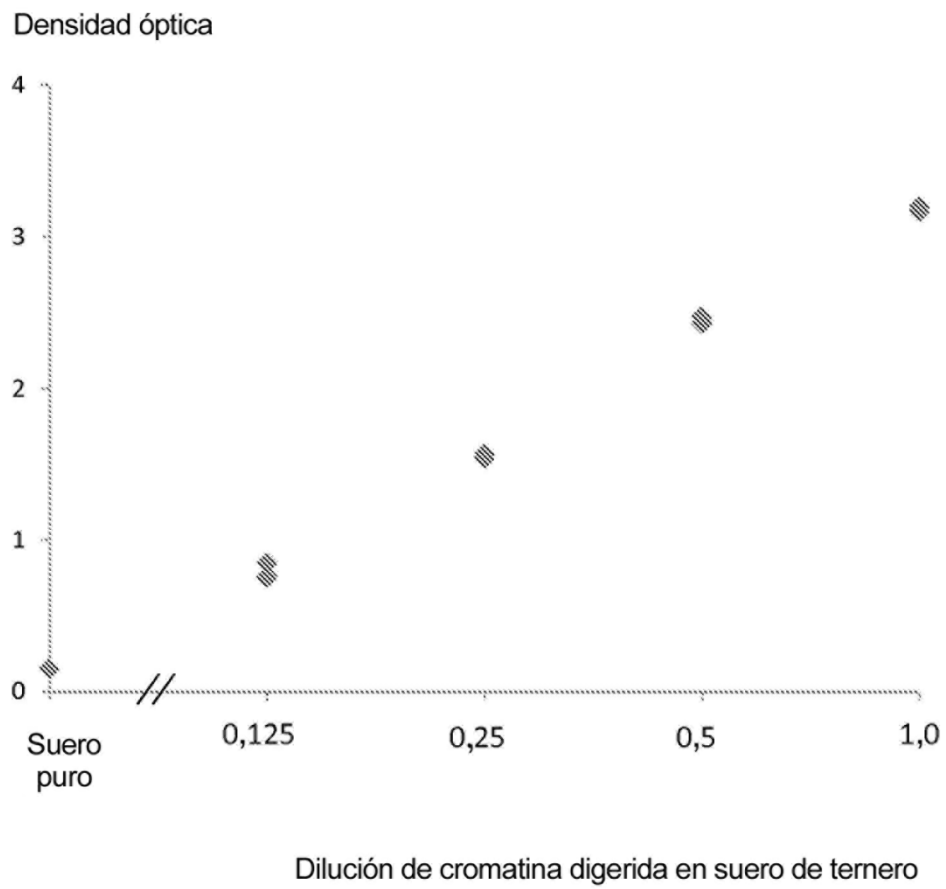


FIGURA 1

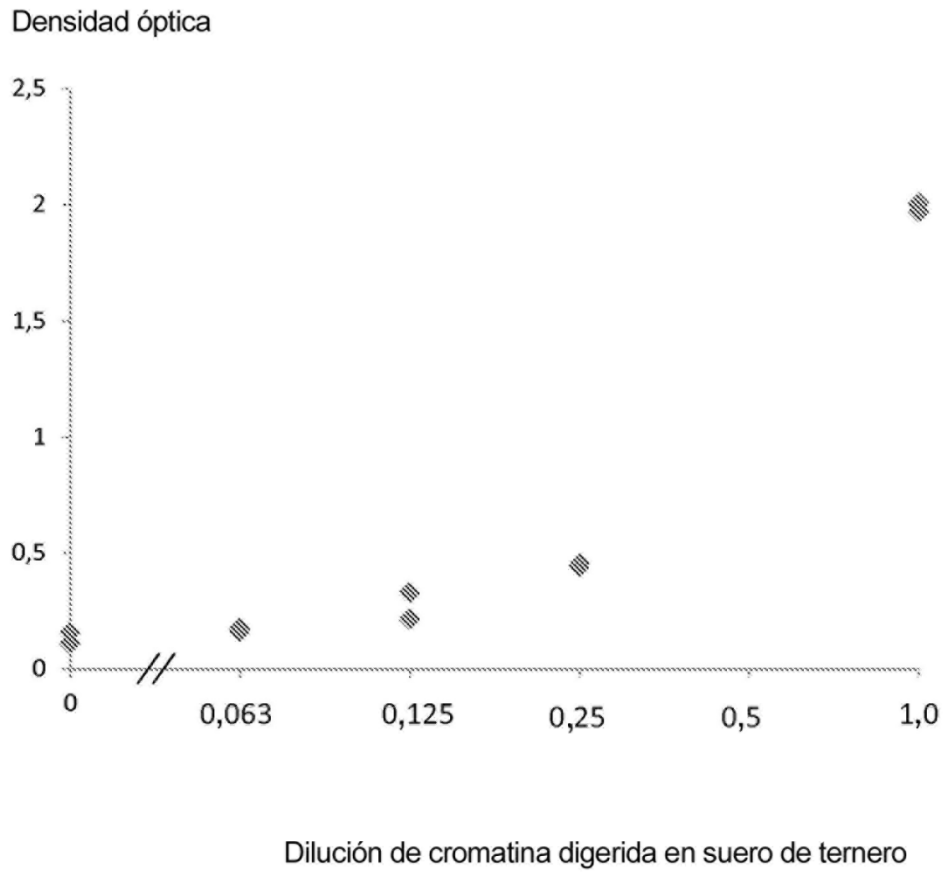


FIGURA 2

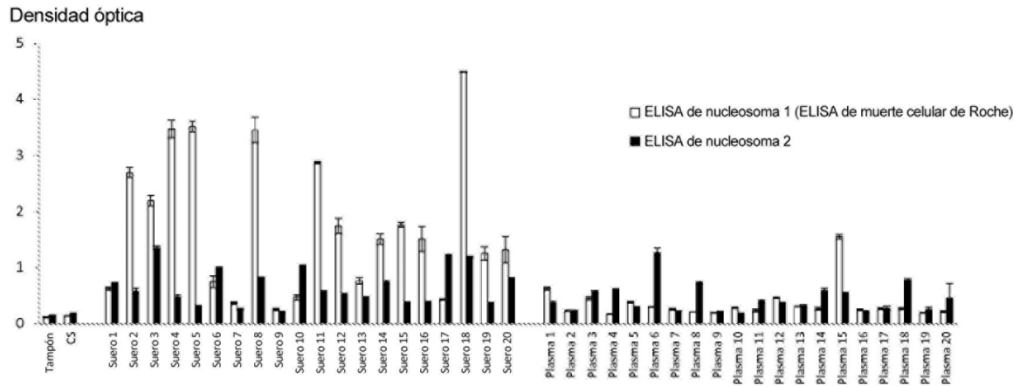


FIGURA 3

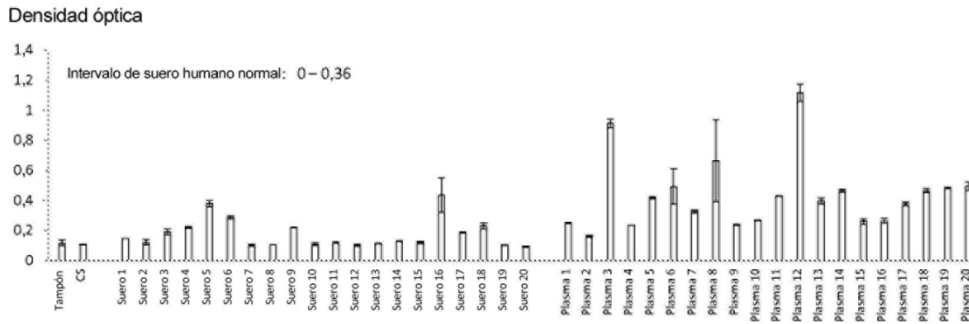


FIGURA 4

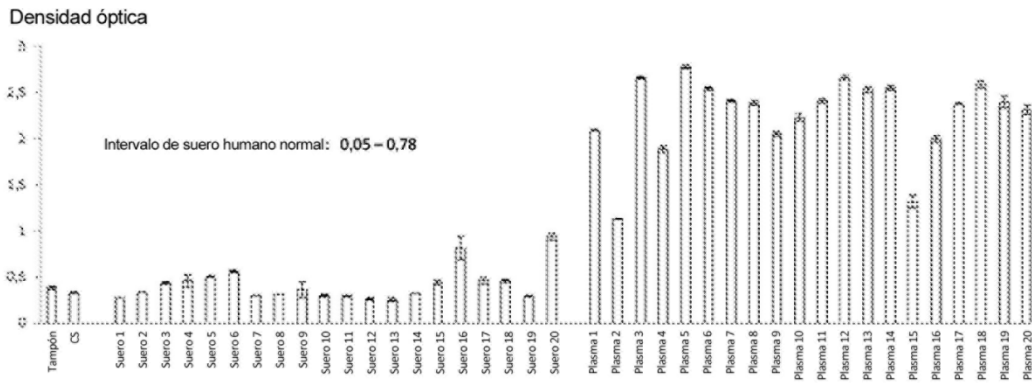


FIGURA 5

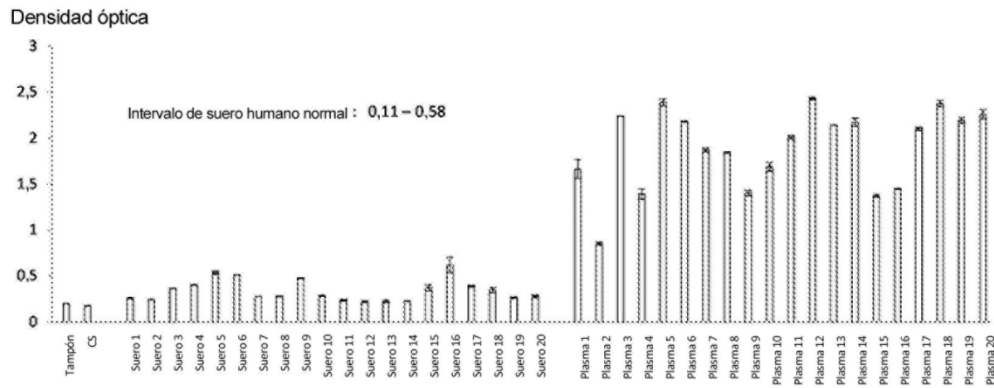


FIGURA 6

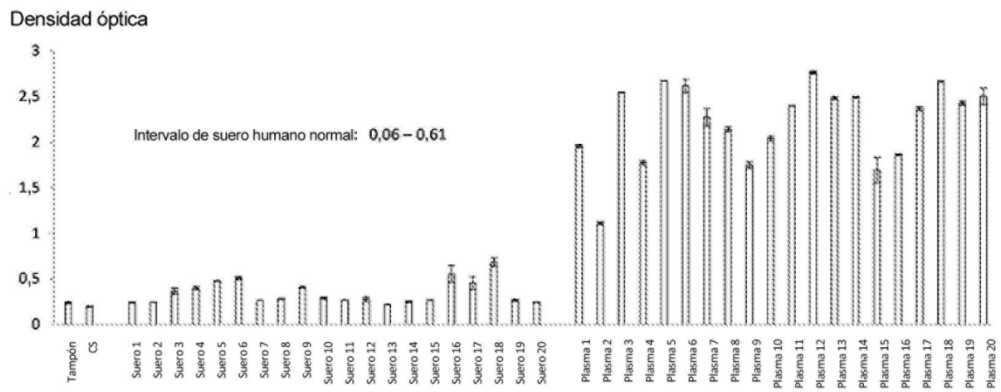


FIGURA 7

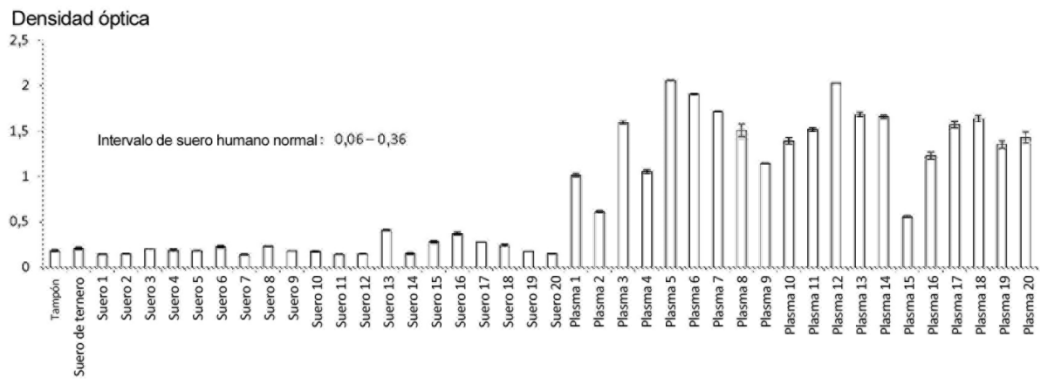


FIGURA 8

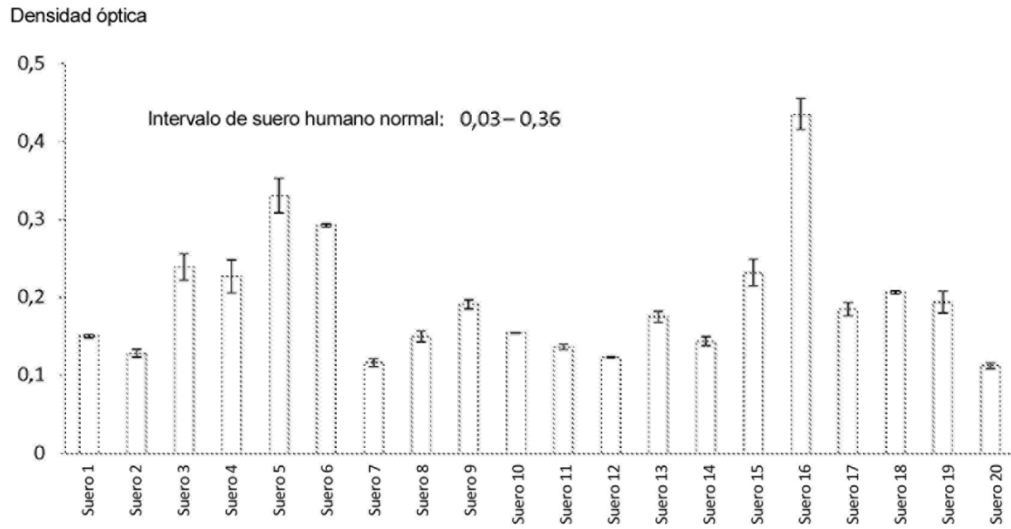


FIGURA 9

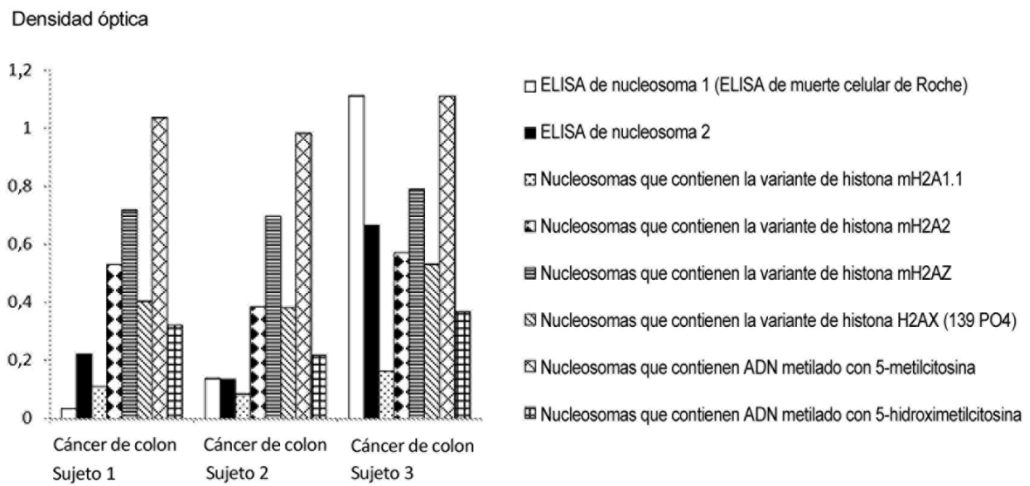


FIGURA 10



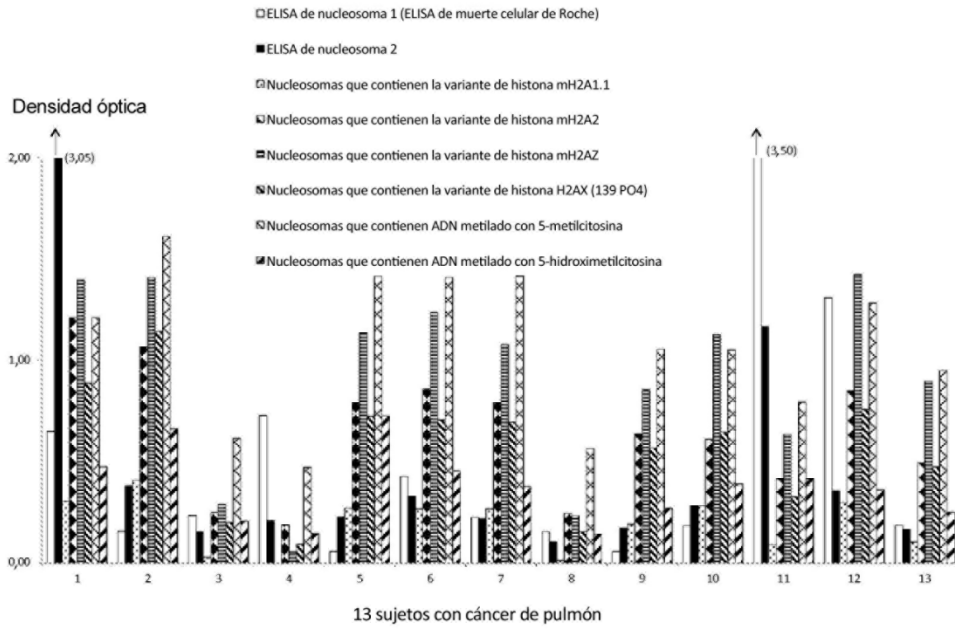


FIGURA 11

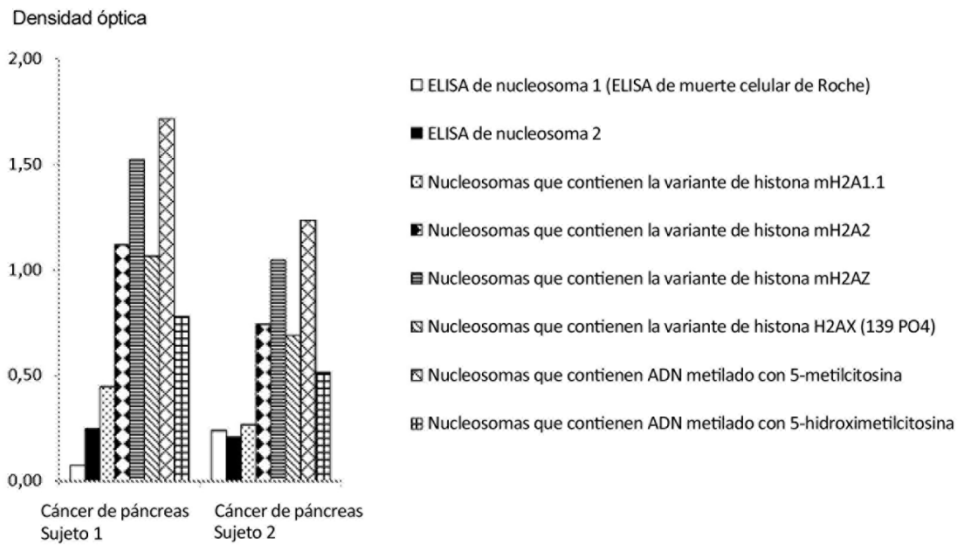


FIGURA 12

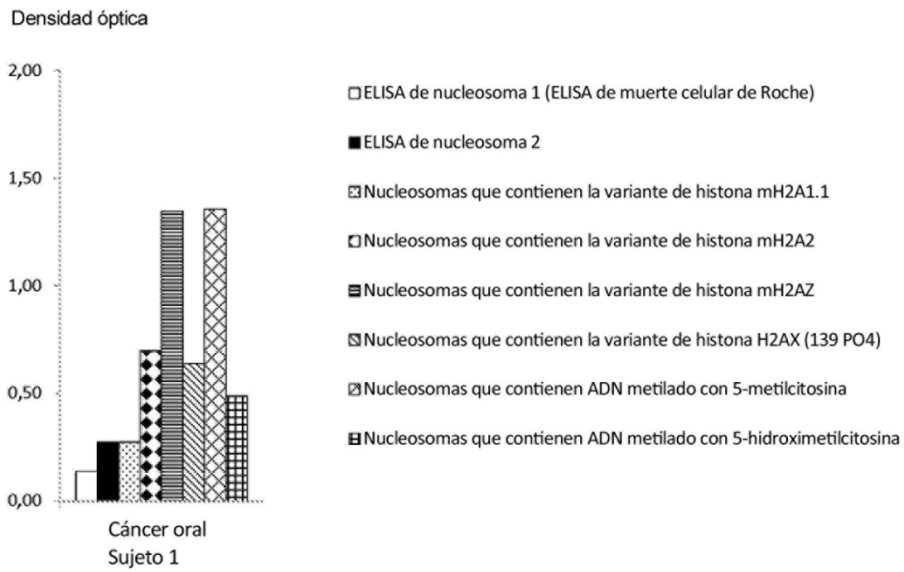


FIGURA 13

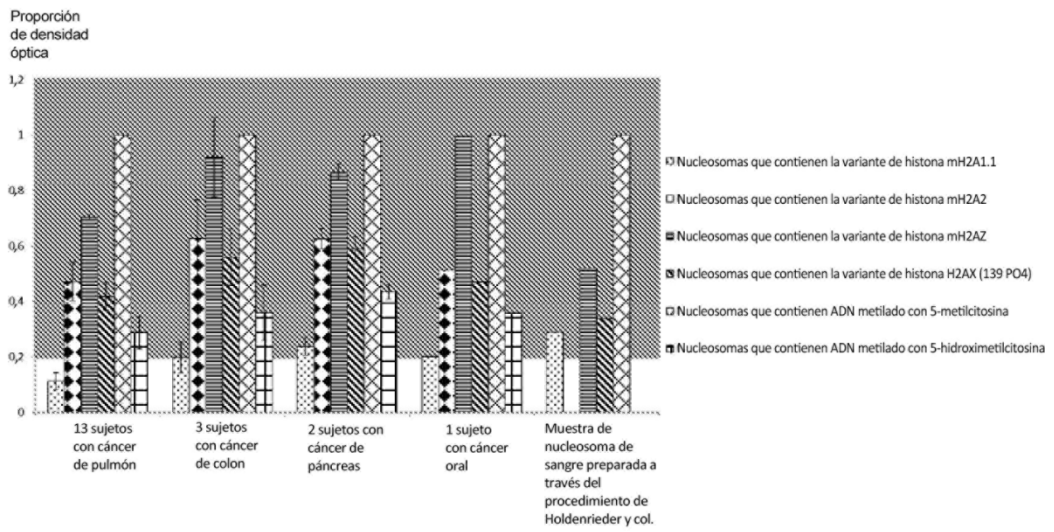


FIGURA 14

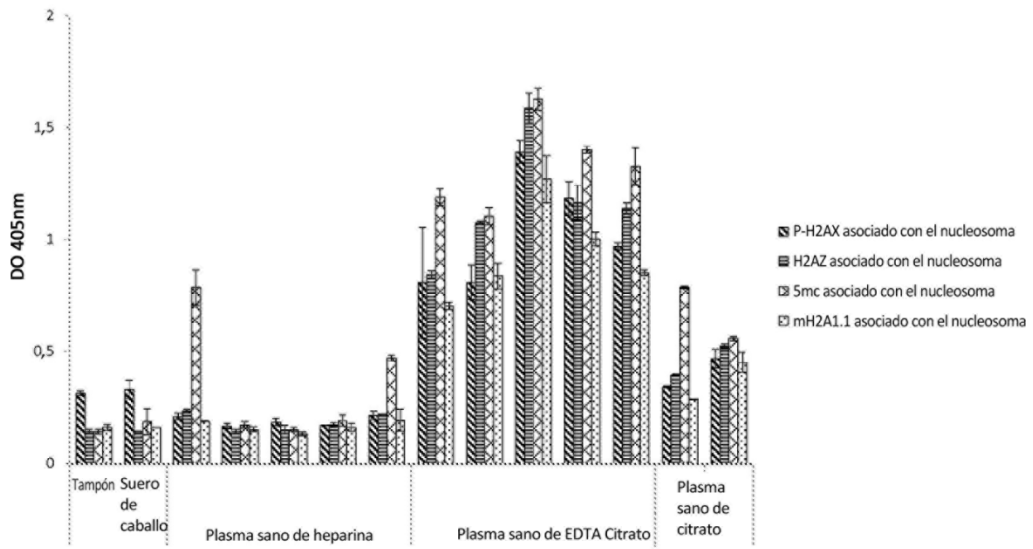


FIGURA 15

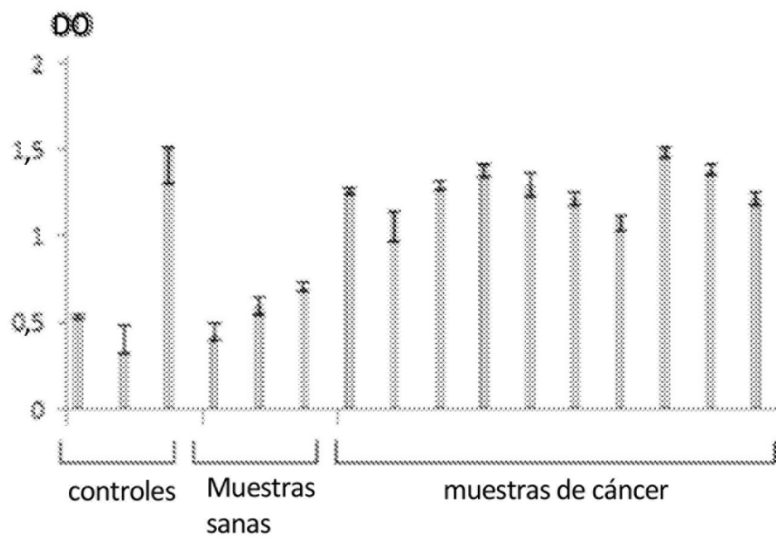
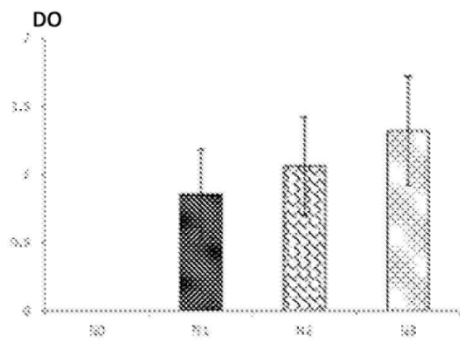
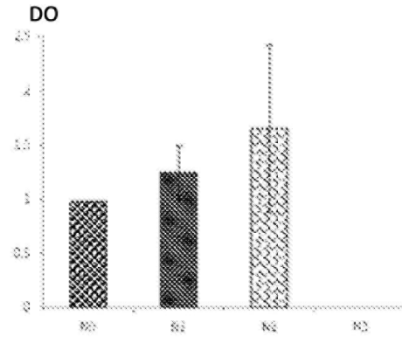


FIGURA 16





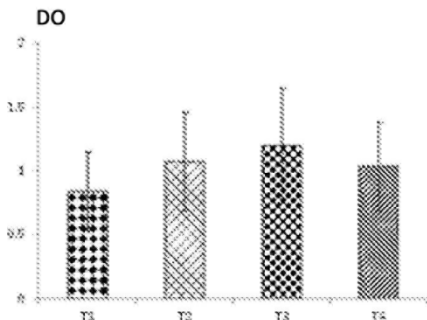
Fase nodal de cáncer de pulmón



Fase nodal de cáncer de colon

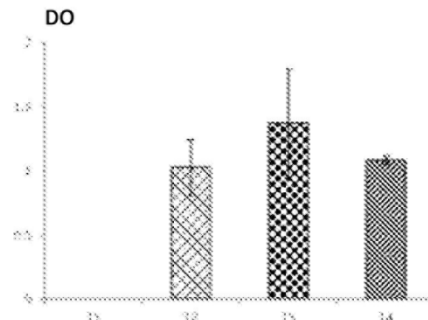
**N0** Sin metástasis de ganglios linfáticos regional  
**N1** Metástasis en los ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales y/o hiliares ipsilaterales y en los ganglios intrapulmonares, incluida la afectación por extensión directa  
**N2** Metástasis en los ganglios linfáticos mediastinales ipsilaterales y/o subcarinales  
**N3** Metástasis en los ganglios linfáticos mediastinales contralaterales, hiliares contralaterales, ipsilaterales o escalenos contralaterales o supraclaviculares

**N0** Sin metástasis de ganglios linfáticos regional  
**N1** Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regional  
**N2** Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regional



Fase/tamaño de cáncer de pulmón

**T1:** tumor <3cm  
**T2:** 3cm < tumor < 7cm  
**T3:** tumor > 7 cm  
**T4:** tumor de cualquier tamaño que invade otro órgano, tejido



Fase/tamaño de cáncer de colon

**T1:** tumor invade submucosa  
**T2:** tumor invade muscularis propria  
**T3:** tumor invade a través de la muscularis propria hacia tejidos pericólicas  
**T4:** tumor penetra en la superficie del peritoneo visceral, invade o se adhiere a los otros órganos o estructuras

FIGURA 19

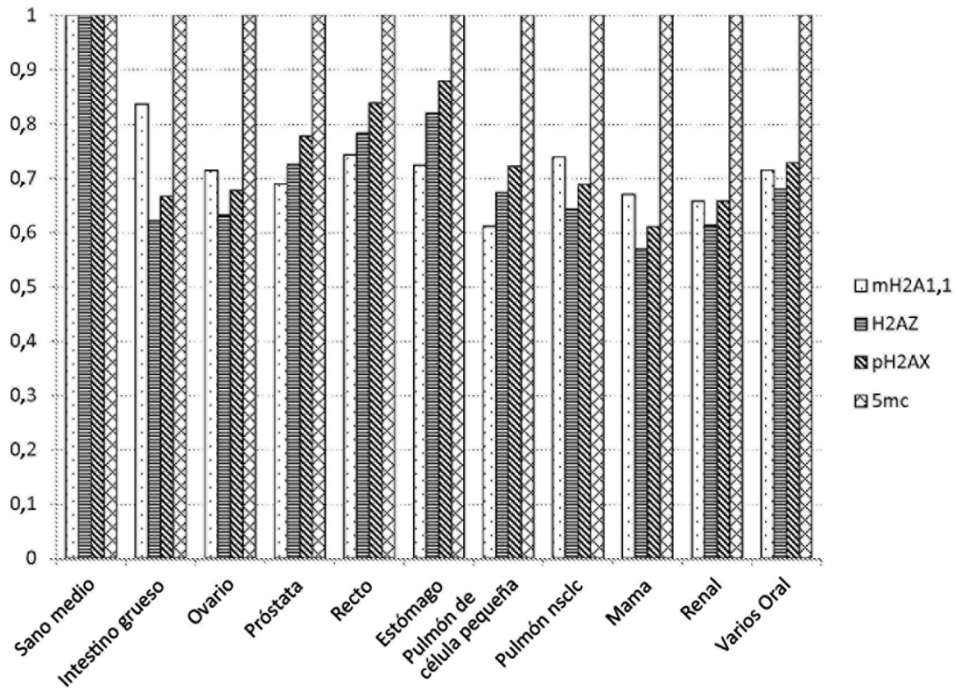


FIGURA 20

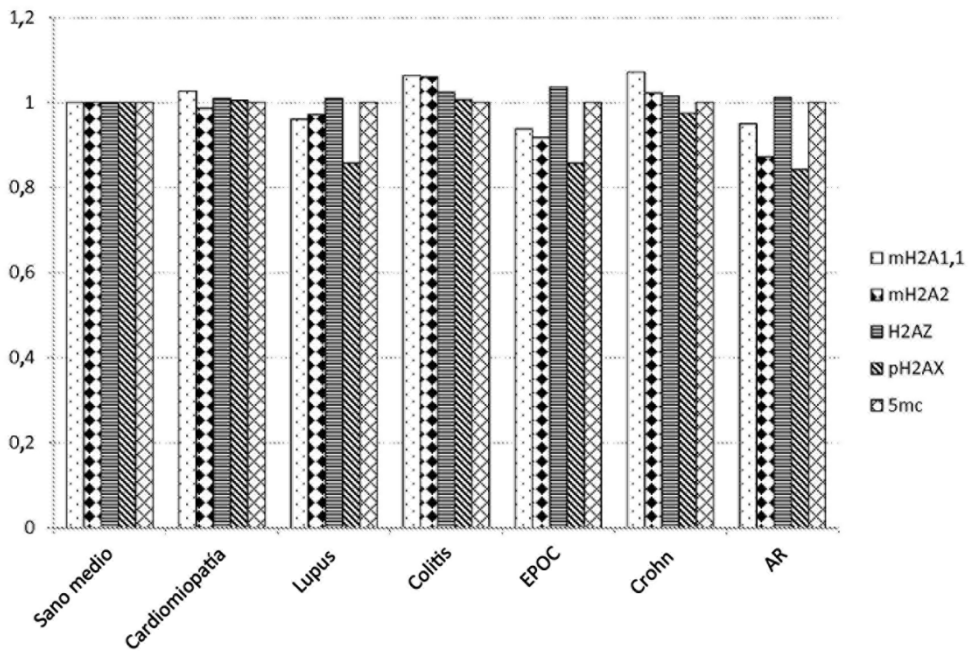


FIGURA 21