

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 701**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2016 PCT/GB2016/051994**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017 WO17001863**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2016 E 16736594 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3317671**

54 Título: **Uso de nucleosomas libres de células como biomarcadores en muestras de esputo**

30 Prioridad:

01.07.2015 GB 201511512

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

08.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MICALLEF, JACOB y
HERZOG, MARIELLE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 772 701 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

Uso de nucleosomas libres de células como biomarcadores en muestras de esputo

Campo de la invención

5 La invención se refiere al uso de nucleosomas libres de células y, en particular, a una característica epigenética de los nucleosomas libres de células como biomarcador de la enfermedad. La invención también proporciona un procedimiento para la detección de cáncer de pulmón y precáncer mediante la detección y medición de la presencia de nucleosomas y nucleosomas alterados epigenéticamente en muestras de esputo. En particular, el procedimiento se relaciona con la detección y el perfil epigenético de fragmentos de cromatina nucleosómica en muestras de esputo y el uso de esta información epigenética para establecer su origen celular en la cromatina de las células pulmonares sanas o en la cromatina de las células de cáncer de pulmón.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer de pulmón es una enfermedad común con un estimado de 1,8 millones de casos nuevos y 1,6 millones de muertes en todo el mundo en 2012. La mayoría de los casos de cáncer de pulmón están asociados con el tabaquismo. La mortalidad varía mucho dependiendo de si la enfermedad se detecta en una etapa localizada temprana, cuando hay opciones de tratamiento efectivas disponibles, o en una etapa tardía cuando la enfermedad puede haberse diseminado dentro del pulmón o más allá cuando el tratamiento es más difícil. La tasa de supervivencia a 5 años puede ser tan alta como del 80% para aquellos en quienes se detecta la enfermedad en la etapa IA, pero solo alrededor del 4% para aquellos en quienes se detecta la enfermedad en etapa tardía. Desafortunadamente, la mayoría de los cánceres se detectan actualmente en una etapa tardía.

20 Los procedimientos seguros y no invasivos para la detección del cáncer de pulmón permitirían la detección temprana del cáncer, lo que llevaría a un tratamiento más temprano y muchos años de vida salvada. La detección temprana del cáncer también ahorraría dinero y recursos para los proveedores de atención médica al reducir la necesidad de costosas terapias farmacológicas y hospitalizaciones en etapas avanzadas. Idealmente, las pruebas de cáncer de pulmón también identificarían nódulos de pulmón potencialmente malignos o precancerosos que pueden progresar a cáncer si no se tratan, pero se pueden extirpar o controlar si se identifican.

25 Los procedimientos actuales para la detección del cáncer de pulmón incluyen radiografías de tórax y tomografías computarizadas, pero estos procedimientos tienen poca precisión clínica y someten a los pacientes a dosis potencialmente peligrosas de rayos X. Los estudios han demostrado que el cribado con tomografía computarizada de baja dosis detecta nódulos potencialmente cancerosos en poblaciones de alto riesgo y disminuye la mortalidad. Sin embargo, la tomografía computarizada de baja dosis también tiene inconvenientes, incluida su interpretación subjetiva, una baja especificidad clínica para el cáncer de pulmón que conduce a una alta tasa de falsos positivos y posibles problemas de seguridad derivados del uso repetido de rayos X incluso a dosis más bajas. La baja especificidad clínica de los procedimientos de rayos X y tomografía computarizada significa que detectan nódulos de etiología desconocida en los pulmones de muchos sujetos que no pueden identificarse como de naturaleza maligna o no maligna y esto ha llevado a otro desafío diagnóstico para los oncólogos. Por lo tanto, existe una necesidad clínica de una prueba no invasiva para el diagnóstico diferencial de los nódulos pulmonares malignos y no malignos.

30 Otros procedimientos de prueba de cáncer de pulmón en investigación incluyen pruebas de mutación de secuencias de ADN y pruebas específicas de metilación de secuencias de genes. Las anomalías del ADN son características de todas las enfermedades cancerosas. El ADN de las células cancerosas difiere del de las células sanas en muchos aspectos, que incluyen, entre otros, mutaciones puntuales, translocaciones, número de copias de genes, anomalías de microsatélites, integridad de la cadena de ADN y modificaciones de nucleótidos (por ejemplo, metilación de citosina en la posición 5). Estas alteraciones asociadas con el tumor en la estructura o secuencia del ADN se investigan de forma rutinaria en células cancerosas o tejidos extraídos en una biopsia o cirugía con fines de diagnóstico clínico, pronóstico y selección de tratamiento personalizado. Sin embargo, las pruebas de ADN en los tejidos son demasiado invasivas para pruebas o exámenes de detección generalizados.

35 La sangre de los pacientes con cáncer contiene ADN tumoral circulante (ctDNA) que se cree que se origina en células cancerosas moribundas o muertas. La investigación de muestras de sangre y tejidos coincidentes de pacientes con cáncer muestra que las mutaciones asociadas al cáncer, presentes en el tumor de un paciente (pero no en sus células sanas) también están presentes en el ctDNA en las muestras de sangre tomadas del mismo paciente (Newman y col., 2014). De manera similar, las secuencias de ADN, particularmente las secuencias promotoras de genes, que están metiladas diferencialmente (alteradas epigenéticamente por la metilación de residuos de citosina) en células cancerosas también pueden detectarse como secuencias metiladas en ctDNA en la circulación.

40 Un desafío para las pruebas de mutación de secuencia de ctDNA es que cualquier mutación de secuencia particular solo ocurrirá en una minoría (generalmente una pequeña minoría) de cánceres. Por lo tanto, cualquier procedimiento de detección de cáncer que se base en la detección de una secuencia de mutación tendrá una baja sensibilidad clínica y detectará solo una pequeña proporción de cánceres, incluso si tiene un rendimiento analítico perfecto y siempre detecta la mutación si está presente. Por ejemplo, cuando ocurre una mutación particular en solo el 5% de los cánceres, cualquier prueba de este tipo solo puede tener una sensibilidad clínica del 5%, incluso si el procedimiento

en sí tiene una sensibilidad analítica del 100%. Sin embargo, debido a que el ADN de todos los cánceres contiene mutaciones de secuencia; La sensibilidad clínica para la detección del cáncer se puede aumentar mediante la prueba de múltiples secuencias de ADN que comúnmente están mutadas en el cáncer. En un estudio reciente sobre el cáncer de pulmón, se analizaron muestras de sangre tomadas de pacientes con cáncer de pulmón para detectar 534 secuencias genéticas frecuentemente mutadas de 139 oncogenes conocidos utilizando procedimientos de secuenciación profunda. Se encontraron mutaciones en muestras de todos los pacientes con cánceres en estadio II, III y IV y en el 50% de los pacientes con cáncer en estadio I (Newman y col., 2014). El coste de la secuenciación profunda para cientos de mutaciones hace que esta técnica no sea adecuada para el uso clínico de rutina, pero el procedimiento puede formar una base para futuras pruebas clínicas.

La hipermetilación de ciertas secuencias específicas de genes de ctDNA también se ha investigado para determinar la posible utilidad de biomarcadores en el cáncer de pulmón. Por ejemplo, se detectó que la detección de secuencias del gen Septin-9 hipermetilado mediante amplificación de ADN extraído del plasma detecta el 44% de los cánceres de pulmón (Powrozek y col., 2014). El estado de metilación del ADN de genes o loci específicos generalmente se detecta mediante la desaminación selectiva de bisulfito de la citosina, pero no la 5-metilcitosina (5mc), a uracilo, lo que conduce a un cambio primario en la secuencia de ADN que puede detectarse mediante secuenciación u otros medios (Allen y col., 2004).

Existe una necesidad clínica de pruebas precisas, seguras, no invasivas y de bajo coste para identificar a las personas con cáncer de pulmón en etapa temprana, especialmente en los fumadores. Desafortunadamente, actualmente no hay pruebas disponibles y solo alrededor del 20% de los cánceres de pulmón se detectan pronto.

La presente invención se refiere a la detección de nucleosomas libres de células y características epigenéticas de nucleosomas libres de células en muestras de esputo. Los nucleosomas libres de células se han reportado previamente en la sangre, donde se cree que se originan de células muertas o moribundas. Se desconoce el mecanismo de liberación de las células muertas hacia la circulación, pero se cree que involucra macrófagos circulantes que eliminan las células muertas por fagocitosis (Jiang y col., 2003). El nivel de nucleosomas circulantes que se encuentra en la sangre de sujetos sanos es bajo, pero a menudo se encuentran niveles elevados en la sangre de sujetos con una variedad de afecciones, incluido el cáncer de pulmón (Holdenrieder, 2001). Sin embargo, los niveles elevados de nucleosomas en sangre son un marcador inespecífico de niveles elevados de muerte celular y no distinguen el cáncer de pulmón de otros tipos de cáncer o de otras enfermedades o de lesiones o traumatismos. No hay informes de nucleosomas en el esputo.

Los nucleosomas tienen una inmensa diversidad de estructura química debido a su papel en la regulación epigenética de la expresión génica. El cuerpo humano comprende muchos tipos celulares diferentes de fenotipos y funciones muy diferentes en el cuerpo a pesar de que todos contienen el mismo genoma. Esta diversidad fenotípica se debe a la expresión diferencial del genoma en diferentes tipos de células. El control de la expresión diferencial de genes no se comprende por completo, pero los mecanismos básicos incluyen la regulación génica mediante una serie de señales epigenéticas interconectadas asociadas con el gen, incluidas las secuencias de ácido nucleico no codificantes, así como los aspectos estructurales de la cromatina, incluido el control del empaquetamiento de la cromatina (por ejemplo; como eucromatina o heterocromatina), control de posicionamiento de nucleosomas y sitios accesibles a nucleasas, modificación química del ADN, por ejemplo metilación de residuos de citosina, y variación en la composición y estructura del complejo de histonas alrededor del cual se envuelve el ADN, por ejemplo, por modificación postraduccional de las proteínas histonas o mediante la inclusión de isoformas de histonas alternativas. Por lo tanto, la estructura química de la cromatina celular y sus nucleosomas constituyentes está sujeta a una gran variedad de alteraciones epigenéticas que juntas forman un complejo sistema regulador de genes. Este sistema regulador está dañado en el cáncer, lo que lleva a cambios epigenómicos globales en la estructura cromosómica. Las características alteradas de la cromatina conducen a una mala regulación genética que se asocia con el desarrollo y la progresión del cáncer. Además, la inhibición, prevención o reversión de estos cambios en las características epigenéticas de la cromatina y los nucleosomas que utilizan fármacos epigenéticos es eficaz en el tratamiento de enfermedades cancerosas. Dichos fármacos epigenéticos incluyen, por ejemplo, inhibidores del complejo de histona desacetilasa (HDACi), inhibidor de histona metiltransferasa (HMTi) y fármacos inhibidores del ADN metiltransferasa (DNMTi).

El nucleosoma es la unidad repetitiva básica de la estructura de la cromatina y consiste en un complejo proteico de ocho histonas centrales altamente conservadas (que comprende un par de cada una de las histonas 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 un conector y participa en la compactación de la cromatina. El ADN se enrolla alrededor de nucleosomas consecutivos en una estructura que a menudo se asemeja a "cuentas en una cadena" y esto forma la estructura básica de la abierta o la eucromatina. En compacta o heterocromatina, esta cadena se enrolla y se superenrolla en una estructura cerrada y compleja (Herranz y Esteller, 2007).

La estructura de los nucleosomas en la cromatina celular puede variar según la modificación postraduccional (PTM) de las proteínas de histona y por la inclusión de proteínas de histona variantes. La PTM de las proteínas histonas produce con mayor frecuencia, pero no solo, en las colas de las ocho histonas centrales y las modificaciones comunes incluyen acetilación, metilación o ubiquitinación de residuos de lisina, así como la metilación de residuos de arginina y la fosforilación de residuos de serina. Se sabe que las modificaciones de histonas están involucradas en la regulación epigenética de la expresión génica (Herranz y Esteller, 2007). La estructura del nucleosoma también puede variar

mediante la inclusión de isoformas o variantes de histonas alternativas que son diferentes genes o productos de unión y tienen diferentes secuencias de aminoácidos. Las variantes de histona se pueden clasificar en varias familias que se subdividen en tipos individuales. Las secuencias de nucleótidos de una gran cantidad de variantes de histonas son conocidas y están disponibles públicamente, por ejemplo, en la base de datos de histonas (Histone DataBase) del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano NHGRI (<http://genome.nhgri.nih.gov/histones/complete.shtml>), la base de datos GenBank (Secuencia genética NIH), la base de datos de secuencias de nucleótidos EMBL y el banco de datos de ADN de Japón (DDBJ).

La variante de histona y los patrones de modificación de histona presentes en células sanas y enfermas han demostrado diferir en numerosos estudios (principalmente inmunohistoquímicos) (Herranz y Esteller, 2007). Una desventaja de los procedimientos inmunohistoquímicos para el uso clínico en la detección del cáncer de pulmón es que la recogida de muestras de tejido es invasiva y requiere cirugía o biopsia.

La estructura del nucleosoma también varía según la modificación química de su componente de ADN, incluida la metilación del ADN (Herranz y Esteller, 2007). Desde hace algún tiempo se sabe en la técnica que el ADN puede ser metilado en la posición 5 de los nucleótidos de citosina para formar 5-metilcitosina y la participación de la metilación del ADN en el cáncer se notificó ya en 1983 (Feinberg y Vogelstein, 1983). Los patrones de metilación del ADN observados en las células cancerosas difieren de los de las células sanas. Se notifica que los elementos repetitivos, particularmente alrededor de las áreas pericentroméricas, están hipometilados en el cáncer en relación con las células sanas, pero se notifica que los promotores de genes específicos están hipermetilados en el cáncer. Se notifica que el balance de estos dos efectos produce hipometilación global del ADN en el cáncer y este patrón es un sello distintivo de las células cancerosas (Esteller 2007, Hervouet y col., 2010, Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011).

La estructura del nucleosoma también varía según la unión del nucleosoma a cualquiera de una multitud de otras proteínas presentes en la cromatina para formar aductos de nucleosomas. La cromatina comprende una gran cantidad de proteínas no histonas de una amplia variedad de tipos con una variedad de funciones que incluyen factores de transcripción, factores de mejora de la transcripción, factores de represión de la transcripción, enzimas modificadoras de histonas, proteínas de reparación del daño del ADN, receptores de hormonas nucleares y muchos más, unidos a su ADN constituyente y/o histonas (Yoshida y Shimura, 1972). El estudio de las proteínas unidas a la cromatina se ha llevado a cabo en gran medida mediante procedimientos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Estos procedimientos son bien conocidos en la técnica pero son complejos, laboriosos y caros.

Los nucleosomas libres de células *per se* pueden detectarse mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y se han notificado varios procedimientos (Salgame y col., 1997; Holdenrieder y col., 2001; van Nieuwenhuijze y col., 2003). Estos ensayos generalmente emplean un anticuerpo antihistona (por ejemplo, anti-H2B, anti-H3 o anti-H1, H2A, H2B, H3 y H4) como anticuerpo de captura y un anticuerpo complejo anti-ADN o anti-H2A-H2B-ADN como anticuerpo de detección.

Anteriormente hemos notificado ensayos ELISA para nucleosomas que contienen señales epigenéticas particulares, incluidos nucleosomas que contienen modificaciones de histonas particulares, variantes de histonas particulares y modificaciones de ADN particulares, así como aductos de nucleosomas particulares (documentos WO 2005/019826, WO 2013/030579, WO 2013/030577, WO 2013/084002). Anteriormente hemos utilizado estos ensayos para mostrar que los nucleosomas libres de células circulantes alterados epigenéticamente pueden detectarse en la sangre de pacientes enfermos.

Sorprendentemente, ahora hemos demostrado la detección de fragmentos de cromatina de nucleosomas libres de células en muestras de esputo obtenidas de pacientes y hemos demostrado que la naturaleza epigenética o el perfil estructural de estos nucleosomas pueden usarse para determinar su origen. Los fragmentos de cromatina se han identificado como procedentes de células sanas o de células enfermas, incluidas células de cáncer de pulmón o de una mezcla de células. La presente invención no implica secuenciación de ADN de genes particulares, sino que se basa en la medición de los niveles de nucleosomas en el esputo *per se*, así como la investigación de la alteración epigenética de todo el genoma del nucleosoma u otros fragmentos de cromatina en el esputo. Ahora notificamos procedimientos de inmunoensayo simples para la estimación directa de nucleosomas y nucleosomas libres de células alterados epigenéticamente y aductos de nucleosomas en muestras de esputo y su determinación de tener un origen de cromatina de células sanas o cancerosas.

Resumen de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un nucleosoma libre de células como biomarcador en una muestra de esputo, para el diagnóstico o detección de cáncer de pulmón.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar o detectar cáncer de pulmón en un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

(i) detectar o medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de esputo obtenida del sujeto; y

(ii) usar el nivel medido de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética como

indicativo de la presencia de dicha enfermedad en el sujeto.

Breve descripción de las figuras

5 **Figura 1:** diagrama de puntos de los resultados de densidad óptica de un ELISA H3K9Ac asociado a un nucleosoma realizado en muestras de esputo obtenidas de sujetos con cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y sujetos de control sanos de aproximadamente la misma edad.

Figura 2: curva ROC que muestra los resultados obtenidos para la precisión clínica de un ELISA de esputo H3K9Ac asociado a un nucleosoma para distinguir sujetos con cáncer de pulmón de sujetos de control sanos de edad similar y de sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

10 **Figura 3:** diagrama de puntos de los resultados de un procedimiento de prueba de panel de la invención que incluye H3K9Ac, H4K16Ac y H4K20Me3 asociados a nucleosomas realizados en muestras de esputo obtenidas de sujetos con cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y sujetos de control sanos de edad similar. Los valores de prueba se calcularon a partir de los resultados de DO de los ensayos individuales usando el modelo aritmético; Valor de prueba = 1,94 [H3K9Ac] – 1,24 [H4K16Ac] – 0,55 [H4K20Me3]

15 **Figura 4:** curva ROC que muestra los resultados obtenidos para la precisión clínica de un procedimiento de prueba de panel de la invención que incluye H3K9Ac, H4K16Ac y H4K20Me3 asociados a nucleosomas para distinguir sujetos con cáncer de pulmón de sujetos de control sanos de edad similar y de sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Descripción detallada de la invención

20 La invención se refiere al uso de nucleosomas libres de células, y en particular a una característica epigenética de los nucleosomas libres de células como biomarcador para el cáncer de pulmón. La invención también proporciona un procedimiento para la detección de cáncer de pulmón y precáncer mediante la detección y medición de la presencia de nucleosomas y nucleosomas alterados epigenéticamente en muestras de esputo. En particular, el procedimiento se relaciona con la detección y el perfil epigenético de fragmentos de cromatina nucleosómica en muestras de esputo y el uso de esta información epigenética para establecer su origen celular en la cromatina de las células pulmonares sanas o en la cromatina de las células de cáncer de pulmón. Anteriormente hemos notificado la detección y el perfil epigenético de fragmentos de cromatina nucleosómica en muestras de sangre (documentos WO 2005/019826, WO 2013/030579, WO 2013/030577, WO 2013/084002). La presencia de fragmentos de cromatina epigenética alterados en una muestra de sangre tomada de un sujeto puede usarse para indicar la presencia de un cáncer en ese sujeto, pero puede ser menos informativo del órgano particular afectado por ese cáncer porque todos los tejidos están perfundidos por la sangre. La ventaja particular del uso de muestras de esputo es que la muestra misma limita el origen de fragmentos de cromatina epigenética alterados al tracto respiratorio. La presencia de fragmentos de cromatina epigenética alterados en una muestra de esputo tomada de un sujeto puede usarse para indicar la presencia de un cáncer en ese sujeto e identificar ese cáncer como un cáncer de los pulmones o del tracto respiratorio.

35 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un nucleosoma libre de células como biomarcador en una muestra de esputo, para el diagnóstico o detección de cáncer de pulmón.

40 En una realización, el cáncer incluye afecciones precancerosas y carcinoma in situ. Hemos demostrado que el nivel de nucleosomas (*per se*) se altera en las muestras de esputo de pacientes enfermos en relación con los niveles de muestras de esputo de sujetos sanos y que estos nucleosomas comprenden diferentes niveles absolutos y relativos de una variedad de estructuras epigenéticas. Una ventaja del esputo como una muestra de paciente es el grado de especificidad del órgano que su uso confiere en las pruebas de biomarcadores.

En una realización, el biomarcador se usa para el diagnóstico o detección de cáncer, tal como cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP).

En una realización, el nucleosoma libre de células es un mononucleosoma, oligonucleosoma u otro fragmento de cromosoma.

45 En una realización, el biomarcador de esputo comprende el nivel de nucleosomas *per se*. Se apreciará que el nivel de nucleosomas de esputo *per se* puede estimarse, por ejemplo, utilizando procedimientos de inmunoensayo para nucleosomas similares a los conocidos en la técnica (Salgame y col., 1997; Holdenrieder y col., 2001; van Nieuwenhuijze y col., 2003).

50 En una realización, el biomarcador de esputo comprende un nucleosoma libre de células alterado epigenéticamente o modificado de otra manera. Así, por ejemplo, el biomarcador es una característica epigenética de un nucleosoma libre de células.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar o detectar cáncer de pulmón en un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

- (i) detectar o medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de

esputo obtenida del sujeto; y

(ii) usar el nivel medido de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética como indicativo de la presencia de dicha enfermedad en el sujeto.

5 En una realización, la característica epigenética se selecciona de: una modificación de histona postraducciona, una variante de histona o isoforma, una modificación de ADN o una proteína aducida al nucleosoma

10 En una realización, la característica epigenética de un nucleosoma libre de células comprende una o más modificaciones postraduccionales de histonas. En la técnica se conoce un gran número de tales modificaciones de histonas y este número aumenta con las modificaciones recientemente identificadas. Por ejemplo, sin limitación, las histonas contienen una variedad de residuos de aminoácidos en múltiples posiciones, incluidos los residuos de lisina, serina, arginina y treonina en las histonas H2, H3 y H4, así como sus isoformas o variantes de secuencia. Los residuos de aminoácidos pueden modificarse de múltiples maneras, por ejemplo, sin limitación, los residuos de lisina pueden ser acetilados, ubiquitinados, biotinilados o mono, di o trimetilados. Cualquier modificación de histona puede ser una característica epigenética adecuada para usar en la invención, ya sea detectada o medida como un resto de histona modificado individualmente, o si se detecta o mide como un componente de histona modificado de un mononucleosoma, oligonucleosoma u otro fragmento de cromatina libre de células, por ejemplo; utilizando un cromatográfico, espectrofotométrico de masas, biosensor, inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), inmunoensayo u otro procedimiento de detección. En una realización preferida, las histonas modificadas asociadas a nucleosomas se miden por medio de un procedimiento de inmunoensayo (inmunométrico) de 2 sitios que utiliza un anticuerpo u otro aglutinante selectivo para un epítipo de nucleosoma y otro para la modificación particular de histona de interés. Hemos demostrado que los niveles relativos de los niveles de modificación postraducciona de histonas asociadas a nucleosomas se alteran en las muestras de esputo de pacientes enfermos en comparación con los niveles de muestras de esputo de sujetos sanos.

25 En una realización de la invención, se investiga un grupo o clase de modificaciones de histonas relacionadas (en lugar de una única modificación) en una muestra de esputo. Un ejemplo típico de esta realización, sin limitación, implicaría un inmunoensayo de 2 sitios que emplea un anticuerpo u otro aglutinante selectivo dirigido a unirse a nucleosomas y un anticuerpo u otro aglutinante selectivo dirigido a unir el grupo de modificaciones de histonas en cuestión. Los ejemplos de tales anticuerpos dirigidos a unirse a un grupo de modificaciones de histonas incluirían, con fines ilustrativos, sin limitación, anticuerpos anti-pan-acetilación (por ejemplo, un anticuerpo Pan-acetil H4), anticuerpos anti-citrulinación o anticuerpos anti-ubiquitinación.

30 En una realización alternativa, la característica epigenética de un nucleosoma libre de células comprende una o más variantes de histona o isoformas. Se conocen muchas variantes de histona en la técnica (por ejemplo, sin limitación; las variantes de histona H2 incluyen H2A1, H2A2, mH2A1, mH2A2, H2AX y H2AZ), y este número está aumentando con las isoformas recientemente identificadas. La isoforma de histona o las estructuras de proteínas variantes también son susceptibles de modificación postraducciona. Por ejemplo; la variante H2A H2AX puede ser fosforilada postraduccionalmente en la serina 139 y este resto a menudo se llama gamma-H2AX. Cualquier variante de histona, incluida cualquier variante modificada postraduccionalmente, puede ser una característica epigenética adecuada para su uso en la invención, ya sea detectada o medida como un resto de variante de histona individual, por ejemplo usando un inmunoensayo, cromatografía, espectrofotometría de masas, ChIP, biosensor u otro procedimiento para la detección de un resto de isoforma de histona, o si se detecta o mide como un componente de histona de un mononucleosoma, oligonucleosoma u otro fragmento de cromatina libre de células que incorpora la variante de histona. En una realización preferida, las variantes de histonas asociadas a nucleosomas se miden por medio de un inmunoensayo de 2 sitios que utiliza un anticuerpo u otro aglutinante selectivo para un epítipo de nucleosoma y otro para la variante de histona particular o isoforma de interés. Hemos demostrado que los niveles relativos de los niveles de variante de histona asociados a nucleosomas están alterados en las muestras de esputo de pacientes enfermos en comparación con los niveles de muestras de esputo de sujetos sanos.

50 En una realización alternativa, la característica epigenética de un nucleosoma libre de células comprende una o más modificaciones de ADN. En la técnica se conocen varias modificaciones particulares de ADN (por ejemplo, metilación, hidroximetilación y carboximetilación de citosina) y este número aumenta con las modificaciones recientemente identificadas. Cualquier nucleótido modificado puede ser una característica epigenética adecuada para usar en la invención, ya sea detectada o medida en restos de ADN, ácido nucleico, nucleótido o nucleósido aislados, por ejemplo usando un inmunoensayo, cromatografía, espectrofotometría de masas, ChIP, biosensor u otro procedimiento para la detección de un resto de ácido nucleico modificado, o ya sea detectado o medido por cualquier procedimiento para mononucleosomas, oligonucleosomas u otros fragmentos de cromatina libres de células que incorporan un nucleótido modificado particular o modificación de ADN. En una realización preferida, las modificaciones de ADN asociadas a nucleosomas se miden por medio de un inmunoensayo de 2 sitios que utiliza un anticuerpo u otro aglutinante selectivo para un epítipo de nucleosoma y otro para la modificación de ADN particular de interés. Hemos demostrado que los niveles relativos de los niveles de 5-metilcitosina asociados a nucleosomas están alterados en las muestras de esputo de pacientes enfermos en comparación con los niveles de muestras de esputo de sujetos sanos. Para mayor claridad, el procedimiento de la presente invención no se refiere a la evaluación del estado de metilación (u otra modificación del ADN) de ninguna secuencia o gen de ADN en particular, sino al estado de modificación global del ADN de los nucleosomas o fragmentos de cromatina presentes en las muestras de prueba de esputo.

En una realización alternativa, la característica epigenética de un nucleosoma libre de células comprende uno o más aductos o complejos de proteína-nucleosoma. Se sabe que existe un gran número de aductos o complejos de proteína-nucleosoma en la cromatina (por ejemplo; HMGB, EZH2 y aductos de nucleosoma del receptor de la hormona nuclear) y este número aumenta con las proteínas recientemente identificadas que son activas en la cromatina. Cualquier aducto de proteína-nucleosoma puede ser una característica epigenética adecuada para su uso en la invención, ya sea detectada o medida por cualquier procedimiento para aductos de mononucleosomas libres de células, aductos de oligonucleosomas u otros aductos de fragmentos de cromatina que incorporan una proteína particular, por ejemplo, un inmunoensayo de 2 sitios que utiliza un anticuerpo u otro aglutinante selectivo para un epítipo de nucleosoma y otro para la proteína particular comprendida en el aducto. Hemos demostrado que los niveles relativos de aductos de nucleosomas asociados a nucleosomas están alterados en las muestras de esputo de pacientes enfermos en comparación con los niveles de muestras de esputo de sujetos sanos. En una realización, dos o más mediciones de nucleosomas libres de células *per se* y/o las características epigenéticas de nucleosomas libres de células se realizan como un panel de características de nucleosomas.

En una realización adicional, el biomarcador comprende un panel de biomarcadores seleccionados entre: el nivel de nucleosomas *per se*, una o más modificaciones particulares de histonas o nucleosomas libres de células que comprenden una modificación particular de histonas, variantes de histonas o nucleosomas libres de células que comprenden una variante particular de histonas, modificaciones de ADN o nucleosomas libres de células que comprenden una modificación de ADN particular o aductos de nucleosomas. Como las diferentes poblaciones pueden no ser epigenéticamente idénticas o similares, los paneles óptimos seleccionados para diferentes animales o diferentes poblaciones pueden variar. Por lo tanto, un panel de dichos biomarcadores seleccionados para su uso para detectar cáncer de pulmón (por ejemplo) en humanos puede no ser el mismo que un panel seleccionado para su uso en otra especie (por ejemplo, gatos o perros). De manera similar, el panel óptimo para detectar cáncer de pulmón en humanos hombres y mujeres (o cualquier otro animal) puede ser diferente. De manera similar, el panel óptimo para detectar cáncer de pulmón en diferentes subpoblaciones o razas humanas puede diferir. Alternativamente, el mismo panel puede usarse en diferentes poblaciones (por ejemplo, en hombres y mujeres) pero con diferentes ponderaciones usadas para los miembros del ensayo del panel. Por ejemplo; El valor de prueba de un panel de tres ensayos que comprende los ensayos "A", "B" y "C" puede calcularse a partir de una expresión matemática como: "Valor de prueba = A + 2B + 3C" en hombres con un valor de corte de "X" para determinar un resultado positivo o negativo y de una expresión matemática diferente como "Valor de prueba = 3A + 2B + C" en mujeres con un valor de corte diferente de "Y".

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar o cuantificar una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de esputo obtenida de un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra de esputo con un primer agente de unión que se une a nucleosomas libres de células o un componente de los mismos;
- (ii) poner en contacto la muestra de esputo o los nucleosomas libres de células con un segundo agente de unión que se une a una característica epigenética dentro de dichos nucleosomas libres de células;
- (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a la característica epigenética dentro de dichos nucleosomas libres de células en la muestra de esputo; y
- (iv) usar la presencia, grado o cantidad de dicha unión como una medida de la presencia de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética en la muestra de esputo.

La característica epigenética mencionada puede ser una modificación particular de histona postraduccional, una variante de histona particular o isoforma, una modificación de ADN particular o una proteína particular aducida a dicho nucleosoma.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar o cuantificar una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de esputo obtenida de un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra de esputo con un primer agente de unión que se une a una característica epigenética dentro de dichos nucleosomas libres de células;
- (ii) poner en contacto la muestra de esputo o los nucleosomas libres de células con un segundo agente de unión que se une a los nucleosomas libres de células o un componente de los mismos;
- (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a nucleosomas libres de células o un componente del mismo en la muestra de esputo; y
- (iv) usar la presencia, grado o cantidad de dicha unión como una medida de la presencia de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética en la muestra de esputo.

La característica epigenética mencionada puede ser una modificación particular de histona postraduccional, una variante de histona particular o isoforma, una modificación de ADN particular o una proteína particular aducida a dicho nucleosoma.

5 En un aspecto adicional de la invención, el nivel medido de nucleosomas que contienen una estructura epigenética particular se usa para determinar el origen celular de los nucleosomas presentes en una muestra de esputo. Por ejemplo; si los nucleosomas de esputo se originan de la cromatina de células sanas, células de cáncer de pulmón o células con otras lesiones o de cualquier mezcla de tales células. Los expertos en la materia tendrán claro que un sujeto cuyos pulmones contienen células cancerosas también contendrá células sanas y que una muestra de esputo obtenida de dicho sujeto puede contener nucleosomas procedentes de células sanas, así como de células cancerosas.

10 De manera similar, pueden ocurrir nucleosomas con otras combinaciones de orígenes en sujetos con diferentes afecciones médicas, incluidos nucleosomas de células sanas, así como nucleosomas de uno o más tipos de células enfermas con una o diferentes lesiones. En una realización preferida, se mide un panel de niveles de estructura epigenética del nucleosoma de esputo y el resultado se usa para determinar el origen celular, o los orígenes, de los nucleosomas presentes en la muestra.

15 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar el origen celular de nucleosomas libres de células de esputo en un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

(i) detectar o medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de esputo obtenida del sujeto; y

20 (ii) usar el nivel medido de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética como un indicador de si los nucleosomas libres de células se originan de células pulmonares sanas, células cancerosas de pulmón o células con otras lesiones o de cualquier mezcla de tales células.

25 En una realización preferida de la invención, se realizan ensayos de esputo para dos o más características epigenéticas para producir un perfil epigenético que consiste en múltiples características de nucleosomas epigenéticos. El perfil epigenético puede usarse para determinar el origen de los nucleosomas presentes en la muestra (ya sea que se originen de la cromatina de células sanas, células de cáncer de pulmón o células con otras lesiones o de cualquier mezcla de tales células). El perfil epigenético puede usarse para determinar la presencia o no de un cáncer de pulmón u otras lesiones en el sujeto de quien se tomó la muestra de esputo.

30 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar nucleosomas libres de células de esputo con una característica epigenética que incluye aductos de nucleosomas y modificaciones de histonas asociadas a nucleosomas, modificaciones de ADN y variantes de histonas en una muestra de esputo obtenida de un sujeto según cualquiera de los procedimientos anteriores que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto la muestra de esputo con un primer y segundo agente de unión en el que uno de dichos agentes de unión se une a nucleosomas libres de células o un componente de los mismos y el otro de dichos agentes de unión se une a una característica epigenética de dichos nucleosomas libres de células;

35 (ii) detectar o cuantificar la unión de uno o ambos de dichos agentes de unión en la muestra de esputo; y

(iii) usar la presencia, grado o cantidad de dicha unión como una medida de la presencia de nucleosomas libres de células con dicha característica epigenética en la muestra de esputo.

40 Se apreciará que las características epigenéticas descritas en la presente memoria también se pueden analizar independientemente de su inclusión, o de otro modo, dentro de un nucleosoma. Por lo tanto, según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar o detectar cáncer de pulmón en un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

(i) detectar o medir el nivel de una variante de histona particular, isoforma de histona o una histona que contiene una modificación postraduccional particular o aducto de nucleosoma en la muestra de esputo;

45 (ii) usar el nivel medido de la variante de histona particular, isoforma o modificación en la muestra de esputo como un indicador de la presencia de dicha enfermedad en el sujeto.

50 En una realización de la invención, las histonas en una muestra de esputo se analizan para determinar la variante de histona, isoforma o composición de modificación de histona de dicha muestra. En una realización, las histonas en una muestra de esputo pueden aislarse para dicho ensayo, por ejemplo, sin limitación, mediante extracción ácida de la muestra. En otra realización, se proporciona un inmunoensayo para una modificación de histona que emplea un primer agente de unión antihistona en combinación con otro agente de unión dirigido a unir una modificación de histona en el mismo resto de histona. En otra realización, se proporciona una variante de histona o inmunoensayo de isoforma que emplea dos agentes de unión antihistona dirigidos a unir diferentes epítomos en el mismo resto de histona, al menos uno de los cuales es específico de la isoforma de interés.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar o detectar cáncer de pulmón

en un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

(i) detectar o medir el nivel de un nucleótido modificado epigenéticamente en la muestra de esputo obtenida del sujeto y

5 (ii) usar el nivel medido del nucleótido modificado epigenéticamente en la muestra de esputo como un indicador de la presencia de dicha enfermedad en el sujeto.

10 En una realización preferida de este aspecto, el nucleótido modificado epigenéticamente medido en fragmentos de cromatina de esputo es 5-metilcitosina o ADN metilado. Para mayor claridad, este aspecto de la invención no debe confundirse con los procedimientos para la prueba de metilación de genes que implican la investigación del estado de metilación de citosina de un gen particular o secuencia de ADN, por ejemplo, según lo descrito por Powrozek y col., 2014. Por el contrario, la presente invención implica la determinación del nivel global de 5-metilcitosina independientemente de la secuencia del gen.

15 En una realización de la invención, los nucleótidos modificados en una muestra de esputo se analizan para determinar la composición de nucleótidos modificada de dicha muestra. En una realización, los nucleótidos y/o ADN en una muestra de esputo pueden aislarse para dicho ensayo, por ejemplo, sin limitación, por extracción con disolvente orgánico o ADN cromatográfico de la muestra. En otra realización, se proporciona un inmunoensayo para un nucleótido modificado. Este puede ser un inmunoensayo de anticuerpo único que emplea un agente de unión antinucleótido, por ejemplo, un agente de unión anti-5-metilcitosina, o un inmunoensayo de 2 sitios, por ejemplo, que emplea un primer agente de unión de ADN anti-monocatenario o bicatenario en combinación con otro agente de unión dirigido a unirse a un nucleótido modificado.

20 En una realización preferida de la invención, se proporciona un procedimiento de inmunoensayo de 2 sitios para la medición de características epigenéticas incorporadas en nucleosomas *in situ* empleando un agente de unión anti-nucleosoma inmovilizado en combinación con una modificación antihistona o variante antihistona o modificación anti-ADN o agente de unión de detección de proteína anti-aducida. En otra realización de la invención, se proporciona un inmunoensayo de 2 sitios que emplea un agente de unión de detección antinucleosoma en combinación con una modificación antihistona inmovilizada o una variante antihistona o modificación anti-ADN o agente de unión a proteínas anti-aducido. En una realización, el aducto de nucleosoma incluye una proteína de grupo de alta movilidad, una proteína polycomb, una enzima modificadora de cromatina o un receptor de hormona nuclear.

30 En una realización preferida, se usa un panel de múltiples características de nucleosomas epigenéticos para detectar la presencia de un cáncer de pulmón en el sujeto. Además, se pueden incluir más pruebas dentro de dicho panel para aumentar su precisión clínica, incluidas, por ejemplo, pruebas de hemoglobina y/u otros marcadores tumorales (por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA), CA125 y CA19.9) y/o mutaciones específicas o secuencias de genes metilados. Los parámetros adicionales pueden incluir cualquier información clínica relevante, por ejemplo, sin limitación de edad, sexo, índice de masa corporal, tabaquismo y hábitos alimenticios.

35 En una realización de la invención, el nivel de una característica epigenética estructural particular de un nucleosoma en una muestra de esputo, o un panel de los niveles de 2 o más de tales características epigenéticas, se usa para determinar el tratamiento farmacológico óptimo u otro régimen de tratamiento para un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para evaluar la idoneidad de un animal o un ser humano para un tratamiento médico que comprende las etapas de:

40 (i) detectar o medir un nucleosoma libre de células que contiene una característica epigenética en una muestra de esputo obtenida del sujeto; y

(ii) usar el nivel medido de nucleosomas libres de células con dicha característica detectada como un parámetro para la selección de un tratamiento adecuado para el sujeto.

45 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para controlar la eficacia de una terapia en un animal o un sujeto humano que tiene, o se sospecha que tiene, o que está predispuesto a cáncer de pulmón que comprende las etapas de:

(i) medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en la muestra de esputo obtenida del sujeto; y

50 (ii) usar el nivel medido de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética en comparación con una muestra anterior tomada de dicho sujeto como indicativo de la eficacia de dicha terapia.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar el pronóstico de un animal o un sujeto humano con cáncer, adenoma, enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria que comprende las etapas de:

(i) medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en la muestra de esputo obtenida

del sujeto; y

(ii) usar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética como indicativo del pronóstico de cáncer, adenoma, enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria.

5 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar o medir nucleosomas libres de células de esputo con una característica epigenética, ya sea solo o como parte de un panel de mediciones, con el propósito de detectar o diagnosticar un estado de enfermedad, o para evaluar la idoneidad de un animal o un sujeto humano para un tratamiento médico, o para monitorear un tratamiento de un sujeto animal o humano, para su uso en sujetos con cáncer de pulmón real o sospechoso.

10 Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para identificar un biomarcador epigenético asociado a nucleosomas libres de células de esputo para detectar o diagnosticar el estado de una enfermedad en un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

(i) detectar o medir un nucleosoma libre de células de esputo con una característica epigenética en una muestra de esputo de un sujeto enfermo;

15 (ii) detectar o medir un nucleosoma libre de células con la misma característica epigenética en una muestra de esputo de un sujeto sano o un sujeto de control; y

(iii) usar la diferencia entre los niveles medidos detectados en un sujeto enfermo y un sujeto de control para identificar si un nucleosoma con la característica epigenética es útil como un biomarcador para el estado de la enfermedad, ya sea como un biomarcador independiente o en combinación con otros biomarcadores.

20 Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un kit que comprende uno o más agentes de unión capaces de detectar y/o cuantificar una característica epigenética de un nucleosoma libre de células de esputo para el diagnóstico o detección de cáncer de pulmón.

25 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un panel de pruebas para obtener un perfil epigenético de nucleosomas de esputo con respecto a múltiples características de nucleosomas epigenéticos. Tal panel de prueba puede consistir, por ejemplo, en dos o más mediciones de nucleosomas que contienen diferentes epítomos de nucleosomas; incluyendo, sin limitación, diferentes aductos y/o variantes de histonas y/o modificaciones de histonas y/o modificaciones de ADN y/o mediciones de nucleosomas *per se*, o cualquier combinación o proporción de cualquiera de estos y otros epítomos de nucleosomas. Los expertos en la materia tendrán claro que cualquiera de estos paneles también puede incluir otros marcadores (no epigenéticos y/o no nucleosómicos) que incluyen hemoglobina y otros marcadores tumorales conocidos.

30 Se apreciará que cualquiera de los procedimientos antes mencionados puede usarse como una prueba independiente o en combinación con las pruebas existentes.

35 El perfil de nucleosoma epigenético obtenido puede usarse para determinar las células de origen de los fragmentos de cromatina en los que se produjeron los nucleosomas. Los orígenes celulares probables pueden incluir, por ejemplo, células sanas, células de cáncer de pulmón, células de inflamación, células de EPOC, células asmáticas y células de cualquier otra lesión torácica. Los fragmentos de cromatina de esputo pueden incluir fragmentos que se originan a partir de una mezcla de dos o más tipos de células diferentes, por ejemplo, sin limitación, de células sanas, así como de células de cáncer de pulmón. Si alguno (incluso una minoría) de los fragmentos de cromatina nucleosómica presentes en la muestra de esputo se origina en una célula enferma, por ejemplo, una célula de cáncer de pulmón, esto indica la presencia de una enfermedad, por ejemplo, cáncer de pulmón, en el sujeto del que se obtuvo esputo.

40 Los expertos en la materia tendrán claro que los dos anticuerpos u otros aglutinantes utilizados pueden dirigirse a unirse a nucleosomas intactos o a cualquier parte componente de un nucleosoma, incluidos, entre otros, una histona, una variante de histona, una modificación de histona o cualquier nucleótido (modificado o no) u otra parte del componente de ADN de un nucleosoma. Esto se aplica en cualquier combinación tanto a los anticuerpos inmovilizados como a los de detección (u otros aglutinantes) utilizados en un inmunoensayo clásico de 2 sitios. Así, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar (solo) aquellos nucleosomas que contienen ambas características a las que se dirigen los aglutinantes. Una ventaja de este diseño es que los epítomos de nucleosomas de esputo pueden seleccionarse para ser epítomos cuya concurrencia en nucleosomas de esputo está asociada con células sanas o células de cáncer de pulmón o células enfermas de otro modo. El uso de dicho anticuerpo o aglutinante selectivo para un epítipo común a muchos o la mayoría o todos los nucleosomas del origen de una enfermedad (p. ej., cáncer), pero que está ausente o es más raro en los nucleosomas de origen celular sano, como un inmunosorbente (generalmente anticuerpo en fase sólida) seleccionará dichos nucleosomas de origen celular enfermo. Esto proporciona una selectividad de nucleosoma tumoral o un aspecto de enriquecimiento para el ensayo.

55 En una realización de la invención, el anticuerpo u otro aglutinante selectivo seleccionado como aglutinante antinucleosómico es selectivo para el enriquecimiento de nucleosomas de origen tumoral. En una realización preferida, el anticuerpo u otro aglutinante selectivo antinucleosómico utilizado está dirigido a unirse a la histona H3.1 y/o H3.2 y/o H3t. El aglutinante selectivo para nucleosomas de origen tumoral puede usarse en cualquier ensayo, incluidos los

ensayos para el nivel de nucleosomas *per se* (de origen tumoral), cualquier modificación de histona particular o nucleosomas libres de células que comprendan una modificación de histona particular, variante de histona o nucleosomas libres de células que comprendan una variante de histona particular, modificación de ADN o nucleosomas libres de células que comprendan una modificación de ADN particular o un aducto de nucleosoma.

5 Los procedimientos para la recogida de muestras de esputo han estado en uso durante muchos años y son bien conocidos en la técnica. El procedimiento de recogida de esputo utilizado en el presente estudio consistió en pedirles a los sujetos que respiraran a través de un nebulizador que contiene una solución de NaCl para inducir la formación de esputo durante 5 minutos, seguido de tos en un recipiente. Si no se produjo esputo, este proceso se repitió hasta un máximo de 3 veces más (es decir, hasta un total de 20 minutos respirando en un nebulizador). Se midió el volumen de muestra y la muestra se diluyó con solución salina tamponada con fosfato. La muestra diluida se centrifugó para eliminar el material celular, se filtró a través de una gasa y se congeló hasta que se usó para el ensayo.

10 Los dispositivos para la recogida de material de muestra de esputo están disponibles comercialmente, incluidos, por ejemplo; LungFlute, que es un pequeño dispositivo de audio autoalimentado que induce el esputo al generar ondas de sonido y vibraciones en las vías respiratorias de los pulmones (Anjuman y col., 2013). Será claro para los expertos en la materia que se puede usar cualquier procedimiento de recogida de muestras de esputo para la invención. De manera similar, se puede usar cualquier muestra derivada de esputo que se haya diluido, filtrado, separado, purificado o preparado de otro modo para el análisis para la invención.

15 Cualquier procedimiento para aislar y/o detectar o medir el nivel de modificaciones de histona y/o nucleosomas libres de células que comprende una modificación de histona particular y/o variantes de histona y/o nucleosomas libres de células que comprenden una variante de histona particular y/o modificaciones de ADN y/o nucleosomas libres de células que comprenden una modificación de ADN particular y/o aductos de nucleosomas y/o nucleosomas *per se* como biomarcadores en una muestra de esputo pueden usarse para la invención. Los ejemplos de procedimientos para la detección o medición de estos analitos incluyen procedimientos cromatográficos, espectroscópicos (particularmente espectrometría de masas), biosensor, ChIP y procedimientos inmunoquímicos. Algunos procedimientos de detección o medición pueden implicar el enriquecimiento o aislamiento previo de estos analitos de la muestra de esputo, por ejemplo, mediante procedimientos que incluyen extracción con solvente (por ejemplo, para extraer ácidos nucleicos), extracción con ácido (por ejemplo, para extraer proteínas de histona), cromatografía o purificación por afinidad/aislamiento utilizando un aglutinante selectivo de anticuerpos u otros aglutinantes de analitos específicos.

20 Hemos demostrado que los procedimientos de la invención pueden usarse en muestras de esputo para detectar el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), incluido el cáncer de pulmón en estadio temprano. Para los expertos en la materia, estará claro que la materia de esputo puede pasar a través o por encima de un cáncer de pulmón. El condensado del aliento, el lavado broncoalveolar (BAL) y el líquido plural son fluidos que también pasan a través o sobre el tórax en el que se pueden formar cánceres torácicos y particularmente cánceres y precánceres de pulmón. Está claro que los procedimientos de la invención también se pueden aplicar a condensado de aliento, BAL y fluido plural.

Será claro para los expertos en la materia que los procedimientos de la invención descritos incluyen una variedad de realizaciones que incluyen ensayos de tipo biosensor y ensayos sin etiqueta del tipo comercializado, por ejemplo, por ForteBio Incorporated de EE.UU.

30 Los expertos en la materia tendrán claro que los términos anticuerpo, aglutinante o ligando con respecto a cualquier aspecto de la invención no son limitantes, sino que pretenden incluir cualquier aglutinante capaz de unirse a moléculas o entidades particulares y que cualquier aglutinante adecuado puede ser utilizado en el procedimiento de la invención. También quedará claro que el término nucleosomas pretende incluir mononucleosomas y oligonucleosomas libres de células y cualquier fragmento de cromatina que pueda analizarse en medios fluidos.

35 Un aspecto adicional de la descripción proporciona ligandos o aglutinantes, tales como compuestos naturales o compuestos sintetizados químicamente, capaces de unirse específicamente al biomarcador. Un ligando o aglutinante según la invención puede comprender un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo, o un ligando sintético tal como un anticuerpo plástico, o un aptámero u oligonucleótido, capaz de unirse específicamente al biomarcador. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo capaz de unirse específicamente al biomarcador. Un ligando según la invención puede marcarse con un marcador detectable, tal como un marcador luminescente, fluorescente, enzimático o radiactivo; alternativa o adicionalmente, un ligando según la invención puede marcarse con una etiqueta de afinidad, p. ej., una etiqueta de biotina, avidina, estreptavidina o His (por ejemplo, hexa-His). Alternativamente, la unión del ligando se puede determinar usando una tecnología sin etiqueta, por ejemplo, la de ForteBio Inc.

40 Un biosensor según la descripción puede comprender el biomarcador o un imitador estructural/de forma capaz de unirse específicamente a un anticuerpo contra el biomarcador. También se proporciona una matriz que comprende un ligando o imitador como se describe en la presente memoria.

La descripción proporciona también el uso de uno o más ligandos como se describe en la presente memoria, que

puede producirse de forma natural o sintetizarse químicamente, y es adecuadamente un péptido, anticuerpo o fragmento del mismo, aptámero u oligonucleótido, o el uso de un biosensor de la invención, o una matriz de la invención, o un kit de la invención para detectar y/o cuantificar el biomarcador. En estos usos, la detección y/o cuantificación se puede realizar en una muestra biológica como se define en la presente memoria.

- 5 Se proporcionan kits de diagnóstico o monitorización para realizar los procedimientos de la invención. Dichos kits comprenderán adecuadamente un ligando según la invención, 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.

- 10 Un aspecto adicional de la descripción es un kit para detectar la presencia de un estado de enfermedad, que comprende un biosensor capaz de detectar y/o cuantificar uno o más de los biomarcadores como se define en la presente memoria.

- 15 Los biomarcadores para detectar la presencia de una enfermedad son objetivos esenciales para el descubrimiento de nuevos objetivos y moléculas de fármacos que retrasan o detienen la progresión del trastorno. Como el nivel del biomarcador es indicativo de trastorno y de respuesta al fármaco, el biomarcador es útil para la identificación de nuevos compuestos terapéuticos en ensayos *in vitro* y/o *en vivo*. Los biomarcadores de la invención pueden emplearse en procedimientos para seleccionar compuestos que modulan la actividad del biomarcador.

- 20 Por lo tanto, en un aspecto adicional de la descripción, se proporciona el uso de un aglutinante o ligando, como se describe, que puede ser un péptido, anticuerpo o fragmento del mismo o un aptámero u oligonucleótido según la invención; o el uso de un biosensor según la invención, o una matriz según la invención; o un kit según la invención, para identificar una sustancia capaz de promover y/o suprimir la generación del biomarcador.

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

- 25 El término "biomarcador" significa un indicador distintivo biológico o derivado biológicamente de un proceso, evento o condición. Los biomarcadores pueden usarse en procedimientos de diagnóstico, p. ej., cribado clínico y evaluación del pronóstico y en el seguimiento de los resultados de la terapia, identificando los sujetos con mayor probabilidad de responder a un tratamiento terapéutico particular, cribado y desarrollo de fármacos. Los biomarcadores y sus usos son valiosos para la identificación de nuevos tratamientos farmacológicos y para el descubrimiento de nuevos objetivos para el tratamiento farmacológico.

- 30 Los términos "detectar" y "diagnosticar" tal como se usan en la presente memoria comprenden la identificación, confirmación y/o caracterización de un estado de enfermedad. Los procedimientos de detección, monitoreo y diagnóstico según la invención son útiles para confirmar la existencia de una enfermedad, para monitorear el desarrollo de la enfermedad evaluando el inicio y la progresión, o para evaluar la mejoría o regresión de la enfermedad. Los procedimientos de detección, monitoreo y diagnóstico también son útiles en los procedimientos para la evaluación del cribado clínico, el pronóstico, la elección de la terapia, la evaluación del beneficio terapéutico, es decir, para el cribado de fármacos y el desarrollo de fármacos.

- 40 Los procedimientos de diagnóstico y monitoreo eficientes proporcionan "soluciones de sujeto" muy potentes con el potencial de mejorar el pronóstico, al establecer el diagnóstico correcto, permitir la identificación rápida del tratamiento más apropiado (disminuyendo así la exposición innecesaria a los efectos secundarios dañinos de los medicamentos) y reducir las tasas de recaída.

- 45 En una realización, dicho biomarcador se libera de las células de un tumor. Por lo tanto, según 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 asociada o liberada de las células de un tumor y (ii) demostrar que el nivel de dicho biomarcador está asociado con el tamaño, el estadio, la agresividad o la diseminación del tumor.

- 50 Los inmunoensayos de la invención incluyen cualquier procedimiento que emplee uno o más anticuerpos u otros aglutinantes específicos dirigidos a unirse a un nucleosoma o a un componente de nucleosoma o a una característica epigenética de un nucleosoma. Los inmunoensayos incluyen inmunoensayos de 2 sitios o ensayos inmunométricos que pueden ser ensayos sin etiqueta o emplear (sin limitación) procedimientos de detección radioactivos, enzimáticos, fluorescentes, fluorescentes de resolución temporal, quimioluminiscentes, turbidimétricos o de partículas. Los ensayos también pueden ser inmunoensayos de un solo sitio, inmunoensayos limitados con reactivos o procedimientos de inmunoensayo competitivos que incluyen procedimientos de inmunoensayo de antígeno marcado y anticuerpo marcado con un solo anticuerpo con una variedad de tipos de marcadores que incluyen radiactivo, enzima, fluorescente, fluorescente de resolución temporal, quimioluminiscente, turbidimensional y etiquetas de partículas.
- 55 Todos estos procedimientos de inmunoensayo son bien conocidos en la materia.

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

proporcionará el beneficio de monitorear o evaluar la eficacia del tratamiento de un estado de enfermedad. Dichos procedimientos de monitorización de la invención pueden usarse para monitorizar el inicio, la progresión, la estabilización, la mejora, la recaída y/o la remisión.

5 Por lo tanto, la descripción también proporciona un procedimiento para controlar la eficacia de una terapia para un estado de enfermedad en un sujeto, sospechoso de tener dicha enfermedad, que comprende detectar y/o cuantificar el biomarcador presente en una muestra biológica de dicho sujeto. En los procedimientos de monitoreo, las muestras de prueba se pueden tomar en dos o más ocasiones. El procedimiento puede comprender además comparar el nivel de los biomarcadores presentes en la muestra de prueba con uno o más controles y/o con una o más muestras de prueba anteriores tomadas anteriormente del mismo sujeto de prueba, p. ej., antes del comienzo de la terapia, y/o del mismo sujeto de prueba en una etapa anterior de la terapia. El procedimiento puede comprender detectar un cambio en la naturaleza o cantidad de los biomarcadores en las muestras de prueba tomadas en diferentes ocasiones.

Por lo tanto, según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para controlar la eficacia de la terapia para un estado de enfermedad en un sujeto humano o animal, que comprende:

- (i) cuantificar la cantidad del biomarcador como se define en la presente memoria; y
- 15 (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 anterior del mismo sujeto de prueba.

20 Un cambio en el nivel del biomarcador en la muestra de prueba en relación con el nivel en una muestra de prueba previa tomada anteriormente del mismo sujeto de prueba puede ser indicativo de un efecto beneficioso, p. ej., estabilización o mejora, de dicha terapia en el trastorno o sospecha de trastorno. Además, una vez que se ha completado el tratamiento, el procedimiento de la invención puede repetirse periódicamente para controlar la recurrencia de una enfermedad.

25 Los procedimientos para monitorear la eficacia de una terapia se pueden usar para monitorear la efectividad terapéutica de las terapias existentes y las nuevas terapias en sujetos humanos y en animales no humanos (por ejemplo, en modelos animales). Estos procedimientos de monitoreo pueden incorporarse en pantallas para nuevas sustancias farmacológicas y combinaciones de sustancias.

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

30 Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para identificar un biomarcador para detectar la presencia de un estado de enfermedad. El término "identificar" como se usa en la presente memoria significa confirmar la presencia del biomarcador presente en la muestra biológica. La cuantificación de la cantidad de biomarcador presente en una muestra puede incluir la determinación de la concentración del biomarcador presente en la muestra. La identificación y/o cuantificación se puede realizar directamente en la muestra, o indirectamente en un extracto de la misma, o en una dilución de la misma.

35 En aspectos alternativos de la invención, la presencia del biomarcador se evalúa mediante la detección y/o cuantificación de anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse específicamente al biomarcador que el cuerpo del sujeto genera en respuesta al biomarcador y, por lo tanto, está presente en una muestra biológica de un sujeto que tiene un estado de enfermedad.

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

45 La identificación y/o cuantificación de biomarcadores puede realizarse mediante la detección del biomarcador o de un fragmento del mismo, p. ej., un fragmento con truncamiento C-terminal, o con truncamiento N-terminal. Los fragmentos tienen una longitud adecuada de más de 4 aminoácidos, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de longitud. Se observa en particular que los péptidos de la misma secuencia o relacionados con el de las colas de histona son fragmentos particularmente útiles de proteínas de histona.

50 El biomarcador puede detectarse directamente, p. ej., por SELDI o MALDI-TOF. Alternativamente, el biomarcador puede detectarse directa o indirectamente a través de la interacción con un ligando o ligandos tales como un anticuerpo o un 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 aglutinante puede poseer una etiqueta detectable, tal como una etiqueta luminiscente, fluorescente o radiactiva, y/o una etiqueta de afinidad.

- 5 Por ejemplo, la detección y/o cuantificación se puede realizar mediante uno o más procedimientos seleccionados del grupo que consiste en: SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), un análisis 1-D basado en gel, un análisis 2-D basado en gel, especificación de masa (MS), fase inversa (RP) LC, permeación de tamaño (filtración en gel), intercambio iónico, afinidad, HPLC, UPLC y otras técnicas basadas en LC o LC MS. Las técnicas apropiadas de LC MS incluyen ICAT® (Applied Biosystems (biosistemas aplicados), CA, EE.UU.) o iTRAQ® (Applied Biosystems (biosistemas aplicados), CA, EE.UU.). La cromatografía líquida (por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía líquida de baja presión (LPLC)), cromatografía de capa fina, espectroscopía de RMN (resonancia magnética nuclear) también podrían usarse.
- 10 Los procedimientos de diagnóstico o monitorización según la invención pueden comprender el análisis de una muestra mediante SELDI TOF o MALDI TOF para detectar la presencia o el nivel del biomarcador. Estos procedimientos también son adecuados para el cribado clínico, el pronóstico, el seguimiento de los resultados de la terapia, la identificación de los sujetos con mayor probabilidad de responder a un tratamiento terapéutico particular, para el cribado y desarrollo de fármacos, y la identificación de nuevos objetivos para el tratamiento farmacológico.
- 15 La identificación y/o cuantificación de los biomarcadores de analito se puede realizar utilizando un procedimiento inmunológico, que implica un anticuerpo, o un fragmento del mismo capaz de unirse específicamente al biomarcador. Los procedimientos inmunológicos adecuados incluyen inmunoensayos de 2 sitios (ensayos inmunométricos o inmunoensayos sándwich), tales como ELISA sándwich, en el que la detección de los biomarcadores de analito se realiza utilizando dos anticuerpos que reconocen diferentes epítomos en un biomarcador de analito; radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas directos, indirectos o competitivos (ELISA), inmunoensayos enzimáticos (EIA), inmunoensayos de fluorescencia (FIA), transferencia Western, inmunoprecipitación y cualquier inmunoensayo a base de partículas (p. ej., usando partículas de látex de oro, plata o látex, partículas magnéticas o puntos Q). Los procedimientos inmunológicos se pueden realizar, por ejemplo, en formato de placa de microtitulación o tira.
- 20 Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un biomarcador identificado por el procedimiento como se define en la presente memoria.
- 25 En una realización, uno o más de los biomarcadores pueden ser reemplazados por una molécula, o un fragmento medible de la molécula, encontrado corriente arriba o corriente abajo del biomarcador en una ruta biológica.
- Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de una modificación de histona postraduccional, una variante de histona o isoforma o un nucleótido modificado como biomarcador en una muestra de esputo para el diagnóstico o detección de cáncer de pulmón.
- 30 La identificación de biomarcadores clave específicos de una enfermedad es fundamental para la integración de los procedimientos de diagnóstico y los regímenes terapéuticos. Mediante el uso de biomarcadores predictivos, se pueden desarrollar herramientas de diagnóstico apropiadas, como los biosensores; en consecuencia, en los procedimientos y usos de la invención, la identificación y cuantificación pueden realizarse usando un biosensor, sistema microanalítico, sistema de microingeniería, sistema de microseparación, sistema de inmunocromatografía u otros dispositivos analíticos adecuados. El biosensor puede incorporar un procedimiento inmunológico para la detección de biomarcadores, tecnologías eléctricas, térmicas, magnéticas, ópticas (p. ej., holograma) o acústicas. Mediante el uso de tales biosensores, es posible detectar los biomarcadores objetivo en las concentraciones anticipadas encontradas en muestras biológicas.
- 35 Como se usa en la presente memoria, el término "biosensor" significa cualquier cosa capaz de detectar la presencia del biomarcador. Ejemplos de biosensores se describen en la presente memoria.
- Los biosensores según la descripción pueden comprender un aglutinante o ligandos de ligando, como se describe en la presente memoria, capaz de unirse específicamente al biomarcador. Tales biosensores son útiles para detectar y/o cuantificar un biomarcador de la invención.
- 40 Los 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 "código de barras" o configuraciones de matriz.
- 45 En los sensores de hologramas inteligentes (Smart Holograms Ltd, Cambridge, Reino Unido), una imagen holográfica se almacena en una delgada película de polímero que se sensibiliza para reaccionar específicamente con el biomarcador. En la exposición, el biomarcador reacciona con el polímero y produce una alteración en la imagen que muestra el holograma. La lectura del resultado de la prueba puede ser un cambio en el brillo óptico, la imagen, el color y/o la posición de la imagen. Para aplicaciones cualitativas y semicuantitativas, un holograma de sensor puede leerse a simple vista, eliminando así la necesidad de equipos de detección. Se puede usar un sensor de color simple para leer la señal cuando se requieren mediciones cuantitativas. La opacidad o el color de la muestra no interfiere con el funcionamiento del sensor. El formato del sensor permite la multiplexación para la detección simultánea de varias sustancias. Los sensores reversibles e irreversibles pueden diseñarse para cumplir diferentes requisitos, y es posible el monitoreo continuo de un biomarcador particular de interés.
- 50
- 55

Adecuadamente, los biosensores para la detección de uno o más biomarcadores de la invención combinan el reconocimiento biomolecular con los medios apropiados para convertir la detección de la presencia, o cuantificación, del biomarcador en la muestra en una señal. Los biosensores se pueden adaptar para pruebas de diagnóstico de "sitio alternativo", p. ej., en la sala, departamento de subsujetos, cirugía, hogar, campo y lugar de trabajo.

5 Los biosensores para detectar uno o más biomarcadores de la invención incluyen sensores acústicos, de resonancia de plasmones, holográficos, de interferometría de biocapa (BLI) y sensores de microingeniería. Los elementos de reconocimiento impresos, la tecnología de transistores de película delgada, los dispositivos de resonancia acústica magnética y otros sistemas electroacústicos novedosos pueden emplearse en biosensores para la detección de uno o más biomarcadores de la invención.

10 Los procedimientos que implican la identificación y/o cuantificación de uno o más biomarcadores de la invención se pueden realizar en instrumentos de mesa, o se pueden incorporar en plataformas desechables, de diagnóstico o monitoreo que se pueden usar en un entorno que no sea de laboratorio, p. ej., en el consultorio del médico o al lado de la cama del sujeto. Los biosensores adecuados para realizar los procedimientos de la invención incluyen tarjetas de "crédito" con lectores ópticos o acústicos. Los biosensores se pueden configurar para permitir que los datos recopilados se transmitan electrónicamente al médico para su interpretación y, por lo tanto, pueden formar la base de la medicina electrónica.

15 Los kits de diagnóstico para el diagnóstico y monitoreo de la presencia de un estado de enfermedad se describen en la presente memoria. En una realización, los kits contienen adicionalmente un biosensor capaz de identificar y/o cuantificar un biomarcador. Adecuadamente, un kit según la invención puede contener uno o más componentes seleccionados del grupo: un aglutinante de ligando, o ligandos, específicos para el biomarcador o un imitador estructural/de forma del biomarcador, uno o más controles, uno o más reactivos y uno o más consumibles; opcionalmente junto con las instrucciones de uso del kit según cualquiera de los procedimientos definidos en la presente memoria.

20 La identificación de biomarcadores para un estado de enfermedad permite la integración de procedimientos de diagnóstico y regímenes terapéuticos. La detección de un biomarcador de la invención puede usarse para seleccionar sujetos antes de su participación en ensayos clínicos. Los biomarcadores proporcionan los medios para indicar la respuesta terapéutica, la falta de respuesta, el perfil de efectos secundarios desfavorables, el grado de cumplimiento de la medicación y el logro de niveles de fármaco en suero adecuados. Los biomarcadores pueden usarse para advertir sobre la respuesta adversa al fármaco. Los biomarcadores son útiles en el desarrollo de terapias personalizadas, ya que la evaluación de la respuesta se puede utilizar para ajustar la dosis, minimizar la cantidad de medicamentos recetados, reducir el retraso en la obtención de una terapia efectiva y evitar reacciones adversas a los medicamentos. Por lo tanto, al monitorear un biomarcador de la invención, el cuidado del sujeto se puede adaptar con precisión para que coincida con las necesidades determinadas por el trastorno y el perfil farmacogenómico del sujeto, el biomarcador se puede usar para valorar la dosis óptima, predecir una respuesta terapéutica positiva e identificar a aquellos sujetos con alto riesgo de efectos secundarios graves.

25 Las pruebas basadas en biomarcadores proporcionan una evaluación de primera línea de "nuevos" sujetos y proporcionan medidas objetivas para un diagnóstico preciso y rápido, que no se puede lograr con las medidas actuales.

30 Además, las pruebas de diagnóstico de biomarcadores son útiles para identificar miembros de la familia o sujetos con enfermedad leve o asintomática o que pueden tener un alto riesgo de desarrollar enfermedad sintomática. Esto permite el inicio de una terapia apropiada o medidas preventivas, p. ej., manejo de factores de riesgo. Se reconoce que estos enfoques mejoran los resultados y pueden prevenir la aparición manifiesta del trastorno.

35 Los procedimientos de monitoreo de biomarcadores, los biosensores y los kits también son vitales como herramientas de monitoreo del sujeto, para permitir al médico determinar si la recaída se debe al empeoramiento del trastorno. Si se considera que el tratamiento farmacológico es inadecuado, la terapia puede restablecerse o aumentarse; se puede administrar un cambio en la terapia si es apropiado. Como los biomarcadores son sensibles al estado del trastorno, proporcionan una indicación del impacto de la terapia farmacológica.

Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para tratar cáncer, adenoma, enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria en un animal o un sujeto humano, que comprende las siguientes etapas:

- 50 (i) detectar o medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en la muestra de esputo del sujeto;
- (ii) usar el nivel medido de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética como indicativo de la presencia de dicha enfermedad en el sujeto; y
- 55 (iii) administrar un agente terapéutico a un sujeto diagnosticado en la etapa (ii) como paciente con cáncer, adenoma, enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria.

Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para tratar cáncer, adenoma,

enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria en un individuo que lo necesite, que comprende la etapa de administración de un agente terapéutico a un paciente identificado con niveles diferentes de característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de esputo en comparación con los niveles de dicha característica epigenética de un nucleosoma libre de células de un sujeto de control.

- 5 En una realización, el procedimiento de tratamiento comprende el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer de pulmón, en particular el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP).

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

Ejemplo 1

10 Se recogieron muestras de esputo de 17 sujetos sin tratamiento diagnosticados con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), incluidos 2 sujetos con enfermedad en estadio T1, 2 sujetos con enfermedad en estadio T2, 5 sujetos con enfermedad en estadio T3, 4 sujetos con enfermedad en estadio T4 y 4 sujetos con enfermedad de estadio indeterminado Tx. También se recogieron muestras de esputo de 10 sujetos diagnosticados con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y 12 sujetos de control sanos con una edad aproximada. Para la recogida, se pidió a los sujetos que respiraran a través de un nebulizador que contenía solución de NaCl para inducir la formación de esputo durante 5 minutos, seguido de tos en un recipiente. Si no se produjo esputo, esto se repitió hasta un máximo de 3 veces más (es decir, hasta un total de 20 minutos respirando con un nebulizador). Se midió el volumen de muestra y la muestra se diluyó 1 + 3 con solución salina tamponada con fosfato. La muestra diluida se centrifugó para eliminar el material celular, se filtró a través de una gasa y se congeló hasta que se usó para el ensayo.

20 Las muestras de esputo diluido se analizaron utilizando un procedimiento ELISA de la invención para 9 ensayos de nucleosomas diferentes, incluida la concentración de nucleosomas *per se*, así como las siguientes características epigenéticas asociadas a nucleosomas; modificaciones de ADN: 5-metilcitosina, variantes de histona: gamma-H2AX, modificaciones de histona: H3K9Me3, H3K9Ac, H3K27Me3, H4K16Ac, H4K20Me3, H4PanAc (pan-acetilado H4). Para cada ensayo, se agregaron 10 µl de esputo diluido por duplicado a un pozo de microtitulación previamente recubierto con un anticuerpo antinucleosoma y se incubó durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con un tampón de lavado (200 µL/pocillo, tampón 0,05M Tris/HCl, pH 7.5 que contiene Tween 20 al 1%) y 50 µL de una solución de anticuerpo biotinilado (diluido en 0,05M Tris/HCl, pH 7.5 que contiene 0,9% de NaCl, 0,05% de desoxicolato de sodio y 1% de sustituto de Nonidet P40) dirigido a unirse a la característica epigenética de interés (es decir, dirigido a unirse a nucleosomas *per se*, o 5-metilcitosina, o gamma-H2AX, o H3K9Me3, o H3K9Ac, o H3K27Me3, o H4K16Ac, o H4K20Me3 o H4PanAc respectivamente). Los pocillos se incubaron durante 90 minutos más a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo como antes y se añadió una solución de estreptavidina marcada con enzima peroxidasa de rábano e incubada durante 30 minutos más. Los pocillos se lavaron de nuevo y se añadió una solución de sustrato coloreada (100 µL/pocillo, sal de 2,2'-azinobis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]-diamonio) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La densidad óptica (DO) de los pocillos se midió a una longitud de onda de 405 nm utilizando un lector de placa de microtitulación estándar. Se observó una curva de respuesta a la dosis de color creciente con una concentración de estructura epigenética asociada a nucleosomas creciente con una señal de fondo baja observada en el control negativo que no contiene nucleosomas.

Los resultados de DO de cada uno de los 9 ensayos de nucleosomas epigenéticos individuales se trazaron como un gráfico de puntos y como una curva de Característica del Operador del Receptor (ROC). Los resultados del área bajo la curva (AUC) se muestran para los 9 ensayos en la Tabla 1.

40 **Tabla 1**

La discriminación de los procedimientos ELISA individuales de la invención para sujetos con cáncer de pulmón de sujetos sanos y para sujetos con cáncer de pulmón de sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Los resultados se expresan como porcentaje de área bajo la curva (AUC) calculada por el análisis de la característica del operador receptor (ROC).

Característica epigenética de un solo nucleosoma	% AUC Cáncer vs. sano	% AUC Cáncer vs. EPOC
Nucleosomas <i>per se</i>	68	63
5-metilcitosina	67	70
Gamma-H2AX	55	52
H3K9Me3	63	57
H3K9Ac	91	83
H3K27Me3	51	56

Característica epigenética de un solo nucleosoma	% AUC Cáncer vs. sano	% AUC Cáncer vs. EPOC
H4K16Ac	70	63
H4K20Me3	57	52
H4PanAc	50	66

La Tabla 1 muestra que algunas de las características epigenéticas probadas están más alteradas en CPCNP que otras. Los más alterados (cifras más altas de AUC) fueron H3K9Ac, H4K16Ac, el nivel de nucleosoma *per se* y 5-metilcitosina. Estos ensayos también fueron generalmente los ensayos más diferentes en pacientes con cáncer que en pacientes con EPOC. Un diagrama de puntos y una curva ROC para el ensayo individual de esputo H3K9Ac se muestran en las Figuras 1 y 2 respectivamente. El uso de esta característica epigenética única de fragmentos de cromosomas de esputo detectó el 82% de los sujetos con cáncer de pulmón sin resultados falsos positivos para sujetos sanos y sorprendentemente detectó el 78% de los sujetos con cáncer de pulmón sin resultados falsos positivos para sujetos con EPOC. Esto demuestra que los procedimientos de la invención pueden detectar el cáncer de pulmón y distinguirlo de otras afecciones pulmonares. La capacidad de diferenciar afecciones pulmonares malignas y no malignas es una necesidad clínica no satisfecha importante para los cirujanos de cáncer de pulmón.

Ejemplo 2

Los resultados de la densidad óptica (DO) de las diversas mediciones de características epigenéticas individuales, realizadas en el ejemplo 1 anterior, se compilaron en varias combinaciones para obtener resultados del panel de prueba. La discriminación de los procedimientos ELISA de panel múltiple de la invención para identificar sujetos con cáncer de pulmón de sujetos sanos y de sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se determinó usando modelos matemáticos aritméticos simples calculados usando el análisis discriminante lineal de Fisher de los resultados de DO para el individuo. Procedimientos de ELISA. Los resultados se evaluaron mediante el análisis ROC de los modelos respectivos y las sensibilidades clínicas calculadas para algunos procedimientos de panel, con una especificidad clínica del 100% y al 90%, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

La discriminación de algunos procedimientos ELISA de panel múltiple de la invención para sujetos con cáncer de pulmón de sujetos sanos y para sujetos con cáncer de sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Los modelos matemáticos para los paneles se calcularon utilizando el análisis discriminante lineal de Fisher de los resultados de DO para los procedimientos ELISA individuales. Los resultados se expresan como porcentaje de sensibilidad clínica observada al 100% o 90% de especificidad para CPCNP vs. sano o para CPCNP vs. EPOC.

Panel de características epigenéticas de nucleosomas	Cáncer vs. Sano Sensibilidad al 100% (90%) de especificidad	Cáncer vs. EPOC Sensibilidad al 100% (90%) de especificidad
H3K9Ac y H4K16Ac	90% (100%)	0% (82%)
H3K9Ac y H4K20Me3	100% (100%)	0% (76%)
H3K9Ac y 5mc	100% (100%)	6% (6%)
H3K9Ac, 5mc y H4K16Ac	100% (100%)	6% (29%)
H3K9Ac, H4K16Ac y H4K20Me3	100% (100%)	0% (82%)

Se obtuvieron valores de sensibilidad clínica del 100%, con una especificidad del 100%, que mostraban una discriminación perfecta de pacientes con cáncer de pacientes sanos en esta cohorte para varias combinaciones de paneles de ensayo que incluyen H3K9Ac y 5-metilcitosina como se muestra en la Tabla 2. Sorprendentemente, la combinación de H3K9Ac y H4K20Me3 también dio una discriminación perfecta. Esto muestra que una característica epigenética que puede ser un pobre discriminador de CPCNP solo (por ejemplo, H4K20Me3) puede, sin embargo, ser útil como discriminador cuando se usa como parte del panel que incluye otros ensayos.

Sorprendentemente, los resultados de la prueba de panel muestran una precisión clínica del 100% (sensibilidad clínica del 100% con especificidad clínica del 100%) para la discriminación de sujetos con CPCNP de sujetos sanos en esta cohorte para varias pruebas de panel diferentes, así como una excelente discriminación para pacientes con cáncer de EPOC pacientes (Tabla 2). Esto demuestra la precisión y robustez de la invención. Un diagrama de puntos y una curva ROC obtenida para la prueba de panel que incluye H3K9Ac, H4K16Ac y H4K20Me3 se muestran en las Figuras 3 y

4. El uso de este panel proporcionó una discriminación perfecta de pacientes con cáncer de sujetos sanos y una sensibilidad clínica del 82% para la discriminación de sujetos con CPCNP de sujetos con EPOC al 90% de especificidad. Esto es sorprendente porque el diagnóstico diferencial del cáncer de pulmón por otras afecciones pulmonares es un problema clínico particularmente difícil. Llegamos a la conclusión de que estas pruebas son más seguras que los procedimientos de exploración para la detección del cáncer que involucran rayos X y la precisión clínica lograda en esta pequeña cohorte de sujetos supera la de cualquier prueba no invasiva para CPCNP actualmente disponible.

Ejemplo 3

- 10 Se obtiene una muestra de esputo de un paciente con cáncer de pulmón antes de un posible régimen de tratamiento con un medicamento u otra terapia (por ejemplo, un HDACi, HMTi, DNMTi u otro medicamento epigenético) y el estado epigenético del tumor se evalúa utilizando un procedimiento de invención (por ejemplo, un inmunoensayo de 2 sitios para nucleosomas que contienen una característica epigenética particular o un panel de dichos inmunoensayos de 2 sitios). El estado epigenético de los nucleosomas de esputo se utiliza para determinar qué terapia es probable que sea un tratamiento efectivo u óptimo para el paciente.

15 **Ejemplo 4**

- 20 Se obtiene una muestra de esputo de un paciente con cáncer de pulmón antes de un régimen de tratamiento (por ejemplo, con un fármaco epigenético que incluye un HDACi, HMTi, DNMTi) y se evalúa el estado epigenético del tumor utilizando un procedimiento de la invención (por ejemplo, un 2 -inmunoensayo de sitio para nucleosomas que contienen una característica epigenética particular o un panel de dichos inmunoensayos de 2 sitios). Se obtienen más muestras de esputo del paciente después del tratamiento y se vuelve a evaluar el estado epigenético de los nucleosomas de esputo ante cualquier cambio para verificar o controlar la eficacia del fármaco en el paciente.

Ejemplo 5

- 25 Se obtiene una muestra de esputo de un paciente con cáncer de pulmón y se evalúa el estado epigenético del tumor utilizando un procedimiento de la invención (por ejemplo, un inmunoensayo de 2 sitios para nucleosomas que contienen una característica epigenética particular o un panel de dichos inmunoensayos de 2 sitios). El estado epigenético de los nucleosomas de esputo se utiliza para evaluar el pronóstico del paciente.

Referencias

- Allen y col., Un procedimiento simple para estimar la metilación global del ADN utilizando PCR de bisulfito de elementos de ADN repetitivos. *Investigación de ácidos nucleicos*: 32 (3) e38DOI: 10.1093/nar/gnh032
- 30 Anjuman y col. Evaluación de flauta pulmonar en muestras de esputo para análisis molecular de cáncer de pulmón. *Medicina clínica y traslacional*, 2, 15, 2013
- Esteller, Epigenómica del cáncer: metilomas de ADN y mapas de modificación de histonas *Nature Reviews Genetics*: 8, 286-298, 2007
- 35 Feinberg y Vogelstein, la hipometilación distingue los genes de algunos cánceres humanos de sus contrapartes normales. *Nature*: 301, 89-92, 1983 doi: 10. 1371/journal.pone.0003759, 2008
- Hervouet y col., La interrupción de las interacciones Dnmt1/PCNA/UHRF1 promueve la tumorigénesis de células gliales humanas y de ratones
- PLoS ONE* 5 (6): e11333. doi: 10.1371/journal.pone.0011333, 2010
- 40 Herranz y Esteller, metilación del ADN y modificaciones de la histona en pacientes con cáncer: posibles objetivos pronósticos y terapéuticos. *Methods Mol Biol*.361: 25-62, 2007
- Holdenrieder y col., Nucleosomas en suero de pacientes con enfermedades benignas y malignas. *Int. J. Cáncer (Pred. Oncol.)*: 95, 114-120, 2001
- Jiang y col., *Sangre*. 102, 2243-50, 2003
- La Carta Médica sobre Fármacos y Terapéutica*. 56, 100-101, 2014
- 45 Newman y col. Un procedimiento ultrasensible para cuantificar el ADN tumoral circulante con una amplia cobertura del paciente. *Nature Medicine* doi: 10.1038/nm.3519, 2014
- Powrozek y col. Septin 9 promotor de la metilación de la región en el ADN de circulación libre - papel potencial en el diagnóstico no invasivo del cáncer de pulmón: informe preliminar. *Oncología médica*, 31, 917, 2014
- 50 Rodríguez-Paredes y Esteller, la epigenética del cáncer llega a la oncología convencional. *Medicina de la naturaleza*: 17 (3), 330-339, 2011

Salgame y col., Una ELISA para la detección de apoptosis. Investigación de ácidos nucleicos, 25 (3), 680-681, 1997

van Nieuwenhuijze y col., Tiempo entre el inicio de la apoptosis y la liberación de nucleosomas de las células apoptóticas: supuestas implicaciones para el lupus eritematoso sistémico. Ann Rheum Dis; 62: 10-14, 2003

5 Yoshida y Shimura, Aislamiento de proteína cromosómica no histona del timo de ternera. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Estructura de proteína; 263 (3), 690-695, 1972

REIVINDICACIONES

1. Uso de un nucleosoma libre de células como biomarcador en una muestra de esputo, para el diagnóstico o la detección de cáncer de pulmón.
- 5 2. Uso como se define en la reivindicación 1, en el que el biomarcador es una característica epigenética de un nucleosoma libre de células.
3. Uso como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el nucleosoma libre de células es un mononucleosoma u oligonucleosoma.
4. Un procedimiento para diagnosticar o detectar cáncer de pulmón en un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:
 - 10 (i) detectar o medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de esputo obtenida del sujeto; y
 - (ii) usar el nivel medido de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética como indicativo de la presencia de dicha enfermedad en el sujeto.
- 15 5. El uso o procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la característica epigenética se selecciona de: una modificación de histona postraduccional, una variante o isoforma de histona, una modificación de ADN o una proteína aducida al nucleosoma, tal como una modificación de ADN seleccionada de 5-metilcitosina, una o más variantes de histona seleccionadas de gamma-H2AX y H2AZ o una o más modificaciones de histona seleccionadas de: H3K9Me3, H3K9Ac, H3K27Me3, H4K16Ac, H4K20Me3, ubiquitin-H2A y H4PanAc (pan-acetilado H4).
- 20 6. Un procedimiento para monitorear la eficacia de una terapia en un animal o un sujeto humano que tiene, o se sospecha que tiene, o que está predispuesto al cáncer de pulmón que comprende las etapas de:
 - (i) medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de esputo obtenida del sujeto; y
 - 25 (ii) usar el nivel medido de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética en comparación con una muestra anterior tomada de dicho sujeto como indicativo de la eficacia de dicha terapia.
7. Un procedimiento para determinar el pronóstico de un animal o un sujeto humano con cáncer de pulmón que comprende las etapas de:
 - (i) medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de esputo obtenida del sujeto; y
 - 30 (ii) usar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética como indicativo del pronóstico del cáncer de pulmón.
8. El uso o procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es para el diagnóstico o la detección de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP).
- 35 9. Un procedimiento para determinar el origen celular de los nucleosomas libres de células de esputo en un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:
 - (i) detectar o medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de esputo obtenida del sujeto; y
 - (ii) usar el nivel medido de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética como un indicador de si los nucleosomas libres de células se originan de células pulmonares sanas, células cancerosas de pulmón o células con otras lesiones o de cualquier mezcla de tales células.
 - 40
10. El uso o procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha detección o medición comprende un procedimiento de inmunoensayo, inmunoquímico, espectroscopía de masas, cromatográfico, inmunoprecipitación de cromatina o biosensor.
- 45 11. El uso o procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dos o más mediciones de nucleosomas libres de células *per se* y/o las características epigenéticas de nucleosomas libres de células se realizan como un panel de características de nucleosomas.
12. Uso de un kit que comprende uno o más agentes de unión capaces de detectar y/o cuantificar una característica epigenética de un nucleosoma libre de células de esputo para el diagnóstico o detección de cáncer de pulmón en una muestra de esputo.

- 13.** Un procedimiento para detectar o cuantificar una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de esputo obtenida de un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:
- (i) poner en contacto la muestra de esputo con un primer agente de unión que se une a nucleosomas libres de células o un componente de los mismos;
 - 5 (ii) poner en contacto la muestra de esputo o los nucleosomas libres de células con un segundo agente de unión que se une a una característica epigenética dentro de dichos nucleosomas libres de células;
 - (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a la característica epigenética dentro de dichos nucleosomas libres de células en la muestra de esputo; y
 - 10 (iv) usar la presencia, grado o cantidad de dicha unión como una medida de la presencia de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética en la muestra de esputo.
- 14.** Un procedimiento para detectar o cuantificar una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra de esputo obtenida de un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:
- (i) poner en contacto la muestra de esputo con un primer agente de unión que se une a una característica epigenética dentro de dichos nucleosomas libres de células;
 - 15 (ii) poner en contacto la muestra de esputo o los nucleosomas libres de células con un segundo agente de unión que se une a los nucleosomas libres de células o un componente de los mismos;
 - (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a nucleosomas libres de células o un componente del mismo en la muestra de esputo; y
 - 20 (iv) usar la presencia, grado o cantidad de dicha unión como una medida de la presencia de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética en la muestra de esputo.
- 15.** Procedimiento según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el que la característica epigenética se selecciona de: una modificación de histona postraducciona, una variante o isoforma de histona, una modificación de ADN o una proteína aducida a dicho nucleosoma, tal como una modificación de ADN seleccionada de 5-metilcitosina, una o más variantes de histona seleccionadas de gamma-H2AX y H2AZ o una o más modificaciones de histona seleccionadas de: H3K9Me3, H3K9Ac, H3K27Me3, H4K16Ac, H4K20Me3, ubiquitin-H2A y H4PanAc (pan-acetilado H4).
- 25

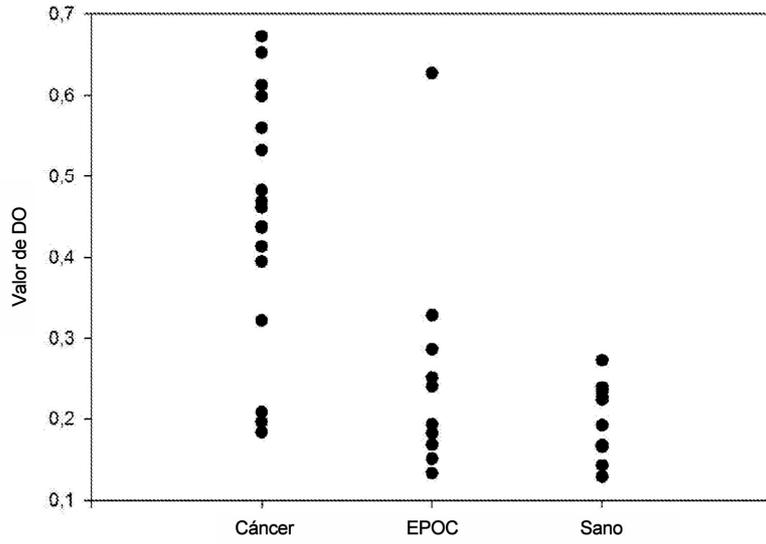


FIGURA 1

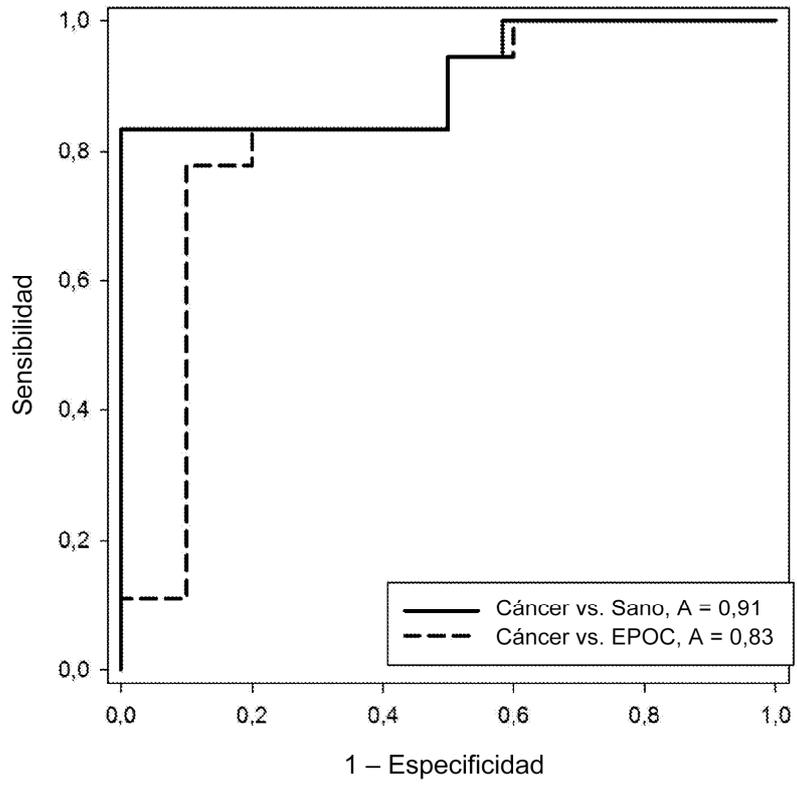


FIGURA 2

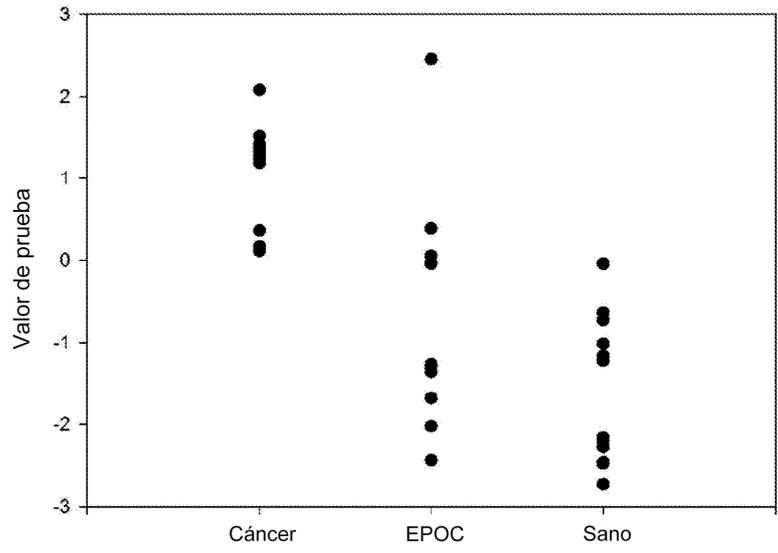


FIGURA 3

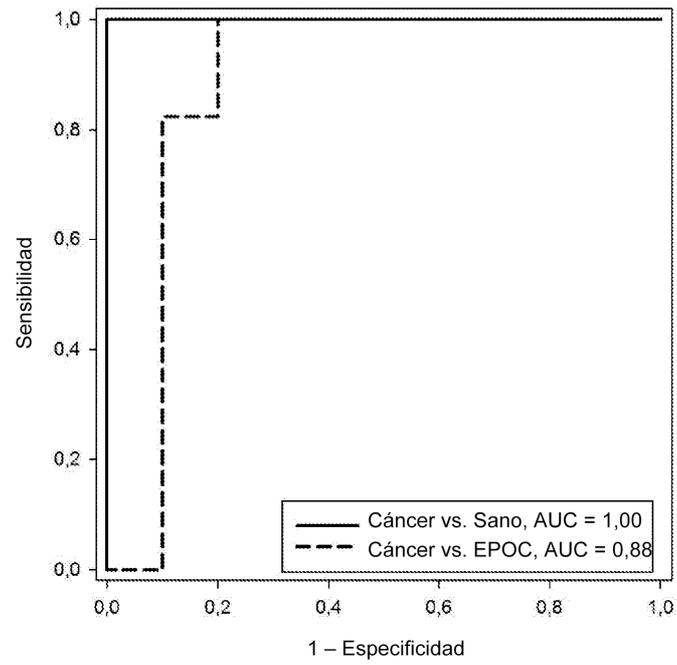


FIGURA 4