(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 775 178**

(51) Int. CI.:

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/GB2016/051995**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017 WO17001864**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2016 E 16736595 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3317672**

(54) Título: **Uso de nucleosomas libres de células como biomarcadores en muestras fecales**

(30) Prioridad:

01.07.2015 GB 201511542

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2020

(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:

PONS ARIÑO, Ángel

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 fecales

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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 un biomarcador de enfermedad. La invención también proporciona un procedimiento para la detección de cáncer colorrectal y pólipos mediante la detección y la medición de la presencia de nucleosomas y nucleosomas alterados epigenéticamente en muestras fecales. En particular, el procedimiento se relaciona con la detección y el perfil epigenético de fragmentos de cromatina nucleosómica en muestras fecales y el uso de esta información epigenética para establecer su origen celular en la cromatina de células colorrectales sanas o en la cromatina de cáncer colorrectal o células de adenoma colorrectal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad común con una alta mortalidad. Se entiende que la biología de la enfermedad involucra una progresión del adenoma precanceroso (pólipo) con displasia creciente que conduce a las etapas I, II, III y eventualmente a la etapa IV del CCR. 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 colon o el recto o incluso después, cuando el tratamiento es más difícil. La tasa de supervivencia a 5 años es > 90% para aquellos en quienes se detecta la enfermedad en la etapa I, pero solo alrededor del 10% para aquellos en quienes se detecta la enfermedad metastásica en la etapa IV. Por esta razón, muchos países tienen programas de detección de CCR para identificar a las personas que tienen CCR, adenomas o pólipos precancerosos. La incidencia del CCR depende de la edad y el sexo; siendo más común en hombres que en mujeres y más común en personas mayores. El CCR es raro en personas menores de 50 años, por lo que es más útil para evaluar a las personas mayores. El intervalo de edad real de detección probado varía en los programas de detección en diferentes países, pero generalmente es del orden de 50 a 74 años.

Los programas de detección de CCR permiten que este cáncer se detecte más temprano de lo que sería descubierto de otro modo, lo que lleva a un tratamiento más temprano y muchos años de vida a salvo. La detección temprana de CCR también ahorra dinero y recursos para los proveedores de atención médica, al reducir la necesidad de costosas terapias con medicamentos contra el cáncer en la etapa tardía y las hospitalizaciones. Idealmente, los programas de detección de CCR también detectarían pólipos colorrectales precancerosos o adenomas que podrían progresar a CCR si no se tratasen, pero que pueden eliminarse en caso de ser detectados antes de que se desarrolle cáncer. El pronóstico para tales pacientes es bueno.

Todos los procedimientos comúnmente usados para la detección y/o el análisis de CCR presentan los principales inconvenientes. El principal procedimiento de detección de CCR empleado en los EE.UU. es la colonoscopia. La colonoscopia consiste esencialmente en examinar visualmente el colon usando un endoscopio que atraviesa el colon descendente, transversal y ascendente en búsqueda de lesiones cancerosas o potencialmente precancerosas. La principal ventaja de la colonoscopia es su precisión de detección, que es del orden del 95% de sensibilidad clínica para el CCR, así como también tasas muy altas de detección de adenomas precancerosos, todo con una especificidad clínica muy alta (> 95%). Esta precisión hace que la colonoscopia sea el estándar de oro para la detección de CCR, especialmente porque las lesiones de bajo grado se pueden eliminar en el momento de su detección. Sin embargo, la colonoscopia presenta varias limitaciones como procedimiento de detección o análisis de CCR de primera línea. La colonoscopia es un procedimiento altamente invasivo que requiere un ingreso quirúrgico, el procedimiento generalmente se realiza bajo anestesia, requiere la preparación del intestino por parte del paciente con anticipación y, en algunos casos, causa lesiones al paciente (por ejemplo, desgarro del intestino) y es costoso (> $ 1000). El CCR se detecta en aproximadamente el 0,5% de las colonoscopias de detección, por lo que la gran mayoría de las personas examinadas se someten a un procedimiento quirúrgico con poco beneficio. Debido a estas desventajas, el cumplimiento del paciente con la colonoscopia es bajo y muchas personas en edad de detección no se someten al procedimiento. Por estos motivos, la colonoscopia no se usa como procedimiento de detección o análisis de CCR de primera línea en la mayoría de los países del mundo.

Algunos proveedores de atención médica emplean un procedimiento relacionado llamado sigmoidoscopia, donde se usa un alcance más corto para examinar solo el colon descendente. Aunque este procedimiento no observa dos tercios del colon, examina el área donde se observan los cánceres con mayor frecuencia. Las desventajas de la sigmoidoscopia son similares a las de la colonoscopia y, por razones similares, no se la usa comúnmente como prueba de primera línea. También se usa la colonoscopia virtual o la colonografía por tomografía computarizada (TC). Este procedimiento emplea una combinación de rayos X y tecnología informática para crear imágenes del recto y el colon a fin de detectar tumores colorrectales y pólipos.

Los procedimientos de detección y análisis de CCR más comúnmente usados involucran un procedimiento de dos etapas, en el que la población en edad de detección se evalúa primero con una prueba fecal no invasiva de primera línea para identificar un subgrupo de la población de detección donde existe un mayor riesgo de CCR. Las personas que dan positivo en la prueba fecal son derivadas para una colonoscopia de seguimiento. Por lo general, alrededor del 5% de estas personas tienen CCR. El resultado del examen fecal es negativo para la mayoría de las personas, por lo que el procedimiento de dos etapas previene colonoscopias innecesarias en la mayoría de las personas que no presentan lesión. Sin embargo, las pruebas fecales actuales tienen poca precisión clínica y existe la necesidad de efectuar pruebas de CCR fecales más asequibles y precisas.

El principio subyacente a las pruebas fecales actuales para el CCR es la detección de sangrado en el colon o el recto. En lenguaje sencillo; cuando el colon o el recto están parcialmente bloqueados por un crecimiento canceroso o precanceroso intruso, es probable que el movimiento de las heces más allá del bloqueo cause lesiones y sangrado. Este sangrado se detecta al analizar la muestra fecal para detectar la presencia de hemoglobina. Como el grado de sangrado puede variar mucho de un día a otro, es posible que la prueba deba realizarse varias veces en días separados.

Todas las pruebas de CCR fecal están diseñadas para detectar la hemoglobina fecal y se pueden dividir en tres tipos principales. La prueba de sangre oculta en heces de guayaco (FOBT o gFOBT) es un procedimiento de prueba química para la hemoglobina, en el que el paciente o el operador suelen untar una pequeña cantidad de heces en un papel recubierto con ácido alfa-guayacónico u otro sustrato. Si hay sangre en las heces, el agregado de peróxido de hidrógeno al papel produce un cambio rápido de color a través de la oxidación del ácido alfa-guayacónico a una quinona de color azul en una reacción catalizada por el hemo (un componente de la hemoglobina). El consumo de carne (y, por lo tanto, hemo), así como también algunas verduras, que contienen otras moléculas catalizadoras que se comportan como el hemo en la prueba, puede causar resultados de falsos positivos. Del mismo modo, algunas sustancias, incluyendo la vitamina C, pueden dar resultados de falsos negativos, por lo que a menudo se recomienda la restricción dietética antes de la prueba. Las pruebas FOBT de guayaco pueden tener una alta especificidad clínica, según el punto de corte usado, y tienen una sensibilidad del 60 al 70% para la detección de CCR. La detección de pólipos precancerosos o adenomas es deficiente. Los procedimientos químicos FOBT fueron el procedimiento de elección en el pasado y, aunque todavía se usan ampliamente, están siendo desplazados por los procedimientos de prueba inmunoquímica fecal.

Los procedimientos de prueba inmunoquímica fecal, o FIT, (también llamados iFOBT o FOBTi) son esencialmente pruebas de inmunoensayo para la hemoglobina humana en muestras fecales. Los procedimientos FIT son menos susceptibles a resultados de falsos positivos y negativos debido a la interferencia de los factores dietéticos y pueden detectar pequeñas cantidades de sangre en las heces. Estas pruebas tienen una especificidad similar a la gFOBT, pero detectan lesiones de cáncer ligeramente más relevantes en términos clínicos. La detección de pólipos o adenomas es deficiente.

El tercer tipo de prueba fecal para la detección de CCR es una innovación más reciente e involucra el análisis de secuencias de ADN en las heces, además del análisis de hemoglobina. En estos procedimientos, el ADN se extrae de las heces y se analiza para identificar mutaciones de secuencia asociadas al cáncer y/o cambios en la metilación del ADN específicos del gen. Un ejemplo de este enfoque lo proporciona la prueba Cologuard producida por Exact Sciences Corporation. La prueba involucra un panel de 11 marcadores para CCR en las heces, que incluyen hemoglobina, 7 mutaciones de secuencia de ADN, 2 metilaciones de secuencia de ADN y la secuencia de ADN para beta actina (como control para la normalización de los resultados). En esta prueba, la muestra de heces del paciente se procesa en el laboratorio para aislar el ADN de las heces. A continuación, se amplifica el ADN y se investiga la metilación del gen NDRG4 y BMP3 mediante la amplificación, de señal y objetivo, cuantitativa y específica del alelo en tiempo real. Las mutaciones de KRAS asociadas al cáncer también se investigan usando estos ensayos y todas se evalúan en relación con el nivel de ADN total evaluado por la amplificación de beta actina. Los resultados de metilación, mutación y hemoglobina del ADN se combinan para proporcionar un resultado positivo o negativo. La prueba Cologuard es más precisa que las pruebas simples FOBT o FIT y detecta el 92% de los cánceres y el 42% de los pólipos, con una especificidad del 87% (The Medical Letter, 2014).

La mayoría de los programas de análisis fecal FOBT y FIT informan una baja captación de pacientes (50-60%). Por lo general, se supone que esto se debe al requisito desagradable para el manejo del material fecal, además de la baja precisión de las pruebas. La prueba fecal Cologuard tiene una mayor precisión, pero queda por determinar si esto aumentará el cumplimiento del paciente, ya que recientemente se aprobó para su uso en los EE.UU. (agosto de 2014) y aún no se usa comúnmente. La principal desventaja del método Cologuard es su alto costo, debido a la naturaleza compleja de su prueba de panel, que involucra múltiples procedimientos de análisis realizados en múltiples plataformas de análisis, incluyendo el inmunoensayo, así como también el análisis de secuencias de ADN específicas y el análisis de la metilación de las secuencias de ADN. Es probable que el alto costo descarte el uso generalizado de la detección en la mayoría de los países. La complejidad y la naturaleza multiplataforma de la prueba también significan que es poco probable que se realice fuera de sofisticados laboratorios dedicados.

Los biomarcadores clásicos, incluyendo el antígeno carcinoembrionario (CEA), se han investigado como posibles biomarcadores a base de sangre para el CCR, pero su precisión clínica es demasiado baja para el uso rutinario y se usan mejor para la monitorización del paciente. Más recientemente, se ha investigado la hipermetilación de secuencias genéticas específicas para su uso como biomarcadores de diagnóstico para cánceres en sangre. Por ejemplo, se reseñó que un procedimiento reseñado para la detección de hipermetilación del gen de septina 9 por amplificación por PCR del ADN extraído de plasma detectaba un 72 % de los cánceres de colon con una tasa de falsos positivos del 10 % (Grutzmann y col., 2008). El estado de metilación del ADN de genes o loci específicos se detecta habitualmente por desaminación selectiva de citosina con bisulfito, pero no de 5-metilcitosina, hasta uracilo, lo que lleva a un cambio en la estructura primaria del ADN que puede detectarse por medio de una secuenciación o mediante otros medios (Allen y col., 2004).

Existe una necesidad clínica de pruebas precisas, seguras, no invasivas y de bajo costo para identificar a las personas con cáncer colorrectal en etapa temprana o pólipos precancerosos. Desafortunadamente, todas las pruebas disponibles actualmente son inexactas, invasivas o de alto costo.

La presente invención se refiere a la detección de nucleosomas libres de células y características epigenéticas de los nucleosomas libres de células en muestras fecales. Los nucleosomas libres de células se han informado previamente en la sangre, donde se cree que se originan a partir 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 que incluyen cáncer de CCR (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 CCR de otros tipos de cáncer o de otras enfermedades, lesiones o traumatismos. No hay informes sobre nucleosomas en las heces.

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. Todos estos tipos celulares contienen el mismo genoma, pero fenotipos ampliamente diferentes y funciones diferentes en el cuerpo. Esta diversidad fenotípica es debida a la expresión diferencial del genoma en diferentes tipos celulares. El control de la expresión diferencial de genes no se comprende por completo, pero los mecanismos básicos incluyen la regulación génica mediante una serie de señales epigenéticas interconectadas asociadas al gen, incluyendo las secuencias de ácido nucleico no codificantes, así como también los aspectos estructurales de la cromatina, incluyendo el control del empaquetamiento de la cromatina (por ejemplo; como eucromatina o heterocromatina), el control de posicionamiento de nucleosomas y los sitios accesibles a nucleasas, la modificación química del ADN, por ejemplo, la metilación de residuos de citosina, y la variación en la composición y estructura del complejo de histonas alrededor del cual se envuelve el ADN, por ejemplo, por la modificación postraduccional de las proteínas histonas o mediante la inclusión de isoformas o variantes de histonas alternativas (diferentes productos de genes de histonas). Por consiguiente, la cromatina celular, y sus nucleosomas constituyentes, comprenden una gran variedad de características epigenéticas estructurales químicas que están sujetas a una variedad de alteraciones 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. La estructura alterada de la cromatina conduce a una mala regulación genética que se asocia al desarrollo y progresión del cáncer. Además, la prevención o reversión de estos cambios en las características químicas epigenéticas de la cromatina y los nucleosomas usando medicamentos epigenéticos es eficaz en el tratamiento de enfermedades cancerosas. Dichos medicamentos epigenéticos incluyen, por ejemplo, inhibidores del complejo de deacetilasa de histonas (HDACi), inhibidores de histona metiltransferasa (HMTi) y medicamentos inhibidores de la ADN metiltransferasa (DNMTi).

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

La estructura de los nucleosomas en la cromatina celular puede variar según la modificación postraduccional (MPT) de las proteínas histonas y por la inclusión de proteínas histonas variantes. La MPT de proteínas histonas ocurre más comúnmente, aunque no solamente, en las colas de las ocho histonas nucleares y las modificaciones comunes incluyen acetilación, metilación o ubiquitinación de residuos de lisina, así como también metilación de residuos de arginina y fosforilación de residuos de serina. Las modificaciones de histona son conocidas por estar involucradas en la regulación epigenética de la expresión génica (Herranz y Esteller, 2007). La estructura del nucleosoma puede variar también por la inclusión de isoformas de histona alternativas o variantes que son diferentes productos génicos o de empalme y tienen diferentes secuencias aminoacídicas. Las variantes de histona pueden clasificarse en una serie de 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 del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI) (http://genome.nhgri.nih.gov/histones/complete.shtml), en la Base de datos de GenBank (la secuencia genética de NIH), en la base de datos de secuencias de nucleótidos de EMBL y en el banco de datos de ADN de Japón (DDBJ).

Se ha mostrado que difieren las variantes de histona y patrones de modificación de histona presentes en células sanas y enfermas en numerosos estudios (la mayoría inmunohistoquimicos) (Herranz y Esterler, 2007). Una desventaja de los procedimientos inmunohistoquímicos para uso clínico es que la recogida de muestra de tejido es invasiva al involucrar cirugía o biopsia.

La estructura del nucleosoma también varía según la modificación química de su componente de ADN, incluyendo el estado de 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 informó tan temprano como en 1983 (Feinberg y Vogelstein, 1983). Los patrones de metilación de ADN observados en células cancerosas difieren de aquellos de células sanas. Se reseña que los elementos repetitivos, particularmente alrededor de las áreas pericentroméricas, están hipometilados en las células cancerosas respecto a las sanas, pero se reseña que los promotores de genes específicos están hipermetilados en cáncer. Se informa que el balance de estos dos efectos da como resultado una hipometilación global del ADN en el cáncer y este es un sello distintivo de las células cancerosas (Esteller 2007, Hervouet y col., 2010, Rodriguez-Paredes y Esteller, 2011).

La estructura del nucleosoma también varía según la unión del nucleosoma a cualquier multitud de otras proteínas presentes en la cromatina para formar aductos de nucleosomas. La cromatina comprende una gran cantidad de proteínas que no son 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. El estudio de las proteínas unidas a cromatina se ha llevado a cabo en gran medida por procedimientos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Estos procedimientos son bien conocidos en la materia, pero son complejos, laboriosos y caros.

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

Hemos informado previamente ensayos ELISA para nucleosomas que contienen señales epigenéticas particulares, incluyendo nucleosomas que contienen modificaciones de histonas particulares, variantes de histonas particulares y modificaciones de ADN particulares, así como también aductos de nucleosomas particulares (WO 2005/019826, WO 2013/030579, WO 2013/030577, WO 2013/084002). Anteriormente hemos usado 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 fecales obtenidas de pacientes y hemos demostrado que es posible usar la naturaleza epigenética o el perfil estructural de estos nucleosomas para determinar su origen. Los fragmentos de cromatina se han identificado como procedentes de células sanas o de células gastroenterológicas enfermas, incluyendo células de cáncer colorrectal y células de pólipos o de una mezcla de estas células. A diferencia de los procedimientos fecales anteriores, como el método Cologuard, la presente invención no involucra la secuenciación de ADN de genes particulares, sino que se basa en la medición de los niveles de nucleosomas fecales *per se*, así como también la investigación de la alteración epigenética de todo el genoma del nucleosoma u otros fragmentos de cromatina en las heces. Ahora informamos procedimientos de inmunoensayo simples para la estimación directa de nucleosomas y nucleosomas libres de células alterados epigenéticamente y aductos de nucleosomas en muestras fecales y su determinación de tener un origen sano, de CCR o de cromatina de células de pólipo.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

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

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar o detectar cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo 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 fecal 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

Figura 1. Resultados de ELISA para la detección de nucleosomas libres de células en muestras fecales diluidas tomadas de 3 sujetos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere al uso de nucleosomas libres de células en las muestras fecales y, en particular, a una característica epigenética de los nucleosomas libres de células como un biomarcador de enfermedad. La invención también proporciona un procedimiento para la detección de cáncer colorrectal y pólipos mediante la detección y la medición de la presencia de nucleosomas y nucleosomas alterados epigenéticamente en muestras fecales. En particular, el procedimiento se relaciona con la detección y el perfil epigenético de fragmentos de cromatina nucleosómica en muestras fecales y el uso de esta información epigenética para establecer su origen celular en la cromatina de células colorrectales sanas o en la cromatina de cáncer colorrectal o células de adenoma colorrectal. Anteriormente hemos informado 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 fecales es que la muestra misma limita el origen de fragmentos de cromatina epigenética alterados al tracto gastrointestinal. Además, dado que es probable que los nucleosomas que se originan en las áreas superiores del tracto se digieran, la presencia de fragmentos de cromatina epigenética alterados en una muestra fecal tomada de un sujeto puede usarse para indicar la presencia de un cáncer en ese sujeto e identificar ese cáncer como un cáncer colorrectal o un pólipo precanceroso.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un nucleosoma libre de células como un biomarcador en una muestra fecal para el diagnóstico o detección de cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo. Hemos demostrado que el nivel de nucleosomas (*per se*) se altera en las muestras de heces de pacientes enfermos en relación con los niveles de muestras de heces de sujetos sanos y que estos nucleosomas comprenden diferentes niveles absolutos y relativos de una variedad de estructuras epigenéticas. Una ventaja de las heces como muestra de pacientes es el grado de especificidad de los órganos que su uso confiere en las pruebas de biomarcadores.

En una realización, el biomarcador se usa para el diagnóstico o la detección de cáncer colorrectal o los pólipos colorrectales.

En una realización, el biomarcador comprende el nivel de nucleosomas *per se.* Se apreciará que el nivel de nucleosomas fecales *per se* puede estimarse, por ejemplo, usando 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).

En una realización, el biomarcador comprende un nucleosoma libre de células alterado epigenéticamente o modificado de otro modo. Por consiguiente, por ejemplo, el biomarcador es una característica epigenética de un nucleosoma libre de células.

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

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar o detectar cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo en un animal o un ser humano que comprende las etapas de: (i) detectar o medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra fecal 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.

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

En una realización adicional, 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, entre otras, las histonas contienen una variedad de residuos de aminoácidos en múltiples posiciones, incluyendo los residuos de lisina, serina, arginina y treonina en las histonas H2, H3 y H4, así como también sus isoformas o variantes de secuencia. Estos pueden modificarse de múltiples maneras, incluyendo, por ejemplo, entre otras, acetilación, ubiquitinación, biotinilación o mono,

di o trimetilación de residuos de lisina. Cualquier modificación de histona puede ser una característica adecuada para usar en la invención, ya sea detectada o medida como una fracción de histona modificada individualmente, o si se detecta o mide como un componente de histona de un mononucleosoma, un oligonucleosoma u otro fragmento de cromatina libre de células, por ejemplo; usando un cromatógrafo, un espectrofotómetro de masas, un biosensor, recurriendo a una inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), un 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 usa un anticuerpo u otro ligante selectivo para un epítopo de nucleosoma y otro para la modificación particular de histona de interés. Hemos demostrado que los niveles relativos de los niveles de modificación postraduccionales de histonas asociados al nucleosoma están alterados en las muestras de heces de pacientes enfermos, en comparación con los niveles de muestras de heces de sujetos sanos.

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 fecal. Un ejemplo típico de esta realización, entre otros, involucra un inmunoensayo de 2 sitios que emplea un anticuerpo u otro ligante selectivo dirigido a unirse a nucleosomas y un anticuerpo u otro ligante selectivo dirigido a unir el grupo de modificaciones de histonas en cuestión. Los ejemplos de dichos anticuerpos dirigidos a unirse a un grupo de modificaciones de histonas incluirían, con fines ilustrativos, entre otros, anticuerpos antipanacetilación (por ejemplo, un anticuerpo panacetil H4), anticuerpos anticitrulinación o anticuerpos antiubiquitinación.

En una realización alternativa, la característica epigenética de un nucleosoma libre de células comprende una o más variantes de histona o isoformas. En la técnica, se conocen muchas variantes de histonas (por ejemplo; las variantes de histona H2 incluyen la H2A1, la H2A2, la mH2A1, la mH2A2, la H2AX y la H2AZ), y este número aumenta con las isoformas recientemente identificadas. Las estructuras de proteínas variantes de isoforma de histona también son susceptibles de modificación postraduccional. Por ejemplo; la variante H2A H2AX puede ser fosforilada tras la traducción en la serina 139 y a esta fracción a menudo se le llama gamma-H2AX. Cualquier variante de histona, incluyendo cualquier variante modificada, puede ser una característica adecuada para su uso en la invención, ya sea detectada o medida como fracciones de variante de histona individual, por ejemplo, usando un inmunoensayo, una cromatografía, una espectrofotometría de masas, una ChIP, un biosensor u otro procedimiento para la detección de un fracción 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 histona asociadas al nucleosoma se miden por medio de un inmunoensayo de 2 sitios que usa un anticuerpo u otro ligante selectivo para un epítopo de nucleosoma y otro para la variante de histona particular o la isoforma de interés. Hemos demostrado que los niveles relativos de los niveles de variantes de histona asociados al nucleosoma están alterados en las muestras de heces de pacientes enfermos, en comparación con los niveles de muestras de heces de sujetos sanos.

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 o nucleósido modificado o cualquier modificación de ADN puede ser una característica adecuada para su uso en la invención, ya sea que se detecte o mida en fracciones de ADN, ácido nucleico, nucleótido o nucleósido aislados, por ejemplo, usando un inmunoensayo, una cromatografía, una espectrofotometría de masas, una ChIP, un biosensor u otro procedimiento para la detección de una fracción de ácido nucleico modificado, o ya sea que se detecte o mida por cualquier procedimiento para mononucleosomas, oligonucleosomas u otros fragmentos de cromatina libres de células que incorporan la modificación particular del ADN. En una realización preferida, las modificaciones de ADN asociadas a nucleosomas se miden por medio de un inmunoensayo de 2 sitios que usa un anticuerpo u otro ligante selectivo para un epítopo 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 al nucleosoma están alterados en las muestras de heces de pacientes enfermos, en comparación con los niveles de muestras de heces de sujetos sanos. Para mayor claridad, el procedimiento de la presente invención no tiene que ver con la evaluación del estado de metilación (u otra modificación del ADN) de ninguna secuencia o gen de ADN en particular, sino con el estado de modificación global del ADN de los nucleosomas u otros fragmentos de cromatina presentes en las muestras fecales de prueba.

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 están asociadas a la cromatina. Cualquier aducto de proteína-nucleosoma puede ser una característica adecuada para usar en la invención, ya sea detectado o medido por cualquier procedimiento para aductos de mononucleosomas libres de células, aductos de oligonucleosomas u otros aductos de fragmentos de cromatina que incorporan la proteína particular, por ejemplo, un inmunoensayo de 2 sitios que usa un anticuerpo u otro ligante selectivo a un epítopo de nucleosoma y otro a 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 heces de pacientes enfermos, en comparación con los niveles de muestras de heces 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 de entre: el nivel de nucleosomas, 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 consiguiente, un panel de dichos biomarcadores seleccionados para su uso en la detección de CCR (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 CCR en humanos machos y hembras (o cualquier otro animal) puede ser diferente. De manera similar, el panel óptimo para detectar CCR en diferentes subpoblaciones o razas humanas puede diferir. De manera alternativa, 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 resultado del valor de prueba de un panel de tres ensayos que comprende los ensayos "A", "B" y "C" se pueden calcular a partir de una expresión matemática como (Valor de prueba = A + 2B + 3C) en hombres con un valor de corte de "X" y de una expresión matemática diferente como (Valor de prueba = 3A + 2B + C) en mujeres con un valor de corte diferente de "Y".

Según un aspecto adicional de la invención, existe un procedimiento para detectar o cuantificar una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra fecal obtenida de un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de: (i) poner la muestra fecal en contacto con un primer agente de unión que se une a nucleosomas libres de células o un componente del mismo; (ii) poner la muestra fecal o los nucleosomas libres de células en contacto 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 fecal; 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 fecal.

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 un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para detectar o cuantificar una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra fecal obtenida de un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de: (i) poner la muestra fecal en contacto con un primer agente de unión que se une a una característica epigenética dentro de dichos nucleosomas libres de células; (ii) poner la muestra fecal o los nucleosomas libres de células en contacto con un segundo agente de unión que se une a nucleosomas libres de células o un componente de los mismos; (iii) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a los nucleosomas libres de células o un componente de los mismos en la muestra fecal; 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 fecal.

La estructura 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.

En otro aspecto de la invención, el nivel medido de nucleosomas que contienen la característica epigenética particular se usa para determinar el origen celular de los nucleosomas presentes en una muestra fecal. Por ejemplo; si los nucleosomas fecales se originan a partir de la cromatina de células gastroenterológicas sanas, células de CCR, células de pólipos o células con otras lesiones, o de cualquier mezcla de tales células. Los expertos en la materia tendrán claro que un sujeto cuyo colon o recto contiene células cancerosas también contendrá células sanas y que una muestra fecal obtenida de dicho sujeto puede contener nucleosomas procedentes de células sanas, así como también de células cancerosas y/o adenomas o células de pólipos. De manera similar, pueden ocurrir nucleosomas con otras combinaciones de orígenes en sujetos con diferentes afecciones médicas, incluyendo los nucleosomas de células sanas, así como también los nucleosomas de uno o más tipos de células enfermas con una o más lesiones diferentes. En una realización preferida, se usa un panel de niveles de estructura epigenética de nucleosoma fecal medidos para determinar el o los orígenes celulares de los nucleosomas presentes en la muestra.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar el origen celular de nucleosomas libres de células fecales 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 fecal 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 gastroenterológicas sanas, células de cáncer colorrectal, células de pólipos, células con otras lesiones o cualquier mezcla de las mismas.

En una realización preferida de la invención, se realizan varios ensayos fecales de la invención (usando cualquier procedimiento de la invención) para producir un perfil epigenético que consiste en múltiples características del nucleosoma epigenético. 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 gastroenterológicas sanas, células del CCR, células de pólipos o células con otras lesiones o de cualquier mezcla de tales células). El perfil epigenético puede usarse para determinar la presencia o ausencia de un cáncer colorrectal, uno o más pólipos u otras lesiones en el sujeto del que se tomó la muestra fecal.

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

(i) obtener una muestra fecal del sujeto;

(ii) poner la muestra fecal en contacto con un primero y un segundo agente de unión donde 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;

(iii) detectar o cuantificar la unión de uno o ambos de dichos agentes de unión en la muestra fecal; y

(iv) 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 fecal.

Se apreciará que las características epigenéticas descritas en esta invención también se pueden analizar independientemente de su inclusión, o de otro modo, dentro de un nucleosoma. Por consiguiente, según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar o detectar un cáncer, un adenoma, una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria en un animal o un sujeto humano, que comprende las etapas de:

(i) obtener una muestra fecal del sujeto;

(ii) detectar o medir el nivel de una variante de histona particular, isoforma de histona o una histona que contiene una modificación postraduccional particular en la muestra fecal; y

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

En una realización de la invención, las histonas en una muestra fecal se analizan para determinar la variante de histona, la isoforma o la composición de modificación de histona de dicha muestra. En una realización, las histonas en una muestra fecal pueden aislarse para dicho ensayo, por ejemplo, entre otros, mediante extracción con ácido 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 la misma fracción de histona. En otra realización, se proporciona una variante de histona o un inmunoensayo de la isoforma que emplea dos agentes de unión antihistona dirigidos a unir diferentes epítopos en la misma fracción de histona, siendo que al menos uno de ellos es específico de la isoforma de interés.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar o detectar cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo en un animal o un ser humano que comprende las etapas de: (i) detectar o medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra fecal 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.

En una realización preferida de este aspecto, el nucleótido modificado epigenéticamente y medido en fragmentos de cromatina fecal 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 involucra la investigación del estado de metilación de citosina de un gen particular o secuencia de ADN, por ejemplo, como se usa en el método Cologuard. Por el contrario, la presente invención involucra la determinación del nivel global de 5-metilcitosina independientemente de la secuencia del gen.

En una realización de la invención, los nucleótidos modificados en una muestra fecal se analizan para determinar la composición de nucleótidos modificada de dicha muestra. En una realización, los nucleótidos y/o el ADN en una muestra fecal pueden aislarse para dicho ensayo, por ejemplo, entre otros, mediante la extracción con solvente 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 antimonocatenario o bicatenario en combinación con otro agente de unión dirigido a unirse a un nucleótido modificado.

En una realización preferida de la invención, se proporciona un procedimiento de inmunoensayo de 2 sitios para la medición de las características epigenéticas incorporadas de nucleosomas in situ, empleando un agente de unión antinucleosoma inmovilizado en combinación con una modificación antihistona marcada, una variante antihistona o una modificación anti ADN, o un agente de unión de detección de proteínas antiaducto. En otra realización de la invención, se proporciona un inmunoensayo de 2 sitios que emplea un agente de unión antinucleosoma marcado en combinación con una modificación antihistona inmovilizada, una variante antihistona, una modificación anti ADN o un agente de unión de proteínas antiaducto.

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.

En una realización, la enfermedad se selecciona de entre cáncer, tal como un cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo.

En una realización preferida, se usa un panel de múltiples características de nucleosomas epigenéticos para detectar la presencia de un cáncer colorrectal o un adenoma o pólipo colorrectal en el sujeto. Además, se pueden incluir más pruebas dentro de dicho panel para aumentar su precisión clínica, incluyendo, por ejemplo, pruebas de hemoglobina, otros marcadores tumorales conocidos, incluyendo el antígeno carcinoembrionario (CEA) y/o secuencias genéticas específicas mutadas o metiladas. Los parámetros adicionales pueden incluir cualquier información clínica relevante, por ejemplo, entre otros, edad, sexo, índice de masa corporal, tabaquismo y hábitos alimenticios.

En una realización de la invención, el nivel de una característica epigenética estructural particular de un nucleosoma en una muestra fecal, 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.

También se describe un procedimiento para evaluar la idoneidad de un animal o un sujeto humano para un tratamiento médico que comprende las etapas de:

(i) detectar o medir un nucleosoma libre de células fecales que contiene una característica epigenética en una muestra obtenida de dicho sujeto enfermo; 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.

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, se sospecha que tiene o está predispuesto a cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo que comprende las etapas de: (i) medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra fecal obtenida del sujeto; y (ii) usar el nivel 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 otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar el pronóstico de un animal o un sujeto humano con un cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo, que comprende las etapas de: (i) medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra fecal obtenida del sujeto; y (ii) usar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen dicha característica epigenética como indicativo del pronóstico de un cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un procedimiento para detectar o medir nucleosomas libres de células fecales con una característica epigenética, ya sea solo o como parte de un panel de mediciones, con el fin 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 controlar un tratamiento de un sujeto animal o humano, para su uso en sujetos con cáncer real o sospechado, tumores benignos, enfermedades inflamatorias o enfermedades autoinmunes.

También se describe un procedimiento para identificar un biomarcador epigenético asociado a un nucleosoma libre de células fecales para detectar o diagnosticar un estado de enfermedad en un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

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

(ii) detectar o medir un nucleosoma libre de células con la misma característica epigenética en una muestra fecal de un sujeto sano o un sujeto 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.

Según un aspecto adicional 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 fecales para el diagnóstico o detección de un cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo en una muestra fecal.

En una realización, el uno o más agentes de unión comprende un ligando o ligante específico para el nucleosoma libre de células o una parte componente del mismo, o una imitación estructural/de forma de la base de ADN, del nucleótido o nucleósido o una parte componente del mismo.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un panel de pruebas para obtener un perfil epigenético de nucleosomas fecales 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 epítopos de nucleosomas; incluyendo, entre otras, 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 relación de cualquiera de estos y otros epítopos 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.

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

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 gastroenterológicas sanas, células de inflamación, células del CCR o células de adenoma o pólipo. Los fragmentos de cromatina fecal pueden incluir fragmentos que se originan a partir de una mezcla de dos o más tipos celulares diferentes, por ejemplo, entre otros, de células sanas, así como también de células de un CCR o de pólipos. Si alguno (incluso una pequeña minoría) de los fragmentos de cromatina nucleosómica presentes en la muestra fecal tiene un origen de células de un CCR o de pólipos, esto indica claramente la presencia de un cáncer o pólipo colorrectal en el sujeto del que se obtuvo el material fecal.

Los expertos en la materia tendrán claro que los dos anticuerpos u otros ligantes usados pueden dirigirse a unirse a nucleosomas intactos o a cualquier parte componente de un nucleosoma, incluyendo, 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 ligantes) usados en un inmunoensayo clásico de 2 sitios. Por consiguiente, 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 ligantes. Una ventaja de este diseño es que los epítopos de nucleosomas fecales pueden seleccionarse para ser epítopos cuya concurrencia en nucleosomas fecales está asociada a células gastroenterológicas, células de CCR, células de pólipos o células que, de otro modo, están enfermas. El uso de dicho anticuerpo o ligante selectivo para un epítopo común a muchos, la mayoría o todos los nucleosomas de origen de una enfermedad (por ejemplo, cáncer), pero que está ausente o es más raro en los nucleosomas de origen celular sano, se seleccionará como un inmunosorbente (generalmente un anticuerpo en fase sólida) para dichos nucleosomas de origen celular enfermo. Esto proporciona un aspecto de selectividad de nucleosomas tumorales para el ensayo.

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

Los procedimientos para la recolección de muestras fecales o de heces han sido usados durante muchos años para las pruebas FOBT y FIT y son bien conocidos en la técnica. Un procedimiento común involucra la recolección de material fecal por parte del paciente y untar una pequeña cantidad de material fecal en un soporte que, a continuación, se transporta a un laboratorio. En otro procedimiento, una pequeña cantidad de material fecal recogido por el paciente se diluye en un tampón y se transporta al laboratorio. En algunos procedimientos, la recolección repetida, por ejemplo, en 3 días separados, se realiza para análisis múltiples, a fin de reducir el error involucrado en una sola medición de muestra, particularmente para las mediciones FOBT.

Los dispositivos para la recolección de material de muestra fecal están disponibles comercialmente. En nuestros estudios, se recolectaron muestras fecales usando un dispositivo de recolección recomendado para su uso con una prueba FIT disponible comercialmente. El dispositivo incluye una barra de muestra que se usa para recoger una pequeña cantidad de material fecal. A continuación, se inserta la sonda en su tubo, donde se extrae el exceso de muestra de la vara y se agregan 10 mg de muestra fecal a 2 ml de tampón. El tubo también contiene un sistema de filtro para eliminar los sólidos cuando una porción de la muestra líquida se elimina para el análisis. Para los expertos en la materia, quedará claro que, para la invención, se puede usar cualquier procedimiento de recolección de muestras fecales. De manera similar, para la invención, puede usarse cualquier muestra derivada de heces que se haya diluido, filtrado, separado, purificado o preparado de otro modo para el análisis.

Para la invención, es posible usar cualquier procedimiento para aislar y/o detectar o medir el nivel de modificaciones de histona y/o nucleosomas libres de células que comprenda una modificación de histona particular y/o variantes de histona y/o nucleosomas libres de células que comprendan una variante de histona particular y/o modificaciones de ADN y/o nucleosomas libres de células que comprendan una modificación de ADN particular y/o aductos de nucleosomas y/o nucleosomas *per se*, como biomarcadores. Los ejemplos de procedimientos para la detección o medición de estos analitos incluyen procedimientos cromatográficos, espectroscópicos (particularmente espectrometría de masas), un biosensor, una ChIP y procedimientos inmunoquímicos. Algunos procedimientos de detección o medición pueden involucrar un enriquecimiento o aislamiento previo de estos analitos de la muestra fecal, por ejemplo, mediante procedimientos que incluyen cromatografía o purificación/aislamiento por afinidad usando un ligante selectivo de anticuerpos u otros ligantes de analitos específicos. El aislamiento o la purificación de la modificación del ADN se puede lograr mediante procedimientos de extracción de ADN conocidos en la técnica.

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

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

Un aspecto adicional de la descripción proporciona ligandos o ligantes, tales como compuestos de origen natural o sintetizados químicamente, capaces de unión específica al biomarcador. Un ligando o ligante 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 unión específica al biomarcador. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo capaz de unión específica al biomarcador. Un ligando según la invención puede marcarse con un marcador detectable, tal como un marcador luminiscente, fluorescente, enzimático o radiactivo; como alternativa o adicionalmente, un ligando según la descripción puede marcarse con un marcaje de afinidad, por ejemplo, un marcaje de biotina, avidina, estreptavidina o His (por ejemplo, hexa-His). Como alternativa, la unión de ligando puede determinarse usando tecnología exenta de marcación, por ejemplo, aquella de ForteBio Inc.

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

Se proporciona también por la descripción el uso de uno o más ligandos como se describen en la presente invención, que pueden ser de origen natural o sintetizados químicamente, y es, de manera adecuada, un péptido, anticuerpo o fragmento del mismo, aptámero u oligonucleótido, o el uso de un biosensor de la invención, 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 puede efectuarse en una muestra biológica como se define en la presente invención.

Se proporcionan kits de diagnóstico o monitorización para efectuar los procedimientos de la invención. Tales kits comprenderán, de manera adecuada, 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 invención, opcionalmente junto con instrucciones para el uso del kit.

Un aspecto adicional de la descripción es un kit para detectar la presencia de un estado patológico, que comprende un biosensor capaz de detectar y/o cuantificar uno o más de los biomarcadores definidos en la presente invención.

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

Por consiguiente, en un aspecto adicional de la descripción, se proporciona el uso de un ligante o ligando como se describe que puede ser un péptido, anticuerpo o fragmento del mismo o 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.

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

El término "biomarcador" significa un indicador biológico o derivado biológicamente distintivo de un proceso, evento o afección. Los biomarcadores pueden usarse en procedimientos de diagnóstico, por ejemplo, análisis clínico, y tanto en la evaluación de pronóstico como en la monitorización de los resultados de la terapia, en la identificación de los sujetos que es más probable que respondan a un tratamiento terapéutico particular, el análisis y el desarrollo de medicamentos. Los biomarcadores y usos de los mismos son valiosos para la identificación de nuevos tratamientos farmacológicos y para el descubrimiento de nuevos objetivos para tratamiento farmacológico.

Los términos "detectar" y "diagnosticar" como se usan en la presente invención engloban identificación, confirmación y/o caracterización de un estado patológico. Los procedimientos de detección, monitorización y diagnóstico según la invención son útiles para confirmar la existencia de una enfermedad, para monitorizar el desarrollo de la enfermedad valorando inicio y progresión o para valorar la mejora o regresión de la enfermedad. Los procedimientos de detección, monitorización y diagnóstico son también útiles en procedimientos para la evaluación de análisis clínicos, los pronósticos, la elección de la terapia y la evaluación del beneficio terapéutico, es decir, para el análisis de medicamentos y el desarrollo de medicamentos.

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

En una realización, dicho biomarcador es liberado a partir de las células de un tumor. Por consiguiente, 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 asociado a, o liberado a partir de, las células de un tumor y (ii) demostrar que el nivel de dicho biomarcador está asociado al tamaño, etapa, agresividad o diseminación del tumor.

Los inmunoensayos de la descripción incluyen cualquier procedimiento que emplee uno o más anticuerpos u otros ligantes específicos dirigidos a unirse a un nucleosoma, a un componente de nucleosoma o a una característica epigenética de un nucleosoma. Los inmunoensayos incluyen inmunoensayos de 2 sitios o ensayos inmunométricos que emplean procedimientos de detección enzimática (por ejemplo, ELISA), ensayos inmunométricos marcados con fluorescencia, ensayos inmunométricos marcados con fluorescencia resueltos en el tiempo, ensayos inmunométricos quimioluminiscentes, ensayos inmunoturbidimétricos, ensayos inmunométricos marcados con partículas y ensayos inmunoradiométricos, así como también inmunoensayos de sitio único, inmunoensayos con reactivos limitados y procedimientos de inmunoensayos competitivos incluyendo procedimientos de inmunoensayo de antígeno marcado y anticuerpo único marcado con una variedad de tipos de marcación, incluyendo marcación radiactiva, enzimática, fluorescente, fluorescente resuelta en el tiempo y con partículas. Todos estos procedimientos de inmunoensayo son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Salgame *y col.,* 1997 y Van Nieuwenhuijze *y col.,* 2003.

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

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

Por consiguiente, según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para monitorizar la eficacia de la terapia para un estado patológico en un sujeto humano o animal que comprende:

(i) cuantificar la cantidad de biomarcador como se define en la presente invención; y

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

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

Los procedimientos para monitorizar la eficacia de una terapia pueden usarse para monitorizar la efectividad terapéutica de terapias existentes y nuevas terapias en sujetos humanos y en animales no humanos (por ejemplo, en modelos animales). Estos procedimientos de monitorización pueden incorporarse a análisis de nuevas sustancias farmacológicas y combinaciones de sustancias. En una realización adicional, la monitorización de cambios más rápidos debidos a terapias de acción rápida se realiza en intervalos más cortos de horas o días.

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

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

La identificación y/o cuantificación pueden efectuarse 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 procedimientos de la invención, la cuantificación puede efectuarse midiendo la concentración del biomarcador en la muestra o muestras. Las muestras biológicas que pueden ensayarse en un procedimiento de la invención incluyen aquellas definidas anteriormente en la presente invención. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, cuando sea adecuado, diluyéndolas, concentrándolas y almacenándolas de la manera habitual.

La identificación y/o cuantificación de los biomarcadores puede efectuarse mediante la detección del biomarcador o de un fragmento de mismo, por ejemplo, un fragmento con truncamiento del extremo terminal C, o con truncamiento del extremo terminal N. Los fragmentos son, de manera adecuada, mayores de 4 aminoácidos de longitud, por ejemplo, de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de longitud. Se señala en particular que los péptidos de la misma secuencia o relacionada con la de colas de histona son fragmentos particularmente útiles de proteínas histonas.

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

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

Los procedimientos de diagnóstico o monitorización según la invención pueden comprender analizar una muestra por SELDI TOF o MALDI TOF para detectar la presencia o el nivel del biomarcador. Estos procedimientos son también adecuados para análisis clínico, pronóstico, monitorización de los resultados de la terapia, identificación de los sujetos que es más probable que respondan a un tratamiento terapéutico particular, análisis y desarrollo de medicamentos e identificación de nuevos objetivos para el tratamiento farmacológico.

La identificación y/o cuantificación de los biomarcadores de analito pueden efectuarse usando un procedimiento inmunológico, que implica un anticuerpo o fragmento del mismo capaz de unión específica al biomarcador. Los procedimientos inmunológicos adecuados incluyen inmunoensayos de 2 sitios (ensayos inmunométricos o inmunoensayos de sándwich), tales como el ELISA de sándwich, en los que la detección de los biomarcadores de analito se efectúa usando dos anticuerpos que reconocen diferentes epítopos en un biomarcador de analito; radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) directa, indirecta o competitiva, inmunoensayos enzimáticos (EIA), inmunoensayos de fluorescencia (FIA), transferencia Western, inmunoprecipitación y cualquier inmunoensayo basado en partículas (por ejemplo, que usa partículas de oro, plata o látex, partículas magnéticas o puntos cuánticos). Los procedimientos inmunológicos pueden efectuarse, por ejemplo, en formato de placa de microvaloración o tira. En una realización, la detección o medición comprende un procedimiento de inmunoensayo, un procedimiento inmunoquímico, una espectroscopía de masas, un procedimiento cromatográfico, una inmunoprecipitación de cromatina o el uso de un biosensor.

Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un biomarcador identificado mediante el procedimiento como se define en la presente invención.

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

Según otro aspecto 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 fecal para el diagnóstico o detección de un cáncer, un adenoma, una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria.

La identificación de biomarcadores clave específicos de una enfermedad es esencial para la integración de los procedimientos de diagnóstico y regímenes terapéuticos. Usando biomarcadores predictivos pueden desarrollarse herramientas de diagnóstico adecuadas tales como biosensores; por consiguiente, en procedimientos y usos de la invención, la identificación y cuantificación pueden efectuarse usando un biosensor, sistema microanalítico, sistema micromanipulado, sistema de microseparación, sistema inmunocromatográfico u otros dispositivos analíticos adecuados. El biosensor puede incorporar un procedimiento inmunológico para la detección del biomarcador o biomarcadores, tecnologías eléctrica, térmica, magnética, óptica (por ejemplo, holograma) o acústica. Usando tales biosensores, es posible detectar el biomarcador o biomarcadores diana a las concentraciones previstas encontradas en muestras biológicas.

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

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

El biomarcador o biomarcadores pueden detectarse usando un biosensor que incorpora tecnologías basadas en hologramas "inteligentes" o sistemas acústicos de alta frecuencia, tales sistemas son particularmente susceptibles de

configuraciones de "código de barras" o matriz.

En sensores de hologramas inteligentes (Smart Holograms Ltd, Cambridge, Reino Unido), se almacena una imagen holográfica en una película polimérica fina que se sensibiliza para reaccionar específicamente con el biomarcador. Tras la exposición, el biomarcador reacciona con el polímero conduciendo a una alteración de la imagen exhibida por el holograma. La lectura que resulta de la prueba puede ser un cambio en el brillo óptico, imagen, color y/o posición de la imagen. Para aplicaciones cualitativas y semicuantitativas, puede leerse un holograma sensor a simple vista, eliminando, por consiguiente, la necesidad de un equipo de detección. Puede usarse un sensor de color sencillo para leer la señal cuando se requieren medidas cuantitativas. La opacidad del color de la muestra no interfiere con la operación del sensor. El formato del sensor permite la multiplexación para detección simultánea de varias sustancias. Pueden diseñarse sensores reversibles e irreversibles para satisfacer diferentes requisitos, y es factible una monitorización continua de un biomarcador particular de interés.

De manera adecuada, los biosensores para la detección de uno o más biomarcadores combinan el reconocimiento biomolecular con medios adecuados para convertir la detección de la presencia, o la cuantificación, del biomarcador en la muestra en una señal. Los biosensores pueden adaptarse para un ensayo de diagnóstico de "sitio alternativo", por ejemplo, en la sala, en el servicio ambulatorio, en cirugía, en el hogar, en el campo y en el lugar de trabajo.

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

Los procedimientos que implican la identificación y/o cuantificación de uno o más biomarcadores de la descripción pueden efectuarse en instrumentos de laboratorio o pueden incorporarse a plataformas de diagnóstico o monitorización desechables que pueden usarse en un entorno no de laboratorio, por ejemplo, en la consulta del médico o en el lecho del sujeto. Los biosensores adecuados para efectuar los procedimientos de la invención incluyen tarjetas "de crédito" con lectores ópticos o acústicos. Los biosensores pueden configurarse para permitir transmitir electrónicamente los datos recogidos al médico para interpretación y, por consiguiente, pueden constituir la base de medicina a distancia.

En la presente invención, se describen kits de diagnóstico para el diagnóstico y la monitorización de la presencia de un estado de enfermedad. En una realización, los kits contienen adicionalmente un biosensor capaz de identificar y/o cuantificar un biomarcador. De manera adecuada, un kit según la descripción puede contener uno o más componentes seleccionados de entre el grupo de: un ligante de ligandos o ligandos específicos del biomarcador o un mimético estructural/conformacional del biomarcador, uno o más controles, uno o más reactivos y uno o más consumibles; opcionalmente junto con instrucciones para el uso del kit según cualquiera de los procedimientos definidos en la presente invención.

La identificación de biomarcadores para un estado patológico permite la integración de los procedimientos de diagnóstico y los regímenes terapéuticos. La detección de un biomarcador de la invención puede usarse para cribar sujetos antes de su participación en ensayos clínicos. Los biomarcadores proporcionan los medios para manifestar la respuesta terapéutica, falta de respuesta, perfil de efectos secundarios desfavorable, grado de cumplimiento de la medicación y consecución de niveles séricos de medicamento adecuados. Los biomarcadores pueden usarse para proporcionar avisos de respuesta adversa a medicamentos. Los biomarcadores son útiles en el desarrollo de terapias personalizadas, como evaluación de respuesta pueden usarse para ajuste fino de la dosificación, minimizar el número de medicaciones prescritas, reducir el retraso en el logro de una terapia efectiva y evitar reacciones farmacológicas adversas. Por consiguiente, al monitorizar un biomarcador de la invención, la asistencia al sujeto puede adaptarse precisamente para satisfacer las necesidades determinadas por el trastorno y el perfil farmacogenómico del sujeto, por consiguiente, el biomarcador puede usarse para titular la dosis óptima, predecir una respuesta terapéutica positiva e identificar aquellos sujetos con alto riesgo de efectos secundarios graves.

Las pruebas basadas en biomarcadores proporcionan una evaluación de primera línea de sujetos "nuevos" y proporcionan medidas objetivas para un diagnóstico exacto y rápido, que no puede alcanzarse usando las medidas actuales.

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

Los procedimientos de monitorización de biomarcador, biosensores y kits son también vitales como herramientas de monitorización del sujeto, para posibilitar al médico determinar si la recaída es debida al empeoramiento del trastorno. Si se valora que el tratamiento farmacológico es inadecuado, entonces puede restablecerse o aumentarse la terapia; puede

darse un cambio de terapia si es adecuado. 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 un cáncer, un adenoma, una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria en un animal o un sujeto humano, que comprende las siguientes etapas:

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

(iii) administrar un agente terapéutico a un sujeto diagnosticado en la etapa (ii) como paciente de cáncer, adenoma, enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria.

Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un procedimiento para tratar un cáncer, un adenoma, una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria en un individuo que lo necesite, que comprende la etapa de administrar un agente terapéutico a un paciente identificado con niveles diferentes de característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra fecal, en comparación con los niveles de dicha característica epigenética de un nucleosoma libre de células de un sujeto de control.

En una realización, el procedimiento de tratamiento comprende el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo.

Ahora, la invención se ilustrará con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Se recolectan muestras fecales de 150 sujetos que posteriormente se examinan mediante colonoscopia, después de una prueba FIT positiva en un programa de detección de CCR de rutina. Las muestras se recogen usando una sonda de muestra para recoger una pequeña cantidad de material fecal. A continuación, se inserta la sonda en su tubo, donde se extrae el exceso de muestra de la sonda y se agregan 10 mg de muestra fecal a 2 ml de tampón. Cada tubo también contiene un sistema de filtro para eliminar sólidos de la muestra líquida antes del análisis. Las muestras fecales diluidas se analizan usando los procedimientos de la presente invención para múltiples ensayos de nucleosomas diferentes, incluyendo la concentración de nucleosomas *per se,* así como también una serie de características epigenéticas asociadas a nucleosomas que incluyen una o más modificaciones de ADN que incluyen 5-metilcitosina, una o más variantes de histona que incluyen gamma-H2AX y H2AZ, una o más modificaciones de histona que incluyen H3K9Me3, H3K9Ac, H3K27Me3, H4K16Ac, H4K20Me3, ubiquityl-H2A y H4PanAc (pan-acetilado H4). Para cada ensayo, se agregan 50 µL de material fecal diluido por duplicado a un pocillo de microtitulación previamente recubierto con un anticuerpo antinucleosoma por duplicado y se procede a la incubación durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavan tres veces con un tampón de lavado (200 µl/pocillo, tampón TRIS/HCl 0,05 M, pH 7,5 que contiene Tween 20 al 1%) y 50 µl de una solución de anticuerpo biotinilado (diluido en TRIS 0,05 M, pH 7,5 que contiene 0,9 % NaCl, 0.05% de desoxicolato de sodio y 1% de sustituto Nonidet P40) dirigido a unirse a la estructura epigenética de interés (es decir, dirigido a unirse a nucleosomas *per se,* 5-metilcitosina, gamma-H2AX, H2AZ, H3K9Me3, H3K9Ac, H3K27Me3, H4K16Ac, H4K20Me3, ubiquityl-H2A o H4PanAc respectivamente). Los pocillos se incubaron durante 90 minutos más a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente como antes y se agregó una solución de estreptavidina marcada con enzima peroxidasa de rábano, a continuación, se procedió a una incubación durante 30 minutos más. Los pocillos se lavaron de nuevo y una solución de sustrato coloreado (100 µl/pocillo, sal de diamonio de ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con una agitación suave. Se midió la densidad óptica (DO) de los pocillos a una longitud de onda de 405 nm usando un lector de placas de microvaloración estándar. Se observó una señal de OD de fondo baja en el control negativo que no contenía nucleosomas y se observaron señales de OD más altas para las muestras fecales del sujeto. Esto demuestra la presencia de nucleosomas en las muestras fecales.

EJEMPLO 2

Los resultados de OD de cada uno de los ensayos de nucleosomas epigenéticos fecales individuales descritos en el EJEMPLO 1 se trazan como un diagrama de puntos y como una curva de la Característica del operador del receptor (ROC). Las curvas ROC, y las áreas bajo las curvas ROC, muestran que algunas de las características epigenéticas probadas están más alteradas en las células del CCR o de los pólipos, en comparación con las células sanas respecto de otras. Además, cuando estos ensayos se combinan para su uso como panel; se obtienen pruebas altamente precisas que muestran una discriminación altamente sensible y específica del cáncer respecto de pacientes sanos, lo que se destina a varias combinaciones de análisis diferentes. La combinación de resultados de ensayos individuales en una

prueba de panel se realiza usando cualquier procedimiento de análisis de parámetros múltiples, de los cuales, muchos son conocidos en la técnica. El análisis de regresión (por ejemplo, el análisis discriminante lineal de Fisher) es un procedimiento común. Estas pruebas de panel fecal son más seguras y de menor costo que los procedimientos de colonoscopia para la detección del cáncer y la precisión clínica alcanzada excede la de las pruebas FOBT y FIT.

EJEMPLO 3

Se obtiene una muestra fecal de un paciente con CCR antes de un posible régimen de tratamiento con un medicamento (por ejemplo, con un HDACi, HMTi, DNMTi u otro medicamento epigenético) y el estado epigenético del tumor se evalúa usando 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 fecales se usa para determinar qué régimen de tratamiento es probable que sea una terapia efectiva para el paciente.

EJEMPLO 4

Se obtiene una muestra fecal de un paciente con CCR antes de un régimen de tratamiento con un medicamento (por ejemplo, un HDACi, HMTi, DNMTi u otro medicamento epigenético) y el estado epigenético del tumor se evalúa usando 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). Se obtienen muestras fecales adicionales del paciente después del tratamiento y se vuelve a evaluar el estado epigenético de los nucleosomas fecales para verificar o controlar la eficacia del tratamiento en el paciente.

EJEMPLO 5

Se obtiene una muestra fecal de un paciente con CCR y se evalúa el estado epigenético del tumor usando 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 fecales se usa para evaluar el pronóstico del paciente.

EJEMPLO 6

Se recolectó una muestra fecal de cada uno de los 3 sujetos para evaluar la presencia de nucleosomas en la muestra usando un sistema de recolección de muestras fecales disponible comercialmente, como se describió en el EJEMPLO 1. Una sonda de muestra para recoger una pequeña cantidad de material fecal. A continuación, se insertó la sonda en su tubo, donde se extrajo el exceso de muestra de la sonda y se agregaron 10 mg de muestra fecal a 2 ml de tampón. El tubo también contenía un sistema de filtro para eliminar los sólidos de la muestra líquida antes del análisis.

Las muestras fecales diluidas se analizaron para determinar el contenido de nucleosomas libres de células por duplicado mediante un procedimiento ELISA de la invención como sigue. Se preparó una placa de microtitulación recubierta con anticuerpo antihistona mediante el agregado de 100 µL de una solución de anticuerpo antinucleosómico (15 ug/ml en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4) a cada pocillo de microtitulación y los pocillos se incubaron durante 9 horas a 4°C. A continuación, se eliminó la solución de anticuerpo y se bloquearon los pocillos mediante el agregado de 200 µl de una solución de tampón de fosfato de 0,1 M y pH 7,4 que contenía sacarosa al 5% y Tween 20 al 0,1% y los pocillos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de bloqueo se eliminó y los pocillos se lavaron 3 veces con 200 µL de tampón de lavado (como se describió en el EJEMPLO 1). A cada pocillo se le agregaron 100 µL de solución de muestra fecal diluida o 10 µL de solución de muestra fecal diluida y 50 µL de tampón de ensayo. Los pocillos se incubaron durante 2,5 horas a temperatura ambiente con una agitación suave. A continuación, se eliminó la muestra diluida y los pocillos se lavaron 3 veces más con 200 µL de tampón de lavado. A continuación, se agregó el anticuerpo antihistona biotinilado diluido en 50 µL de tampón de ensayo y se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente con una agitación suave. A continuación, se eliminó la solución de anticuerpos biotinilados y los pocillos se lavaron 3 veces más con 200 µL de tampón de lavado. Una solución de conjugado de peroxidasa de rábano silvestre y estreptavidina en 50 µL de tampón de ensayo se agregó, a continuación, y se procedió a la incubación durante 0,5 horas a temperatura ambiente con una agitación suave. A continuación, se eliminó la solución del conjugado de peroxidasa de rábano silvestre y estreptavidina y los pocillos se lavaron 3 veces más con 200 µL de tampón de lavado. Se agregó una solución de sustrato coloreado (100 µl/pocillo, sal de diamonio del ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con una agitación suave. Se midió la densidad óptica (DO) de los pocillos a una longitud de onda de 405 nm usando un lector de placas de microvaloración estándar.

Los resultados se muestran en la Figura 1 con barras de error que indican la reproducibilidad de los resultados experimentales duplicados. Se observó una señal de OD baja para la muestra 1, tanto para 10 µL/pocillo como para 100 µL/pocillo, lo que indica que el nivel de nucleosomas libres de células en esta muestra era bajo o indetectable. Para la

muestra 2, se observó una señal OD superior para 100 µl/pocillo, lo que indica que 100 µl de esta muestra contenían un nivel detectable de nucleosomas libres de células. Sin embargo, los nucleosomas presentes en 10 µL no fueron detectables. Para la muestra 3, se observó una señal de OD más alta tanto para 10 µL/pocillo como para 100 µL/pocillo, lo que indica un mayor nivel de nucleosomas libres de células en esta muestra que en la muestra 1 o la muestra 2.

El mismo anticuerpo antihistona se usó en este experimento como el anticuerpo recubierto y el anticuerpo biotinilado. Como el mismo epítopo en una sola molécula de histona no puede unirse dos veces, una señal positiva en el ensayo indica la presencia de nucleosomas intactos en la muestra fecal. Hasta donde sabemos, esta es la primera demostración de la presencia de nucleosomas libres de células en una muestra fecal y también la primera demostración de un procedimiento para la medición o detección de nucleosomas libres de células en una muestra fecal.

BIBLIOGRAFÍA

Allen y col., A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. Nucleic Acids Research: 32(3) e38DOI: 10.1093/nar/gnh032

Esteller, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps Nature Reviews Genetics: 8, 286-298, 2007

Feinberg y Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature: 301, 89-92, 1983

Grutzmann y col., Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. PLoS ONE 3(11): e3759. doi:10.1371/journal.pone.0003759, 2008

Hervouet y col., Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 Interactions Promotes Tumorigenesis from Human and Mice Glial Cells PLoS ONE 5(6): e11333. doi:10.1371/journal.pone.0011333, 2010

Herranz y Esteller, DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. Methods Mol Biol.361:25-62, 2007

Holdenrieder y col., Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. Int. J. Cancer (Pred. Oncol.): 95, 114-120, 2001 Jiang y col., Blood. 102, 2243-50, 2003

The Medical Letter on Drugs and Therapeutics. 56, 100-101, 2014

Rodríguez-Paredes y Esteller, Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. Nature Medicine: 17(3), 330-339, 2011

Salgame y col., An ELISA for detection of apoptosis. Nucleic Acids Research, 25(3), 680-681, 1997

van Nieuwenhuijze y col., Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis; 62: 10-14, 2003

Yoshida and Shimura, Isolation of nonhistone chromosomal protein from calf thymus. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure; 263(3), 690-695, 1972

REIVINDICACIONES

1. El uso de un nucleosoma libre de células como biomarcador en una muestra fecal para el diagnóstico o detección de cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo.

2. El uso como se define en la reivindicación 1, donde el biomarcador es una característica epigenética de un nucleosoma libre de células.

3. El uso como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el nucleosoma libre de células es un mononucleosoma o un oligonucleosoma.

4. Un procedimiento para diagnosticar o detectar un cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo en un animal o un ser humano, que comprende las etapas de:

(i) detectar o medir una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra fecal 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. El uso o procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde la característica epigenética se selecciona de entre: 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 entre gamma-H2AX y H2AZ o una o más modificaciones de histona seleccionadas de entre: H3K9Me3, H3K9Ac, H3K27Me3, H4K16Ac, H4K20Me3, ubiquityl-H2A y H4PanAc (H4 panacetilado).

6. Un procedimiento para monitorizar la eficacia de una terapia en un animal o un sujeto humano que tiene, se sospecha que tiene o está predispuesto a tener un cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo, que comprende las etapas de:

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

(ii) usar el nivel 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 colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo que comprende las etapas de:

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

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

8. Un procedimiento para determinar el origen celular de nucleosomas libres de células fecales 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 fecal 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 a partir de células gastroenterológicas sanas, células de cáncer colorrectal, células de pólipos, células con otras lesiones o cualquier mezcla de las mismas.

9. El uso o procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha detección o medición comprende un procedimiento de inmunoensayo, un procedimiento inmunoquímico, una espectroscopía de masas, un procedimiento cromatográfico, una inmunoprecipitación de cromatina o un procedimiento de biosensor.

10. El uso o procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde 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 nucleosoma.

11. 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 fecales para el diagnóstico o detección de un cáncer colorrectal, un adenoma colorrectal o un pólipo en una muestra fecal.

12. Un procedimiento para detectar o cuantificar una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra fecal obtenida de un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto la muestra fecal 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 fecal 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 fecal; 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 fecal.

13. Un procedimiento para detectar o cuantificar una característica epigenética de un nucleosoma libre de células en una muestra fecal obtenida de un animal o un sujeto humano que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto la muestra fecal 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 fecal o los nucleosomas libres de células con un segundo agente de unión que se une a 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 de los mismos en la muestra fecal, 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 fecal.

14. Un procedimiento según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, donde la característica epigenética se selecciona de entre: una modificación de histona postraduccional, 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 entre gamma-H2AX y H2AZ o una o más modificaciones de histona seleccionadas de entre: H3K9Me3, H3K9Ac, H3K27Me3, H4K16Ac, H4K20Me3, ubiquityl-H2A y H4PanAc (H4 panacetilado).

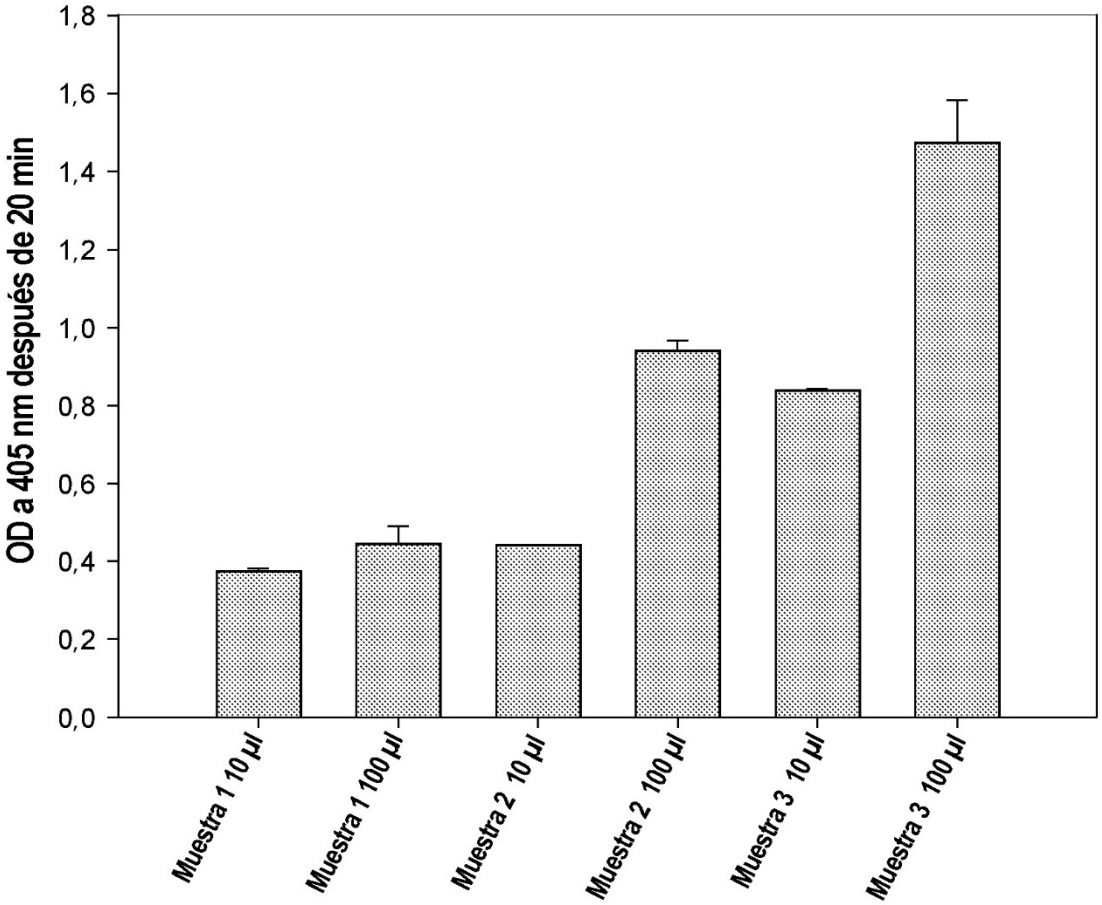
OD a 405 nm después de 20 min
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Muestra 1 10 µl
Muestra 1 100 µl
Muestra 2 10 µl
Muestra 2 100 µl
Muestra 3 10 µl
Muestra 3 100 µl

FIGURA 1