

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 628**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2015.01)

G01N 33/68 (2015.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2015 PCT/AU2015/050723**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016 WO16077881**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2015 E 15861885 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.03.2021 EP 3221701**

54 Título: **Biomarcadores de glucoproteínas para adenocarcinoma de esófago y esófago de Barrett y usos de los mismos**

30 Prioridad:

17.11.2014 AU 2014904616

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.12.2021

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND (100.0%)
St.Lucia, Queensland 4072, AU**

72 Inventor/es:

**HILL, MICHELLE MEI CHIH;
SHAH, ALOK y
CAO, KIM-AHN LÊ**

74 Agente/Representante:

DÍAZ DE BUSTAMANTE TERMINEL, Isidro

ES 2 883 628 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores de glucoproteínas para adenocarcinoma de esófago y esófago de Barrett y usos de los mismos

CAMPO

5 Esta divulgación se refiere, en general, a biomarcadores para esófago de Barrett y adenocarcinoma de esófago y los usos de los mismos, tales como en métodos para detectar la presencia, y supervisar la progresión, de esófago de Barrett y adenocarcinoma de esófago. La divulgación también se refiere a métodos para el tratamiento y métodos de supervisión del tratamiento de esófago de Barrett y adenocarcinoma de esófago, así como a kits y composiciones para su uso en dichos métodos.

ANTECEDENTES

10 El adenocarcinoma de esófago (EAC) es ahora el principal cáncer de esófago en los países industrializados, con un aumento alarmante de la incidencia del 3 % anual durante los últimos 30 años. Aunque el EAC es raro en sujetos menores de 40 años, su incidencia aumenta significativamente con cada década a partir de entonces. Esto es probablemente el resultado de un estilo de vida y hábitos alimentarios cambiantes, con factores de riesgo de EAC conocidos que incluyen, por ejemplo, acumulación de grasa visceral abdominal, ingesta alta de grasas y colesterol
15 en la dieta con una ingesta baja de frutas y verduras, reflujo ácido (enfermedad por reflujo gastroesofágico) y tabaquismo.

El esófago de Barrett (BE; también conocido como metaplasia de Barrett), un cambio metaplásico del revestimiento del esófago caracterizado por el reemplazo del epitelio escamoso estratificado normal por epitelio columnar metaplásico, es un factor de riesgo importante de EAC y se cree que la mayoría de EAC se desarrollan a partir de
20 BE. Los sujetos con BE tienen 30-125 veces más riesgo de desarrollar EAC que los sujetos sin BE, y se estima que entre el 0,5 % y el 1 % de los sujetos con BE desarrollan EAC cada año (Tischoff et al. Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2008; 2: 653-63). El BE se desarrolla con relativa lentitud, generalmente durante de 5 a 10 años. Se cree que este desarrollo es una respuesta al trastorno por reflujo gastroesofágico crónico, que es una afección común en las poblaciones occidentales. La progresión maligna a EAC sigue una serie de estadios generalmente aceptados,
25 desde la metaplasia, a la displasia de bajo grado (LGD), a la displasia de alto grado (HGD) y después a adenocarcinoma, con la implicación de modificaciones genéticas y epigenéticas.

A pesar del tratamiento agresivo, la tasa de supervivencia a 5 años para EAC es baja, de solo el 9 al 24 %. Es probable que esto se deba al diagnóstico en fase tardía: aproximadamente dos tercios de los pacientes diagnosticados tienen enfermedad en fase avanzada, momento en el que las terapias actuales son en gran medida
30 ineficaces. Los protocolos de cribado actuales para EAC generalmente implican la detección endoscópica de pacientes con trastorno por reflujo gastroesofágico crónico de alto riesgo para determinar el grado de displasia en muestras de biopsia endoscópica. Aquellos con HGD son candidatos para la ablación endoscópica de la mucosa o la resección esofágica para ralentizar o prevenir la progresión de la enfermedad. Sin embargo, estos programas de cribado endoscópico tienen limitaciones asociadas con el error de muestreo, la variabilidad en la evaluación de las
35 biopsias entre los médicos y la heterogeneidad de los tejidos. Se producen falsos positivos y, a la inversa, se ha encontrado cáncer invasivo hasta en un 40 % de los pacientes a pesar de resultados endoscópicos negativos. Además, incluso con estos programas de cribado endoscópico, más del 80 % de los EAC se diagnostican sin ningún diagnóstico previo de BE o trastorno por reflujo gastroesofágico, más del 80 % de los pacientes con BE no están diagnosticados (y, por lo tanto, no se recomiendan para programas de cribado posteriores y en curso) y muchos
40 pacientes que se someten a cribado de rutina nunca progresan a EAC. Esto indica que las metodologías de cribado actuales no son particularmente efectivas para identificar a los pacientes de alto riesgo y distinguir entre los que progresan a EAC y los que no. Por tanto, existe una necesidad clínica insatisfecha de métodos mejorados para el diagnóstico de EAC.

45 Cheng et al. (2005. Gene expression in rats with Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma induced by gastroduodenoesophageal reflux. World Journal of Gastroenterology. 11(33). 5117-5122.) desvela que el epitelio esofágico expuesto en exceso a ingredientes nocivos del reflujo duodenal y gástrico puede convertirse en esófago de Barrett (BE) e incluso adenocarcinoma de esófago (EA) gradualmente y que el nivel de expresión génica es diferente entre EA y BE, y puede estar relacionado con la aparición y progresión de EA.

50 Shah et al. (2014. Discovery and validation of novel serum glycoprotein biomarkers for Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. Cancer Research. 74(19 Suplemento). Resumen 2492.) desvela el descubrimiento y la validación de nuevos biomarcadores de glucoproteínas séricas para esófago de Barrett y adenocarcinoma de esófago.

55 Shah et al. (2015. Serum Glycoprotein Biomarker Discovery and Qualification Pipeline Reveals Novel Diagnostic Biomarker Candidates for Esophageal Adenocarcinoma. Molecular & Cellular Proteomics. 14(11). 3023-3039.) desvela que un proceso en fase de desarrollo de descubrimiento y calificación de biomarcadores de glucoproteínas séricas revela nuevos biomarcadores de diagnóstico candidatos para adenocarcinoma de esófago.

Vieira. (2014. Síntese e Optimização de Nanopartículas Funcionalizadas para a Recuperação Selectiva de

Glicoproteínas em Fluidos Humanos. Departamento De Ciências Da Vida, Universidade De Coimbra.) desvela la síntesis y optimización de nanopartículas funcionalizadas para la recuperación selectiva de glucoproteínas en fluidos humanos.

5 Choi et al. (2011. High-throughput lectin magnetic bead array-coupled tandem mass spectrometry for glycoprotein biomarker discovery. Electrophoresis. 32(24). 3564-3575.) desvela el uso de espectrometría de masas en tándem acoplada a una matriz de perlas magnéticas con lectina de alto rendimiento para el descubrimiento de biomarcadores de glucoproteínas.

Maier et al. (2009. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. FEBS Letters. 583(24). 3966-3973.) analiza la correlación de ARNm y proteína en muestras biológicas complejas.

10 RESUMEN

La invención se define con referencia a las reivindicaciones adjuntas.

15 En una realización, la invención proporciona un método para distinguir entre un estado sano (HC), adenocarcinoma de esófago (EAC) y esófago de Barrett (BE) en un sujeto, comprendiendo el método determinar en una muestra del sujeto el nivel de una glucoespecie de al menos una glucoproteína, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre al menos dos de HC, EAC y BE, y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no HC, EAC o BE en función de si los niveles respectivos de las glucoespecies individuales están por encima o por debajo de un umbral predeterminado correspondiente que se correlaciona con la presencia o ausencia de HC, EAC o BE, donde la al menos una glucoproteína comprende el C9 del complemento.

20 La presente divulgación se basa en parte en la identificación de glucoproteínas séricas que están glucosiladas diferencialmente en sujetos con EAC, BE y en sujetos sanos (es decir, sujetos que tienen un estado sano (HC)). Por tanto, los sujetos con EAC tienen una "firma" o "perfil" de glucosilación en suero diferente de los pacientes con BE y los pacientes sanos, y los pacientes con BE tienen una firma o perfil de glucosilación en suero diferente de los pacientes sanos. Por consiguiente, como se describe en el presente documento, la detección del nivel de uno o más de estos diferentes tipos de glucosilación en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, suero o plasma, de un sujeto puede usarse para determinar la probabilidad de presencia o ausencia de cualquiera de EAC o BE en el sujeto. La supervisión de los niveles de uno o más de los tipos de glucosilación identificados en el presente documento también se puede utilizar para supervisar el progreso de EAC o BE, tal como antes, durante y/o después del tratamiento. Por consiguiente, en algunos aspectos, la supervisión de los niveles de uno o más tipos de glucosilación identificados en el presente documento también se puede usar para supervisar la eficacia del tratamiento de EAC o BE.

25 Por tanto, la presente divulgación representa un avance significativo respecto a las tecnologías actuales para la gestión de EAC y BE. En determinados aspectos ventajosos, se basa en medir el nivel de al menos una glucoespecie. La presente divulgación también proporciona biomarcadores robustos para determinar la probabilidad de la presencia o ausencia de EAC o BE.

35 En un aspecto, la divulgación proporciona un método para determinar la probabilidad de la presencia o ausencia de una afección seleccionada de un HC, EAC y BE en un sujeto, comprendiendo el método determinar en una muestra del sujeto el nivel de una glucoespecie de una glucoproteína, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre al menos dos de HC, EAC y BE, y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no la afección en función de si el nivel de la glucoespecie está por encima o por debajo de un umbral predeterminado que se correlaciona con la presencia de la afección.

40 En algunos aspectos de la divulgación, los métodos determinan la probabilidad de que EAC esté presente o ausente en un sujeto, donde el método comprende determinar en una muestra del sujeto el nivel de una glucoespecie de una glucoproteína, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre EAC y una o más de otras afecciones (por ejemplo, un HC y/o BE), y determinar la probabilidad de que EAC esté presente o ausente en el sujeto en función de si el nivel de la glucoespecie está por encima o por debajo de un umbral predeterminado que se correlaciona con la presencia o ausencia de EAC.

45 En algunos aspectos de la divulgación, los métodos determinan la probabilidad de que BE esté presente o ausente en un sujeto, donde los métodos comprenden determinar en una muestra del sujeto el nivel de una glucoespecie de una glucoproteína, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre BE y una o más de otras afecciones (por ejemplo, un HC y/o EAC), y determinar la probabilidad de que BE esté presente o ausente en el sujeto en función de si el nivel de la glucoespecie está por encima o por debajo de un umbral predeterminado que se correlaciona con la presencia o ausencia de BE.

50 En algunos aspectos de la divulgación, los métodos determinan la probabilidad de que el sujeto tenga un HC en un sujeto, es decir, la ausencia de EAC y/o BE. En tales aspectos, los métodos comprenden determinar en una muestra del sujeto el nivel de una glucoespecie de una glucoproteína, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre HC y una o más de otras afecciones (por ejemplo, BE y/o EAC), y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no un HC en función de si el nivel de la glucoespecie está por encima o por debajo de un umbral predeterminado

que se correlaciona con la presencia o ausencia de un HC.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para determinar la probabilidad de la presencia o ausencia de una afección seleccionada de un HC, EAC y BE en un sujeto, comprendiendo el método determinar en una muestra del sujeto los niveles respectivos de una pluralidad de glucoespecies de una o más glucoproteínas, donde las glucoespecies individuales se expresan diferencialmente entre al menos dos de HC, EAC y BE, y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no la afección en función de si los niveles respectivos de las glucoespecies individuales están por encima o por debajo un umbral predeterminado correspondiente que se correlaciona con la presencia o ausencia de la afección.

En algunos aspectos, los métodos determinan la probabilidad de que EAC esté presente o ausente en un sujeto, donde los métodos comprenden determinar en una muestra del sujeto los niveles respectivos de una pluralidad de glucoespecies de una o más glucoproteínas, donde las glucoespecies individuales se expresan diferencialmente entre EAC y una o más otras afecciones (por ejemplo, un HC y/o BE), y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no EAC en función de si los niveles respectivos de las glucoespecies individuales están por encima o por debajo de un umbral predeterminado correspondiente que se correlaciona con la presencia o ausencia de EAC.

En algunos aspectos de la divulgación, los métodos determinan la probabilidad de que BE esté presente o ausente en un sujeto, en los que los métodos comprenden determinar en una muestra del sujeto los niveles respectivos de una pluralidad de glucoespecies de una o más glucoproteínas, donde las glucoespecies individuales se expresan diferencialmente entre BE y una o más otras afecciones (por ejemplo, un HC y/o EAC), y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no BE en función de si los niveles respectivos de las glucoespecies individuales están por encima o por debajo de un umbral predeterminado correspondiente que se correlaciona con la presencia o ausencia de BE.

En otros aspectos de la divulgación, los métodos para determinar la probabilidad de la presencia o ausencia de un HC en un sujeto comprenden determinar en una muestra del sujeto los niveles respectivos de una pluralidad de glucoespecies de una o más glucoproteínas, donde las glucoespecies individuales se expresan diferencialmente entre HC y una o más de otras afecciones (por ejemplo, BE y/o EAC), y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no HC en función de si los niveles respectivos de las glucoespecies individuales están por encima o por debajo de un umbral predeterminado correspondiente que se correlaciona con la presencia o ausencia de HC.

En algunos aspectos de la divulgación, una glucoproteína individual comprende una primera glucoespecie y una segunda glucoespecie donde la primera glucoespecie se expresa diferencialmente entre una pluralidad de afecciones y la segunda glucoespecie no se expresa tan diferencialmente.

En algunos aspectos preferidos de la divulgación, la glucoproteína se selecciona del grupo que comprende o consiste en: afamina, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glucoespecie ácida 1, alfa-1B-glucoespecie, alfa-2-antiplasmina, alfa-2-HS-glucoespecie, alfa-2-macroglobulina, alfa-2-antiplasmina, antitrombina-III, apolipoproteína B-100, beta-2-glucoespecie 1, cadena alfa de la proteína de unión a C4b, ceruloplasmina, factor de coagulación XII, subunidad B del subcomponente C1q del complemento, C5 del complemento, componente C7 del complemento, componente C9 del complemento, factor B del complemento, ficolina-3, gelsolina, haptoglobina, hemopexina, inhibidor de la proteasa C1 plasmática, paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica y serotransferrina.

En algunos aspectos de la divulgación, el nivel de una glucoespecie individual se determina poniendo en contacto la muestra con una molécula de unión a glicano específica para la glucoespecie, en condiciones que permiten la unión de la molécula de unión a glicano a la glucoespecie. La molécula de unión a glicano se selecciona adecuadamente del grupo que consiste en una lectina, un anticuerpo glucoespecífico, un aptámero glucoespecífico, un péptido glucoespecífico y una molécula pequeña glucoespecífica.

Las lectinas ilustrativas adecuadas para este fin incluyen lectina de *Aleuria aurantia* (AAL); fitohemaglutinina eritroaglutinante (EPHA); jacalina (JAC); lectina de *Narcissus pseudonarcissus* (NPL); aglutinina de *Pisum sativum* (PSA); aglutinina de germen de trigo (WGA); lectina de *Bauhinia purpurea* (BPL); aglutinina de *Erythrina cristagalli* (ECA); aglutinina de soja (SBA); aglutinina de *Helix pomatia* (HPA); aglutinina de *Wisteria floribunda* (WFA); lectina de *Datura stramonium* (DSA); aglutinina de *Helix aspersa* (HAA); lectina de *Solanum tuberosum* (STL); concanavalina A (ConA); lectina de *Galanthus nivalis* (GNL); aglutinina I de *Ulex europeus* (UEA); Aglutinina II de *Maackia amurensis* (MAA), aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA); y fitohemaglutinina leucoaglutinante (LPHA).

En algunos aspectos de la divulgación, las glucoespecies que se expresan diferencialmente entre sujetos con EAC y sujetos sanos se seleccionan del grupo que comprende o consiste en: componente del complemento, componente C9 del complemento de unión a AAL, componente C9 del complemento de unión a EPHA, componente C9 del complemento de unión a JAC, componente C9 del complemento de unión a NPL, componente C9 del complemento de unión a PSA, componente C9 del complemento de unión a WGA, gelsolina de unión a AAL, gelsolina de unión a EPHA, gelsolina de unión a JAC, gelsolina de unión a PSA, haptoglobina de unión a EPHA, haptoglobina de unión a NPL, haptoglobina de unión a PSA, haptoglobina de unión a WGA, factor B del complemento de unión a JAC, alfa-1-antiquimotripsina de unión a JAC, alfa-1-antiquimotripsina de unión a NPL, alfa-1-antiquimotripsina de unión a WGA, C5 del complemento de unión a JAC, hemopexina de unión a JAC, cadena alfa de la proteína de unión a C4b de

unión a JAC, cadena alfa de la proteína de unión a C4b de unión a NPL, inhibidor de la proteasa C1 plasmática de unión a JAC, hemopexina de unión a JAC, alfa-1 glucoproteína ácida de unión a AAL, alfa-1 glucoproteína 1 ácida de unión a EPHA, ceruloplasmina de unión a JAC, ceruloplasmina de unión a NPL, antitrombina-III de unión a NPL, ficolina 3 de unión a STL, subunidad B del subcomponente C1q del complemento de unión a WGA.

- 5 Preferentemente, las glucoespecies (es decir, definidas por la molécula de unión a glicano (por ejemplo, lectina) y la glucoproteína a la que se une) que se expresan diferencialmente entre EAC y HC se seleccionan de la tabla 1:

TABLA 1

| Lectina | Glucoproteína | |
|---------|--|---|
| | Sobreexpresada | Subexpresada |
| AAL | componente C9 del complemento | gelsolina |
| PSA | haptoglobina, componente C9 del complemento | gelsolina |
| EPHA | haptoglobina, componente C9 del complemento | gelsolina, alfa-2-macroglobulina, alfa-2-HS-glucoproteína |
| JAC | factor B del complemento, alfa-1-antiquimotripsina, C5 del complemento, componente C9 del complemento, hemopexina, cadena alfa de la proteína de unión a C4b, inhibidor de la proteasa C1 plasmática, cofactor 2 de heparina | gelsolina |
| NPL | haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, componente C9 del complemento, cadena alfa de la proteína de unión a C4b | |
| WGA | haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, componente C9 del complemento | |

- 10 En aspectos específicos de la divulgación, las glucoespecies que se expresan diferencialmente entre EAC y HC se seleccionan de la tabla 2:

TABLA 2

| Lectina | Glucoproteína | |
|---------|---|------------------------------------|
| | Sobreexpresada | Subexpresada |
| AAL | componente C9 del complemento | gelsolina |
| EPHA | haptoglobina, componente C9 del complemento | gelsolina, alfa-2-HS-glucoproteína |
| JAC | alfa-1-antiquimotripsina, componente C9 del complemento, inhibidor de la proteasa C1 plasmática | gelsolina |
| NPL | haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, componente C9 del complemento | |

- 15 En otros aspectos de la divulgación, las glucoespecies que se expresan diferencialmente entre EAC y HC se seleccionan del grupo que comprende o consiste en los enumerados en la tabla 3:

TABLA 3

| Lectina | Glucoproteína | |
|---------|---|--|
| | Sobreexpresada | Subexpresada |
| AAL | alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, componente C9 del complemento, alfa-1B-glucoproteína, subcomponente C1s del complemento, componente C7 del complemento, alfa-1-glucoproteína ácida 2 | cadena gamma de fibrinógeno, proteína 4 de unión a retinol, gelsolina, proteína S dependiente de vitamina K, subunidad ácido-lábil del complejo proteico de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, afamina |
| EPHA | haptoglobina, factor B del complemento, alfa-1-antiquimotripsina, componente C9 del complemento, subcomponente C1s del complemento, componente C7 del complemento | cadena gamma de fibrinógeno, alfa-2-HS-glucoproteína, gelsolina, cadherina-5, subunidad beta de hemoglobina, N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa |
| JAC | haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, cadena gamma de fibrinógeno, componente C9 del complemento, alfa-2-HS-glucoproteína, inhibidor de la proteasa C1 plasmática, subcomponente C1s del complemento | apolipoproteína A-I, cadena beta de fibrinógeno, proteína 4 de unión a retinol, calicreína plasmática, gelsolina, proteína S dependiente de vitamina K, calistatina, cadherina-5, subunidad ácido-lábil del complejo proteico de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, centriolina, N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, subunidad beta de hemoglobina, serotransferrina, cadena gamma de fibrinógeno |
| NPL | haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, componente C9 del complemento, serotransferrina, hemopexina, alfa-1B-glucoproteína | apolipoproteína A-I, alfa-1B-glucoproteína, gelsolina, proteína S dependiente de vitamina K, paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica, cadherina-5, subunidad ácido-lábil del complejo proteico de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, alfa-1-glucoproteína ácida 2, subunidad beta de hemoglobina, paraoxonasa/lactonasa 3 sérica, N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa |

5 En otros aspectos más de la divulgación, las glucoespecies que se expresan diferencialmente entre sujetos con un HC y aquellos con BE se seleccionan del grupo que comprende o consiste en: alfa-2-macroglobulina de unión a EPHA, apolipoproteína B-100 de unión a JAC, apolipoproteína B-100 de unión a NPL, ficolina-3 de unión a AAL, ficolina-3 de unión a STL, subunidad C del subcomponente C1q del complemento de unión a AAL, proteína AMBP de unión a EPHA, alfa-1-glucoproteína ácida 1 de unión a EPHA, factor de coagulación XII de unión a JAC, antitrombina-III de unión a NPL, alfa-2-antiplasmina de unión a SNA y ceruloplasmina de unión a STL.

10 Preferentemente, las glucoespecies (es decir, definidas por la molécula de unión a glicano (por ejemplo, lectina) y la glucoproteína a la que se une) que se expresan diferencialmente entre BE y un HC se seleccionan de la tabla 4:

TABLA 4

| Lectina | Glucoproteína | |
|---------|-----------------------|-----------------------|
| | Sobreexpresada | Subexpresada |
| EPHA | | alfa-2-macroglobulina |
| JAC | apolipoproteína B-100 | |
| NPL | apolipoproteína B-100 | |

15 En aspectos específicos de la divulgación, las glucoespecies que se expresan diferencialmente entre EAC y HC se seleccionan de apolipoproteína B-100 de unión a JAC y apolipoproteína B-100 de unión a NPL.

En otros aspectos de la divulgación, las glucoespecies que se expresan diferencialmente entre sujetos con BE y aquellos con un HC se seleccionan de las enumeradas en la tabla 5:

TABLA 5

| Lectina | Glucoproteína | |
|---------|------------------------|--|
| | Sobreexpresada | Subexpresada |
| AAL | lumicán | |
| EPHA | lumicán | Protrombina, fibronectina |
| JAC | | apolipoproteína M, protrombina, angiotensinógeno, apolipoproteína A-I, cadena beta de fibrinógeno, calicreína plasmática, apolipoproteína B-100, glucoproteína rica en histidina, proteína S dependiente de vitamina K, cadena alfa del componente C8 del complemento, factor H del complemento, alfa-2-antiplasmina, calistatina, afamina, subunidad beta de hemoglobina. |
| NPL | beta-2-glucoproteína 1 | apolipoproteína B-100, alfa-2-antiplasmina, cadherina-5, subunidad beta de hemoglobina |

- 5 En otros aspectos más de la divulgación, las glucoespecies que se expresan diferencialmente entre sujetos con EAC y sujetos con BE se seleccionan del grupo que comprende o consiste en: componente C9 del complemento de unión a AAL, componente C9 del complemento de unión a EPHA, componente C9 del complemento de unión a WGA, componente C9 del complemento de unión a JAC, componente C9 del complemento de unión a NPL, componente C9 del complemento de unión a PSA, gelsolina de unión a AAL, gelsolina de unión a EPHA, gelsolina de unión a JAC, gelsolina de unión a PSA, gelsolina de unión a NPL, gelsolina de unión a WGA, haptoglobina de unión a AAL, haptoglobina de unión a EPHA, haptoglobina de unión a JAC, haptoglobina de unión a PSA, haptoglobina de unión a WGA, factor B del complemento de unión a JAC, alfa-1-antiquimotripsina de unión a EPHA, alfa-1-antiquimotripsina de unión a PSA, alfa-1-antiquimotripsina de unión a JAC, C5 del complemento de unión a AAL, C5 del complemento de unión a JAC, C5 del complemento de unión a PSA, componente C7 del complemento de unión a AAL, componente C7 del complemento de unión a PSA, componente C7 del complemento de unión a EPHA, componente C7 del complemento de unión a JAC, apolipoproteína B-100 de unión a AAL, apolipoproteína B-100 de unión a NPL, serotransferrina de unión a EPHA, alfa-1-antitripsina de unión a JAC, alfa-1B-glucoproteína de unión a JAC, alfa-1-glucoproteína ácida 1 de unión a AAL, ficolina-3 de unión a AAL, subunidad C del subcomponente C1q del complemento de unión a AAL, alfa-1-glucoproteína ácida 1 de unión a AAL, ceruloplasmina de unión a JAC, ceruloplasmina de unión a STL, factor de coagulación XII de unión a JAC y alfa-2-antiplasmina de unión a SNA.
- 10
- 15
- 20 Preferentemente, las glucoespecies (es decir, definidas por la molécula de unión a glicano (por ejemplo, lectina) y la glucoproteína a la que se une) que se expresan diferencialmente entre EAC y BE se seleccionan de la tabla 6:

TABLA 6

| Lectina | Glucoproteína | |
|---------|--|---|
| | Sobreexpresada | Subexpresada |
| AAL | haptoglobina, 5 del complemento, componente C9 del complemento, componente C7 del complemento | apolipoproteína B-100, gelsolina |
| PSA | haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, 5 del complemento, componente C9 del complemento, componente C7 del complemento | gelsolina |
| EPHA | haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, componente C9 del complemento, serotransferrina, componente C7 del complemento | gelsolina |
| JAC | haptoglobina, factor B del complemento, alfa-1-antitripsina, alfa-1-antiquimotripsina, C5 del complemento, componente C9 del complemento, alfa-1B-glucoproteína, componente C7 del complemento | gelsolina |
| NPL | componente C9 del complemento | apolipoproteína B-100, gelsolina, afamina |
| WGA | haptoglobina, componente C9 del complemento | gelsolina |

- 25 En aspectos específicos de la divulgación, las glucoespecies que se expresan diferencialmente entre EAC y BE se seleccionan de componente C9 del complemento de unión a AAL, componente C9 del complemento de unión a

EPHA, componente C9 del complemento de unión a JAC, componente C9 del complemento de unión a NPL, alfa-1-antiquimotripsina de unión a JAC, alfa-1B-glicoproteína de unión a JAC; gelsolina de unión a NPL; y gelsolina de unión a EPHA.

- 5 En otros aspectos de la divulgación, las glucoespecies que se expresan diferencialmente entre EAC y BE se seleccionan de las enumeradas en la tabla 7:

TABLA 7

| Lectina | Glucoproteína | |
|---------|--|---|
| | Sobreexpresada | Subexpresada |
| AAL | Protrombina, componente C9 del complemento | proteína 4 de unión a retinol |
| EPHA | Factor B del complemento, componente C9 del complemento, | beta-2-glicoproteína 1, gelsolina, lumicán, paraoxonasa/lactonasa 3 sérica |
| JAC | Ceruloplasmina, protrombina, alfa-1-antiquimotripsina, componente C9 del complemento, hemopexina, alfa-1B-glicoproteína, inhibidor de la proteasa C1 plasmática, factor I del complemento, factor H del complemento, subcomponente C1s del complemento, cadena beta de la proteína de unión a C4b, cadena pesada H4 del inhibidor de inter-alfa-tripsina | |
| NPL | Componente C9 del complemento | gelsolina |

10 En algunos aspectos preferidos, los métodos de la divulgación comprenden determinar el nivel de 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más de 20 glucoespecies de una o más glucoproteínas. Por ejemplo, las una o más glucoproteínas pueden seleccionarse opcionalmente del grupo que comprende: componente 9 del complemento, gelsolina, alfa-1B-glicoproteína, angiotensinógeno y alfa-2-macroglobulina. Más específicamente, las glucoespecies pueden comprender adecuadamente el componente 9 del complemento seleccionado del grupo que comprende o consiste en: componente 9 del complemento de unión a JAC, componente 9 del complemento de unión a NPL y componente 9 del complemento de unión a WGA. Como alternativa, o además, las glucoespecies también pueden comprender gelsolina seleccionada del grupo que comprende o consiste en gelsolina de unión a EPHA y gelsolina de unión a SNA. Como alternativa, o además de estas glucoespecies, las glucoespecies también pueden ser una o más de alfa-1B-glicoproteína de unión a EPHA, angiotensinógeno de unión a WGA y alfa-2-macroglobulina de unión a NPL.

20 En algunos aspectos de la divulgación, el umbral predeterminado del método descrito en el presente documento representa el nivel de una glucoespecie correspondiente en una muestra de un sujeto de control, o representa un valor por encima o por debajo del nivel de la glucoespecie en una muestra de un sujeto de control, nivel que se correlaciona con la presencia de la afección seleccionada. Por ejemplo, el sujeto de control puede tener EAC o BE. Como alternativa, el sujeto de control es un sujeto sano que no tiene EAC o BE.

25 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un método para determinar la probabilidad de la presencia o ausencia de una afección seleccionada de un HC, EAC y BE en un sujeto, comprendiendo el método determinar en una muestra del sujeto la proporción de un nivel de una glucoespecie de una glucoproteína respecto al nivel total de la glucoproteína en la muestra, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre al menos dos de HC, EAC y BE, y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no la afección en función de si la proporción de la glucoespecie está por encima o por debajo de un umbral predeterminado que se correlaciona con la presencia o ausencia de la afección.

30 En un aspecto relacionado de la divulgación, los métodos determinan la probabilidad de que EAC esté presente o ausente en un sujeto, en el que el método comprende determinar en una muestra del sujeto la proporción del nivel de una glucoespecie de una glucoproteína respecto al nivel total de la glucoproteína en la muestra, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre EAC y una o más otras afecciones (por ejemplo, un HC y/o BE), y determinar la probabilidad de que EAC esté presente o ausente en el sujeto en función de si la proporción está por encima o por debajo de un umbral predeterminado que se correlaciona con la presencia o ausencia de EAC.

35 En otro aspecto relacionado de la divulgación, los métodos determinan la probabilidad de que BE esté presente o ausente en un sujeto, donde los métodos comprenden determinar en una muestra del sujeto la proporción del nivel de una glucoespecie de una glucoproteína respecto al nivel total de la glucoproteína en la muestra, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre BE y una o más otras afecciones (por ejemplo, un HC y/o EAC), y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no BE en función de si la proporción está por encima o por debajo de un

umbral predeterminado que se correlaciona con la presencia o ausencia de BE.

5 En otro aspecto relacionado más de la divulgación, los métodos que determinan la probabilidad de que el sujeto tenga o no un HC, comprendiendo el método determinar en una muestra del sujeto la proporción de un nivel de una glucoespecie de una glucoproteína respecto al nivel total de la glucoproteína en la muestra, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre un HC y una o más otras afecciones (por ejemplo, BE y/o EAC), y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no un HC en función de si la proporción está por encima o por debajo de un umbral predeterminado que se correlaciona con la presencia o ausencia de un HC.

En aspectos preferidos de la divulgación, la determinación se realiza en función de los niveles o proporciones de una pluralidad de glucoespecies de una o más glucoproteínas.

10 En algunos aspectos de la divulgación, tras determinar que la probabilidad de que EAC esté presente en el sujeto está por encima del umbral predeterminado, el sujeto se expone adecuadamente a un régimen de tratamiento para tratar EAC. Los regímenes de tratamiento comprenden opcionalmente cirugía, radioterapia o quimioterapia. Por ejemplo, se puede realizar una cirugía para extirpar todo o parte del esófago.

15 En algunos aspectos de la divulgación, el método de determinación lo realiza una persona que también expone al sujeto al régimen de tratamiento. Como alternativa, la muestra del sujeto se puede proporcionar a otra persona (por ejemplo, una persona en un laboratorio) para realizar el método de determinación antes de proporcionar los resultados del método de determinación a la persona que expone al sujeto al régimen de tratamiento.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de supervisión de la progresión de EAC en un sujeto, que comprende determinar en una primera muestra del sujeto el nivel de una glucoespecie de una glucoproteína, determinar en una segunda muestra del sujeto el nivel de la glucoespecie, donde la segunda muestra se toma en un momento posterior a la primera muestra, y comparar los niveles en la primera y la segunda muestra, donde un aumento o disminución en el nivel de la glucoespecie en la segunda muestra en comparación con la primera muestra se correlaciona con la progresión o regresión de EAC.

25 En un aspecto relacionado, la divulgación también proporciona un método para supervisar la progresión de EAC en un sujeto, que comprende: determinar en una primera muestra del sujeto los niveles respectivos de una pluralidad de glucoespecies de una o más glucoproteínas, determinar en una segunda muestra del sujeto los niveles respectivos de la pluralidad de glucoespecies, donde la segunda muestra se toma en un momento posterior a la primera muestra, y comparar los niveles respectivos en la primera y la segunda muestra, donde un aumento o disminución en el nivel de las glucoespecies en la segunda muestra en comparación con la primera muestra se correlaciona con la progresión o regresión de EAC.

35 En otro aspecto relacionado más, la divulgación proporciona un método para supervisar la progresión de EAC en un sujeto, que comprende determinar en una primera muestra del sujeto las respectivas proporciones de los niveles de una pluralidad de glucoespecies de una o más glucoproteínas respecto a los niveles totales de las una o más glucoproteínas, determinar en una segunda muestra del sujeto las proporciones respectivas de los niveles de la pluralidad de glucoespecies respecto a los niveles totales de las glucoproteínas, donde la segunda muestra se toma del sujeto en un momento posterior a la primera muestra, y comparar las proporciones respectivas en la primera y la segunda muestra, donde un aumento o disminución en la proporción de las glucoespecies en la segunda muestra en comparación con la primera muestra se correlaciona con la progresión o regresión de EAC.

40 Los descubrimientos de la presente invención también permiten métodos para supervisar la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar una afección seleccionada de un HC, EAC y BE, y determinar la respuesta de un sujeto a dicho tratamiento (por ejemplo, si es una respuesta positiva o negativa a dicho tratamiento). Por tanto, en otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para supervisar la eficacia de un régimen de tratamiento particular en un sujeto hacia un estado de salud deseado (por ejemplo, HC), comprendiendo el método: (1) proporcionar una correlación de un perfil de glucoespecies de referencia con la probabilidad de tener HC, donde el perfil de glucoespecies de referencia evalúa al menos una glucoespecie (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más glucoespecies) de una o más glucoproteínas, (2) obtener un perfil de glucoespecies correspondiente de un sujeto que tiene HC, EAC o BE después del tratamiento con un régimen de tratamiento, donde una similitud del perfil de glucoespecies del sujeto después del tratamiento con el perfil de glucoespecies de referencia indica la probabilidad de que el régimen de tratamiento sea eficaz para cambiar el estado de salud del sujeto al estado de salud deseado.

55 Otro aspecto más de la presente divulgación proporciona un método para correlacionar un perfil de glucoespecies de referencia con un régimen de tratamiento eficaz para una afección seleccionada entre HC, EAC y BE, donde el perfil de glucoespecies de referencia evalúa al menos una glucoespecie (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más glucoespecies), comprendiendo el método: (a) determinar un perfil de glucoespecies de muestra de un sujeto con la afección antes del tratamiento, donde el perfil de glucoespecies de muestra evalúa, para al menos una glucoespecie en el perfil de glucoespecies de referencia, una glucoespecie correspondiente, y correlacionar el perfil de glucoespecies de muestra con un régimen de tratamiento que sea eficaz para tratar la afección en el sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para determinar si un régimen de tratamiento es

eficaz para tratar a un sujeto con una afección seleccionada entre HC, EAC y BE, comprendiendo el método: (a) correlacionar un perfil de glucoespecies de referencia antes del tratamiento con un régimen de tratamiento eficaz para la afección, donde el perfil de glucoespecies de referencia evalúa al menos una glucoespecie (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más glucoespecies) y (b) obtener un perfil del de glucoespecies de muestra del sujeto después del tratamiento, donde el perfil de glucoespecies de muestra evalúa, para una glucoespecie individual en el perfil de glucoespecies de referencia, una glucoespecie correspondiente, y donde el perfil de glucoespecies de muestra después del tratamiento indica si el régimen de tratamiento es eficaz para tratar la afección en el sujeto.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para correlacionar un perfil de glucoespecies con una respuesta positiva o negativa a un régimen de tratamiento para una afección seleccionada entre HC, EAC y BE, comprendiendo el método: (a) obtener un perfil de glucoespecies de un sujeto con la afección después del comienzo del régimen de tratamiento, donde el perfil de glucoespecies evalúa al menos una glucoespecie (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más glucoespecies) y (b) correlacionar el perfil de glucoespecies del sujeto con una respuesta positiva o negativa al régimen de tratamiento.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un método para determinar una respuesta positiva o negativa a un régimen de tratamiento por parte de un sujeto con una afección seleccionada entre HC, EAC y BE, comprendiendo el método: (a) correlacionar un perfil de glucoespecies de referencia con una respuesta positiva o negativa al régimen de tratamiento, donde el perfil de glucoespecies de referencia evalúa al menos una glucoespecie (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más glucoespecies) y (b) determinar un perfil de glucoespecies de muestra del sujeto, donde el perfil de glucoespecies de muestra del sujeto evalúa, para una glucoespecie individual en el perfil de glucoespecies de referencia, una glucoespecie correspondiente e indica si el sujeto está respondiendo al régimen de tratamiento.

En algunos aspectos de la divulgación, los métodos para determinar una respuesta positiva o negativa a un régimen de tratamiento comprenden además: determinar un primer perfil de glucoespecies de muestra del sujeto antes de comenzar el régimen de tratamiento, donde el primer perfil de glucoespecies de muestra evalúa al menos una glucoespecie (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más glucoespecies) y comparar el primer perfil de glucoespecies de muestra con un segundo perfil de glucoespecies de muestra del sujeto después del comienzo del régimen de tratamiento, donde el segundo perfil de glucoespecies de muestra evalúa, para una glucoespecie individual en el primer perfil de glucoespecies de muestra, una glucoespecie correspondiente.

La evaluación de glucoespecies incluye adecuadamente determinar los niveles de glucoespecies individuales, que se correlacionan con la presencia de una afección, como se ha descrito ampliamente anteriormente y en otras partes en el presente documento.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método de supervisión o cribado de individuos caracterizados por tener un mayor riesgo de desarrollar BE y/o EAC para la probabilidad de que el sujeto tenga o no EAC o BE. Se sabe que los factores de riesgo ilustrativos conocidos para desarrollar cualquiera o ambas de estas afecciones son ser hombres mayores de 40 años que son diagnosticados como obesos (es decir, identificados por acumular altos niveles de grasa visceral abdominal, grasa dietética), tener una ingesta alta de colesterol, padecer reflujo ácido (enfermedad por reflujo gastroesofágico) y tabaquismo. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona además un método de supervisión o cribado de un sujeto de alto riesgo para BE o EAC, comprendiendo el método determinar en una muestra del sujeto el nivel de una glucoespecie de una glucoproteína, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre al menos dos de HC, EAC y BE, y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no la afección en función de si el nivel de la glucoespecie está por encima o por debajo de un umbral predeterminado que se correlaciona con la presencia o ausencia de la afección. En algunos aspectos de la divulgación, una muestra del sujeto se puede comparar con una muestra anterior tomada en una fecha anterior del sujeto para determinar el cambio en los niveles de la glucoespecie a lo largo del tiempo, y determinar así si la probabilidad de que el sujeto desarrolle BE o EAC está aumentando.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** es un esquema de los procesos de (A) matriz de perlas magnéticas con lectina (LeMBA), (B) descubrimiento de biomarcadores y (C) - (D) verificación de biomarcadores. En (B) se muestran dos enfoques para el descubrimiento de biomarcadores. El método de diferencia de unión de grupo identifica candidatos que están presentes en un grupo y ausentes en otro grupo. El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLS-DA) combinado con los análisis de estabilidad generan una lista clasificada de candidatos. El análisis ilustrado en (D) muestra LeMBA acoplado con inmunotransferencia de Western para la verificación del nivel de proteína. (MS: espectrometría de masas; IB: inmunotransferencia; HC: estado sano; DC: estado patológico).

La **figura 2** demuestra la característica de detección de valores atípicos de GlycoSelector que permite la visualización de errores experimentales o sesgos presentes en los datos usando cuatro herramientas de visualización gráfica diferentes. (A y E) Análisis de componentes principales, (B y F) agrupamiento jerárquico, (C y G) salidas gráficas de diagramas de caja (donde la "intensidad total" está normalizada y a escala) y (D y H) diagramas de barras del coeficiente de variación para la pantalla de descubrimiento de biomarcadores de

BE/EAC. Los números únicos en el gráfico indican el análisis de la muestra de un paciente individual. El análisis número 63 (flecha) en el panel A a D se consideró un valor atípico en función de las herramientas de visualización. La muestra se volvió a analizar en el espectrómetro de masas y se realizó de nuevo la detección de valores atípicos (panel E a H).

5 La **figura 3** muestra el descubrimiento de biomarcadores y la verificación ortogonal. Se analizaron muestras de suero de 29 pacientes (sanos-9, BE-10 y EAC-10) usando el producto en fase de desarrollo LeMBA-GlycoSelector. (A) Agrupación de sPLS-DA: la representación de la muestra de sPLS-DA se basa en los 100 mejores candidatos a lectina-proteína que diferencian a EAC (grupo de la izquierda en el gráfico) de BE (grupo de la derecha en el gráfico). (B) Análisis de estabilidad: entre los 100 mejores candidatos para sPLS-DA, 82 candidatos superaron el límite de criterios de estabilidad de 0,6 usando un análisis de validación cruzada de 10 veces repetido 1000 veces. (C) Superposición entre candidatos a lectina-proteína que diferencia a BE de un fenotipo sano, EAC de BE y EAC de un fenotipo sano. (D) Número de proteínas candidatas únicas identificadas para cada lectina en el análisis con LeMBA-GlycoSelector. Cada una de las 20 lectinas usadas para el cribado identificó al menos una proteína candidata única. (Barras transparentes - candidatos expresados de manera diferente entre HC y BE; barras grises: candidatos expresados de manera diferente entre BE y EAC; barras negras: candidatos expresados de manera diferente entre HC y EAC). (E y F) Resultados de cuantificación relativa de proteómica sin marca para AAL-HP y AAL-GSN, respectivamente. (E) AAL-HP (AAL-P00738) y (F) AAL-GSN (AAL-P06396) fueron los dos mejores candidatos identificados usando sPLS-DA y la herramienta de diferencia de unión de grupo, respectivamente. (G y H) Intensidad normalizada para AAL-HP y AAL-GSN usando inmunotransferencia (H: sano; B: BE; E: EAC; y C: control).

15 La **figura 4** muestra los datos de LeMBA-MS para gelsolina como ejemplo. El eje Y muestra la abundancia relativa (observe la escala logarítmica). El eje X muestra la unión a cada una de las 20 lectinas, agrupadas en grupos de reactividad general. Las lectinas enmarcadas muestran una unión diferente de forma estadísticamente significativa entre los grupos de BE y EAC (* $p < 0,05$, prueba de la t de Student). (Barras transparentes: HC; barras grises: BE; barras negras: EAC).

20 La **figura 5** muestra una reducción de gelsolina fucosilada en EAC. (A) Inmunotransferencia que muestra niveles de gelsolina sérica total similares. (B) Datos individuales para las dos lectinas reactivas con fucosa con unión de gelsolina reducida en EAC. (Gráficas circulares: HC; gráficas cuadradas: BE; gráficas triangulares: EAC).

25 La **figura 6** proporciona datos demostrativos preliminares de paneles de marcadores de glucoespecies ejemplares. (A) Curva ROC del panel de múltiples marcadores para BE frente a EAC; (B) curva ROC del panel de múltiples marcadores para HC frente a EAC; y (C) curva ROC del panel de múltiples marcadores para HC frente a BE.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

1. Definiciones

35 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente por los expertos en la materia a la que pertenece la divulgación. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o ensayo de la presente divulgación, se describen métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente divulgación, los siguientes términos se definen a continuación.

40 Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "una glucoespecie" significa una glucoespecie o más de una glucoespecie.

45 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas pero no el exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, todo lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren en ni contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados.

50 El término "sujeto de control", como se usa en el contexto de la presente divulgación, puede referirse a un sujeto que se sabe que está afectado por un estado patológico (por ejemplo, EAC o BE) (control positivo), o a un sujeto que se sabe que no está afectado o diagnosticado con el estado patológico (control negativo), es decir, sano. Cabe señalar que un sujeto de control que se sabe que está sano, es decir, que no padece el estado patológico, puede padecer posiblemente otra enfermedad no puesta a prueba/conocida. También se entiende que los sujetos de control y los controles sanos incluyen datos obtenidos y usados como estándar, es decir, pueden usarse una y otra vez para múltiples sujetos diferentes. En otras palabras, por ejemplo, al comparar una muestra de sujeto con una muestra de control, los datos de la muestra de control podrían haberse obtenido en un conjunto diferente de experimentos, por

ejemplo, podría ser un promedio obtenido de varios sujetos sanos y no se obtuvo realmente en el momento en que se obtuvieron los datos del sujeto.

5 El término "correlacionar" generalmente se refiere a determinar una relación entre un tipo de datos con otro o con un estado. En diversos aspectos de la divulgación, correlacionar un perfil de glucoespecies con la presencia o ausencia de una afección (por ejemplo, una afección seleccionada de un HC, EAC y BE) comprende determinar la presencia, ausencia o cantidad de al menos una glucoespecie en un sujeto que padece esa afección, o en personas que se sabe que están libres de esa afección. En aspectos específicos de la divulgación, un perfil de niveles, ausencias o presencias de glucoespecies se correlaciona con una probabilidad global o un resultado particular, usando curvas de características operativas del receptor (ROC).

10 Por "glucoproteína correspondiente" se entiende un biomarcador de glucoproteína que es estructural y/o funcionalmente similar o igual a un biomarcador de glucoespecie. Las glucoproteínas correspondientes representativas incluyen otras glucoespecies de la glucoproteína e isoformas de la glucoproteína sin ninguna glucosilación.

15 El término "expresión diferencial" de glucoespecies como se usa en el presente documento, significa diferencias cualitativas y/o cuantitativas en los patrones de expresión de glucoespecies temporales y/o locales, por ejemplo, entre una muestra biológica tomada de sujetos con una afección en comparación con una muestra comparable tomada de sujetos que carecen de la afección. Por tanto, una glucoespecie expresada diferencialmente puede tener su expresión alterada cualitativamente, incluyendo una activación o inactivación en, por ejemplo, una muestra biológica de un sujeto con un estado patológico (por ejemplo, EAC) o estado susceptible de enfermedad (por ejemplo, BE) frente un estado biológico de un sujeto sano. La diferencia en la expresión de glucoespecies también puede ser cuantitativa, por ejemplo, en que la expresión se modula, es decir, se sobreexpresa, lo que da como resultado una cantidad aumentada de glucoespecies, o se subexpresa, lo que da como resultado una cantidad disminuida de glucoespecies. El grado en el que difiere la expresión de las glucoespecies solo necesita ser lo suficientemente grande para cuantificarse mediante técnicas estándar de cuantificación o caracterización. Por ejemplo, una glucoespecie se expresa diferencialmente entre las muestras si la cantidad de glucoespecie en una muestra es significativamente diferente (es decir, $p < 0,05$) de la cantidad de glucoespecie en la otra muestra. Cabe señalar que si la glucoespecie es detectable en una muestra y no detectable en la otra, entonces se puede considerar que la glucoespecie está presente diferencialmente.

30 Como se usa en el presente documento, el término "probabilidad" se usa como una medida de si los sujetos con un perfil de glucoespecies particular tienen realmente una afección (o no) basándose en un modelo matemático dado. Una probabilidad aumentada, por ejemplo, puede ser relativa o absoluta y puede expresarse cualitativa o cuantitativamente. Por ejemplo, un riesgo incrementado puede expresarse simplemente determinando el nivel del sujeto de una glucoespecie dada y colocando al sujeto de prueba en una categoría de "riesgo incrementado", basándose en estudios poblacionales previos. Como alternativa, se puede determinar una expresión numérica del riesgo incrementado del sujeto de prueba basándose en el análisis del nivel de glucoespecies.

La mayoría de las proteínas (o péptidos) secretadas de origen natural comprenden restos de carbohidratos o sacáridos unidos al péptido mediante enlaces específicos a un número selecto de aminoácidos a lo largo de la longitud de la cadena peptídica principal. Por tanto, muchos péptidos de origen natural se denominan "glucopéptidos" o "glucoproteínas" o se denominan proteínas o péptidos "glucosilados".

40 Los azúcares predominantes descubiertos en las glucoproteínas son glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetilgalactosamina ("GalNAc"), N-acetilglucosamina ("GlcNAc") y ácido siálico (por ejemplo, ácido N-acetilneuramínico ("NANA" o "NeuAc"), donde "Neu" es ácido neuramínico) y "Ac" se refiere a "acetilo"). El procesamiento de los grupos de azúcar ocurre de forma cotraduccional en la luz del RE y continúa en el aparato de Golgi para las glucoproteínas enlazadas a N.

45 La estructura de oligosacárido unida a la cadena principal de la proteína se conoce como molécula de "glicano". Las estructuras de glicanos que se encuentran en los glucopéptidos de origen natural se dividen típicamente en dos clases, "glicanos enlazados a N" u "oligosacáridos enlazados a N" y "glicanos enlazados a O" u oligosacáridos enlazados a O.

50 Los péptidos expresados en células eucariotas comprenden típicamente N-glicanos. Los "N-glicanos" se N-glucosilan en un nitrógeno amida de una asparagina o un residuo de arginina en una proteína mediante un residuo de N-acetilglucosamina. Estos "sitios de glucosilación unidos a N" ocurren en la estructura primaria del péptido que contiene, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos asparagina-X-serina/treonina, donde X es cualquier residuo de aminoácido excepto prolina y ácido aspártico.

55 Una "molécula de unión a glicano" se refiere a cualquier molécula que sea capaz de unirse a un componente de glicano de una glucoproteína. Típicamente, la molécula de unión a glicano es específica de glucoespecie (o glucoespecífica) en el sentido de que se une selectivamente al glicano de una glucoespecie de una glucoproteína pero no a otra, de modo que puede usarse para distinguir diferentes glucoespecies de la glucoproteína. Las moléculas de unión a glicanos pueden ser naturales o sintéticas e incluyen, por ejemplo, lectinas, anticuerpos

glucoespecíficos, aptámeros glucoespecíficos (por ejemplo, aptámero de ARN, aptámero de ADN o aptámero de péptidos), péptidos glucoespecíficos y molécula pequeña glucoespecífica.

5 Como se usa en el presente documento, una "glucoproteína" se refiere a una proteína que tiene estructuras de glicano asociadas con la estructura polipeptídica. Las glucoproteínas se pueden asociar con uno o más tipos de glucosilación en uno o diferentes sitios. Las glucoproteínas que difieren con respecto al tipo de glucosilación generalmente tienen la misma secuencia de aminoácidos o esencialmente la misma secuencia de aminoácidos (por ejemplo, se considera que las isoformas, variantes alélicas y otras variantes tienen esencialmente la misma secuencia de aminoácidos), mientras que las estructuras de glicano asociadas con un tipo particular de glucosilación difiere en al menos un glicano.

10 El término "glucoespecie" se refiere a una glucoproteína con un tipo distinto de glucosilación. El "tipo" o glucosilación se caracteriza por los glicanos presentes en las glucosilaciones en la superficie de la glucoproteína. Por ejemplo, una glucosilación puede comprender glicanos relacionados con fucosa, glicanos relacionados con manosa, glicanos de ácido siálico, etc. Una glucoproteína puede caracterizarse por pertenecer a una, dos, tres, cuatro, cinco o más de 5 glucoespecies diferentes (por ejemplo, una glucosilación puede comprender tanto un glicano relacionado con fucosa, un glicano relacionado con manosa y un glicano basado en ácido siálico).

15 Como se usa en el presente documento, un sujeto "sano" es un sujeto que no tiene EAC o BE.

Como se usa en el presente documento, "nivel" con referencia a una glucoproteína o glucoespecie se refiere a la cantidad o concentración de la glucoproteína o glucoespecie en una muestra. La cantidad o concentración puede ser absoluta o relativa y puede determinarse usando cualquier método conocido en la técnica.

20 A este respecto, el término "subexpresado" y similares se refieren a una desviación hacia abajo en el nivel de expresión de un biomarcador de EAC en comparación con un nivel de expresión basal de un biomarcador de EAC correspondiente en una muestra de control. El término "sobrexpresado" se refiere a una desviación hacia arriba en el nivel de glucoespecies en comparación con un nivel de expresión basal de una glucoespecie correspondiente en una muestra de control.

25 Como se usa en el presente documento, el término "umbral predeterminado" se refiere a un valor, por encima o por debajo del cual, indica la presencia de una enfermedad, tal como EAC o BE o un estado sano. Por ejemplo, para los fines de la presente divulgación, un umbral predeterminado puede representar el nivel de una glucoespecie particular de una glucoproteína, o la proporción del nivel de una glucoespecie concreta de una glucoproteína respecto al nivel de glucoproteína total, en una muestra de un sujeto de control apropiado, tal como un sujeto sano o un sujeto con BE, o en muestras agrupadas de múltiples sujetos de control o medianas o promedios de múltiples sujetos de control. Por tanto, un nivel o proporción por encima o por debajo del umbral indica la presencia de EAC o BE, como se enseña en el presente documento. En otros ejemplos, un umbral predeterminado puede representar un valor mayor o menor que el nivel o la proporción determinada para un sujeto de control para incorporar un grado de confianza adicional que un nivel o proporción por encima o por debajo del umbral predeterminado es indicativo de la presencia de enfermedad, tal como EAC o BE. Por ejemplo, el umbral predeterminado puede representar el promedio o la media del nivel de una glucoespecie en un grupo de sujetos de control, más o menos 1, 2, 3 o más desviaciones estándar. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente un umbral predeterminado apropiado basándose en el análisis de muestras biológicas de sujetos de control apropiados.

40 La expresión "curvas de características operativas del receptor (ROC)" significa una medida gráfica de sensibilidad (eje y) frente a especificidad 1 (eje x) para una prueba clínica. Una medida importante de la precisión de la prueba clínica es el valor de área bajo la curva ROC (valor de AUC). Si esta área es igual a 1,0, entonces esta prueba es 100 % precisa porque tanto la sensibilidad como la especificidad son 1,0, por lo que no hay falsos positivos ni falsos negativos. Por otro lado, una prueba que no puede discriminar es la línea diagonal de 0,0 a 1,1. El área de la ROC para esta línea es 0,5. Las áreas de la curva ROC (valores de AUC) suelen estar entre 0,5 y 1,0, pero también los valores de ROC por debajo de 0,5 pueden, según la teoría de la información, ser tan buenos si el resultado se interpreta a la inversa. Por lo tanto, de acuerdo con la presente divulgación, un valor de AUC cercano a 1 (por ejemplo, 0,95) representa la misma buena medida para una prueba clínica que un valor de AUC cercano a 0 (por ejemplo, 0,05).

50 Los términos "muestra", "muestra biológica" y similares significan un material que se sabe o se sospecha que contiene una o más glucoespecies u otros biomarcadores de EAC/BE. Una muestra de prueba se puede utilizar directamente como se obtiene de la fuente o después de un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. La muestra se deriva adecuadamente de fracciones de sangre o plasma, incluyendo fracciones de células (por ejemplo, que comprenden células tumorales) o lisados de las mismas, fracciones sin células o agotadas en células, y similares. La muestra se puede tratar antes de su uso, tal como diluyendo fluidos viscosos y similares. Los métodos de tratamiento pueden implicar filtración, destilación, extracción, concentración, inactivación de componentes interferentes (por ejemplo, nucleasas inhibitorias tales como ARNasas y ADNasas), la adición de reactivos y similares.

Los términos "sujeto", "individuo" o "paciente", usados indistintamente en el presente documento, se refieren a

cualquier sujeto animal, particularmente un sujeto mamífero, más particularmente un sujeto humano. En algunos aspectos de la divulgación, el sujeto presenta signos clínicos de una afección como se define en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "signo clínico", o simplemente "signo", se refiere a la evidencia objetiva de una enfermedad presente en un sujeto. Los síntomas y/o signos asociados con las enfermedades a las que se hace referencia en el presente documento y la evaluación de dichos signos son rutinarios y conocidos en la técnica. Los ejemplos de signos de enfermedad varían dependiendo de la enfermedad. Los signos de EAC pueden incluir tumorigénesis, metástasis, angiogénesis. Típicamente, si un sujeto tiene una enfermedad y si un sujeto responde al tratamiento, se puede determinar mediante la evaluación de signos asociados con la enfermedad.

Los términos "tratar" y "tratamiento" como se usan en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, donde el objetivo es prevenir, parcial o completamente, mejorar o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno diana (por ejemplo, EAC o BE), o uno o más síntomas asociados con el mismo. Los términos también se usan en el presente documento para indicar retrasar el inicio, inhibir (por ejemplo, reducir o detener el crecimiento de), aliviar los efectos o prolongar la vida de un paciente que padece cáncer, en particular, EAC. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos diagnosticados con el trastorno, aquellos que se sospecha que tienen el trastorno, aquellos predispuestos a tener el trastorno así como aquellos en quienes se debe prevenir el trastorno. Por tanto, el sujeto que se va a tratar en el presente documento puede haber sido diagnosticado con el trastorno o puede estar predispuesto o ser susceptible al trastorno. En algunos aspectos de la divulgación, el tratamiento se refiere a la erradicación, eliminación, modificación o control de tejido canceroso primario, regional o metastásico que resulta de la administración de uno o más agentes terapéuticos de acuerdo con los métodos de la divulgación. En otros aspectos de la divulgación, dichos términos se refieren a la minimización o el retraso de la propagación del cáncer, resultante de la administración de uno o más agentes terapéuticos a un sujeto con dicha enfermedad. En otros aspectos de la divulgación, dichos términos se refieren a la eliminación de células que causan la enfermedad. El término "tratamiento" como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refiere al acto de tratar.

Como se usa en el presente documento, el término "régimen de tratamiento" se refiere a un régimen profiláctico y/o profiláctico (es decir, antes del inicio de EAC, por ejemplo, si el sujeto está afectado por BE), o a un régimen terapéutico (es decir, después del inicio de EAC). El término "régimen de tratamiento" abarca sustancias naturales y agentes farmacéuticos (es decir, "fármacos") así como cualquier otro régimen de tratamiento que incluye, pero sin limitarse a, quimioterapia, radioterapia, terapia de protones, inmunoterapia, terapia hormonal, fototerapia, crioterapia, cricirugía, terapia con toxinas o terapia pro-apoptosis, ultrasonido focalizado de alta intensidad, tratamientos dietéticos, fisioterapia o regímenes de ejercicio, intervenciones quirúrgicas y combinaciones de los mismos.

Los expertos en la materia apreciarán que los aspectos descritos en el presente documento son susceptibles de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Debe entenderse que la divulgación incluye todas dichas variaciones y modificaciones. La divulgación también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones de dos o más de dichas etapas o características.

2. Biomarcadores para BE y EAC y usos para los mismos

La glucosilación es una modificación dinámica postraducciona que puede alterarse durante el desarrollo y la progresión de un cáncer, tal como EAC, o una afección precancerosa, tal como BE. Como resultado, la misma glucoproteína puede expresarse tanto antes como después de la transformación oncogena, pero la glucosilación de la glucoproteína antes y después de la transformación oncogena puede ser diferente.

Las diferencias en el tipo de glucosilación incluyen la eliminación de un componente de glicano, la adición de un componente de glicano, un cambio en el componente de glicano, tal como la sustitución de un componente de glicano por otro, el cambio en la ramificación de los glicanos y la reorganización de uno o más componentes de glicano en la glucoproteína, como cuando un componente de glicano se desplaza de una posición a otra en la secuencia polipeptídica. La glucosilación diferencial se puede detectar usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, métodos que detectan la unión de un tipo particular de glucosilación a una molécula de unión a glicano, tal como una lectina, un anticuerpo glucoespecífico o un aptámero glucoespecífico, como se describe adicionalmente en el presente documento, que es selectivo y/o específico para el tipo particular de glucosilación. Las diferencias en la glucosilación también se pueden detectar espectroscópicamente. Por ejemplo, se puede usar espectrometría de masas para caracterizar el componente de glicano y distinguir entre diferentes tipos de glucosilación.

La presente divulgación se basa en parte en la identificación de glucoproteínas séricas que están glucosiladas diferencialmente en sujetos con EAC, BE y en pacientes sanos. Por consiguiente, como se describe en el presente documento, la detección de los niveles de uno o más de estos diferentes tipos de glucosilación en glucoproteínas particulares (es decir, una o más glucoespecies) en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, suero o plasma, de un sujeto puede usarse para determinar si el sujeto tiene EAC, BE o está sano (es decir, no tiene BE ni EAC). Por tanto, las glucoespecies pueden considerarse biomarcadores para BE y EAC.

En algunos casos, la presente divulgación proporciona un método que comprende determinar la proporción de un nivel de una glucoespecie de una glucoproteína con respecto al nivel total de la glucoproteína en la muestra, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre al menos dos de EAC, BE y HC, y determinar la probabilidad de que el sujeto tenga o no un HC basándose en si la proporción está por encima o por debajo de un umbral predeterminado que se correlaciona con la presencia o ausencia de EAC o BE. La supervisión de los niveles o proporciones de una o más de las glucoespecies identificadas en el presente documento también se puede usar para supervisar el progreso de la enfermedad, tal como antes, durante y/o después del tratamiento. Por ejemplo, los niveles o proporciones de una glucoespecie particular identificada en el presente documento como aumentada o disminuida en sujetos con EAC en comparación con un sujeto de control sano o un sujeto de control con BE pueden supervisarse durante o después del tratamiento. Un cambio en el nivel o proporción de una o más glucoespecies en el sujeto a lo largo del tiempo para que sea más similar a los niveles o proporciones observados en sujetos de control indica que la enfermedad ha retrocedido. A la inversa, un cambio a lo largo del tiempo en el nivel o proporción de una o más glucoespecies en el sujeto para que sea menos similar a los niveles o proporciones observados en sujetos de control indica que la enfermedad ha progresado. Los métodos de supervisión de la progresión de la enfermedad mediante la evaluación de niveles o proporciones de una o más glucoespecies también son útiles para evaluar la eficacia del tratamiento, por ejemplo para evaluar si el tratamiento ha dado como resultado una regresión de la enfermedad.

Las glucoproteínas identificadas en el presente documento como glucosiladas diferencialmente en sujetos con EAC, BE y en sujetos sanos se seleccionan de: afamina, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida 1, alfa-1-glicoproteína ácida 2, alfa-1B-glicoproteína, alfa-2-antiplasmina, alfa-2-HS-glicoproteína, alfa-2-macroglobulina, alfa-2-antiplasmina, angiotensinógeno, antitrombina-III, apolipoproteína A-I, apolipoproteína B-100, apolipoproteína M, beta-2-glicoproteína 1, cadena alfa de la proteína de unión a C4b, cadena beta de la proteína de unión a C4b, cadherina-5, centriolina, ceruloplasmina, factor de coagulación XII, subunidad B del subcomponente C1q del complemento, subunidad C del subcomponente C1q del complemento, subcomponente C1s del complemento, C5 del complemento, componente C7 del complemento, cadena alfa del componente C8 del complemento, componente C9 del complemento, factor B del complemento, factor H del complemento, factor I del complemento, cadena gamma de fibrinógeno, fibronectina, ficolina-3, gelsolina, haptoglobina, subunidad beta de hemoglobina, hemopexina, glucoproteína rica en histidina, subunidad ácido-lábil del complejo proteico de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, cadena pesada H4 del inhibidor de inter-alfa-tripsina, calistatina, lumicán, N-acetilmuramoiil-L-alanina amidasa, inhibidor de la proteasa C1 plasmática, calicreína plasmática, proteína AMBP, protrombina, proteína 4 de unión a retinol, serotransferrina, paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica, paraoxonasa/lactonasa 3 sérica y proteína S dependiente de vitamina K

Los diversos tipos de glucosilación asociados con las glucoproteínas séricas anteriores exhiben diferentes propiedades de unión a lectina resultantes de las diferentes estructuras de glicano en las proteínas. Estos tipos de glucosilación incluyen, por ejemplo, glucosilaciones que se unen a lectinas que tienen una reactividad general con $\alpha\beta$ -D-galactosa, incluida la lectina de *Bauhinia purpurea* (BPL, que se sabe que se une al menos a Gal β 1-3GalNAc), aglutinina de *Erythrina cristagalli* (ECA, que se sabe que se une al menos a Gal β 1-4GlcNAc) y jacalina (JAC, que se sabe que se une al menos a Gal α 1-6GalNAc y Gal β 1-3GalNAc), lectinas que tienen una reactividad general con D-N-acetilgalactosamina, incluyendo aglutinina de soja (SBA, que se sabe que se une a GalNAc α 1-3 Gal), aglutinina de *Helix pomatia* (HPA, que se sabe que se une al menos a α -GalNAc), aglutinina de *Wisteria floribunda* (WFA, que se sabe que se une al menos a GalNAc α 1-6Gal y GalNAc α 1-3GalNAc), lectina de *Datura stramonium* (DSA, que se sabe que se une al menos a oligómeros de β 1-4GlcNAc), aglutinina de *Helix aspersa* (HAA, que se sabe que se une al menos a α -GlcNAc y α -GalNAc), lectina de *Solanum tuberosum* (STL, que se sabe que se une al menos a oligómeros de GlcNAc β 1-4GlcNAc) y aglutinina de germen de trigo (WGA, que se sabe que se une al menos a GlcNAc β 1-4GlcNAc y Neu5Ac), lectinas que tienen una reactividad general con D-manosa, incluyendo concanavalina A (ConA, que se sabe que se une al menos a α -Man, α -Glc y α -GlcNAc), lectina de *Galanthus nivalis* (GNL, que se sabe que se une al menos a Man α 1-3Man) y de *Narcissus pseudonarcissus* (NPL, que se sabe que se une al menos a Man α 1-6Man), lectinas que tienen una reactividad general con α -L-Fucosa, incluyendo lectina de *Aleuria aurantia* (AAL, que se sabe que se une al menos a Fuc con enlaces α 1-2, -3, -6), aglutinina de *Pisum sativum* (PSA, que se sabe que se une al menos a Fuc α 1-6GlcNAc de glicanos enlazados a N) y aglutinina I de *Ulex europeus* (UEA, que se sabe que se une al menos a Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc), lectinas que tienen una reactividad general con ácido siálico, incluyendo aglutinina II de *Maackia amurensis* (MAA, que se sabe que se une al menos a enlaces Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3) y aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA, que se sabe que se une al menos a enlaces Neu5Ac α 2-6) y lectinas que tienen una reactividad general con especificidades complejas, incluyendo fitohemaglutinina eritroaglutinante (EPHA, que se sabe que se une al menos a GlcNAc biseccionante) y fitohemaglutinina leucoaglutinante (L-PHA, que se sabe que se une al menos a β 1-6GlcNAc tri/tetra-antenario).

Por consiguiente, las propiedades de unión a lectina de las glucoproteínas proporcionadas en el presente documento indican el tipo de glucosilación. Por ejemplo, una glucoproteína de unión a AAL, tal como una glucoproteína de unión a AAL de gelsolina, es un tipo fucosilado, que posiblemente contiene oligosacáridos enlazados a Fuc α 1-2, -3, -6, mientras que una glucoproteína de unión a NPL, tal como una glucoespecie de gelsolina de unión a NPL, está manosilada, posiblemente conteniendo oligosacáridos Man α 1-6Man. La identidad de los glicanos en los biomarcadores de glucoproteína descritos en el presente documento se puede determinar con

mayor precisión usando métodos estándar bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, espectrometría de masas, cromatografía de líquidos de alta presión, resonancia magnética nuclear, espectroscopía de correlación, cromatografía de gases-líquidos o cromatografía de gases.

5 Como se describe en el presente documento, los niveles de los diversos tipos de glucosilación presentes en una sola glucoproteína en una muestra, tal como una muestra de sangre, suero o plasma, de sujetos con EAC son diferentes a los de sujetos con BE o sujetos sanos. De forma similar, los niveles de varias glucoespecies de una única glucoproteína enumerados anteriormente en el suero de sujetos con BE son diferentes a los de sujetos con EAC o sujetos sanos. Por consiguiente, las glucoespecies proporcionadas en el presente documento son útiles como biomarcadores en métodos para detectar y controlar el progreso de EAC y BE, y métodos y usos relacionados.

10 2.1 Biomarcadores que distinguen sujetos con EAC de sujetos sanos

Entre las glucoespecies que están presentes en diferentes niveles en sujetos con EAC en comparación con sujetos de control sanos se encuentran las glucoespecies del componente C9 del complemento, gelsolina, haptoglobina, factor B del complemento, alfa-1-antiquimotripsina, C5 del complemento, hemopexina, cadena alfa de la proteína de unión a C4b, inhibidor de la proteasa C1 plasmática, alfa-1-glucoproteína ácida 1, alfa-1-glucoproteína ácida 1, ceruloplasmina, antitrombina-III, ficolina-3 y subunidad B del subcomponente C1q del complemento. Otros marcadores que están presentes a diferentes niveles en sujetos con EAC en comparación con sujetos de control sanos son las glucoespecies de alfa-1-antitripsina, alfa-1B-glucoproteína, subcomponente C1s del complemento, componente C7 del complemento, alfa-1-glucoproteína ácida 2, afamina, cadena gamma de fibrinógeno, proteína 4 de unión a retinol, gelsolina, proteína S dependiente de vitamina K, subunidad ácido-lábil del complejo proteico de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, cadena gamma de fibrinógeno, serotransferrina, subunidad beta de hemoglobina, haptoglobina, factor B del complemento, alfa-2-HS-glucoproteína, cadherina-5, subunidad beta de hemoglobina, apolipoproteína A-I, cadena beta de fibrinógeno, caliceína plasmática, calistatina, cadherina-5 y centriolina.

Por consiguiente, se puede realizar una determinación de la probabilidad de que un sujeto tenga EAC o esté sano y no tenga EAC evaluando el nivel de una o más de estas glucoespecies en una muestra biológica del sujeto, tal como una muestra de suero, plasma o sangre, y comparándolo con el nivel de la misma glucoproteína del mismo tipo de glucosilación en una muestra correspondiente de un sujeto de control sano (es decir, un sujeto que se sabe que no tiene EAC) o muestras de múltiples sujetos de control sanos, donde un aumento o disminución indica que el sujeto tiene EAC. En algunos casos, el nivel de la glucoespecie se compara con un nivel o umbral predeterminado, donde un aumento o disminución en el nivel del sujeto en comparación con el umbral indica que el sujeto tiene EAC. El umbral predeterminado puede calcularse basándose en el nivel de la misma glucoespecie en una muestra correspondiente de un sujeto de control sano o de un grupo de sujetos sanos, de modo que un nivel de la glucoespecie por encima o por debajo del nivel predeterminado indica que el sujeto tiene EAC. En algunos casos, la proporción del nivel de una o más glucoespecies respecto al nivel total de la glucoproteína también aumenta o disminuye en un sujeto con BE en comparación con un sujeto de control sano o un grupo de sujetos de control sanos y, por tanto, también puede ser usado para determinar la presencia de EAC. Cuando se evalúan dos o más tipos de glucosilación para una sola glucoproteína, se puede determinar una proporción separada para cada glucoespecie. Como alternativa, se puede determinar una sola proporción de los niveles combinados de los dos o más tipos de glucosilación con una sola glucoproteína respecto al nivel total de la glucoproteína.

40 Las glucoespecies que están presentes a diferentes niveles en sujetos con EAC en comparación con sujetos de control sanos son glucoespecies del componente del complemento, componente C9 del complemento de unión a AAL, componente C9 del complemento de unión a EPHA, componente C9 del complemento de unión a JAC, componente C9 del complemento de unión a NPL, componente C9 del complemento de unión a PSA, componente C9 del complemento de unión a WGA, gelsolina de unión a AAL, gelsolina de unión a EPHA, gelsolina de unión a JAC, gelsolina de unión a PSA, haptoglobina de unión a EPHA, haptoglobina de unión a NPL, haptoglobina de unión a PSA, haptoglobina de unión a WGA, factor B del complemento de unión a JAC, alfa-1-antiquimotripsina de unión a JAC, alfa-1-antiquimotripsina de unión a NPL, alfa-1-antiquimotripsina de unión a WGA, C5 del complemento de unión a JAC, hemopexina de unión a JAC, cadena alfa de la proteína de unión a C4b de unión a JAC, cadena alfa de la proteína de unión a C4b de unión a NPL, inhibidor de la proteasa C1 plasmática de unión a JAC, hemopexina de unión a JAC, alfa-1-glucoproteína ácida 1 de unión a AAL, alfa-1-glucoproteína ácida 1 de unión a EPHA, ceruloplasmina de unión a JAC, ceruloplasmina de unión a NPL, antitrombina-III de unión a NPL, ficolina-3 de unión a STL, subunidad B del subcomponente C1q del complemento de unión a WGA.

Preferentemente, las glucoespecies individuales que se expresan diferencialmente entre sujetos con EAC y sujetos sanos en un sujeto se seleccionan de las glucoespecies identificadas en la tabla 1.

55 En otros aspectos de la divulgación, las glucoespecies individuales que se expresan diferencialmente entre sujetos con EAC y sujetos sanos en un sujeto se seleccionan de las glucoespecies identificadas en la tabla 2.

Por consiguiente, se puede realizar una determinación de la probabilidad de que un sujeto tenga EAC o esté sano (es decir, no es probable que tenga EAC) evaluando el nivel de una o más glucoespecies en una muestra biológica del sujeto, tal como una muestra de suero, plasma o muestra, y comparándolo con el nivel de la misma o más

glucoespecies en una muestra correspondiente de un sujeto de control sano (es decir, un sujeto que se sabe que no tiene EAC) o muestras de múltiples sujetos de control sanos, donde un aumento o disminución indica que el sujeto tiene EAC. En algunos casos, el nivel de las una o más glucoespecies se compara con un nivel o umbral predeterminado, donde un aumento o disminución en el nivel del sujeto en comparación con el umbral indica que el sujeto tiene EAC. El umbral predeterminado puede calcularse basándose en el nivel de la misma glucoespecie en una muestra correspondiente de un sujeto de control sano o de un grupo de sujetos sanos, de modo que un nivel de la glucoespecie por encima o por debajo del nivel predeterminado indica que el sujeto tiene EAC. En algunos casos, la proporción del nivel de una glucoespecie respecto al nivel total de la glucoproteína correspondiente también aumenta o disminuye en un sujeto con EAC en comparación con un sujeto de control sano o un grupo de sujetos de control sanos y, por tanto, también se puede usar para determinar la probabilidad de presencia de EAC. Cuando se evalúan dos o más glucoespecies para una única glucoproteína, se puede determinar una proporción separada para cada glucoespecie. Como alternativa, se puede determinar una proporción única de los niveles combinados de la glucoespecie de la glucoproteína única respecto al nivel total de la glucoproteína.

Las glucoespecies ilustrativas que tienen niveles aumentados en sujetos con EAC en comparación con sujetos sanos incluyen, por ejemplo, aquellas glucoespecies identificadas en la tabla 1 como sobreexpresadas en sujetos con EAC. Por tanto, una determinación de que un sujeto tiene un nivel aumentado de uno o más de estos tipos de glucosilación en comparación con un sujeto de control sano o en comparación con un umbral predeterminado indica que el sujeto tiene EAC. De manera similar, una determinación de que un sujeto tiene una proporción aumentada del nivel de una glucoproteína con uno o más tipos de glucosilación respecto al nivel total de la glucoproteína en comparación con la proporción en un sujeto de control sano o en comparación con un umbral predeterminado indica que el sujeto tiene EAC.

Las glucoespecies ilustrativas que tienen niveles disminuidos en sujetos con EAC en comparación con sujetos sanos incluyen, por ejemplo, aquellas glucoespecies identificadas como subexpresadas en sujetos con EAC. Por tanto, una determinación de que un sujeto tiene un nivel disminuido de una o más de estas glucoespecies en comparación con un sujeto de control sano o en comparación con un umbral predeterminado indica que el sujeto tiene EAC. De manera similar, una determinación de que un sujeto tiene una proporción disminuida del nivel de una o más de estas glucoespecies respecto al nivel total de la glucoproteína en comparación con la proporción en un sujeto de control sano o en comparación con un umbral predeterminado indica que el sujeto tiene EAC.

Los niveles o proporciones de las glucoespecies identificadas anteriormente como biomarcadores útiles para EAC también se pueden usar para supervisar el progreso de la enfermedad en un sujeto que tiene EAC. Por ejemplo, el progreso de la EAC se puede evaluar o supervisar antes, durante o después del tratamiento evaluando el nivel o la proporción (es decir, la proporción del nivel de una glucoespecie respecto al nivel total de la glucoproteína) de una o más glucoespecies en las muestras tomadas en diversos puntos temporales. Por consiguiente, la eficacia del tratamiento también puede evaluarse determinando el nivel o la proporción de una o más glucoespecies en muestras tomadas en diversos puntos temporales, donde al menos uno de esos puntos temporales es durante o después del tratamiento. Un aumento a lo largo del tiempo en el nivel o la proporción de una o más de las glucoespecies identificadas anteriormente como aumentadas en sujetos con EAC en comparación con sujetos sanos indica que la enfermedad ha progresado, mientras que una disminución en una o más de estas glucoespecies indica que la enfermedad ha retrocedido. Por el contrario, una disminución a lo largo del tiempo en el nivel o proporción de una o más de las glucoespecies identificadas anteriormente como disminuidas en sujetos con EAC en comparación con sujetos sanos indica que la enfermedad ha progresado, mientras que un aumento en una o más de estas glucoespecies indica que la enfermedad ha retrocedido. En casos en los que el sujeto se ha sometido a o está recibiendo tratamiento para EAC, la progresión de la enfermedad puede indicar que dicho tratamiento no ha sido eficaz, mientras que la regresión de la enfermedad puede indicar que dicho tratamiento ha sido al menos parcialmente eficaz.

Por consiguiente, un aumento a lo largo del tiempo en el nivel o la proporción de una o más de las glucoespecies identificadas en la tabla 1, tabla 2 o tabla 3 como sobreexpresadas en aquellos sujetos que son diagnosticados con EAC indica que el EAC del sujeto ha progresado a lo largo del tiempo, mientras que una disminución de una o más de estas glucoespecies indica que el EAC del sujeto ha retrocedido.

Una disminución a lo largo del tiempo en el nivel o proporción de una o más de las glucoespecies identificadas en la tabla 1, tabla 2 o tabla 3 como subexpresadas en los sujetos diagnosticados con EAC indica que el EAC del sujeto ha progresado a lo largo del tiempo, mientras que un aumento de una cualquiera o más de estas glucoespecies indica que el EAC del sujeto ha retrocedido.

En algunos casos, se evalúa el nivel o la proporción de más de un tipo de glucosilación con una sola glucoproteína identificada anteriormente para determinar la presencia o progresión de EAC en un sujeto. Por ejemplo, se pueden evaluar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más tipos de glucosilación con una sola glucoproteína. Por tanto, puede evaluarse un panel de más de una glucoespecie para determinar el perfil o la firma de glucosilación de una glucoproteína para un sujeto. En algunos aspectos de la divulgación, este perfil se puede comparar con un perfil correspondiente de un sujeto de control o un grupo de sujetos de control para determinar la presencia o progresión de EAC, donde un cambio en el perfil resultante de aumentos o disminuciones en los niveles o las proporciones de los diversos tipos de glucosilación para una sola glucoproteína, como se describió anteriormente, indica la presencia

o progresión de EAC.

2.2 Biomarcadores que distinguen a sujetos con BE de sujetos sanos

Entre las glucoespecies que están presentes en diferentes niveles en sujetos con BE en comparación con sujetos de control sanos se encuentran las glucoespecies de alfa-2-macroglobulina, apolipoproteína B-100, ficolina-3, subunidad C del subcomponente C1q del complemento, proteína AMBP, alfa-1-gluco proteína ácida 1, factor de coagulación XII, antitrombina-III, alfa-2-antiplasmina y ceruloplasmina.

Las glucoespecies adicionales que están presentes en diferentes niveles en sujetos con BE en comparación con sujetos de control sanos son las glucoespecies de lumicán, protrombina, fibronectina, apolipoproteína M, angiotensinógeno, apolipoproteína A-I, cadena beta de fibrinógeno, calicreína plasmática, gluco proteína rica en histidina, proteína S dependiente de vitamina K, cadena alfa del componente C8 del complemento, factor H del complemento, calistatina, afamina y subunidad beta de hemoglobina.

Por consiguiente, se puede realizar una determinación de si un sujeto tiene BE o está sano y no tiene BE evaluando el nivel de una o más de estas glucoespecies en una muestra biológica del sujeto, tal como una muestra de suero, plasma o sangre, y comparándolo con el nivel de la misma gluco proteína del mismo tipo de glucosilación en una muestra correspondiente de un sujeto de control sano (es decir, un sujeto que se sabe que no tiene BE) o muestras de múltiples sujetos de control sanos, donde un aumento o disminución indica que el sujeto tiene BE. En algunos casos, el nivel de la gluco especie se compara con un nivel o umbral predeterminado, donde un aumento o disminución en el nivel del sujeto en comparación con el umbral indica que el sujeto tiene BE. El umbral predeterminado puede calcularse basándose en el nivel de la misma gluco especie en una muestra correspondiente de un sujeto de control sano o de un grupo de sujetos sanos, de modo que un nivel de la gluco especie por encima o por debajo del nivel predeterminado indica que el sujeto tiene BE. En algunos casos, la proporción del nivel de una o más glucoespecies respecto al nivel total de la gluco proteína también aumenta o disminuye en un sujeto con BE en comparación con un sujeto de control sano o un grupo de sujetos de control sanos y, por tanto, también puede usarse para determinar la presencia de BE. Cuando se evalúan dos o más tipos de glucosilación para una sola gluco proteína, se puede determinar una proporción separada para cada gluco especie. Como alternativa, se puede determinar una sola proporción de los niveles combinados de los dos o más tipos de glucosilación con una sola gluco proteína respecto al nivel total de la gluco proteína.

Las glucoespecies que se expresan diferencialmente entre sujetos sanos y aquellos diagnosticados con BE se seleccionan del grupo que comprende o consiste en: alfa-2-macroglobulina de unión a EPHA, apolipoproteína B-100 de unión a JAC, apolipoproteína B-100 de unión a NPL, ficolina-3 de unión a AAL, ficolina-3 de unión a STL, subunidad C del subcomponente C1q del complemento de unión a AAL, proteína AMBP de unión a EPHA, alfa-1-gluco proteína ácida 1 de unión a EPHA, factor de coagulación XII de unión a JAC, antitrombina-III de unión a NPL, alfa-2-antiplasmina de unión a SNA y ceruloplasmina de unión a STL.

Preferentemente, las glucoespecies individuales (es decir, definidas por la molécula de unión a glicano (por ejemplo, lectina) y la gluco proteína a la que se une) que se expresan diferencialmente entre sujetos con BE y sujetos sanos se seleccionan de la tabla 4. Por tanto, una determinación de que un sujeto tiene un nivel aumentado de una o más de esas glucoespecies identificadas en la tabla 4 o tabla 5 como sobreexpresadas en comparación con un sujeto de control sano o en comparación con un umbral predeterminado indica que el sujeto tiene BE. De manera similar, una determinación de que un sujeto tiene una proporción aumentada del nivel de una o más de estas glucoespecies respecto al nivel total de la gluco proteína correspondiente en comparación con la proporción en un sujeto de control sano o en comparación con un umbral predeterminado indica que el sujeto tiene BE.

Las glucoespecies ilustrativas que tienen niveles disminuidos en sujetos con BE en comparación con sujetos sanos incluyen, por ejemplo, aquellas glucoespecies identificadas en la tabla 4 o tabla 5 como subexpresadas en sujetos diagnosticados con BE. Por tanto, una determinación de que un sujeto tiene un nivel disminuido de una o más de estas glucoespecies en comparación con un sujeto de control sano o en comparación con un umbral predeterminado indica que el sujeto tiene BE. De manera similar, una determinación de que un sujeto tiene una proporción disminuida del nivel de una o más de esas glucoespecies respecto al nivel total de la gluco proteína correspondiente en comparación con la proporción en un sujeto de control sano o en comparación con un umbral predeterminado indica que el sujeto tiene BE.

Los niveles o proporciones de las glucoespecies de una o más gluco proteínas identificadas anteriormente como biomarcadores útiles para BE también pueden usarse para supervisar el progreso de la enfermedad en un sujeto que tiene BE. Por ejemplo, el progreso de BE puede evaluarse o supervisarse antes, durante o después del tratamiento evaluando el nivel o la proporción (es decir, la proporción del nivel de una gluco especie respecto al nivel total de la gluco proteína) de una o más de las glucoespecies en muestras tomadas en diversos puntos temporales. Por consiguiente, la eficacia del tratamiento también puede evaluarse determinando el nivel o la proporción de una o más de las glucoespecies en muestras tomadas en diversos puntos temporales, donde al menos uno de esos puntos temporales es durante o después del tratamiento. Un aumento a lo largo del tiempo en el nivel o proporción de una o más de las glucoespecies identificadas anteriormente como aumentadas en sujetos con BE en comparación con sujetos sanos indica que la enfermedad ha progresado, mientras que una disminución en una o más de estas

glucoespecies indica que la enfermedad ha retrocedido. Por el contrario, una disminución a lo largo del tiempo en el nivel o la proporción de una o más de las glucoespecies identificadas anteriormente como disminuidas en sujetos con BE en comparación con sujetos sanos indica que la enfermedad ha progresado, mientras que un aumento en una o más de estas glucoespecies indica que la enfermedad ha retrocedido. En casos en los que el sujeto se ha sometido a o está recibiendo tratamiento para BE, la progresión de la enfermedad puede indicar que dicho tratamiento no ha sido eficaz, mientras que la regresión de la enfermedad puede indicar que dicho tratamiento ha sido al menos parcialmente eficaz.

Por consiguiente, un aumento a lo largo del tiempo en el nivel o la proporción de una o más de esas glucoespecies identificadas en la tabla 4 o tabla 5 como sobreexpresadas en un sujeto diagnosticado con BE indica que el BE del sujeto ha progresado a lo largo del tiempo, mientras que una disminución de una cualquiera o más de estas glucoespecies indica que el BE del sujeto ha retrocedido.

Una disminución a lo largo del tiempo en el nivel o la proporción de alfa-2-macroglobulina en un sujeto con BE indica que el BE del sujeto ha progresado a lo largo del tiempo, mientras que un aumento de esta glucoespecie indica que el BE del sujeto ha retrocedido.

En algunos casos, se evalúa el nivel o la proporción de más de una glucoespecie identificada anteriormente para determinar la presencia o progresión de BE en un sujeto. Por ejemplo, se pueden evaluar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más glucoespecies. Por tanto, se puede evaluar un panel de glucoespecies para determinar un perfil o firma de glucoespecies para un sujeto. En algunos aspectos de la divulgación, este perfil se puede comparar con un perfil correspondiente de un sujeto de control o un grupo de sujetos de control para determinar la presencia o progresión de BE, donde un cambio en el perfil resultante de aumentos o disminuciones en los niveles o las proporciones de las diversas glucoespecies, como se describió anteriormente, indica la presencia o progresión de BE.

2.3 Biomarcadores que distinguen a sujetos con EAC de sujetos con BE

Entre las glucoespecies que están presentes a diferentes niveles en una muestra biológica de un sujeto con EAC en comparación con sujetos con BE, se encuentran las glucoespecies de haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, componente C9 del complemento, factor B del complemento, C5 del complemento, hemopexina, cadena alfa de la proteína de unión a C4b, inhibidor de la proteasa C1 plasmática, gelsolina, alfa-2-macroglobulina, alfa-2-HS-glicoproteína, ficolina-3, subunidad C del subcomponente C1q del complemento, alfa-1-glicoproteína ácida 1, ceruloplasmina, factor de coagulación XII y alfa-2-antiplasmina. Glucoespecies adicionales que están presentes a diferentes niveles en una muestra biológica de un sujeto con EAC en comparación con sujetos con BE son glucoespecies de protrombina, hemopexina, alfa-1B-glicoproteína, factor I del complemento, factor H del complemento, subcomponente C1s del complemento, cadena beta de proteína de unión a C4b, cadena pesada H4 del inhibidor de inter-alfa-tripsina, proteína 4 de unión a retinol, beta-2-glicoproteína 1, lumicán y paraoxonasa/lactonasa 3 sérica.

Por consiguiente, se puede realizar una determinación de si un sujeto tiene EAC evaluando el nivel de una o más de estas glucoespecies en una muestra biológica, tal como una muestra de suero, plasma o sangre, del sujeto y comparándola con el nivel de la misma glucoespecie en una muestra correspondiente de un sujeto de control con BE o de múltiples sujetos de control, donde un aumento o disminución indica que el sujeto tiene EAC. En algunos casos, la abundancia o el nivel de la glucoespecie se compara con un umbral predeterminado, donde un aumento o una disminución indica que el sujeto tiene EAC. El umbral predeterminado se determina basándose en el nivel de la misma glucoespecie en una muestra correspondiente de un sujeto de control con BE o de un grupo de sujetos de control con BE, de modo que un nivel de las glucoespecies en la muestra del sujeto por encima o por debajo del nivel predeterminado indica que el sujeto tiene EAC. En algunos casos, la proporción del nivel de una o más glucoespecies de una glicoproteína respecto al nivel total de la glicoproteína también aumenta o disminuye en un sujeto con EAC en comparación con un sujeto de control con BE o un grupo de sujetos de control con BE. Cuando se evalúan dos o más glucoespecies de la misma glicoproteína, se puede determinar una proporción separada para cada glucoespecie. Como alternativa, se puede determinar una proporción única de los niveles combinados de las dos o más glucoespecies de la glicoproteína respecto al nivel total de la glicoproteína.

Entre las glucoespecies que están presentes a diferentes niveles en sujetos con EAC en comparación con sujetos con BE se encuentran las glucoespecies de componente C9 del complemento de unión a AAL, componente C9 del complemento de unión a EPHA, componente C9 del complemento de unión a WGA, componente C9 del complemento de unión a JAC, componente C9 del complemento de unión a NPL, componente C9 del complemento de unión a PSA, gelsolina de unión a AAL, gelsolina de unión a EPHA, gelsolina de unión a JAC, gelsolina de unión a PSA, gelsolina de unión a NPL, gelsolina de unión a WGA, haptoglobina de unión a AAL, haptoglobina de unión a EPHA, haptoglobina de unión a JAC, haptoglobina de unión a PSA, haptoglobina de unión a WGA, factor B del complemento de unión a JAC, alfa-1-antiquimotripsina de unión a EPHA, alfa-1-antiquimotripsina de unión a PSA, alfa-1-antiquimotripsina de unión a JAC, C5 del complemento de unión a AAL, C5 del complemento de unión a JAC, C5 del complemento de unión a PSA, componente C7 del complemento de unión a AAL, componente C7 del complemento de unión a PSA, componente C7 del complemento de unión a EPHA, componente C7 del complemento de unión a JAC, apolipoproteína B-100 de unión a AAL, apolipoproteína B-100 de unión a NPL, serotransferrina de unión a EPHA, alfa-1-antitripsina de unión a JAC, alfa-1B-glicoproteína de unión a JAC, alfa-1-

glucoproteína ácida 1 de unión a AAL, ficolina-3 de unión a AAL, subunidad C del subcomponente C1q del complemento de unión a AAL, alfa-1-glucoproteína ácida 1 de unión a AAL, ceruloplasmina de unión a JAC, ceruloplasmina de unión a STL, factor de coagulación XII de unión a JAC y alfa-2-antiplasmina de unión a SNA.

5 Preferentemente, las glucoespecies individuales (es decir, definidas por la molécula de unión a glicano (por ejemplo, lectina) y la glucoproteína a la que se une) que se expresan diferencialmente entre EAC y BE se seleccionan de la tabla 6.

En otros aspectos de la divulgación, las glucoespecies individuales (es decir, definidas por la molécula de unión a glicano (por ejemplo, lectina) y la glucoproteína a la que se une) que se expresan diferencialmente entre EAC y BE se seleccionan de la tabla 7.

10 Por tanto, una determinación de que un sujeto tiene un nivel disminuido de una o más de estas glucoespecies en comparación con un sujeto de control con BE o en comparación con un umbral predeterminado indica que el sujeto tiene EAC. De manera similar, una determinación de que un sujeto tiene una proporción disminuida del nivel de una o más de estas glucoespecies de una glucoproteína respecto al nivel total de la glucoproteína en comparación con la proporción en un sujeto de control con BE o en comparación con un umbral predeterminado indica que el sujeto
15 tiene EAC.

En ejemplos particulares, se evalúan los niveles de diferentes glucoespecies de gelsolina para determinar si un sujeto tiene EAC. Como se indicó anteriormente, los niveles de múltiples glucoespecies de gelsolina se reducen en sujetos con EAC en comparación con sujetos con BE, como se establece en la tabla 6 o tabla 7. Estas isoformas de gelsolina incluyen gelsolina de unión a AAL, gelsolina de unión a JAC y gelsolina de unión a PSA, y comparar el nivel con el nivel del mismo tipo de glucosilación de gelsolina en un sujeto de control con BE o con un umbral predeterminado, donde una disminución indica que el sujeto tiene EAC.
20

En ejemplos adicionales, se evalúa la proporción del nivel de una o más glucoespecies de gelsolina respecto al nivel de gelsolina total en una muestra de un sujeto para determinar si el sujeto tiene EAC. Por tanto, en algunos ejemplos, los métodos de la presente divulgación incluyen determinar el nivel de una glucoespecie de gelsolina seleccionada del grupo que consiste en gelsolina de unión a AAL, gelsolina de unión a JAC y gelsolina de unión a PSA, en una muestra de un sujeto y también determinar los niveles totales de gelsolina en la misma muestra. A continuación, se determina una proporción del nivel de gelsolina con un solo tipo de glucosilación respecto al nivel de gelsolina total y se compara con la misma proporción determinada para un sujeto de control con BE o se compara con un umbral predeterminado. Una disminución en la proporción en el sujeto en comparación con el sujeto de control o un umbral predeterminado indica que el sujeto tiene EAC. En algunos casos, el nivel de dos o más tipos de glucosilación de gelsolina, tales como dos o más gelsolina de unión a AAL, gelsolina de unión a JAC y gelsolina de unión a PSA, se miden para determinar una proporción del nivel combinado de los dos o más tipos de glucosilación de gelsolina respecto al nivel total de gelsolina. Esta proporción se compara, a continuación, con la misma proporción determinada para un sujeto de control con BE o se compara con un umbral predeterminado, donde una disminución en la proporción del sujeto en comparación con el sujeto de control o umbral predeterminado indica que el sujeto tiene EAC.
25
30
35

Los niveles o proporciones de las glucoespecies identificadas anteriormente como biomarcadores útiles para EAC también se pueden usar para supervisar el progreso de la enfermedad en un sujeto que tiene EAC. Por ejemplo, el progreso de EAC se puede evaluar o supervisar antes, durante o después del tratamiento evaluando el nivel o la proporción (es decir, la proporción del nivel de una glucoespecie de una glucoproteína respecto al nivel total de la glucoproteína) de una o más de las glucoespecies en muestras tomadas en diversos puntos temporales. Por consiguiente, la eficacia del tratamiento también puede evaluarse determinando el nivel o la proporción de una o más de las glucoespecies en muestras tomadas en diversos puntos temporales, donde al menos uno de esos puntos temporales es durante o después del tratamiento. Un aumento a lo largo del tiempo en el nivel o proporción de una o más de las glucoespecies identificadas anteriormente como aumentadas en sujetos con EAC en comparación con BE o una muestra sana indica que la enfermedad ha progresado, mientras que una disminución en una o más de estas glucoespecies indica que la enfermedad ha retrocedido. Por el contrario, una disminución a lo largo del tiempo en el nivel o la proporción de una o más de las glucoespecies identificadas anteriormente como disminuidas en sujetos con EAC en comparación con BE o una muestra sana indica que la enfermedad ha progresado, mientras que un aumento en una o más de estas glucoespecies indica que la enfermedad ha retrocedido. En casos en los que el sujeto se ha sometido a o está recibiendo tratamiento para EAC, la progresión de la enfermedad puede indicar que dicho tratamiento no ha sido eficaz, mientras que la regresión de la enfermedad puede indicar que dicho tratamiento ha sido al menos parcialmente eficaz.
40
45
50

Por lo tanto, un aumento a lo largo del tiempo en el nivel o proporción de una o más de las glucoespecies de glucoproteína seleccionadas de las identificadas en la tabla 6 o tabla 7 como sobreexpresadas en un sujeto con EAC en comparación con un sujeto con BE, en un sujeto diagnosticado con EAC, indica que el EAC del sujeto ha progresado a lo largo del tiempo, mientras que una disminución de una o más de estas glucoespecies indica que el EAC del sujeto ha retrocedido.
55

Una disminución a lo largo del tiempo en el nivel o proporción de una o más de esas glucoespecies de glucoproteína

que se identifican en la tabla 6 o tabla 7 como subexpresadas en un sujeto con EAC en comparación con un sujeto con BE, en un sujeto diagnosticado con EAC, indica que el EAC del sujeto ha progresado a lo largo del tiempo, mientras que un aumento de una o más de estas glucoespecies indica que el EAC del sujeto ha retrocedido.

5 En algunos casos, se evalúa el nivel o la proporción de más de una glucoespecie identificada anteriormente para determinar la presencia o progresión de EAC en un sujeto. Por ejemplo, se pueden evaluar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más glucoespecies. Por tanto, puede evaluarse un panel de glucoespecies para determinar un "perfil de glucoproteínas" para un sujeto. En algunos aspectos de la divulgación, este perfil se puede comparar con un perfil correspondiente de un sujeto de control o un grupo de sujetos de control para determinar la presencia o progresión de EAC, donde un cambio en el perfil resultante de aumentos o disminuciones en los niveles o las proporciones de las diversas glucoespecies, como se describió anteriormente, indica la presencia o progresión de EAC.

3. Métodos para evaluar los niveles de biomarcadores

15 Los niveles de glucoespecies identificadas en el presente documento como biomarcadores útiles para detectar la probabilidad de la presencia o ausencia de, o supervisar el progreso de, EAC y BE, pueden evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, métodos que detectan la unión de una glucoespecie a una molécula de unión a glicano, tal como una lectina, un anticuerpo glucoespecífico o un aptámero glucoespecífico que es selectivo y/o específico para la glucoespecie, tales como transferencias de Western, ELISA y técnicas basadas en microarrays. También se pueden usar métodos espectroscópicos para evaluar el nivel de una glucoespecie en una muestra.

20 El nivel de una o más glucoespecies como se describe en el presente documento se evalúa en una muestra biológica de un sujeto. Más típicamente, la muestra biológica es una muestra de sangre, suero, plasma o fracción de sangre, aunque se contemplan otros tipos de muestras. La muestra puede obtenerse del sujeto antes o después del diagnóstico de BE o EAC. Por ejemplo, en los métodos de la presente divulgación que se usan para detectar BE o EAC, la muestra puede obtenerse de un sujeto antes o después de que ese sujeto haya sido diagnosticado con o haya tenido BE o EAC. En los métodos de la presente divulgación que se usan para supervisar el progreso de la enfermedad, la muestra se obtiene del sujeto después de que se le haya diagnosticado que tiene o haya tenido BE o EAC. Por ejemplo, en algunos casos, el sujeto ha sido diagnosticado con BE o EAC, a continuación se ha evaluado que ha curado la enfermedad antes de tomar la muestra para evaluar los niveles de una o más glucoespecies. En casos en los que se ha diagnosticado que el sujeto tiene o ha tenido BE o EAC, el sujeto puede haberse sometido o estar sometiéndose a un tratamiento, tal como un tratamiento quirúrgico o médico. Se pueden tomar una o más muestras del sujeto en uno o más puntos temporales. Por ejemplo, para supervisar el progreso de la enfermedad, se toman al menos dos muestras en dos puntos temporales diferentes, para comparar los niveles de una o más glucoproteínas a lo largo del tiempo. En ejemplos particulares, se toman 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más muestras del sujeto durante un período de días, semanas, meses o años.

35 En aspectos particulares de los métodos de la divulgación, el nivel de una glucoespecie se evalúa detectando la unión de la glucoespecie a una molécula de unión a glicano apropiada. En un ejemplo, la molécula de unión a glicano es una lectina. Las lectinas son proteínas o glucoproteínas que se unen a toda o parte de la estructura de un glicano. Una lectina puede unirse a un resto de glicano específico que es parte de una glucoproteína u otra molécula que contiene glicano, tal como un glucolípido, glucosfosfatidilinositol o glucosaminoglicano. Las lectinas son capaces de unirse a glicanos específicos. Ventajosamente, la alta especificidad de una lectina por un resto de glicano particular facilita la precipitación, el aislamiento y/o la detección de glucoproteínas con un único tipo particular de glucosilación de o en una muestra biológica, uniéndose específicamente a esos tipos de glucosilación.

45 Las lectinas útiles para unirse a glucoespecies de glucoproteínas descritas en el presente documento para determinar los niveles de glucoespecies en una muestra incluyen lectina de *Bauhinia purpurea* (BPL), aglutinina de *Erythrina cristagalli* (ECA), jacalina (JAC), aglutinina de soja (SBA), aglutinina de *Helix pomatia* (HPA), aglutinina de *Wisteria floribunda* (WFA), lectina de *Datura stramonium* (DSA), aglutinina de *Helix aspersa* (HAA), lectina de *Solanum tuberosum* (STL), aglutinina de germen de trigo (WGA), concanavalina A (ConA), lectina de *Galanthus nivalis* (GNL), lectina de *Narcissus pseudonarcissus* (NPL), lectina de *Aleuria aurantia* (AAL), aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), aglutinina-I de *Ulex europeus* (UEA), aglutinina-II de *Maackia amurensis* (MAA), aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA), fitohemaglutinina eritroaglutinante (E-PHA) y fitohemaglutinina leucoaglutinante (L-PHA). Por ejemplo, puede usarse AAL para detectar los niveles de cualquier glucoproteína de unión a AAL, tal como AAL-gelsolina y componente C9 del complemento de unión a AAL. De manera similar, puede usarse PSA para detectar los niveles de cualquier glucoproteína de unión a PSA, incluyendo, pero sin limitarse a, C5 del complemento de unión a PSA y la proteína 4 de unión a retinol de unión a PSA.

55 Los ensayos y técnicas para detectar la unión de una glucoespecie a una lectina son bien conocidos en la técnica, y cualquier ensayo o técnica de este tipo puede usarse en los métodos de la presente divulgación. En un ejemplo, se usa espectrometría de masas acoplada a matriz de perlas magnéticas con lectina (LeMBA-MS), como describen Choi et al. (Electrophoresis (2011) 32, 3564-3575) y también a continuación en el ejemplo 1. En otros ejemplos, se usan inmunoensayos que utilizan lectina para capturar la glucoproteína con una sola glucosilación y un anticuerpo específico de glucoproteína para detectar y cuantificar la glucoproteína capturada. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, transferencias de Western, ELISA, ensayos de lectina-AlphaLISA e inmunofluorescencia. Por ejemplo, los

ELISA basados en lectina (o ensayos de inmovilización basados en lectina (LIA)) pueden implicar recubrir una superficie, tal como una placa de múltiples pocillos, con un anticuerpo específico para la cadena principal polipeptídica de la glucoproteína y añadir a continuación la muestra biológica que contiene la glucoproteína para formar un complejo inmovilizado. A continuación, el complejo se pone en contacto con la lectina biotinilada apropiada y se detecta usando estreptavidina. En otro ejemplo, la placa se recubre con lectina y la muestra biológica se añade para formar complejos de lectina-glucoproteína, que a continuación se detectan usando anticuerpos específicos para la estructura polipeptídica de la glucoproteína. Estos tipos de técnicas pueden modificarse para su uso en aplicaciones clínicas y de diagnóstico que requieren alta sensibilidad y precisión con un coste relativamente bajo. Por ejemplo, se pueden usar analizadores automáticos basados en la unión en fase líquida para detectar y cuantificar glucoproteínas específicas en una muestra biológica, tal como una muestra de suero. Choi et al. (Clinica Chimica Acta (2012) 413: 170-174) y Kagebayashi et al. (Anal Biochem (2009) 388: 306-311) describen el uso de inmunoensayos de microsistemas de análisis total (μ TAS), realizados usando instrumentos totalmente automatizados tales como el inmunoanizador μ TASWako® i30 (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd) para detectar y cuantificar una glucoproteína de alfa-fetoproteína de unión a LCA, y dichos sistemas son fácilmente adaptables para detectar y cuantificar las glucoproteínas descritas en el presente documento.

Las técnicas que implican el uso de sensores electroquímicos también son adecuadas para su uso en los métodos de la divulgación para evaluar los niveles de una glucoespecie en una muestra mediante la unión de la glucoespecie a una lectina. Los sensores electroquímicos incluyen un elemento de biorreconocimiento, tal como una lectina, acoplado a una superficie transductora de electrodo. La interacción específica de una muestra biológica que contiene, por ejemplo, una glucoespecie, con su correspondiente lectina en la superficie del electrodo se detecta mediante la corriente eléctrica o los cambios de potencial que se producen en la interfaz transductor/biomolécula. Este tipo de técnica está descrita por Shah, A.K., Electrochemical detection of glycan and protein epitopes of glycoproteins in serum, Analyst, 2014, 139 (22): 5970-6, y es particularmente adecuada para aplicaciones en el punto de atención.

Por tanto, la presente divulgación también se refiere al uso de lectinas y composiciones que comprenden lectinas para detectar los niveles de una o más glucoespecies en una muestra biológica y, por tanto, al uso de lectinas para determinar la probabilidad de presencia o ausencia de, o supervisar el progreso de, EAC o BE en el sujeto. Por ejemplo, se proporcionan usos de una lectina para determinar el nivel de una o más glucoespecies en una muestra, que comprenden poner en contacto la muestra con la lectina en condiciones que permitan la unión de la glucoespecie a la lectina y detectar y determinar el nivel de la glucoespecie. en la muestra, donde un nivel de la glucoespecie por encima o por debajo de un umbral predeterminado indica la presencia de EAC o BE, como se describió anteriormente en la sección 2. De manera similar, las lectinas se pueden usar para determinar la proporción del nivel de una glucoespecie en una muestra y respecto al nivel total de la glucoproteína, como se describió anteriormente, donde una proporción de la glucoespecie por encima o por debajo de un umbral predeterminado indica la presencia de EAC o BE, como se describió anteriormente en la sección 2.

En algunos de los métodos de la presente divulgación, se determina una proporción del nivel de una glucoespecie respecto al nivel total de la glucoproteína (es decir, el nivel combinado de todos los tipos de glucosilación de la glucoproteína) en una muestra. Por tanto, los métodos de la presente divulgación también pueden requerir evaluar el nivel total de una glucoproteína en una muestra. Puede usarse cualquier método para determinar el nivel de una glucoproteína, tal como la concentración o cantidad de una glucoproteína, en una muestra, y dichos métodos son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. Los métodos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos que utilizan anticuerpos específicos de glucoproteína para capturar las glucoproteínas y un anticuerpo secundario para detectar y cuantificar la glucoproteína capturada. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, transferencias de Western, ELISA e inmunofluorescencia. Los inmunoensayos de μ TAS descritos anteriormente también son adecuados para detectar y cuantificar niveles de una glucoproteína, al igual que las técnicas que implican el uso de sensores electroquímicos, como se describió anteriormente. En algunos aspectos de la divulgación, la detección y cuantificación de la glucoproteína se realiza simultáneamente con, y usando la misma plataforma que, la detección y cuantificación de la glucoespecie. Por ejemplo, los niveles de una glucoespecie particular y los niveles totales de la glucoproteína pueden evaluarse simultáneamente usando los inmunoensayos de μ TAS mencionados anteriormente y descritos por Choi et al. (Clinica Chimica Acta (2012) 413: 170-174) y Kagebayashi et al. (Anal Biochem (2009) 388: 306-311).

Se puede determinar que una glucoespecie es un marcador multivariado, es decir, expresado diferencialmente en una variedad de formas, por ejemplo, entre sujetos o grupos de sujetos con diferentes afecciones si la presencia o ausencia o el nivel medio o mediano o la concentración de la glucoespecie en los diferentes sujetos o grupos de sujetos se calcula como estadísticamente significativo. Las pruebas habituales de significación estadística incluyen, entre otras, la prueba t, ANOVA, Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Mann-Whitney y la razón de posibilidades.

4. Kits

Todos los materiales y reactivos esenciales requeridos para detectar y determinar los niveles de una o más glucoespecies descritas en el presente documento pueden reunirse en un kit. Los kits también pueden incluir opcionalmente reactivos apropiados para la detección de marcas, controles positivos y negativos, soluciones de lavado, membranas de transferencia, tampones de dilución de placas de microtitulación y similares. Por ejemplo, un

5 ensayo inmunoabsorbente de unión a lectina puede incluir una lectina específica para la glucoespecie de la glucoproteína que se va a detectar, un anticuerpo específico para la glucoproteína (es decir, específico para la estructura polipeptídica de la glucosilación) y, opcionalmente, una glucoespecie, que puede ser usada como control positivo. También se pueden incluir tampones, soluciones de lavado o reactivos de bloqueo y enzimas y/o sustratos para la detección de marcas. El kit también puede presentar diversos dispositivos y reactivos para realizar uno de los ensayos descritos en el presente documento y/o instrucciones impresas para usar el kit para determinar el nivel de una glucoproteína.

5. Aplicaciones Terapéuticas

10 La presente divulgación también se extiende a la gestión y el tratamiento de sujetos con BE o EAC. Por ejemplo, cuando los métodos de la presente divulgación se usan para detectar la presencia de EAC o BE en un sujeto, los métodos pueden comprender además tratar el EAC o BE. Las terapias para EAC y BE son bien conocidas en la técnica y un médico experto puede determinar un régimen terapéutico apropiado para un sujeto en particular, en función de la gravedad de la enfermedad y otros factores, tales como la edad y la salud general del sujeto, y administrarlo apropiadamente sin experimentación indebida.

15 El tratamiento para BE puede incluir, por ejemplo, cambios en la dieta y ejercicio, administración de agentes terapéuticos para reducir el reflujo ácido, incluidos inhibidores de la bomba de protones, antiácidos o bloqueadores H₂, terapia fotodinámica (TFD) y resección endoscópica de la mucosa (EMR). Las opciones de tratamiento para EAC pueden variar según la fase del cáncer, es decir, fase 1, 2, 3, 4 o 5, y pueden incluir cirugía para extirpar la parte del esófago que contiene el cáncer (esofagectomía), quimioterapia, inmunoterapias y/o radioterapia.

20 Las radioterapias incluyen radiación y ondas que inducen daño al ADN, por ejemplo, irradiación γ , rayos X, irradiación UV, microondas, emisiones electrónicas, radioisótopos y similares. La terapia se puede lograr irradiando el sitio del tumor localizado con las formas de radiación descritas anteriormente. Es muy probable que todos estos factores produzcan una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas.

25 Los intervalos de dosis para los rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante períodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), hasta dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosis de radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, la intensidad y el tipo de radiación emitida y la captación por las células neoplásicas.

30 Los ejemplos no limitantes de radioterapias incluyen radioterapia de haz externo conformal (50-100 Gray administrados en fracciones durante 4-8 semanas), braquiterapia de dosis alta fraccionada o de una sola sesión, braquiterapia intersticial permanente, radioisótopos sistémicos (por ejemplo, estroncio 89). En algunos aspectos de la divulgación, la radioterapia puede administrarse en combinación con un agente radiosensibilizante. Los ejemplos ilustrativos de agentes radiosensibilizantes incluyen, pero no se limitan a, efaproxiral, etanidazol, fluosol, misonidazol, nimorazol, temoporfina y tirapazamina.

35 Los agentes quimioterapéuticos pueden seleccionarse de una o más de las siguientes categorías:

40 (i) fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y combinaciones de los mismos, como se usan en oncología médica, tales como agentes alquilantes (por ejemplo cis-platino, carboplatino, ciclofosfamida, mostaza nitrogenada, melfalán, clorambucilo, busulfano y nitrosoureas), antimetabolitos (por ejemplo, antifolatos tales como fluoropiridinas como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, arabinósido de citosina e hidroxiaurea, antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina) agentes antimetabólicos, (por ejemplo, alcaloides de la vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides como paclitaxel y docetaxel, e inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecán y camptotecina);

45 (ii) agentes citostáticos tales como antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno e idoxifeno), reguladores a la baja del receptor de estrógenos (por ejemplo, fulvestrant), antiandrógenos (por ejemplo, bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproterona), antagonistas de UH o agonistas de LHRH (por ejemplo, goserelina, leuprorelina y buserelina), progestágenos (por ejemplo, acetato de megestrol), inhibidores de aromatasas (por ejemplo, como anastrozol, letrozol, vorozol y exemestano) e inhibidores de 5 α -reductasa tales como finasterida;

50 (iii) agentes que inhiben la invasión de células cancerosas (por ejemplo, inhibidores de metaloproteinasas como marimastat e inhibidores de la función del receptor del activador del plasminógeno urocinasas);

55 (iv) inhibidores de la función del factor de crecimiento, por ejemplo dichos inhibidores incluyen anticuerpos para el factor de crecimiento, anticuerpos para el receptor del factor de crecimiento (por ejemplo, el anticuerpo anti-erbB2 trastuzumab [Herceptin™] y el anticuerpo anti-erbB1 cetuximab [C225]), inhibidores de farnesil transferasa, Inhibidores de MEK, inhibidores de tirosina cinasa e inhibidores de serina/treonina cinasa, por ejemplo, otros inhibidores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, otros inhibidores de tirosina cinasa de

la familia EGFR tales como N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (gefitinib, AZD1839), N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (erlotinib, OSI-774) y 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (CI 1033)), por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas y por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos;

(v) agentes anti-angiogénicos tales como aquellos que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular, (por ejemplo el anticuerpo anti-factor de crecimiento de células endoteliales vasculares bevacizumab [Avastin™], compuestos tales como los desvelados en las solicitudes de patente internacional WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 y WO 98/13354) y compuestos que funcionan mediante otros mecanismos (por ejemplo, linomida, inhibidores de la función de la integrina $\alpha\beta 3$ y angiostatina);

(vi) agentes dañinos vasculares tales como Combretastatina A4 y compuestos desvelados en las solicitudes de patente internacional WO 99/02166, WO00/40529, WO 00/41669, WO01/92224, WO02/04434 y WO02/08213;

(vii) terapias antisentido, por ejemplo aquellas que se dirigen a las dianas enumeradas anteriormente, tales como ISIS 2503, un antisentido anti-ras, y

(viii) enfoques de terapia génica, que incluyen, por ejemplo, enfoques para reemplazar genes aberrantes tales como p53 aberrante o GDEPT (terapia con profármacos enzimáticos dirigidos a genes) aberrante, tales como los que usan citosina desaminasa, timidina cinasa o una enzima nitrorreductasa bacteriana y enfoques para aumentar la tolerancia del paciente a la quimioterapia o la radioterapia, tal como la terapia génica de resistencia a múltiples fármacos.

Los enfoques de inmunoterapia incluyen, por ejemplo, enfoques *ex vivo* e *in vivo* para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales del paciente, tales como la transfección con citocinas tales como interleucina 2, interleucina 4 o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, enfoques para disminuir la anergia de los linfocitos T, enfoques que usan células inmunes transfectadas tales como células dendríticas transfectadas con citocinas, enfoques que usan líneas de células tumorales transfectadas con citocinas y enfoques que usan anticuerpos antiidiotípicos. Estos enfoques generalmente se basan en el uso de células y moléculas efectoras inmunitarias para atacar y destruir las células cancerosas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula neoplásica. El anticuerpo solo puede servir como efector de la terapia o puede reclutar otras células para facilitar realmente la muerte celular. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina de la tos ferina, etc.) y servir simplemente como agente de dirección. Como alternativa, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula de superficie que interactúa, directa o indirectamente, con una célula diana neoplásica. Diversas células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y linfocitos citolíticos naturales.

Ejemplos de otras terapias contra el cáncer incluyen fototerapia, crioterapia, terapia con toxinas o terapia pro-apoptosis. Un experto en la materia sabría que esta lista no es exhaustiva de los tipos de modalidades de tratamiento disponibles para el cáncer y otras lesiones hiperplásicas.

En casos en los que el cáncer es positivo para HER2, el tratamiento también puede incluir la administración de un anticuerpo anti-HER2, tal como trastuzumab.

Cuando los métodos de la presente divulgación se usan para supervisar el progreso de EAC o BE en un sujeto que se ha sometido o se está sometiendo a tratamiento, y/o evaluar la eficacia del tratamiento, los métodos también pueden incluir modificar o alterar el tratamiento. Por ejemplo, si el nivel o la proporción de una o más glucoespecies identificadas en el presente documento indica que la enfermedad ha progresado y el protocolo de tratamiento actual o anterior ha sido ineficaz, un médico experto puede diseñar un protocolo de tratamiento modificado o alterado. Por ejemplo, si el sujeto se ha sometido a cirugía para extirpar parte del esófago, y el nivel o proporción de una o más glucoespecies identificadas en el presente documento indica que la enfermedad ha progresado después de la cirugía, al sujeto se le puede administrar quimioterapia y/o radioterapia. Por el contrario, si el nivel o la proporción de una o más glucoespecies identificadas en el presente documento indica que la enfermedad ha retrocedido y el protocolo de tratamiento actual o anterior ha sido eficaz, un médico experto puede continuar con el protocolo de tratamiento actual o anterior para continuar la regresión de la enfermedad, o puede optar por reducir o interrumpir el protocolo de tratamiento actual o anterior. Además, los métodos de la presente divulgación también pueden usarse para determinar la probabilidad de que un sujeto que se ha sometido a un régimen de tratamiento (por ejemplo, cirugía) tenga una recidiva de EAC o BE. Preferentemente, el sujeto sería supervisado en un momento después del régimen de tratamiento (por ejemplo, después de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses 6 meses o más de 6 meses) para determinar la probabilidad de que el sujeto tenga una recidiva de EAC o BE.

Típicamente, los agentes terapéuticos como los descritos anteriormente, por ejemplo, se administrarán en composiciones farmacéuticas junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y en una cantidad eficaz para lograr su fin pretendido. La dosis de compuestos activos administrada a un sujeto debe ser suficiente para lograr una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo, tal como una reducción o alivio de los síntomas de EAC o

BE. La cantidad de los compuestos farmacéuticamente activos a administrar puede depender del sujeto a tratar, incluyendo de la edad, el sexo, el peso y el estado general de salud del mismo. A este respecto, las cantidades precisas del o de los compuestos activos para la administración dependerán del criterio del médico.

6. Métodos de supervisión del tratamiento

5 La presente divulgación se puede poner en práctica en el campo de la medicina predictiva con el fin de diagnosticar o supervisar la presencia o el desarrollo de una afección seleccionada de EAC o BE en un sujeto, y/o supervisar la respuesta a la eficacia de la terapia.

10 Los perfiles de glucoespecies de la presente divulgación permiten además la determinación de criterios de valoración en estudios farmacológicos aplicados. Por ejemplo, los ensayos clínicos pueden tardar muchos meses o incluso años en establecer los parámetros farmacológicos para que un medicamento se use en el tratamiento o la prevención de EAC o BE. Sin embargo, estos parámetros pueden estar asociados con un perfil de glucoespecies asociado con un estado de salud (por ejemplo, HC). Por tanto, el ensayo clínico puede acelerarse seleccionando un régimen de tratamiento (por ejemplo, medicamentos y parámetros farmacéuticos), que da como resultado un perfil de glucoespecies asociado con el estado de salud deseado (por ejemplo, HC). Esto se puede determinar, por ejemplo, (1) proporcionando una correlación de un perfil de glucoespecies de referencia con la probabilidad de tener HC, (2) obteniendo un perfil de glucoespecies correspondiente de un sujeto que tiene EAC o BE, después del tratamiento con un régimen de tratamiento, donde una similitud del perfil de glucoespecies del sujeto después del tratamiento con el perfil de glucoespecies de referencia indica la probabilidad de que el régimen de tratamiento sea eficaz para cambiar el estado de salud del sujeto al estado de salud deseado (por ejemplo, HC). Este aspecto de la presente divulgación proporciona de manera ventajosa métodos para controlar la eficacia de un régimen de tratamiento particular en un sujeto (por ejemplo, en el contexto de un ensayo clínico) ya diagnosticado con una afección seleccionada de EAC o BE. Estos métodos aprovechan los biomarcadores de glucoespecies que se correlacionan con la eficacia del tratamiento, por ejemplo, para determinar si el perfil de glucoespecies de un sujeto sometido a tratamiento se normaliza parcial o completamente durante el ciclo o después de la terapia o muestra cambios asociados con la capacidad de respuesta a la terapia.

25 Los perfiles de glucoespecies permiten además la estratificación de los pacientes antes de la inscripción en estudios farmacológicos aplicados. Por ejemplo, un ensayo clínico puede acelerarse seleccionando *a priori* pacientes con un perfil de glucoespecies particular que se beneficiarían más de un régimen de tratamiento particular (por ejemplo, medicamentos y parámetros farmacéuticos). Por ejemplo, la inscripción de pacientes en un ensayo clínico que pruebe la eficacia de una nueva terapia contra el cáncer en EAC incluiría mejor a pacientes con un perfil de glucoespecies que indicara que tenían EAC en lugar de BE y, como tales, los pacientes seleccionados probablemente se beneficiarían de la nueva terapia.

30 Por tanto, la divulgación proporciona métodos para correlacionar un perfil de glucoespecies de referencia con un régimen de tratamiento eficaz para una afección seleccionada de EAC o BE, donde el perfil de glucoespecies de referencia evalúa al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) biomarcador de glucoespecies. Estos métodos generalmente comprenden: (a) determinar un perfil de glucoespecies de muestra de un sujeto con la afección antes del tratamiento (es decir, situación inicial), donde el perfil de glucoespecies de muestra evalúa, para un biomarcador de glucoespecies individual en el perfil de glucoespecies de referencia, un biomarcador de glucoespecies correspondiente, y correlacionar el perfil de glucoespecies de muestra con un régimen de tratamiento que sea eficaz para tratar esa afección.

35 La divulgación proporciona además métodos de determinación de si un régimen de tratamiento es eficaz para tratar a un sujeto con una afección seleccionada entre EAC o BE. Estos métodos generalmente comprenden: (a) correlacionar un perfil de glucoespecies de referencia antes del tratamiento (es decir, situación inicial) con un régimen de tratamiento eficaz para la afección, donde el perfil de glucoespecies de referencia evalúa al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) biomarcador de glucoespecies, y (b) obtener un perfil de glucoespecies de muestra del sujeto después del tratamiento, donde el perfil de glucoespecies de muestra evalúa, para un biomarcador de glucoespecies individual en el perfil de glucoespecies de referencia, un biomarcador de glucoespecies correspondiente, y donde el perfil de glucoespecies de muestra después del tratamiento indica si el régimen de tratamiento es eficaz para tratar la afección en el sujeto.

40 La divulgación también se puede poner en práctica para evaluar si un sujeto responde (es decir, una respuesta positiva) o no responde (es decir, sin respuesta) a un régimen de tratamiento. Este aspecto de la divulgación proporciona métodos para correlacionar un perfil de glucoespecies con una respuesta positiva y/o negativa a un régimen de tratamiento. Estos métodos generalmente comprenden: (a) obtener un perfil de glucoespecies de un sujeto con una afección seleccionada de EAC o BE después del comienzo del régimen de tratamiento, donde el perfil de glucoespecies evalúa al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) biomarcador de glucoespecies, y (b) correlacionar las glucoespecies del sujeto con una respuesta positiva y/o negativa al régimen de tratamiento.

45 La divulgación también proporciona métodos de determinación de una respuesta positiva y/o negativa a un régimen de tratamiento por un sujeto con una afección seleccionada de EAC o BE. Estos métodos generalmente

comprenden: (a) correlacionar un perfil de glucoespecies de referencia con una respuesta positiva y/o negativa al régimen de tratamiento, donde el perfil de glucoespecies de referencia evalúa al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) biomarcador de glucoespecies, y (b) determinar un perfil de glucoespecies de muestra del sujeto, donde el perfil de glucoespecies de muestra del sujeto evalúa, para un biomarcador de glucoespecies individual en el perfil de glucoespecies de referencia, un biomarcador de glucoespecies correspondiente e indica si el sujeto está respondiendo al régimen de tratamiento.

En algunos aspectos de la divulgación, los métodos comprenden además determinar un primer perfil de glucoespecies de muestra del sujeto antes de comenzar el régimen de tratamiento (es decir, un perfil inicial), donde el primer perfil de glucoespecies de muestra evalúa al menos un (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) biomarcador de glucoespecies, y comparar el primer perfil de glucoespecies de muestra con un segundo perfil de glucoespecies de muestra del sujeto después del inicio del régimen de tratamiento, donde el segundo perfil de glucoespecies de muestra evalúa, para un biomarcador de glucoespecies individual en el primer perfil de glucoespecies de muestra, un biomarcador de glucoespecies correspondiente. Este aspecto de la divulgación se puede poner en práctica para identificar pacientes que responden o que no responden relativamente temprano en el proceso de tratamiento, es decir, antes de las manifestaciones clínicas de eficacia. De esta manera, el régimen de tratamiento se puede interrumpir opcionalmente, se puede implementar un protocolo de tratamiento diferente y/o se puede administrar una terapia complementaria. Por tanto, en algunos aspectos de la divulgación, se obtiene un perfil de glucoespecies de muestra en aproximadamente 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 4 meses, seis meses o más desde el inicio de la terapia.

Con el fin de que la divulgación pueda entenderse y ponerse en práctica fácilmente, ahora se describirán aspectos preferidos particulares por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Identificación de biomarcadores para EAC

Para identificar biomarcadores para EAC y BE, se evaluó la abundancia de proteínas con estructuras de glucosilación alteradas (es decir, diferentes glucoespecies) en el suero de pacientes sanos, pacientes con BE y pacientes con EAC mediante espectrometría de masas acoplada a matriz de perlas magnéticas con lectina (LeMBA-MS) esencialmente como lo describen Choi et al. (Electrophoresis (2011) 32, 3564-3575). En la figura 1 se muestra un esquema del protocolo de identificación de biomarcadores.

Materiales y métodos

Preparación de la muestra

En la fase de descubrimiento, se analizaron 29 muestras de suero (tabla 8), que consistían en 10 de cada uno de BE, EAC y 9 controles sanos (4 confirmados sin BE del Study of Digestive Health y 6 controles de población del Australian Cancer Study). Uno de los pacientes de control desarrolló posteriormente BE, por lo que los datos se excluyeron de un análisis adicional. Todos los pacientes eran varones, lo que refleja el predominio masculino de EAC y BE.

Las muestras de suero se desnaturalizaron calentando en tampón desnaturalizante (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, SDS al 1 % p/v, Triton X-100 al 5 % v/v y ditiotreitól (DTT) 20 mM a 60 °C durante 30 minutos, seguido de alquilación con yodoacetamida 100 mM durante 1 hora a 37 °C, manteniendo un estado oscuro, antes de la dilución para la extracción de lectina. Se incubaron 50 µg de muestra de suero alquilado por reacción con perlas conjugadas con lectina en 100 µl de tampón de unión (Tris-HCl pH 7,4, NaCl 300 mM, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, SDS al 0,05 % p/v, Triton X-100 al 1 % v/v) a 4 °C durante 1 hora en un agitador de placas.

Después de la captura de glucoproteína, las perlas se lavaron tres veces con tampón de unión, siete veces con bicarbonato de amonio 50 mM con tres cambios de placas durante las etapas de lavado. Se añadieron 0,95 µg de tripsina de grado de secuenciación en 20 µl de bicarbonato de amonio 50 mM a cada mezcla de reacción y se incubaron a 37 °C durante la noche para la digestión con tripsina sobre la perla. Al día siguiente, los péptidos digeridos se transfirieron a una nueva placa. Las perlas se lavaron con un volumen equivalente de bicarbonato de amonio 50 mM y el sobrenadante se combinó con péptidos digeridos. Las muestras de péptidos reunidas se secaron al vacío y las placas se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior. Se utilizó el manipulador de líquidos Bravo (Agilent Technologies) para hacer que la plataforma tuviera un alto rendimiento.

LC-MS/MS y búsqueda en bases de datos para el descubrimiento de biomarcadores

Las muestras se resuspenden en 20 µl de ácido fórmico al 0,1 % v/v para LC-MS/MS. Dependiendo de la lectina utilizada para la extracción, la cantidad óptima de péptidos tripticos se sometió a LC-MS usando Agilent 6520 QTOF junto con un Chip Cube y 1200 HPLC (se cargaron 9 µl para HAA, HPA y UEA, 6 µl para NPL, STL, GNL, 5 µl para

5 BPL, DSA, ECA, MAA, SBA, WFA y WGA, 4 μ l para AAL, SNA, LPHA, PSA y JAC, 1 μ l para EPHA y ConA). La nanobomba se ajustó a 0,3 μ l/min y la bomba capilar a 4 μ l/min. El chip HPLA usado contiene una columna de captura C18 de 160 nl y una columna analítica C18 de 300 Å de 75 μ m x 150 mm (G4240-62010 Agilent Technologies). El tampón A era ácido fórmico al 0,1 % v/v y el tampón B era acetonitrilo al 90 % v/v que contenía ácido fórmico al 0,1 % v/v. Los péptidos se eluyeron de la columna usando un gradiente desde el 6 % de B hasta el 46 % de B a los 45 minutos. La nanobomba % B se incrementó al 95 % de B a los 45,5 min y se mantuvo al nivel hasta 55,5 min. Disminuyó al 6 % de B original a los 58,5 minutos. La espectrometría de masas se operó en un intervalo dinámico extendido de 2 GHz y se programó para adquirir 8 espectros de MS1 precursores por segundo y 4 espectros de MS/MS para cada espectro de MS. La exclusión dinámica se aplicó después de 2 MS/MS en 0,25 minutos. Se aplicó la exclusión de los péptidos de lectina. El QTOF se ajustó y calibró antes del análisis. Se usaron cien femtomoles/ μ l de péptidos de albúmina de suero bovino predigeridos como control de calidad, antes y después de cada placa. Los niveles de iones de referencia 299,2945 y 1221,9906 se mantuvieron en un mínimo de 5000 y 1000 recuentos respectivamente.

15 Para tener en cuenta las variaciones experimentales, se añadieron a cada muestra 10 pmol de ovoalbúmina de pollo, una glucoproteína que se une a cada lectina, como patrón interno para calcular un factor de normalización para cada proteína identificada. A continuación se realizó LeMBA-MS/MS aislando primero las glucoproteínas séricas usando una matriz de perlas magnéticas con lectina que incluía un panel de 20 lectinas (que se muestra en la tabla 9), realizando a continuación una digestión triptica de las glucoproteínas en la perla seguida de LC-MS/MS usando un par Agilent 6520 QTOF con un Chip CUBE y 1200 HPLC, como describen Choi et al. (Electrophoresis (2011) 32, 3564-3575). El archivo de datos sin procesar resultante se procesó con el software Spectrum Mill para la búsqueda en bases de datos contra la base de datos humana SwissProt para identificar las glucoproteínas.

TABLA 8

| MUESTRAS DE PACIENTES EN FASE DE DESCUBRIMIENTO | | | |
|---|--------------|-------------|--------------|
| Parámetro | Afección | | |
| | Sano (n = 9) | BE (n = 10) | EAC (n = 10) |
| Edad en años (mediana \pm SD) | 66 \pm 10 | 62 \pm 15 | 66 \pm 8 |
| Complicaciones cardiovasculares | 5 | 3 | 3 |
| Diabetes tipo 2 | 1 | 0 | 1 |
| Gastritis | 1 | 1 | 1 |
| Úlcera péptica | 3 | 2 | 3 |
| Otra neoplasia | 1 | 2 | 2 |

TABLA 9

| LECTINAS USADAS EN LEMBA-MS | | | |
|-----------------------------|---|-----------------------------|--|
| Abreviatura de lectina | Fuente de lectina | Reactividad general | Dianas(s) conocida(s) |
| BPL | Lectina de <i>Bauhinia purpurea</i> | α/β -D-Galactosa | Gal β 1-3GalNAc |
| ECA | Aglutinina de <i>Erythrina cristagalli</i> | α/β -D-Galactosa | Gal β 1-3GalNAc |
| JAC | Jacalina | α/β -D-galactosa | Gal α 1-6GalNAc y Gal β 1-3GalNAc |
| SBA | Aglutinina de soja | D-N-Acetilgalactosamina | GalNAc α 1-3Gal |
| HPA | Aglutinina de <i>Helix pomatia</i> | D-N-Acetilgalactosamina | α -GalNAc |
| WFA | Aglutinina de <i>Wisteria floribunda</i> | D-N-Acetilgalactosamina | GalNAc α 1-6Gal y GalNAc α 1-3GalNAc |
| DSA | Lectina de <i>Datura stramonium</i> | D-N-Acetilglucosamina | Oligómeros de β 1-4GlcNAc |
| HAA | Aglutinina de <i>Helix aspersa</i> | D-N-Acetilglucosamina | α -GlcNAc y α -GalNAc |
| STL | Lectina de <i>Solanum tuberosum</i> | D-N-Acetilglucosamina | Oligómeros de GlcNAc β 1-4GlcNAc |
| WGA | Aglutinina de germen de trigo | D-N-Acetilglucosamina | GlcNAc β 1-4GlcNAc y Neu5Ac |
| ConA | Concanavalina A | D-Manosa | α -Man, α -Glc y α -GlcNAc |
| GNL | Lectina de <i>Galanthus nivalis</i> | D-Manosa | Man α 1-3Man |
| NPL | Lectina de <i>Narcissus pseudonarcissus</i> | D-Manosa | Man α 1-6Man |
| AAL | Lectina de <i>Aleuria aurantia</i> | α -L-Fucosa | Fuc con enlaces α 1-2, -3, -6 |
| PSA | Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> | α -L-Fucosa | Fuc α 1-6GlcNAc de glicanos enlazados a N |
| UEA | Aglutinina I de <i>Ulex europeus</i> | α -L-Fucosa | Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc |
| MAA | Aglutinina II de <i>Maackia amurensis</i> | Ácido siálico | Enlaces Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3 |
| SNA | Aglutinina de <i>Sambucus nigra</i> | Ácido siálico | Enlaces Neu5Ac α 2-6 |
| E-PHA | Fitohemaglutinina eritroaglutinante | Especificidades complejas | GlcNAc biseccionante |
| L-PHA | Fitohemaglutinina leucoaglutinante | Especificidades complejas | β 1-6GlcNAc Tri/tetra-antenario |

5 Los datos multidimensionales de LeMBA-MS se almacenaron en la base de datos de GlycoSelector como pares de lectina-proteína con la intensidad de MS1 total medida para las proteínas y el archivo estándar interno correspondiente para la muestra. A continuación, se usó GlycoSelector para realizar la detección de valores atípicos de la muestra (figura 2) y la clasificación de las glucoproteínas mediante la comparación por pares de los grupos de pacientes. Se usó análisis discriminante de regresión de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLS-DA, Le Cao et al. (2011) BMC bioinformatics 12, 253) para seleccionar una lista ordenada de pares de lectina-proteína que se clasificaron entre 2 grupos. Como ejemplo, el gráfico de sPLS-DA de la figura 3a muestra una clara separación de

10

BE y EAC usando los 100 pares de lectina-proteína superiores. De los 100 pares de lectina-proteína superiores, 82 candidatos superaron el límite de estabilidad de 0,6 (figura 3b). Hubo una superposición considerable entre los candidatos a proteína lectina identificados entre los grupos de pacientes sanos frente a BE, BE frente a EAC y sanos frente a EAC (figura 3c). Cada una de las 20 lectinas usadas para el descubrimiento de biomarcadores mostró unión diferencial con al menos un candidato (figura 3d). Para la verificación ortogonal del cribado de LeMBA-MS mediante inmunotransferencia, se eligieron dos candidatos con anticuerpos disponibles, que mostraban una unión alterada a la lectina AAL. La AAL-haptoglobina fue uno de los candidatos estables mejor clasificados en el análisis de sPLS-DA entre sanos frente a EAC y BE frente a EAC mientras que AAL-gelsolina se identificó utilizando la característica de diferencia de unión de grupo de GlycoSelector como cambio de *on-off* entre BE frente a EAC y sanos frente a EAC. Usando el mismo conjunto de muestras de suero de descubrimiento, se realizó una extracción de lectina AAL y se midió la unión de haptoglobina y gelsolina mediante inmunotransferencia. Se cargó una muestra de suero de control en cada transferencia como normalizador entre membranas. La verificación del nivel de proteína por inmunotransferencia confirmó los resultados de MS/MS (figura 3e, 3f), pero mostró una mayor sensibilidad al detectar niveles bajos de gelsolina en todas las muestras de pacientes, cuando algunas fueron indetectables por MS/MS.

Para verificar de manera factible una lista de candidatos identificados en la criba de descubrimiento de biomarcadores en una cohorte independiente de muestras (20 sanos, 21 BE, 20 EAC, con todos los grupos con una mediana de edad de entre 60 y 64 años), se optimizó MRM-MS multiplexado para 41 candidatos a proteína diana y se realizó LeMBA usando 6 lectinas (AAL, EPHA, JAC, NPL, PSA y WGA). La linealidad del método MRM se determinó añadiendo el intervalo de diluciones del péptido estándar de isótopos estables (SIS), que abarca el intervalo de dilución de 3125 veces en una cantidad constante de muestra de extracción de LeMBA. La cantidad de péptido SIS añadido para cada uno de los cuatro péptidos se ajustó de tal manera que la respuesta de la mezcla de péptidos marcados con IX estuviera dentro del intervalo de 5 veces del péptido natural afín. La reproducibilidad del método MRM dinámico se determinó analizando la misma muestra por triplicado durante cuatro días consecutivos. El análisis mostró que el 86 % de los péptidos en el método MRM mostró un % de CV por debajo del 10 % mientras que el 9 % de los péptidos mostró un % de CV entre el 10-20 % y solo el 5 % de los péptidos estaban por encima del 20 %. Además, el % de CV para todo el análisis MRM-MS para SIS, así como el péptido de ovoalbúmina de pollo estándar interno natural, fue inferior al 20 %, lo que sugiere un rendimiento robusto del método LeMBA-MRM-MS. Para tener en cuenta cualquier variación durante las mediciones de espectrometría de masas y extracción de LeMBA, se usaron dos procedimientos de normalización. En primer lugar, la intensidad del péptido de ovoalbúmina natural se normalizó mediante el péptido de ovoalbúmina SIS añadido. En segundo lugar, la intensidad de todos los péptidos medidos de las proteínas diana se normalizó usando la intensidad normalizada del péptido de ovoalbúmina natural. Se realizó un análisis estadístico univariado mediante pruebas de Kruskal-Wallis para evaluar la significación estadística de cada uno de los candidatos. Se calculó el área bajo la característica operativa del receptor (AUROC) para medir el potencial diagnóstico de cada marcador y se realizó una comparación entre fenotipos sanos frente a BE, Be frente a EAC y sanos frente a EAC (véase la tabla 12).

Resultados

De un total de 246 candidatos a lectina-proteína cuantificados, 148 candidatos mostraron un valor p menor que 0,05.

La tabla 10 muestra el aumento o disminución relativa de proteínas glucosiladas diferencialmente ejemplares en el suero de pacientes con EAC en comparación con pacientes sanos, BE en comparación con pacientes sanos, y en el suero de pacientes con EAC en comparación con pacientes con BE, es decir, la abundancia relativa de la glucoespecie específica. Por ejemplo, ocho proteínas (P00751: factor B del complemento, P01011: alfa-1-antiquimotripsina, P01031: C5 del complemento, P02748: componente C9 del complemento, P02790: hemopexina, P04003: cadena alfa de la proteína de unión a C4b, P05155: inhibidor de la proteasa C1 plasmática, P05546: cofactor 2 de heparina) que tiene glicanos que facilitan la unión a JAC (es decir, la glucoespecie de unión a JAC del factor B del complemento, la glucoespecie de unión a JAC de alfa-1-antiquimotripsina, la glucoespecie de unión a JAC del C5 del complemento, la glucoespecie de unión a JAC del componente C9 del complemento, la glucoespecie de unión a JAC de hemopexina, la glucoespecie de unión a JAC de la cadena alfa de la proteína de unión a C4b y la glucoespecie de unión a JAC del inhibidor de la proteasa C1 plasmática, y la glucoespecie de unión a JAC del cofactor 2 de heparina) aumentaron en el suero de pacientes con EAC en comparación con pacientes sanos.

TABLA 10

| ABUNDANCIA RELATIVA DE GLUCOESPECIES | | | |
|--|--|----------------|--|
| Lectina (glicano) | Proteínas (por SwissProt Acc. No.) | | |
| | EAC frente a HC | BE frente a HC | EAC frente a BE |
| AAL (Fuc con enlaces α 1,2,3,6) | ↑ P02748 | | ↑ P00738, P01031, P02748, P10643 |
| | ↓ P06396 | | ↓ P04114, P06396 |
| PSA (Fuc α 1-6GlcNAc) | ↑ P00738, P02748 | | ↑ P00738, P01011, P02748, P01031, P10643 |
| | ↓ P06396 | | ↓ P06396 |
| EPHA (GlcNAc biseccionante) | ↑ P00738, P02748 | ↑ P01023 | ↑ P00738, P01011, P02748, P02787, P10643 |
| | ↓ P01023, P02765, P06396 | | ↓ P06396 |
| JAC (Gal α 1-6GalNAc, Gal β 1-3 GalNAc) | ↑ P00751, P01011, P01031, P02748, P02790, P04003, P05155, P05546 | ↑ P04114 | ↑ P00738, P00751, P01009, P01011, P01031, P02748, P04217, P10643 |
| | ↓ P06396 | | ↓ P06396 |
| NPL (Manosa α 1-3Man) | ↑ P00738, P01011, P02748, P04003 | ↑ P04114 | ↑ P02748 |
| | | | ↓ P04114, P06396, P43652 |
| WGA (GlcNAc β 1-4GlcNAc y Neu5Ac) | ↑ P00738, P02748, P01011 | | ↑ P00738, P02748 |
| | | | ↓ P06396 |

La figura 4 muestra la abundancia relativa de glucoespecies ejemplares que se demostró que aumentaron o disminuyeron significativamente en al menos dos de sujetos con EAC, BE y sanos, y que, por tanto, podrían usarse para distinguir entre pacientes sanos, pacientes precancerosos (BE) y pacientes con EAC y, por lo tanto, determinar la probabilidad de presencia o ausencia de EAC. Por ejemplo, las glucoespecies de gelsolina de unión a AAL (P06396) y gelsolina de unión a PSA estaban presentes en el suero de pacientes con EAC a niveles significativamente reducidos en comparación con el suero de pacientes con BE. Por el contrario, las glucoespecies componente C9 del complemento de unión a AAL (P02748), componente C9 del complemento de unión a AAL y haptoglobina de unión a EPHA (P00738) estaban presentes en el suero de pacientes con EAC a niveles significativamente mayores en comparación con el suero de pacientes con BE. Las figuras 3 muestran la abundancia relativa de glucoespecies ejemplares que demostraron tener un aumento o disminución estadísticamente significativo en la cantidad (según se evaluó usando una prueba ANOVA-Tukey) en el suero de pacientes con BE en comparación con pacientes sanos, y que, por lo tanto, podrían usarse para distinguir a los pacientes sanos de los pacientes precancerosos con EAC.

La figura 4 muestra los datos de LeMBA-MS para gelsolina. Específicamente, el eje Y muestra abundancia relativa (observe la escala logarítmica) y el eje X muestra la unión a cada una de las 20 lectinas, agrupadas en grupos de reactividad general. Las lectinas enmarcadas muestran una unión estadísticamente significativa diferente entre los grupos de BE y EAC (* $p < 0,05$, prueba de la t de Student). El gráfico muestra claramente que las glucoespecies de gelsolina que distinguen más claramente entre BE y EAC en función de su abundancia relativa, y en particular gelsolina de unión a NPL, gelsolina de unión a JAC, gelsolina de unión a PSA y gelsolina de unión a GNL, que se reducen significativamente en el suero de los pacientes con EAC en comparación con los pacientes con BE, lo que sugiere una reducción de múltiples estructuras de glicanos en gelsolina en los pacientes con EAC.

25

EJEMPLO 2

DETECCIÓN DE COMBINACIONES DE GLUCOESPECIES

5 Con el fin de determinar si se podría seleccionar un conjunto de marcadores particularmente robusto con el fin de mejorar la determinación de la probabilidad de presencia o ausencia de BE o EAC en un sujeto, se analizaron combinaciones de glucoespecies identificadas en la tabla relevante (tablas 1, 4 y 6).

10 Se descubrió que la potencia de la prueba de diagnóstico se podría mejorar midiendo un panel de dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco marcadores (véase la tabla 11). En particular, cuando se usan cuatro glucoespecies (componente C9 del complemento de unión a JAC, alfa-1B-gluco proteína de unión a EPHA, gelsolina de unión a EPHA, angiotensina de unión a WGA y alfa-2-macroglobulina) se miden entre sujetos con EAC y controles sanos, se puede lograr un AUC de hasta el 98,25 %.

TABLA 11

| Glucoespecie (EAC frente sano) | AUC |
|--|------------|
| P02748_JAC | 0,775 |
| P02748_JAC P04217_EPHA | 0,86 |
| P02748_JAC P04217_EPHA P06396_EPHA | 0,93 |
| P02748_JAC P04217_EPHA P06396_EPHA P01019_WGA | 0,9825 |
| P02748_JAC P04217_EPHA P06396_EPHA P01019_WGA P01023_NPL | 0,98 |
| P02748_JAC | 0,775 |
| P02748_JAC P06396_EPHA | 0,8475 |
| P02748_JAC P06396_EPHA P02748_WGA | 0,8525 |
| P02748_JAC P06396_EPHA P02748_WGA P02748_NPL | 0,8525 |
| P02748_JAC P06396_EPHA P02748_WGA P02748_NPL P06396_SNA | 0,86 |
| Glucoespecie (EAC frente a BE) | AUC |
| P02748_AAL | 0,8525 |
| P02748_AAL P02748_JAC | 0,835 |
| P02748_AAL P02748_JAC P02748_PSA | 0,8375 |
| P02748_AAL P02748_JAC P02748_PSA P02748_EPHA | 0,8425 |
| P02748_AAL P02748_JAC P02748_PSA P02748_EPHA P02748_WGA | 0,8375 |
| P02748_AAL | 0,8525 |
| P02748_AAL P04114_NPL | 0,91 |
| P02748_AAL P04114_NPL P04217_EPHA | 0,9625 |
| P02748_AAL P04114_NPL P04217_EPHA P01781_PSA | 0,975 |
| P02748_AAL P04114_NPL P04217_EPHA P01781_PSA P0C0L5_WGA | 0,985 |

TABLA 12

| EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GLUCOESPECIES | | | | | |
|--|---------------------------|--------|---|----------------------------------|--------------|
| BE frente a EAC | | | EAC frente a HC | | |
| Glucospecie (Lectina-SwissProt No) | Valor p de Kruskal-Wallis | AUROC | Glucospecie (Lectina-SwissProt No) | Valor p de Kruskal-Wallis | AUROC |
| AL_P00738 | 0,0398 | 0,69 | AAL_P00738 | 0,0583 | 0,675 |
| EPH_P00738 | 0,0200 | 0,715 | EPH_P00738 | 0,0305 | 0,7 |
| JAC_P00738 | 0,0483 | 0,6825 | NPL_P00738 | 0,0349 | 0,695 |
| PSA_P00738 | 0,0483 | 0,6825 | PSA_P00738 | 0,0425 | 0,6875 |
| WGA_P00738 | 0,0483 | 0,6825 | WGA_P00738 | 0,0215 | 0,7125 |
| JAC_P00751 | 0,0398 | 0,69 | JAC_P00751 | 0,0373 | 0,6925 |
| JAC_P01009 | 0,0453 | 0,685 | JAC_P01011 | 0,0305 | 0,7 |
| EPH_P01011 | 0,0265 | 0,705 | NPL_P01011 | 0,0305 | 0,7 |
| JAC_P01011 | 0,0102 | 0,705 | WGA_P01011 | 0,0080 | 0,745 |
| PSA_P01011 | 0,0425 | 0,6875 | EPH_P01023 | 0,0186 | 0,7175 |
| AAL_P01031 | 0,0483 | 0,6825 | JAC_P01031 | 0,0483 | 0,6825 |
| JAC_P01031 | 0,0398 | 0,69 | AAL_P02748 | 0,0161 | 0,7225 |
| PSA_P01031 | 0,0453 | 0,685 | EPH_P02748 | 0,0265 | 0,705 |
| AAL_P02748 | 0,0001 | 0,8525 | JAC_P02748 | 0,0029 | 0,775 |
| EPH_P02748 | 0,0003 | 0,8375 | NPL_P02748 | 0,0074 | 0,7475 |
| JAC_P02748 | 0,0007 | 0,8125 | PSA_P02748 | 0,0161 | 0,7225 |
| NPL_P02748 | 0,0049 | 0,76 | WGA_P02748 | 0,0049 | 0,76 |
| PSA_P02748 | 0,0008 | 0,81 | EPH_P02765 | 0,0483 | 0,6825 |
| WGA_P02748 | 0,0032 | 0,7725 | JAC_P02790 | 0,0200 | 0,715 |
| EPH_P02787 | 0,0326 | 0,6975 | JAC_P04003 | 0,0138 | 0,7275 |
| AAL_P04114 | 0,0483 | 0,6825 | JAC_P05155 | 0,0200 | 0,715 |
| NPL_P04114 | 0,0248 | 0,7075 | JAC_P05546 | 0,0483 | 0,6825 |
| JAC_P04217 | 0,0483 | 0,6825 | AAL_P06396 | 0,0265 | 0,705 |
| AAL_P06396 | 0,0087 | 0,7425 | EPH_P06396 | 0,0014 | 0,795 |
| EPH_P06396 | 0,0186 | 0,7175 | JAC_P06396 | 0,0200 | 0,715 |
| JAC_P06396 | 0,0305 | 0,7 | PSA_P06396 | 0,0110 | 0,73 |
| NPL_P06396 | 0,0173 | 0,72 | | | |
| PSA_P06396 | 0,0483 | 0,6825 | | | |
| WGA_P06396 | 0,0128 | 0,73 | | | |
| AAL_P_10643 | 0,0063 | 0,7525 | | | |
| | | | BE frente a HC | | |
| | | | Glucospecie (Lectina-SwissProt No) | Valor p de Kruskal-Wallis | AUROC |
| EPH_P10643 | 0,0398 | 0,69 | EPH_P01023 | 0,0248 | 0,7075 |
| JAC_P_10643 | 0,0094 | 0,74 | JAC_P04114 | 0,0305 | 0,7 |
| PSA_10643 | 0,0019 | 0,7875 | NPL_P04114 | 0,0215 | 0,7125 |
| NPL_P43652 | 0,0483 | 0,6825 | | | |

Aunque algunas glucospecies de gelsolina estaban presentes a niveles similares en el suero de pacientes sanos, BE y EAC (por ejemplo, gelsolina de unión a WGA), otros estaban presentes a niveles estadísticamente diferentes en los diversos grupos. Por ejemplo, las glucospecies caracterizadas por estar en el suero de pacientes con EAC en cantidades significativamente reducidas en comparación con los pacientes con BE (análisis estadístico usando la prueba de la t de Student), pero no estaban presentes en cantidades significativamente diferentes entre pacientes sanos y con BE. Estos resultados indicaron que hubo una reducción en muchas estructuras de glicanos diferentes, incluidos diversos glicanos que contenían D-Manosa, D-N-Acetilglucosamina, α/β -D-Galactosa y α -L-Fucosa, en las proteínas de gelsolina plasmática de pacientes con EAC en comparación con pacientes con BE.

Para excluir la posibilidad de que la pérdida de gelsolina glucosilada en EAC se debiera a una pérdida total de proteína gelsolina en el suero, se realizó una inmunotransferencia con un anticuerpo anti-gelsolina para medir el nivel de gelsolina total en algunas de las muestras de suero. Como se muestra en la figura 5, hubo una tendencia no significativa hacia un mayor nivel de gelsolina en el suero de pacientes con BE en comparación con pacientes sanos y con EAC, mientras que la cantidad de gelsolina de unión a AAL y de unión a PSA se redujo significativamente en pacientes con EAC. en comparación con pacientes sanos (como se indica por la unión de la gelsolina a las dos lectinas reactivas con fucosa, AAL y PSA).

EJEMPLO 3**VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES DE GLUCOESPECIES**

5 Con el fin de demostrar que los biomarcadores de glucoespecies pueden determinar de forma fiable la probabilidad de que un sujeto tenga una afección relevante, se seleccionaron varios biomarcadores para su validación en una cohorte de sujetos separada y distinta.

10 La tabla 13 muestra el aumento o disminución relativa de proteínas glucosiladas diferencialmente ejemplares en el suero de pacientes con EAC en comparación con pacientes sanos, BE en comparación con pacientes sanos, y en el suero de pacientes con EAC en comparación con pacientes con BE, es decir, la abundancia relativa de la glucoespecie específica. Por ejemplo, seis proteínas (P00738: haptoglobina, P00751: factor B del complemento, P01011: alfa-1-antiquimotripsina, P02748: componente C9 del complemento, P09871: subcomponente C1s del complemento y P10643: componente C7 del complemento) que tienen glicanos que facilitan la unión a EPHA (es decir, la glucoespecie de unión a EPHA de haptoglobina, la glucoespecie de unión a EPHA del factor B del complemento, la glucoespecie de unión a EPHA de alfa-1-antiquimotripsina, la glucoespecie de unión a JAC del componente C9 del complemento, la glucoespecie de unión a EPHA del subcomponente C1s del complemento y la glucoespecie de unión a EPHA del componente C7 del complemento) aumentaron en el suero de pacientes con EAC en comparación con pacientes sanos.

TABLA 13

| Lectina (glicano) | Proteínas (por SwissProt Acc. No.) | | |
|--|--|--|--|
| | EAC frente a HC | BE frente a HC | EAC frente a BE |
| AAL (Fuc con enlaces α 1,2,3,6) | ↑ P01009; P01011; P02748; P04217; P09871; P10643; P19652 | ↑ P51884 | ↑ P02748, P00734 |
| | ↓ P02679; P02753; P06396; P07225; P35858; P43652; Q96PD5 | | ↓ P02753 |
| EPHA (GlcNAc) | ↑ P00738; P00751; P01011; P02748; P09871; P10643 | ↑ P51884 | ↑ P00751, P02748 |
| biseccionante) | ↓ P02679; P02765; P06396; P33151; P68871; Q96PD5 | ↓ P00734; P02751; | ↓ P02749, P06396, P51884, Q15166 |
| JAC (Gal α 1-6GalNAc, Gal β 1-3 GalNAc) | ↑ P00738; P01009; P01011, P02748, P05155, P09871 | | ↑ P00450, P00734; P01011, P02748, P02790, P04217, P05155, P05156, P08603, P09871, P20851, Q14624 |
| | ↓ P02647; P02675; P02679; P02753; P02765; P02787; P06396; P07225; P03952; P06396; P07225; P29622; P33151; P35858; P68871; Q7Z7A1; Q96PD5 | ↑ O95445; P00734; P01019; P02647; P02675; P03952; P04114; P04196; P07225; P07357; P08603; P08697; P29622; P43652; P68871 | |
| NPL (Manosa α 1-3Man) | ↑ P00738, P01009; P01011, P02748, P02790; P04217 | ↑ P02749 | ↑ P02748 |
| | ↓ P02647; P02765; P02787, P06396; P07225; P27169; P33151; P35858; P43652; P68871; Q15166; Q96PD5 | ↑ P04114; P08697; P33151; P68871 | ↓ P06396 |

Materiales y métodos

20

Diseño del estudio e información de la muestra

Se recogieron muestras de suero de pacientes que dieron su consentimiento para que se sometieran al tracto gastrointestinal superior en Ochsner Health Systems, Nueva Orleans, EE. UU. El estudio fue aprobado por los Comités de Ética en Investigación en Humanos de Ochsner Health Systems y la Universidad de Queensland. El

diagnóstico del paciente fue de acuerdo con la práctica actual, endoscopia con histología de muestras de biopsia y clasificado como BE (esófago de Barrett), EAC (adenocarcinoma de esófago) o sano (es decir, sin BE/EAC). La tabla 14 describe las características clínicas de los pacientes. Las muestras se aleatorizaron antes de todos los experimentos. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

5

TABLA 14

| Variables | BE | EAC | HC |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Tamaño de muestra | 12 | 10 | 16 |
| Género (% de varones) | 83 % | 80 % | 75 % |
| Edad (mediana \pm SD) | 71 \pm 10 | 63 \pm 10 | 66 \pm 11 |
| Índice de masa corporal | | | |
| Sano (<25) | 7 | 2 | 2 |
| Sobrepeso (25-30) | 2 | 5 | 4 |
| Obeso (\geq 30) | 3 | 3 | 10 |

Materiales y métodos

10 Las Dynabeads activadas por MyOne™ Tosyl eran de Life Technologies. Las lectinas AAL, EPHA, JAC y NPL eran de Vector Laboratories. La tripsina de grado de secuenciación modificada era de Promega. Triton X-100 y la solución de dodecilsulfato de sodio eran de Bio-rad. Tris base, glicina y cloruro de sodio eran de Amresco. El hidrogenofosfato de disodio dihidratado, el dihidrogenofosfato de sodio dihidratado y el cloruro de calcio dihidratado eran de Ajax Finechem. El cloruro de manganeso era de Univar. El grado de gradiente de acetonitrilo CHROMASOLV® fue de Sigma. Todos los demás reactivos, incluidas las lectinas, no enumerados anteriormente eran de Sigma, a menos que se especifique lo contrario.

15

Metodologías

Las muestras de suero se cribaron usando el ensayo LeMBA-MRM-MS con cuatro lectinas (AAL, EPHA, JAC y NPL) como se NOTIFICÓ anteriormente en Shah et al. 2015 Mol. Cell. Proteomics 14, 3023-3039.

Matriz de perlas magnéticas con lectina (LeMBA)

20 Las lectinas se conjugaron con perlas magnéticas como se describió anteriormente en Shah et al. Mol. Cell. Proteomics 14, 3023-3039. (2, 3). Para cada experimento de extracción, se dispusieron perlas de lectina (AAL, EPHA, JAC y NPL) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Las muestras de suero (que permiten 50 μ g por extracción según lo medido por el ensayo de proteína BCA) se enriquecieron con 10 pmol de ovoalbúmina por reacción como patrón interno. La mezcla de proteínas séricas se desnaturizó y se redujo usando tampón desnaturizante (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, SDS al 1 % p/v, Triton X-100 al 5 % v/v y Ditiotreitil 20 mM) a 60 °C durante 30 minutos, seguido de alquilación con yodoacetamida 100 mM durante 1 hora a 37 °C en la oscuridad. La muestra de suero alquilada (50 μ g por reacción) se incubó con perlas conjugadas con lectina en 100 μ l de tampón de unión (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, SDS al 0,05 % p/v, Triton X-100 al 1 % v/v) a 4 °C durante 1 hora en un agitador de placas para permitir la unión de glucoproteína-lectina. A continuación, las perlas se lavaron secuencialmente con (i) tampón de unión 3 veces y (ii) bicarbonato de amonio 50 mM siete veces, incluyendo tres cambios de placa entre lavados. Para la digestión con tripsina sobre la perla, se añadieron 0,95 μ g de tripsina de grado de secuenciación en 20 μ l de bicarbonato de amonio 50 mM a cada mezcla de reacción y se incubaron a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, los péptidos digeridos se transfirieron a una nueva placa. Las perlas se lavaron con un volumen equivalente de bicarbonato de amonio 50 mM y el sobrenadante se combinó con péptidos digeridos. Las muestras de péptidos se secaron al vacío y las placas se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior. Se usó el manipulador de líquidos Bravo (Agilent Technologies) para hacer que la plataforma tuviera un alto rendimiento.

35

MRM-MS

40 El ensayo de espectrometría de masas-supervisión de reacción múltiple (MRM-MS) se realizó en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent Technologies 6490 acoplado con UHPLC infinito de flujo estándar 1290 equipado con una fuente ESI (corriente en chorro) de flujo estándar. Se desarrolló un ensayo MRM-MS personalizado para 114 proteínas diana y se usó para medir extracciones de cuatro lectinas (AAL, EPHA, JAC y NPL) para cada muestra de paciente de forma independiente. La estrategia detallada para el desarrollo del ensayo MRM-MS se describió en Shah et al. 2015 Mol. Cell. Proteomics 14, 3023-3039.

Desarrollo del método de LC

5 El sistema de UHPLC consistía en una columna cromatográfica de fase inversa AdvanceBio Peptide Mapping (150 x 2,1 mm d.i., 2,7 μ m, número de pieza 653750-902, Agilent Technologies) con una columna de protección de 5 mm de largo. La fase móvil A consistía en ácido fórmico al 0,1 % y la fase móvil B consistía en acetonitrilo al 100 % y ácido fórmico al 0,1 %. El sistema de UHPLC se hizo funcionar a 60 °C, con un caudal de 0,4 ml/min. El gradiente usado para la separación de péptidos fue el siguiente: 3 % de B a los 0 min; 35 % de B a los 40 min; 95 % de B a 40,50 min; 95 % de B a 44,50 min; 3 % de B a los 45 min; seguido del acondicionamiento de las columnas durante 4 min con B al 3 % antes de inyectar la siguiente muestra.

Configuración del espectrómetro de masas

10 El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6490 se hizo funcionar en modo de iones positivos y se controló con el software MassHunter Workstation de Agilent (versión B.06.00 build 6.0.6025.4 SP4). Los parámetros de adquisición de MRM fueron 150 V de RF de alta presión, 60 V de RF de baja presión, 4000 V de voltaje capilar, 300 V de voltaje de la boquilla, 11 l/min de flujo de gas envolvente a una temperatura de 250 al 3 °C, 15 l/min de flujo de gas de secado a una temperatura de 250 °C, flujo de gas del nebulizador de 30 psi, resolución de la unidad (0,7 Da de ancho completo a la mitad del máximo en el primer cuadrupolo (Q1) y el tercer cuadrupolo (Q3), y 200 V de delta EMV (+).

Muestras de cribado para la calificación LeMBA-MRM-MS

20 Se prepararon perlas de lectina suficientes para experimentos de calificación de biomarcadores en un solo lote para minimizar la variación experimental. Las muestras de suero se aleatorizaron para experimentos de LeMBA-MRM-MS. Las muestras de péptidos se enriquecieron con una mezcla de péptidos SIS que contenía 50 femtomoles de cada uno de SPAFTDLHLR, AVEVLPK y LTPLYELVK, 100 femtomoles de LSPIYNLVPVK, 200 femtomoles de NLAVSQVVHK, 500 femtomoles de cada uno de VASMASEK, ISQAVHAAHAEINEAGR y GSFEPVGVDAVSK, y 1000 femtomoles de cada uno de VTSIQDWVQK y LPPNVVEESAR.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

25 Los datos sin procesar del experimento de MRM-MS se procesaron usando Skyline. Todos los picos se verificaron manualmente para una integración correcta, y el área de los picos de cada péptido (suma de todas las transiciones) se exportó para un análisis adicional. En primer lugar, la intensidad del péptido en bruto se normalizó de acuerdo con la mezcla de péptidos SIS. Seguido de la normalización en dos etapas descrita en Shah et al. 2015 Mol. Cell. Proteomics 14, 3023-3039. Se realizaron análisis univariados, multivariados y de curva ROC utilizando Shiny mixOmics (<http://mixomics-projects.di.uq.edu.au/Shiny-dev/>) como se describe en Shah et al. 2015 Mol. Cell. Proteomics 14, 3023-3039.

EJEMPLO 4**DETECCIÓN DE COMBINACIONES ADICIONALES DE BIOMARCADORES DE GLUCOESPECIES**

35 Con el fin de determinar si se podría seleccionar un conjunto robusto adicional de marcadores con el fin de ayudar o mejorar la determinación de la probabilidad de presencia o ausencia de BE o EAC en un sujeto, se analizaron las combinaciones de glucoespecies identificadas en la tabla correspondiente (tablas 3, 5 y 7).

Se descubrió que la potencia de la prueba de diagnóstico podría mejorarse midiendo un panel de dos o más marcadores. En particular, cuando se miden siete glucoespecies entre sujetos con EAC y sujetos con BE, se puede lograr un AUC de hasta el 95 % (véase la tabla 15; y la figura 6).

40 **TABLA 15**

| Comparación | Biomarcadores de glucoespecies | AUROC |
|-----------------|--|--------|
| BE frente a EAC | (1) P00734_AAL; (2) P02748_JAC; (3) P02748_EPH (4) P06396_NPL; (5) P00734_JAC; (6) P00450_JAC; (7) P02748_NPL | 0,9500 |
| HC frente a EAC | (1) P01011_JAC; (2) P02748_EPH; (3) P01011_NPL; (4) P02748_JAC; (5) P01011 EPH; (6) P01011 AAL; (7) P02748_NPL; (8) P09871_EPH; (9) P02748_AAL; (10) P10643_EPH; (11) Q96PD5_NPL | 1,000 |
| HC frente a BE | (1) P51884-AAL; (2) P51884-EPH | 0,9111 |

REIVINDICACIONES

1. Un método para distinguir entre un estado sano (HC), adenocarcinoma de esófago (EAC) y esófago de Barrett (BE) en un sujeto, comprendiendo el método determinar en una muestra del sujeto el nivel de una glucoespecie de al menos una glucoproteína, glucoespecie que se expresa diferencialmente entre al menos dos de HC, EAC y BE, y determina la probabilidad de que el sujeto tenga o no HC, EAC o BE en función de si los niveles respectivos de la glucoespecies individual están por encima o por debajo de un umbral predeterminado correspondiente que se correlaciona con presencia o ausencia de HC, EAC o BE, donde la al menos una glucoproteína comprende el C9 del complemento.
2. El método de la reivindicación 1, donde la al menos una glucoproteína comprende el C9 del complemento y al menos una glucoproteína seleccionada del grupo que comprende o consiste en: afamina, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, alfa-1B-glicoproteína, alfa-2-HS-glicoproteína, alfa-2-macroglobulina, apolipoproteína B-100, beta-2-glicoproteína 1, cadena alfa de la proteína de unión a C4b, C5 del complemento, C7 del complemento, factor B del complemento, gelsolina, haptoglobina, hemopexina, inhibidor de proteasa C1 plasmática, paraoxonasa/arilesterasa 1 sérica y serotransferrina.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el nivel de una glucoespecie individual se determina poniendo en contacto la muestra con una molécula de unión a glicano específica para la glucoespecie, en condiciones que permiten la unión de la molécula de unión a glicano a la glucoespecie.
4. El método de la reivindicación 3, donde la molécula de unión a glicano se selecciona del grupo que consiste en una lectina, un anticuerpo glucoespecífico, un aptámero glucoespecífico, un péptido glucoespecífico y una molécula pequeña glucoespecífica.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la lectina se selecciona entre lectina de Aleuria aurantia (AAL), fitohemaglutinina eritroaglutinante (EPHA), jacalina (JAC), lectina de Narcissus pseudonarcissus (NPL), aglutinina de Pisum sativum (PSA), aglutinina de germen de trigo (WGA), lectina de Bauhinia purpurea (BPL), aglutinina de Erythrina cristagalli (ECA), aglutinina de soja (SBA), aglutinina de Helix pomatia (HPA), aglutinina de Wisteria floribunda (WFA), lectina de Datura stramonium (DSA), aglutinina de Helix aspersa (HAA) lectina de Solanum tuberosum (STL), concanavalina A (ConA), lectina de Galanthus nivalis (GNL), aglutinina I de Ulex europeus (UEA), aglutinina II de Maackia amurensis (MAA), aglutinina de Sambucus nigra (SNA) y fitohemaglutinina leucoaglutinante (LP).
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las glucoespecies individuales (es decir, definidas por la molécula de unión a glicano (por ejemplo, lectina) y la glucoproteína a la que se une) que se expresan diferencialmente entre EAC y HC se seleccionan de la tabla 1:

TABLA 1

| Lectina | Glucoproteína | |
|---------|---|---|
| | Sobreexpresada | Subexpresada |
| AAL | C9 del complemento | gelsolina |
| PSA | haptoglobina, C9 del complemento | gelsolina |
| EPHA | haptoglobina, C9 del complemento | gelsolina, alfa-2-macroglobulina, alfa-2-HS-glicoproteína |
| JAC | factor B del complemento, alfa-1-antiquimotripsina, C5 del complemento, C9 del complemento, hemopexina, cadena alfa de la proteína de unión a C4b, inhibidor de la proteasa C1 plasmática, cofactor 2 de heparina | gelsolina |
| NPL | haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, C9 del complemento, cadena alfa de la proteína de unión a C4b | |
| WGA | haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, C9 del complemento | |

7. El método de la reivindicación 6, en el que las glucoespecies individuales que se expresan diferencialmente entre EAC y HC se seleccionan de la tabla 2:

TABLA 2

| Lectina | Glucoproteína | |
|---------|--|------------------------------------|
| | Sobreexpresada | Subexpresada |
| AAL | C9 del complemento | gelsolina |
| EPHA | Haptoglobina, C9 del complemento | alfa-2-HS-glicoproteína, gelsolina |
| JAC | alfa-1-antiquimotripsina, C9 del complemento, inhibidor de la proteasa C1 plasmática | gelsolina |
| NPL | Haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, C9 del complemento | |

- 5 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las glucoespecies individuales (es decir, definidas por la molécula de unión a glicano (por ejemplo, lectina) y la glucoproteína a la que se une) que se expresan diferencialmente entre EAC y BE se seleccionan de la tabla 6:

TABLA 6

| Lectina | Glucoproteína | |
|---------|--|---|
| | Sobreexpresada | Subexpresada |
| AAL | haptoglobina, 5 del complemento, C9 del complemento, C7 del complemento | apolipoproteína B-100, gelsolina |
| PSA | haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, 5 del complemento, C9 del complemento, C7 del complemento | gelsolina |
| EPHA | haptoglobina, alfa-1-antiquimotripsina, C9 del complemento, serotransferrina, C7 del complemento | gelsolina |
| JAC | haptoglobina, factor B del complemento, alfa-1-antitripsina, alfa-1-antiquimotripsina, C5 del complemento, C9 del complemento, alfa-1B-glicoproteína, C7 del complemento | gelsolina |
| NPL | C9 del complemento | apolipoproteína B-100, gelsolina, afamina |
| WGA | haptoglobina, C9 del complemento | gelsolina |

- 10 9. El método de la reivindicación 8, donde las glucoespecies individuales (es decir, definidas por la molécula de unión a glicano (por ejemplo, lectina) y la glucoproteína a la que se une) que se expresan diferencialmente entre EAC y BE se seleccionan de: C9 del complemento de unión a AAL, C9 del complemento de unión a EPHA, C9 del complemento de unión a JAC, C9 del complemento de unión a NPL, alfa-1-antiquimotripsina de unión a JAC, alfa-1B-glicoproteína de unión a JAC, gelsolina de unión a NPL; gelsolina de unión a EPHA.
- 15 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las glucoespecies individuales (es decir, definidas por la molécula de unión a glicano (por ejemplo, lectina) y la glucoproteína a la que se une) que se expresan diferencialmente entre EAC y BE se seleccionan de la tabla 7:

TABLA 7

| Lectina | Glucoproteína | |
|---------|---|--|
| | Sobreexpresada | Subexpresada |
| AAL | protrombina, C9 del complemento | proteína 4 de unión a retinol |
| EPHA | factor B del complemento, C9 del complemento, | beta-2-glucoproteína 1, gelsolina, lumicán, paraoxonasa/lactonasa 3 sérica |
| JAC | ceruloplasmina, protrombina, alfa-1-antiquimotripsina, C9 del complemento, hemopexina, alfa-1B-glucoproteína, inhibidor de la proteasa C1 plasmática, factor I del complemento, factor H del complemento, subcomponente C1s del complemento, cadena beta de la proteína de unión a C4b, cadena pesada H4 del inhibidor de inter-alfa-tripsina | |
| NPL | C9 del complemento | gelsolina |

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende determinar el nivel de dos o más glucoespecies de la misma glucoproteína.

5 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende determinar el nivel de tres o más glucoespecies de la misma o diferente glucoproteína.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende determinar el nivel de cuatro o más glucoespecies de las mismas o diferentes glucoproteínas.

10 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende determinar el nivel de cinco o más glucoespecies de las mismas o diferentes glucoproteínas.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la al menos una glucoproteína comprende el C9 del complemento y al menos una glucoproteína seleccionada del grupo que comprende o consiste en gelsolina, alfa-1B-glucoproteína, angiotensinógeno y alfa-2-macroglobulina.

15

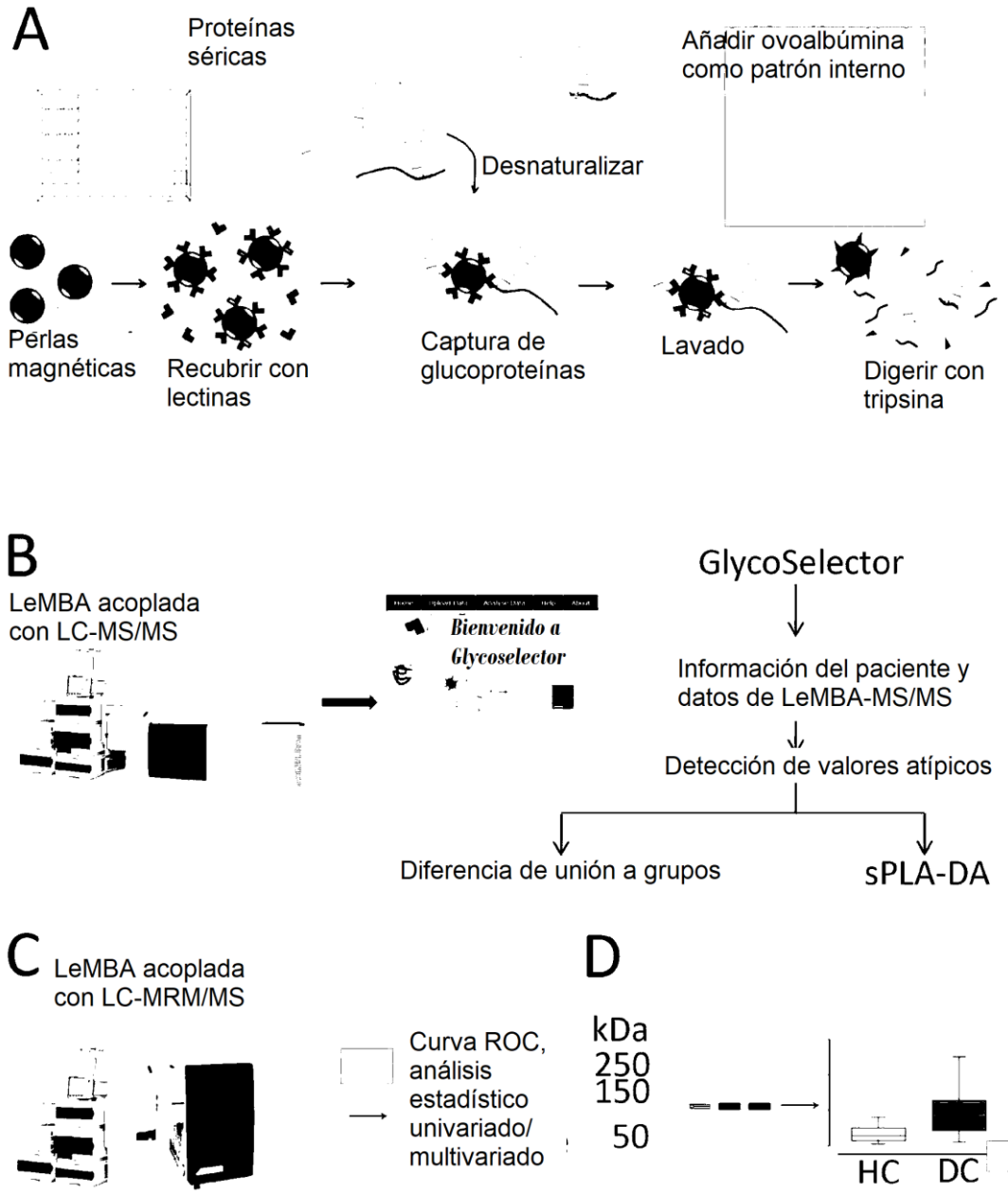


FIGURA 1

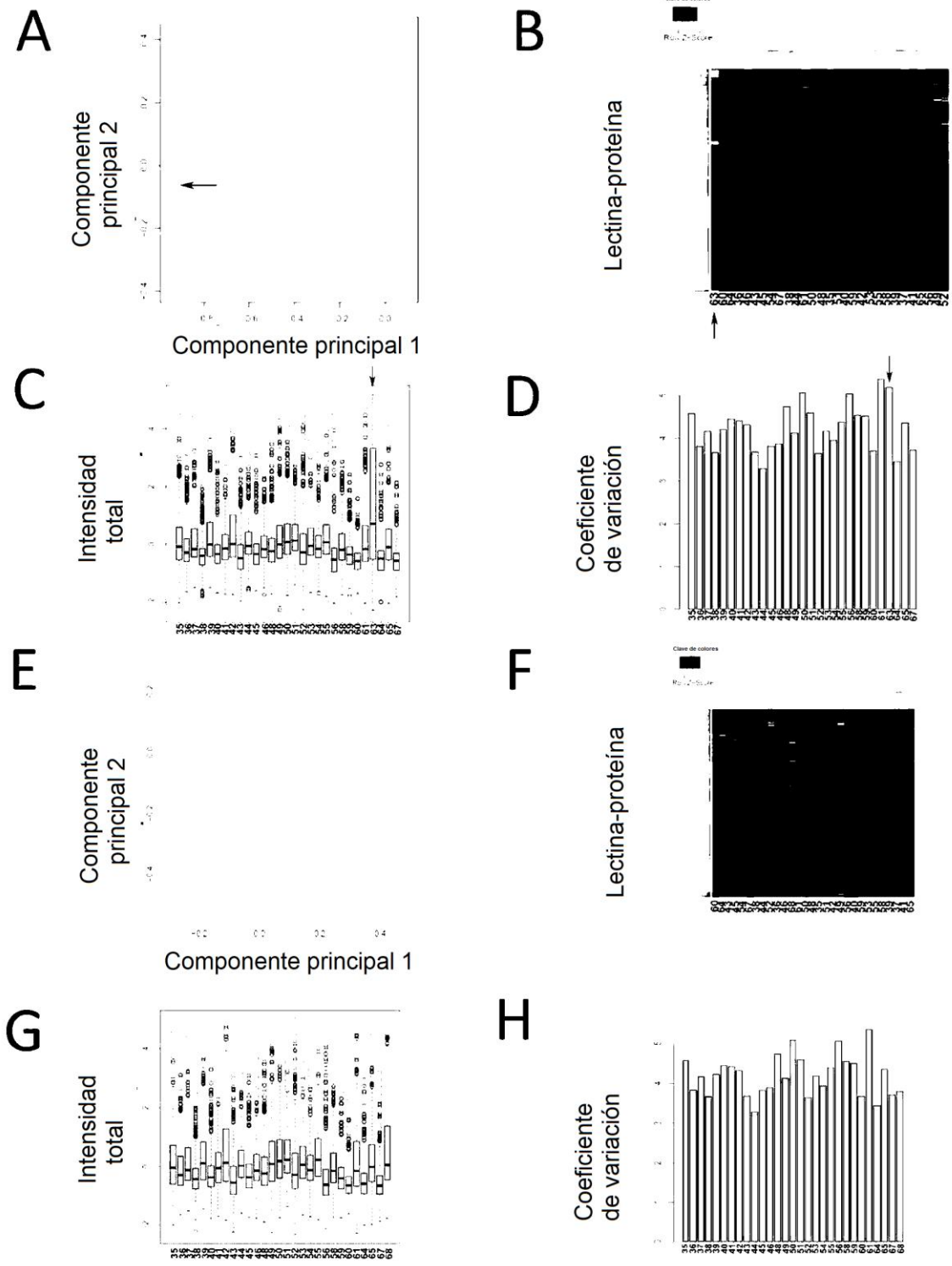


FIGURA 2

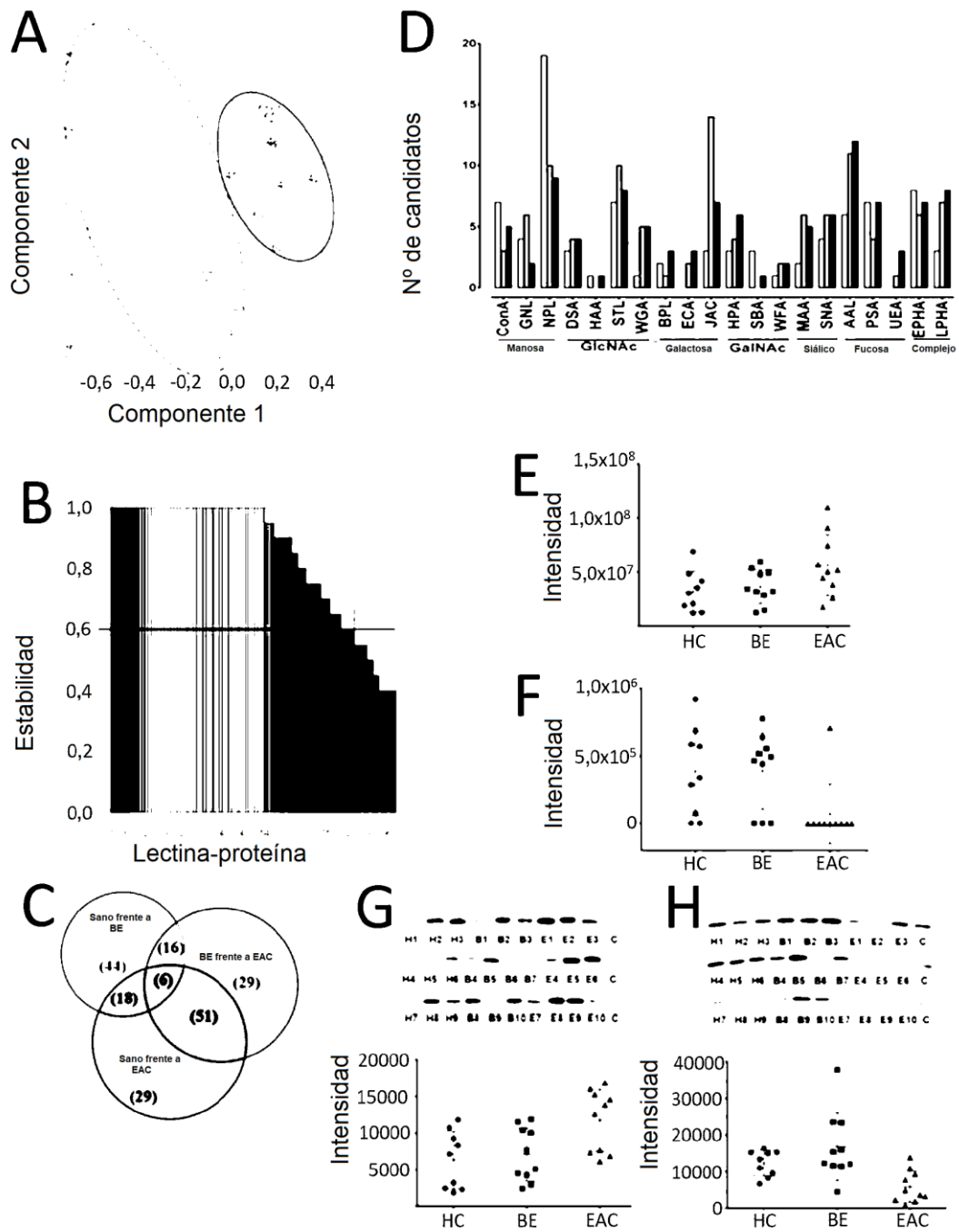


FIGURA 3

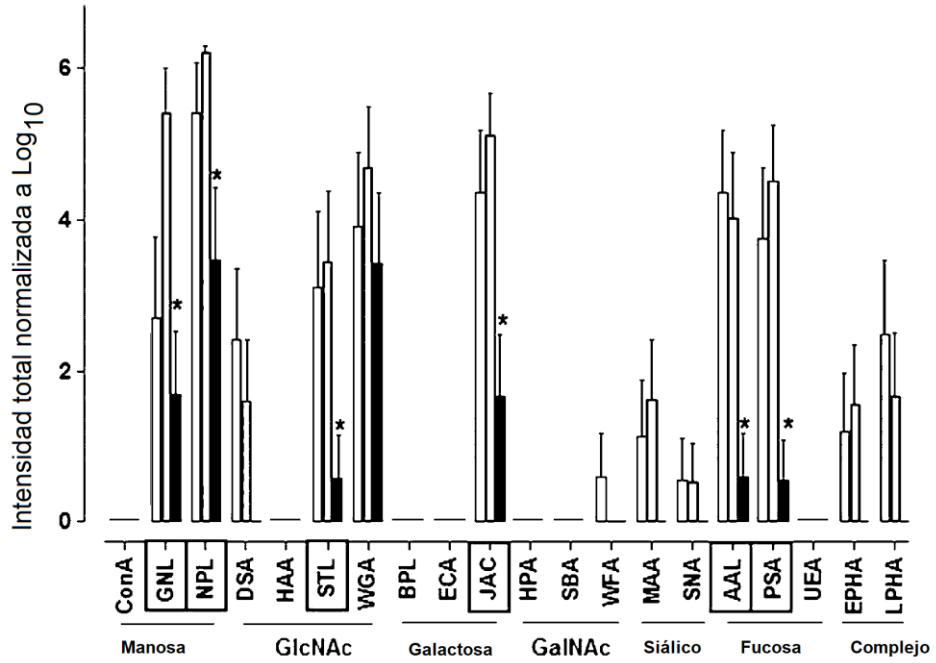


FIGURA 4

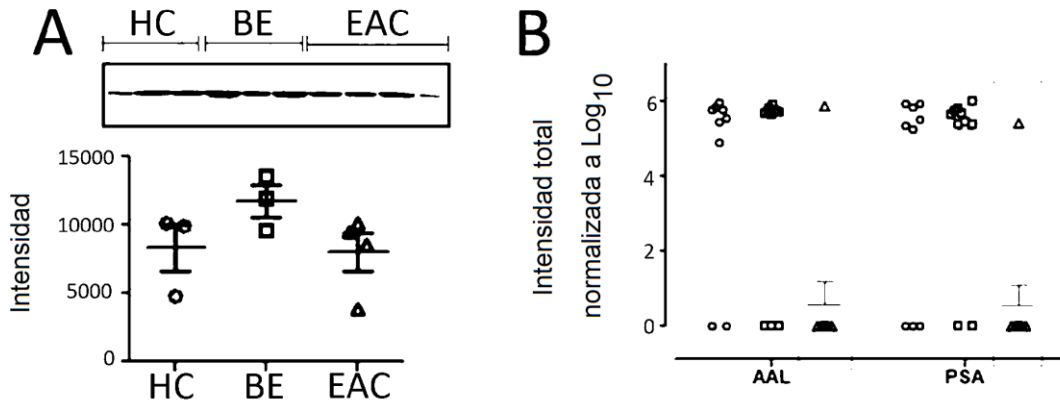


FIGURA 5

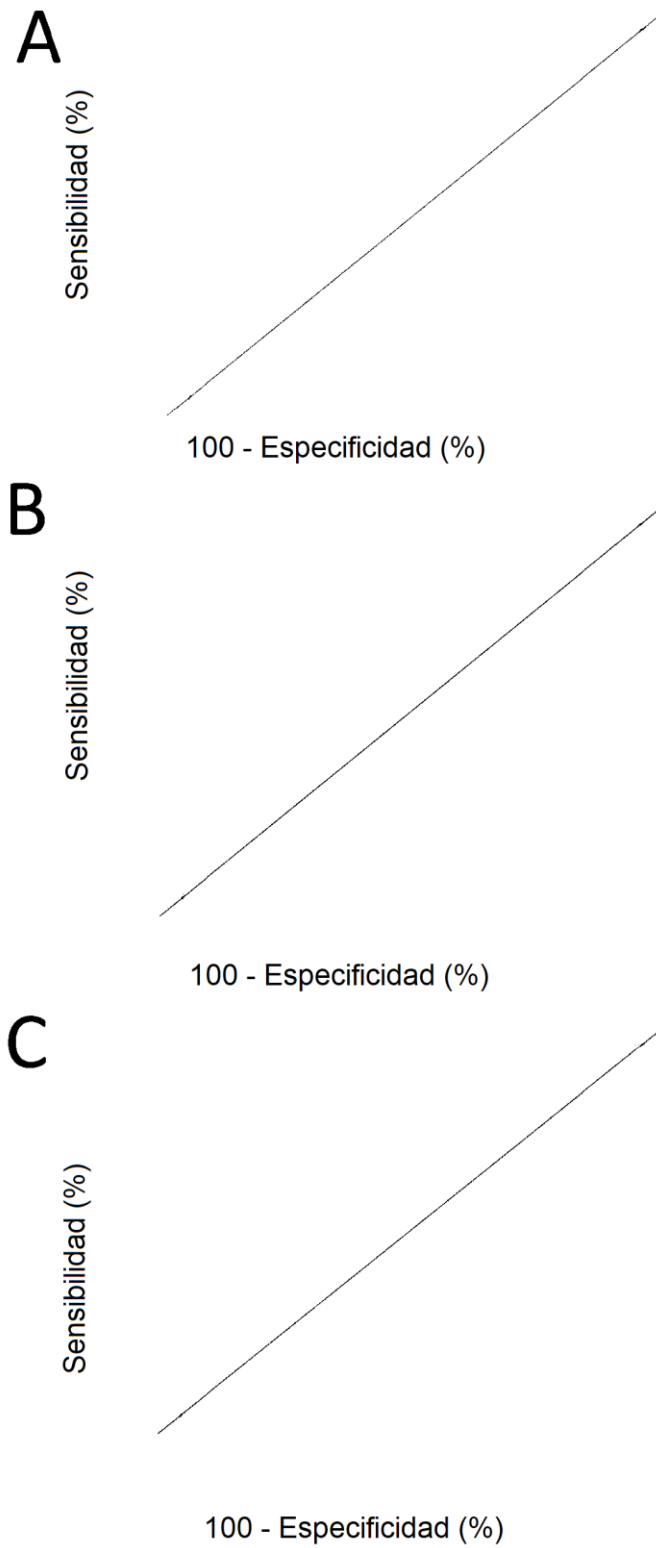


FIGURA 6