

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 371**

51 Int. Cl.:

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: **02.12.2020 PCT/EP2020/084328**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2021 WO21110776**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2020 E 20819704 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 4070111**

54 Título: **Uso de nucleosomas libres de células como biomarcadores**

30 Prioridad:

02.12.2019 US 201962942596 P
06.10.2020 US 202063088408 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MICALLEF, JACOB VINCENT;
WILSON-ROBLES, HEATHER;
ECCLESTON, MARK EDWARD;
HERZOG, MARIELLE CHANTAL ANDREE y
TERRELL, JASON BRADLEY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 988 371 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de nucleosomas libres de células como biomarcadores

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 como biomarcadores en muestras de plasma para cánceres vasculares o hematológicos.

Antecedentes de la invención

10 Los cánceres hematológicos son los tipos de cáncer que afectan a la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos. Se denominan leucemia, linfoma y mieloma dependiendo del tipo de célula afectada. La leucemia es cáncer de las células sanguíneas que usualmente comienza en la médula ósea y viaja a través del torrente sanguíneo. En la leucemia, la médula ósea produce células mutadas y las extiende a la sangre, donde crecen y desplazan a las células sanguíneas sanas. Las enfermedades de linfoma afectan a las células en el sistema linfático. En los linfomas, las células inmunes denominadas linfocitos crecen fuera del control y se recogen en los ganglios linfáticos, el bazo, en otros tejidos linfáticos o en órganos vecinos. El mieloma, también conocido como mieloma múltiple, se desarrolla en la médula ósea y afecta a las células plasmáticas, que producen anticuerpos que atacan infecciones y enfermedades.

15 Los ejemplos de cánceres de la sangre incluyen leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielóide aguda (AML), linfoma de Hodgkin (HL) y linfoma no de Hodgkin (NHL).

20 Las referencias a "leucemia aguda" significan que el cáncer progresa rápida y agresivamente, requiriendo usualmente un tratamiento inmediato. La ALL implica el desarrollo de un gran número de linfocitos inmaduros que son incapaces de luchar contra la infección. Esto hace que el paciente tenga menos espacio para glóbulos blancos sanos, glóbulos rojos y plaquetas en la circulación. Como resultado, el paciente normalmente sufre de un sistema inmune debilitado y los síntomas de anemia, tales como cansancio, falta de aliento y un aumento del riesgo de hemorragia excesiva. El riesgo de desarrollar ALL es mayor en niños menores de 5 años y es el tipo más común de leucemia que afecta a los niños. El riesgo disminuye entonces lentamente hasta la mitad de los 20 años, y comienza a subir de nuevo lentamente después de la edad de 50. En general, aproximadamente 4 de cada 10 casos de ALL se dan en adultos.

25 La AML afecta a los mieloblastos, lo que da como resultado la acumulación de monocitos y granulocitos anormales en la médula ósea. La AML también puede afectar a las células madre mieloides, lo que da como resultado glóbulos rojos o plaquetas anormales. Como con la ALL, esto hace que el paciente tenga niveles más bajos de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas sanos en la circulación. La AML es uno de los tipos más comunes de leucemia en adultos y la edad media en el diagnóstico es 68.

30 El HL y NHL son los dos tipos principales de linfoma. El HL tiene un aspecto particular bajo el microscopio y contiene células denominadas células de Reed-Sternberg (un tipo de linfocito B que se ha vuelto canceroso), mientras que el NHL parece diferente bajo el microscopio y no contiene células de Reed-Sternberg. La mayoría de los linfomas son NHL y sólo aproximadamente 1 de 5 son HL. El NHL es un cáncer que afecta a los linfocitos y normalmente comienza en los ganglios linfáticos o el tejido linfático. Es uno de los cánceres más comunes entre los niños, adolescentes y adultos jóvenes.

35

Los métodos actuales de diagnóstico de la leucemia y el mieloma implican obtener una prueba de recuento sanguíneo completo (CBC) para identificar niveles anormales de glóbulos blancos en relación con glóbulos rojos y plaquetas. Sin embargo, un recuento elevado de glóbulos blancos (WBC) no es específico para pacientes con una malignidad hematológica; también puede ser el resultado de una respuesta en curso a la infección u otro proceso inflamatorio.

40 Para el linfoma, se puede usar un escaneo con rayos X, CT o PET para detectar ganglios linfáticos hinchados, sin embargo, esto también es inespecífico.

45 Con el fin de confirmar un diagnóstico de un cáncer hematológico, se requiere una biopsia de médula ósea o ganglio linfático. Por lo tanto, el sobrediagnóstico de los cánceres hematológicos en una etapa temprana en el proceso de diagnóstico puede conducir a biopsias innecesarias que son invasivas, potencialmente peligrosas y relativamente costosas para los proveedores de atención médica. El análisis citogenético y/o el inmunofenotipado también se pueden usar para confirmar un diagnóstico de cáncer hematológico, sin embargo, estos métodos son caros de realizar y, por lo tanto, típicamente solo se usan en una etapa tardía del proceso de diagnóstico.

50 El angiosarcoma humano es un cáncer vascular raro que afecta a las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos. El hemangiosarcoma canino es, de manera similar, un cáncer que implica la proliferación del endotelio vascular o las paredes de los vasos sanguíneos y es un cáncer canino común que también es difícil de diagnosticar. Los cánceres caninos son más comunes que los cánceres humanos generalmente debido a los efectos genéticos del cruce endogámico y debido a que los perros tienen una vida más corta que los seres humanos y comúnmente contraen el cáncer a los 8 años de edad o más. La detección y el diagnóstico del cáncer en sujetos animales presenta dificultades adicionales sobre el diagnóstico de cánceres humanos. La detección de cáncer en animales no humanos a menudo implica el escaneo, por ejemplo, mediante imagenología de resonancia magnética o escaneo de MRI, pero los animales no permanecerán inmóviles durante el tiempo requerido para el escaneo y, por lo tanto, deben anestesiarse. El seguro de salud de mascotas es raro y puede no cubrir el diagnóstico o la terapia del cáncer lo que

55

hace que esta prueba esté fuera del alcance financiero de muchos propietarios de mascotas. Además, los análisis de sangre en seres humanos para proteínas marcadoras de cáncer normalmente no detectan proteínas animales, por lo que hay menos análisis de sangre disponibles en oncología veterinaria.

5 Holdenrieder *et al.* (2001) Int J Cancer 95: 114-120 describió previamente la detección del nivel de nucleosomas en muestras de suero de pacientes con enfermedades benignas y malignas. Sin embargo, los resultados presentados para muestras de suero no implicaron que hubiera ninguna distinción entre el nivel para cánceres hematológicos, tales como linfoma, en comparación con los otros tipos de cáncer ensayados. La composición epigenética de los nucleosomas libres de células circulantes en términos de su modificación de histonas, variante de histonas, modificación de ADN y contenido de aductos también se han investigado como biomarcadores basados en sangre en el cáncer, véase WO 2005/019826, WO 2013/030577, WO 2013/030579 y WO 2013/084002.

10 WO2019/169263 describe el uso de nucleosomas recombinantes/semisintéticos que llevan modificaciones de histonas y/o ADN como un estándar de referencia para la cuantificación de nucleosomas modificados covalentemente de una muestra biológica. WO2017/068359 describe métodos para detectar y medir la presencia de mononucleosomas y oligonucleosomas libres de células que contienen histona H1 o una modificación, variante o isoforma de histona H1, y el uso de tales mediciones para la detección y diagnóstico de enfermedad.

15 Sigue existiendo la necesidad en la técnica de proporcionar métodos de diagnóstico sencillos y rentables para cánceres vasculares o hematológicos, especialmente aquellos que pueden distinguir de pacientes con otros tipos de enfermedad o cáncer no vascular o no hematológico, pero que pueden presentar síntomas similares.

Sumario de la invención

20 Según un primer aspecto, se proporciona un uso de una isoforma de histona H3.1 de un nucleosoma libre de células como biomarcador en una muestra de plasma, para el diagnóstico o detección de un cáncer vascular o hematológico.

Según un aspecto adicional, se proporciona un uso de una isoforma de histona H3.1 de un nucleosoma libre de células como biomarcador en una muestra de plasma, para el diagnóstico o detección de un cáncer hematológico.

25 Según un aspecto adicional, se proporciona un uso de una isoforma de histona H3.1 de un nucleosoma libre de células como biomarcador en una muestra de plasma, para el diagnóstico o detección de un cáncer vascular.

Según un aspecto adicional, se proporciona un método para diagnosticar o detectar un cáncer vascular o hematológico que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto una muestra de plasma obtenida del sujeto con un agente de unión para detectar o medir nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1; y

30 (ii) utilizar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 detectada para diagnosticar al sujeto con el cáncer vascular o hematológico.

Según un aspecto adicional, se proporciona un método para determinar el pronóstico de un sujeto con un cáncer vascular o hematológico, que comprende las etapas de:

35 (i) poner en contacto una muestra de plasma obtenida del sujeto con un agente de unión para detectar o medir nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1; y

(ii) utilizar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 detectada como indicativa del pronóstico de dicho cáncer vascular o hematológico.

Según un aspecto adicional, se proporciona un método para monitorizar la eficacia de una terapia en un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o está predispuesto a un cáncer vascular o hematológico, que comprende las etapas de:

40 (i) poner en contacto una muestra de plasma obtenida del sujeto con un agente de unión para detectar o medir nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1; y

(ii) comparar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 detectada con una muestra de plasma anterior tomada de dicho sujeto para determinar la eficacia de dicha terapia.

Breve descripción de las figuras

45 **FIGURA 1:** Concentración de nucleosomas libres de células que contienen H3.1 en muestras de plasma obtenidas de sujetos humanos sanos y sujetos humanos con leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML) y linfoma no de Hodgkin (NHLin).

FIGURA 2: Concentración de nucleosomas libres de células que contienen H3.1 en muestras de plasma obtenidas de sujetos humanos con diferentes tipos de cáncer.

50

FIGURA 3: Resultados de densidad óptica (DO) de ELISA de nucleosomas libres de células que contienen citrulinación de H3 (H3cit) en muestras de plasma de sujetos humanos sanos en comparación con (A) resultados de todos los tipos de cánceres hematológicos ensayados, y (B) resultados de sujetos humanos con ALL, AML y NHL.

5 **FIGURA 4:** Resultados de DO de ELISA de nucleosomas libres de células que contienen H3K27Me3 en muestras de plasma de sujetos humanos sanos en comparación con (A) resultados de todos los tipos de cánceres hematológicos ensayados, y (B) resultados de sujetos humanos con ALL, AML y NHL.

10 **FIGURA 5:** Resultados de unidades de luz relativas (RLU) de ELISA de nucleosomas libres de células que contienen acetilación general de H4 (H4panAc) en muestras de plasma de sujetos humanos sanos en comparación con (A) resultados de todos los tipos de cánceres hematológicos ensayados, y (B) resultados de sujetos humanos con ALL, AML y NHL.

FIGURA 6: (A) Resultados de ELISA de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 (ng/ml) en muestras de plasma tomadas de sujetos caninos sanos en comparación con sujetos caninos diagnosticados con linfoma, y (B) curva ROC que muestra la detección de linfoma canino usando los resultados de H3.1.

15 **FIGURA 7:** (A) Resultados de ELISA de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 (ng/ml) en muestras de plasma tomadas de sujetos caninos sanos en comparación con sujetos caninos diagnosticados con hemangiosarcoma, y (B) curva ROC que muestra la detección de hemangiosarcoma canino usando los resultados de H3.1.

FIGURA 8: Resultados de ELISA de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 (ng/ml) y CRP (µg/ml) en muestras de plasma tomadas en serie de 2 sujetos caninos bajo tratamiento para hemangiosarcoma.

20 **FIGURA 9:** Resultados de ELISA de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 (ng/ml) y CRP (µg/ml) en muestras de plasma tomadas en serie de 2 sujetos caninos bajo tratamiento para linfoma.

Descripción detallada

25 Según un primer aspecto, se proporciona un uso de una isoforma de histona H3.1 de un nucleosoma libre de células como biomarcador en una muestra de plasma, para el diagnóstico o detección de un cáncer vascular o hematológico. En particular, el cáncer es un cáncer hematológico.

30 El nucleosoma es la unidad básica de la estructura de la cromatina y consiste en un complejo proteico de ocho histonas centrales altamente conservadas (que comprende un par de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4). Alrededor de este complejo se envuelven aproximadamente 146 pares de bases de ADN. Otra histona, H1 o H5, actúa como un conector y está implicada en la compactación de la cromatina. El ADN se enrolla alrededor de nucleosomas consecutivos en una estructura que a menudo se dice que se asemeja a "perlas en una cadena" y esto forma la estructura básica de la eucromatina o abierta. En la heterocromatina o compactada esta cadena se enrolla y se superenrolla en una estructura cerrada y compleja (Herranz y Esteller (2007) *Methods Mol. Biol.* 361: 25-62).

35 Las referencias al "nucleosoma" pueden referirse al "nucleosoma libre de células" cuando se detecta en muestras de fluido corporal. Se apreciará que el término nucleosoma libre de células a lo largo de este documento pretende incluir cualquier fragmento de cromatina libre de células que incluya uno o más nucleosomas. "Características epigenéticas", "características de señal epigenética" o "estructuras de señal epigenética" de un nucleosoma libre de células como se hace referencia en la presente memoria pueden comprender, sin limitación, una o más modificaciones postraduccionales de histonas, isoformas de histonas, nucleótidos modificados y/o proteínas unidas a un nucleosoma en un aducto de nucleosoma-proteína.

40 Se entenderá que el nucleosoma libre de células puede detectarse mediante la unión a un componente del mismo. El término "componente del mismo", como se usa en la presente memoria, se refiere a una parte del nucleosoma, es decir, no es necesario detectar el nucleosoma completo. El componente de los nucleosomas libres de células puede seleccionarse del grupo que consiste en: una proteína histona (es decir, histona H1, H2A, H2B, H3 o H4), una modificación postraduccional de histona, una variante o isoforma de histona, una proteína unida al nucleosoma (es decir, un aducto de nucleosoma-proteína), un fragmento de ADN asociado con el nucleosoma y/o un nucleótido modificado asociado con el nucleosoma. Según la presente invención, el componente del mismo es la histona (isoforma) H3.1.

50 Los métodos y usos de la invención pueden medir el nivel de nucleosomas (libres de células) *per se*. Las referencias a "nucleosomas *per se*" se refieren al nivel o concentración total de nucleosomas presente en la muestra, independientemente de cualquier característica epigenética que los nucleosomas puedan o no incluir. La detección del nivel total de nucleosomas implica típicamente detectar una proteína histona común a todos los nucleosomas, tal como la histona H4. Por lo tanto, los nucleosomas *per se* pueden medirse detectando una proteína histona central, tal como la histona H4. Como se describe en la presente memoria, las proteínas histonas forman unidades estructurales conocidas como nucleosomas que se usan para empaquetar el ADN en las células eucariotas. Como se ha reportado previamente en WO 2016/067029, se pueden usar variantes de histona particulares, tales como histona H3.1, H3.2 o H3t, para aislar nucleosomas libres de células que se originan a partir de células tumorales. Por lo tanto, se puede

detectar el nivel total de nucleosomas libres de células de origen tumoral.

El recambio celular normal en los seres humanos adultos implica la creación por división celular de unas 10^{11} células diariamente y la muerte de un número similar, principalmente por apoptosis. Durante el proceso de apoptosis, la cromatina se descompone en mononucleosomas y oligonucleosomas que se liberan de las células. En condiciones normales, se informa que los niveles de nucleosomas circulantes encontrados en sujetos sanos son bajos. Se encuentran niveles elevados en sujetos con una variedad de afecciones que incluyen muchos cánceres, enfermedades autoinmunes, afecciones inflamatorias, apoplejía e infarto de miocardio (Holdenreider y Stieber (2009) Crit Rev Clin Lab Sci, 46(1): 1-24).

Los métodos de ELISA de nucleosomas actuales se usan principalmente en cultivo celular, normalmente como un método para detectar la apoptosis (Salgame *et al.* (1997) Nucleic Acids Res, 25(3): 680-681; Holdenrieder *et al.* (2001) *supra*; van Nieuwenhuijze *et al.* (2003) Ann Rheum Dis, 62: 10-14), pero también se usan para la medición de nucleosomas libres de células circulantes en suero y plasma (Holdenrieder *et al.* (2001)). Los niveles séricos y plasmáticos de nucleosomas libres de células liberados en la circulación por las células moribundas se han medido mediante métodos ELISA en estudios de varios cánceres diferentes para evaluar su uso como biomarcador potencial. Se ha reportado que los niveles medios de nucleosomas circulantes son altos en la mayoría, pero no en todos, los cánceres estudiados. Sin embargo, se reporta que los pacientes con tumores malignos tienen concentraciones de nucleosomas en suero que variaron considerablemente y se encontró que algunos pacientes con enfermedad tumoral avanzada tenían niveles bajos de nucleosomas circulantes, dentro del intervalo medido para sujetos sanos (Holdenrieder *et al.* (2001)).

El nucleosoma libre de células puede ser un mononucleosoma u oligonucleosoma, o una mezcla de los mismos.

Los mononucleosomas y los oligonucleosomas pueden detectarse mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y se han reportado varios métodos (por ejemplo, Salgame *et al.* (1997); Holdenrieder *et al.* (2001); van Nieuwenhuijze *et al.* (2003)). Estos ensayos emplean típicamente un anticuerpo anti-histona (por ejemplo, anti-H2B, anti-H3 o anti-H1, H2A, H2B, H3 y H4) como anticuerpo de captura y un anticuerpo anti-ADN o anti-complejo H2A-H2B-ADN como anticuerpo de detección.

Los nucleosomas circulantes no son un grupo homogéneo de complejos de proteína-ácido nucleico. Más bien, son un grupo heterogéneo de fragmentos de cromatina que se originan a partir de la digestión de la cromatina en la muerte celular e incluyen una inmensa variedad de estructuras epigenéticas que incluyen isoformas (o variantes) de histona particulares, modificaciones de histona postraduccionales, nucleótidos o nucleótidos modificados y aductos de proteínas. Será evidente para los expertos en la técnica que una elevación en los niveles de nucleosomas estará asociada con elevaciones en algunos subconjuntos de nucleosomas circulantes que contienen señales epigenéticas particulares que incluyen nucleosomas que comprenden isoformas (o variantes) de histona particulares, que comprenden modificaciones de histona postraduccionales particulares, que comprenden nucleótidos particulares o nucleótidos modificados y que comprenden aductos de proteínas particulares. Los ensayos para estos tipos de fragmentos de cromatina son conocidos en la técnica (por ejemplo, véanse WO 2005/019826, WO 2013/030579, WO 2013/030578, WO 2013/084002).

Se entenderá que los términos "estructura de señal epigenética" y "característica epigenética" se usan indistintamente en la presente memoria. Se refieren a características particulares del nucleosoma que pueden detectarse. En una realización, la característica epigenética del nucleosoma se selecciona del grupo que consiste en: una modificación de histona postraduccionales, una variante de histona, un nucleótido particular y un aducto de proteína.

El término "variante de histona" e "isoforma de histona" se pueden usar indistintamente en la presente memoria. La estructura del nucleosoma también puede variar mediante la inclusión de isoformas o variantes de histona alternativas que son diferentes productos génicos o de corte y empalme y tienen diferentes secuencias de aminoácidos. Se conocen en la técnica muchas isoformas de histona. Las variantes de histonas pueden clasificarse en varias familias que se subdividen en tipos individuales. Las secuencias de nucleótidos de un gran número de variantes de histona son conocidas y están disponibles públicamente, por ejemplo, en la base de datos de histonas del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano NHGRI (Mariño-Ramírez *et al.* The Histone Database: an integrated resource for histones and histone fold-containing proteins. *Database* vol.2011. y <http://genome.nhgri.nih.gov/histones/complete.shtml>), la base de datos de GenBank (secuencia genética de NIH), la base de datos de secuencias de nucleótidos de EMBL y el banco de datos de ADN de Japón (DDBJ). Por ejemplo, las variantes de histona H2 incluyen H2A1, H2A2, mH2A1, mH2A2, H2AX y H2AZ. En otro ejemplo, las isoformas de histona de H3 incluyen H3.1, H3.2 y H3t.

Según la presente invención, la isoforma de histona es H3.1. Como se muestra en los ejemplos presentados en la presente memoria, H3.1 fue eficaz para distinguir sujetos con cáncer vascular o hematológico de sujetos sanos. H3.1 fue particularmente eficaz en la identificación de pacientes con linfoma porque el 84 % de los pacientes con NHL se distinguieron de los sujetos sanos con una especificidad del 90 % (véase la Tabla 1).

- La estructura de los nucleosomas puede variar mediante modificación postraduccional (PTM) de proteínas histonas. La PTM de las proteínas histonas se produce típicamente en las colas de las histonas centrales y las modificaciones comunes incluyen acetilación, metilación o ubiquitinación de residuos de lisina, así como metilación de residuos de arginina y fosforilación de residuos de serina y muchos otros. Se conocen muchas modificaciones de histonas en la técnica y el número está aumentando a medida que se identifican nuevas modificaciones (Zhao y García, 2015 Cold Spring Harb Perspect Biol, 7: a025064). Las PTM de histonas incluyen una PTM de histona de un nucleosoma central, por ejemplo, H3, H2A, H2B o H4, en particular H3, H2A o H2B. Los ejemplos de tales PTM se describen en WO 2005/019826.
- Por ejemplo, la modificación postraduccional puede incluir acetilación, metilación, que puede ser mono, di o trimetilación, fosforilación, ribosilación, citrulinación, ubiquitinación, hidroxilación, glucosilación, nitrosilación, glutaminación y/o isomerización (véase Auso (2001) Biochem Cell Bio 79: 693). Como se muestra en los ejemplos presentados en la presente memoria, H3cit fue la PTM de histona más eficaz para distinguir sujetos con cáncer vascular o hematológico de sujetos sanos.
- También se puede detectar un grupo o clase de modificaciones postraducionales de histonas relacionadas (en lugar de una única modificación). Un ejemplo típico, sin limitación, implicaría un inmunoensayo de 2 sitios que empleara un anticuerpo u otro ligante selectivo dirigido a unirse a nucleosomas y un anticuerpo u otro ligante selectivo dirigido a unirse al grupo de modificaciones de histonas en cuestión. Los ejemplos de tales anticuerpos dirigidos a unirse a un grupo de modificaciones de histona incluirían, con fines ilustrativos sin limitación, anticuerpos anti-acetilación general (por ejemplo, un anticuerpo general-acetil H4 [H4panAc]), anticuerpos anti-citrulinación o anticuerpos anti-ubiquitina.
- Además de la señalización epigenética mediada por la isoforma de histona del nucleosoma y la composición de PTM, los nucleosomas también difieren en su composición de nucleótidos y nucleótidos modificados. La hipometilación global del ADN es un sello distintivo de las células cancerosas y algunos nucleosomas pueden comprender más residuos de 5-metilcitosina (o residuos de 5-hidroximetilcitosina u otros nucleótidos o nucleótidos modificados) que otros nucleosomas.
- Un tipo adicional de subconjunto de nucleosomas circulantes son los aductos de proteínas y nucleosomas. Se sabe desde hace muchos años que la cromatina comprende un gran número de proteínas no histonas unidas a su ADN y/o histonas constituyentes. Estas proteínas asociadas a cromatina son de una amplia variedad de tipos y tienen una variedad de funciones que incluyen factores de transcripción, factores de potenciación de la transcripción, factores de represión de la transcripción, enzimas modificadoras de histonas, proteínas de reparación de daños en el ADN y muchas más. Estos fragmentos de cromatina que incluyen nucleosomas y otras proteínas de cromatina no histonas o ADN y otras proteínas de cromatina no histonas se describen en la técnica.
- Una proteína puede formar un aducto con el nucleosoma, por ejemplo: un factor de transcripción, una proteína del grupo de alta movilidad o una enzima modificadora de cromatina. Las referencias a "factor de transcripción" se refieren a proteínas que se unen al ADN y regulan la expresión génica promoviendo (es decir, activadores) o suprimiendo (es decir, represores) la transcripción. Los factores de transcripción contienen uno o más dominios de unión a ADN (DBD), que se unen a secuencias específicas de ADN adyacentes a los genes que regulan. Todos los nucleosomas circulantes y restos, tipos o subgrupos de nucleosomas descritos en la presente memoria pueden ser útiles en la presente invención.
- Se entenderá que se puede detectar más de una característica epigenética de los nucleosomas libres de células en los métodos y usos de la invención. Se pueden usar múltiples biomarcadores como biomarcador combinado. Por lo tanto, en una realización, el uso comprende más de una característica epigenética de los nucleosomas libres de células como biomarcador combinado. Las características epigenéticas pueden ser del mismo tipo (por ejemplo, PTM, isoformas de histona, nucleótidos o aductos de proteína) o diferentes tipos (por ejemplo, una PTM en combinación con una isoforma de histona). Por ejemplo, se puede detectar una modificación de histona postraduccional y una variante de histona (es decir, se detecta más de un tipo de característica epigenética). Alternativamente, o adicionalmente, se detecta más de un tipo de modificación postraduccional de histona, o se detecta más de un tipo de isoforma de histona. En una realización, el biomarcador combinado es H3.1 y H3cit. En una realización alternativa, el biomarcador combinado es H3.1 y H3K27Me3.
- El término "biomarcador" significa un indicador biológico o derivado biológicamente distintivo de un proceso, evento o afección. Los biomarcadores pueden usarse en métodos de diagnóstico, por ejemplo, cribado clínico, y evaluación del pronóstico y en la monitorización de los resultados de la terapia, identificando a los pacientes que responden más probablemente a un tratamiento terapéutico particular, cribado y desarrollo de fármacos. Los biomarcadores y usos de los mismos son valiosos para la identificación de nuevos tratamientos farmacológicos y para el descubrimiento de nuevas dianas para el tratamiento farmacológico.
- Los métodos y usos descritos en la presente memoria pueden ensayarse en muestras de fluido corporal, en particular muestras de sangre, suero o plasma. Preferiblemente, se usan muestras de plasma. Las muestras de plasma pueden recogerse en tubos de recogida que contienen uno o más anticoagulantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), heparina o citrato de sodio, en particular EDTA.

Cánceres hematológicos

5 Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre, por lo tanto, también pueden denominarse "cánceres de la sangre". Existen 3 tipos principales de cánceres hematológicos: leucemias, que están causadas por la producción rápida de glóbulos blancos anormales; linfomas que están causados por células de linfoma anormales; y mielomas, que es un cáncer de las células plasmáticas.

En una realización, el cáncer hematológico se selecciona de linfoma, leucemia, mieloma, enfermedad mieloproliferativa crónica, gammapatía monoclonal de significación incierta, síndrome mielodisplásico y amiloidosis. En una realización adicional, el cáncer hematológico se selecciona de leucemia o linfoma.

10 La leucemia afecta a los glóbulos blancos y puede clasificarse por el tipo de glóbulos blancos afectados (mieloide o linfática) y por la forma en que progresa la enfermedad (aguda o crónica). Se han identificado varios tipos de leucemia incluyendo, pero sin limitarse a: leucemia linfoblástica aguda (ALL; que también puede denominarse leucemia linfocítica aguda), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia megacarioblástica aguda (AMKL), leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia mieloide aguda infantil (C-AML), leucemia linfocítica aguda infantil (C-ALL), leucemia eosinofílica crónica (CEL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (CMML), leucemia neutrofilica crónica, leucemia de células pilosas, leucemia mielomonocítica juvenil (JMML), leucemia linfocítica granular grande (LGLL), leucemia linfoblástica aguda de células T y leucemia prolinfocítica.

15 En una realización, la leucemia es una leucemia aguda, tal como leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia megacarioblástica aguda (AMKL) o leucemia promielocítica aguda (APL). En una realización adicional, la leucemia se selecciona de leucemia linfocítica aguda (ALL) y leucemia mieloide aguda (AML). Alternativamente, en una realización, la leucemia es una leucemia crónica, tal como leucemia eosinofílica crónica (CEL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (CMML) o leucemia neutrofilica crónica.

20 Tanto el linfoma de Hodgkin (HL) como el linfoma no de Hodgkin (NHL) son linfomas. La mayoría de los pacientes con NHL tienen más de 55 años cuando se diagnostican por primera vez, mientras que la edad media para el diagnóstico del linfoma de Hodgkin es 39. En una realización, el linfoma es linfoma no de Hodgkin (NHL). El NHL puede surgir en los ganglios linfáticos en cualquier lugar del cuerpo, mientras que el HL típicamente comienza en la parte superior del cuerpo, tal como el cuello, el pecho o las axilas.

25 El linfoma de Hodgkin se diagnostica a menudo en una etapa temprana y, por lo tanto, se considera uno de los cánceres más tratables. El linfoma no de Hodgkin típicamente no se diagnostica hasta que ha alcanzado una etapa más avanzada, por lo tanto, los métodos de la invención encuentran un uso particular en el diagnóstico de NHL donde existe la necesidad de detectar pacientes en una etapa temprana de la enfermedad para mejorar el resultado del tratamiento.

Otros cánceres de la sangre

35 El angiosarcoma y el hemangiosarcoma son cánceres de tejidos blandos que implican la proliferación de las células que recubren el sistema vascular, por lo tanto, pueden denominarse "cánceres vasculares". Al igual que los cánceres hematopoyéticos, estos asociados íntimamente con la vasculatura y las células afectadas están en contacto directo con el fluido circulante de la sangre. Hemos mostrado que estos cánceres de la sangre están asociados a niveles muy altos de nucleosomas circulantes que son similares a los niveles observados en el linfoma.

40 Métodos de detección y diagnóstico

La invención proporciona métodos que pueden usarse en la detección o diagnóstico de pacientes con cánceres vasculares o hematológicos. Por lo tanto, según un aspecto adicional, se proporciona un método para diagnosticar o detectar un cáncer vascular o hematológico que comprende las etapas de:

- 45 (i) poner en contacto una muestra de plasma obtenida del sujeto con un agente de unión para detectar o medir nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1; y
- (ii) utilizar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 detectado para diagnosticar al sujeto con el cáncer vascular o hematológico.

Según un aspecto adicional, se proporciona un método para diagnosticar o detectar un cáncer hematológico que comprende las etapas de:

- 50 (i) poner en contacto una muestra de plasma obtenida del sujeto con un agente de unión para detectar o medir nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1; y
- (ii) utilizar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 detectado para diagnosticar al sujeto con el cáncer hematológico.

Alternativamente, según un aspecto adicional, se proporciona un método para diagnosticar o detectar un cáncer vascular que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto una muestra de plasma obtenida del sujeto con un agente de unión para detectar o medir nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1; y
- 5 (ii) usar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 detectado para diagnosticar al sujeto con el cáncer vascular.

Según un aspecto adicional, se proporciona un método para determinar el pronóstico de un sujeto con un cáncer vascular o hematológico, que comprende las etapas de:

- 10 (i) poner en contacto una muestra de plasma obtenida del sujeto con un agente de unión para detectar o medir nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1; y
- (ii) utilizar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 detectado como indicativo del pronóstico de dicho cáncer vascular o hematológico.

15 Si se determina que un sujeto no tiene un cáncer vascular o hematológico, entonces la invención todavía puede usarse para los fines de monitorizar la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, si el uso comprende una muestra de un sujeto que se ha determinado que no tiene un cáncer vascular o hematológico, entonces las mediciones del nivel de biomarcador pueden repetirse en otro punto de tiempo para establecer si el nivel de biomarcador ha cambiado.

Según un aspecto adicional, se proporciona un método para monitorizar la eficacia de una terapia en un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o está predispuesto a un cáncer vascular o hematológico, que comprende las etapas de:

- 20 (i) poner en contacto una muestra de plasma obtenida del sujeto con un agente de unión para detectar o medir nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1; y
- (ii) comparar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 detectado con una muestra de plasma anterior tomada de dicho sujeto para determinar la eficacia de dicha terapia.

25 La detección y/o cuantificación se puede realizar directamente en la muestra de nucleosomas purificada o enriquecida, o indirectamente en un extracto de la misma, o en una dilución de la misma. La cuantificación de la cantidad del biomarcador presente en una muestra puede incluir determinar la concentración del biomarcador presente en la muestra. Los usos y métodos de detección, monitorización y diagnóstico según la invención descritos en la presente memoria son útiles para confirmar la existencia de una enfermedad, para monitorizar el desarrollo de la enfermedad evaluando el inicio y la progresión, o para evaluar la mejora o regresión de la enfermedad. Los usos y métodos de detección, monitorización y diagnóstico también son útiles en métodos para la evaluación de cribado clínico, pronóstico, elección de terapia, evaluación de beneficio terapéutico, es decir, para el cribado de fármacos y el desarrollo de fármacos.

35 La detección o medición puede comprender un método de inmunoensayo, inmunoquímico, de espectroscopía de masas, cromatográfico, de inmunoprecipitación de cromatina o biosensor. En particular, la detección y/o medición puede comprender un método de inmunoensayo de 2 sitios para restos de nucleosomas. Dicho método se prefiere para la medición de nucleosomas o características epigenéticas incorporadas en nucleosomas *in situ* empleando dos agentes de unión anti-nucleosoma o un agente de unión anti-nucleosoma en combinación con un agente de unión de detección anti-modificación de histona o anti-variante de histona o anti-modificación de ADN o anti-aducto de proteína. Además, la detección y/o medición puede comprender un inmunoensayo de 2 sitios que emplea un agente de unión de detección anti-nucleosoma marcado en combinación con un agente de unión inmovilizado anti-modificación de histona o anti-variante de histona o anti-modificación de ADN o anti-proteína en aducto.

40 La detección o medición del nivel del o de los biomarcadores se puede realizar usando uno o más reactivos, tales como un agente de unión adecuado. Por ejemplo, el uno o más agentes de unión pueden comprender un ligando o ligante específico para el biomarcador deseado, por ejemplo, nucleosomas o parte componente de los mismos, una característica epigenética de un nucleosoma, un mimético estructural/de forma del nucleosoma o parte componente del mismo, opcionalmente en combinación con una o más interleuquinas.

45 Estará claro para los expertos en la técnica que los términos "anticuerpo", "ligante" o "ligando" como se usan en la presente memoria no son limitantes, sino que se pretende que incluyan cualquier ligante capaz de unirse a moléculas o entidades particulares y que cualquier ligante adecuado puede usarse en el método de la invención. También estará claro que el término "nucleosomas" pretende incluir mononucleosomas y oligonucleosomas y cualquier fragmento de cromatina de proteína-ADN que pueda analizarse en medios fluidos.

50 Los métodos para detectar biomarcadores se conocen en la técnica. Los reactivos pueden comprender uno o más ligandos o ligantes, por ejemplo, compuestos naturales o sintetizados químicamente, capaces de unirse específicamente a la diana deseada. Un ligando o ligante puede comprender un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo, o un ligando sintético tal como un anticuerpo plástico, o un aptámero u oligonucleótido, capaz de unirse

- específicamente a la diana deseada. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo. Se entenderá que, si se usa un fragmento de anticuerpo, entonces retiene la capacidad de unirse al biomarcador de modo que el biomarcador pueda detectarse (según la presente invención). Un ligando/ligante puede marcarse con un marcador detectable, tal como un marcador luminiscente, fluorescente, enzimático o radiactivo; alternativa o
 5 adicionalmente, un ligando según la invención puede marcarse con una etiqueta de afinidad, por ejemplo, una etiqueta de biotina, avidina, estreptavidina o His (por ejemplo, hexa-His). Alternativamente, la unión al ligando puede determinarse usando una tecnología sin marcador, por ejemplo, la de ForteBio Inc.
- El término "detectar" o "diagnosticar", como se usa en la presente memoria, abarca la identificación, confirmación y/o
 10 caracterización de un estado de enfermedad. Los métodos de detección, monitorización y diagnóstico según la invención son útiles para confirmar la existencia de una enfermedad, para monitorizar el desarrollo de la enfermedad evaluando el inicio y la progresión, o para evaluar la mejora o regresión de la enfermedad. Los métodos de detección, monitorización y diagnóstico también son útiles en métodos para la evaluación de cribado clínico, pronóstico, elección de terapia, evaluación de beneficio terapéutico, es decir, para el cribado de fármacos y el desarrollo de fármacos.
- En una realización, el método descrito en la presente memoria se repite en múltiples ocasiones. Esta realización
 15 proporciona la ventaja de permitir que los resultados de detección sean monitorizados durante un periodo de tiempo. Tal disposición proporcionará el beneficio de monitorizar o evaluar la eficacia del tratamiento de un estado de enfermedad. Tales métodos de monitorización de la invención pueden usarse para monitorizar el inicio, progresión, estabilización, mejora, recaída y/o remisión.
- En los métodos de monitorización, las muestras de ensayo pueden tomarse en dos o más ocasiones. El método puede
 20 comprender además comparar el nivel del o de los biomarcadores presentes en la muestra de ensayo con uno o más controles y/o con una o más muestras de ensayo anteriores tomadas antes del mismo sujeto de ensayo, por ejemplo, antes del comienzo de la terapia, y/o del mismo sujeto de ensayo en una etapa anterior de la terapia. El método puede comprender detectar un cambio en la naturaleza o cantidad del o de los biomarcadores en muestras de ensayo tomadas en diferentes ocasiones.
- Un cambio en el nivel del biomarcador en la muestra de ensayo con respecto al nivel en una muestra de ensayo previa
 25 tomada antes del mismo sujeto de ensayo puede ser indicativo de un efecto beneficioso, por ejemplo, estabilización o mejora de dicha terapia en el trastorno o trastorno sospechado. Además, una vez que se ha completado el tratamiento, el método de la invención puede repetirse periódicamente para monitorizar la recurrencia de una enfermedad.
- Los métodos para monitorizar la eficacia de una terapia pueden usarse para monitorizar la eficacia terapéutica de
 30 terapias existentes y nuevas terapias en sujetos humanos y en animales no humanos (por ejemplo, en modelos animales). Estos métodos de monitorización pueden incorporarse en cribados para nuevas sustancias farmacológicas y combinaciones de sustancias.
- En una realización adicional, la monitorización de cambios más rápidos debidos a terapias de acción rápida puede
 realizarse a intervalos más cortos de horas o días.
- Se proporcionan kits (o paneles) de diagnóstico o monitorización para realizar los métodos de la invención. Dichos kits
 35 comprenderán adecuadamente uno o más ligandos para la detección y/o cuantificación del biomarcador, y/o un biosensor, y/o una matriz como se describe en la presente memoria, opcionalmente junto con instrucciones para el uso del kit.
- También se describe un kit para detectar la presencia de un estado patológico, que comprende un biosensor capaz
 40 de detectar y/o cuantificar uno o más de los biomarcadores como se definen en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, el término "biosensor" significa cualquier cosa capaz de detectar la presencia del biomarcador. En la presente memoria se describen ejemplos de biosensores. Los biosensores pueden comprender un ligante ligando o ligandos, como se describe en la presente memoria, capaces de unirse específicamente al biomarcador. Dichos biosensores son útiles para detectar y/o cuantificar un biomarcador.
- De manera adecuada, los biosensores para la detección de uno o más biomarcadores combinan el reconocimiento
 45 biomolecular con medios apropiados para convertir la detección de la presencia, o cuantificación, del biomarcador en la muestra en una señal. Los biosensores pueden adaptarse para ensayos de diagnóstico de "sitio alternativo", por ejemplo, en la sala hospitalaria, departamento de pacientes externos, cirugía, hogar, campo y lugar de trabajo. Los biosensores para detectar uno o más biomarcadores incluyen sensores acústicos, de resonancia de plasmón, holográficos, de interferometría de biocapa (BLI) y microingeniería. Los elementos de reconocimiento impresos, la
 50 tecnología de transistores de película fina, los dispositivos resonadores acústicos magnéticos y otros sistemas acústico-eléctricos novedosos se pueden emplear en biosensores para la detección de uno o más biomarcadores.
- Los biomarcadores para detectar la presencia de una enfermedad son dianas esenciales para el descubrimiento de
 55 nuevas dianas y moléculas de fármaco que retardan o detienen la progresión del trastorno. Como el nivel del biomarcador es indicativo de trastorno y de respuesta a fármacos, el biomarcador es útil para la identificación de nuevos compuestos terapéuticos en ensayos *in vitro* y/o *in vivo*. Los biomarcadores descritos en la presente memoria pueden emplearse en métodos para cribar compuestos que modulan la actividad del biomarcador.

Por lo tanto, también se describe el uso de un ligante o ligando, como se describe, que puede ser un péptido, anticuerpo o fragmento del mismo o aptámero u oligonucleótido dirigido a un biomarcador; o el uso de un biosensor, o una matriz, o un kit, para identificar una sustancia capaz de promover y/o suprimir la generación del biomarcador.

5 Los inmunoensayos descritos en la presente memoria incluyen cualquier método que emplea uno o más anticuerpos u otros ligantes específicos dirigidos para unirse a los biomarcadores definidos en la presente memoria. Los inmunoensayos incluyen inmunoensayos de 2 sitios o ensayos inmunométricos que emplean métodos de detección enzimáticos (por ejemplo, ELISA), ensayos inmunométricos marcados con fluorescencia, ensayos inmunométricos marcados con fluorescencia en tiempo resuelto, ensayos inmunométricos quimioluminiscentes, ensayos inmunoturbidimétricos, ensayos inmunométricos marcados con partículas y ensayos inmunoradiométricos, así como
10 inmunoensayos de sitio único, inmunoensayos limitados por reactivos, métodos de inmunoensayo competitivos que incluyen métodos de inmunoensayo de antígeno marcado y anticuerpo único marcado con una variedad de tipos de marcadores que incluyen marcadores radiactivos, enzimáticos, fluorescentes, fluorescentes de tiempo resuelto y en partículas. Todos estos métodos de inmunoensayo son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Salgame *et al.* (1997) y van Nieuwenhuijze *et al.* (2003).

15 La identificación, detección y/o cuantificación se puede realizar mediante cualquier método adecuado para identificar la presencia y/o cantidad de una proteína específica en una muestra biológica de un sujeto o una purificación o extracto de una muestra biológica o una dilución de la misma. En particular, la cuantificación puede realizarse midiendo la concentración de la diana en la muestra o muestras. Las muestras biológicas que pueden ensayarse en un método de la invención incluyen las definidas anteriormente en esta memoria. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo,
20 cuando sea apropiado, diluirse o concentrarse, y almacenarse de la manera habitual. La presente invención encuentra un uso particular en muestras de plasma que pueden obtenerse del sujeto.

La identificación, detección y/o cuantificación de biomarcadores se puede realizar mediante la detección del biomarcador o de un fragmento del mismo, por ejemplo, un fragmento con truncamiento C-terminal, o con truncamiento N-terminal. Los fragmentos tienen adecuadamente más de 4 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
25 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de longitud. Se observa, en particular, que los péptidos de la misma secuencia o relacionada con la de las colas de histona son fragmentos particularmente útiles de proteínas de histona.

Por ejemplo, la detección y/o cuantificación se puede realizar mediante uno o más método(s) seleccionados del grupo que consiste en: SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), un análisis basado en gel 1-D, un análisis basado en gel 2-D, espectrometría de masas (MS), LC de fase inversa (RP), permeación por tamaño (filtración en gel), intercambio iónico,
30 afinidad, HPLC, UPLC y otras técnicas basadas en LC o LC MS. Las técnicas de LC MS apropiadas incluyen ICAT® (Applied Biosystems, CA, EE. UU.) o iTRAQ® (Applied Biosystems, CA, EE. UU.). También podrían usarse cromatografía líquida (por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía líquida de baja presión (LPLC)), cromatografía de capa fina, espectroscopía de RMN (resonancia magnética nuclear).

Los métodos que implican la detección y/o cuantificación de uno o más biomarcadores pueden realizarse en
35 instrumentos de sobremesa, o pueden incorporarse en plataformas desechables, de diagnóstico o de monitorización que pueden usarse en un entorno no de laboratorio, por ejemplo, en el consultorio del médico o al lado de la cama del sujeto. Los biosensores adecuados para realizar los métodos de la invención incluyen tarjetas "de crédito" con lectores ópticos o acústicos. Los biosensores pueden configurarse para permitir que los datos recogidos se transmitan electrónicamente al médico para su interpretación y, por lo tanto, pueden formar la base para la medicina electrónica.

40 La identificación de biomarcadores para un estado de enfermedad permite la integración de procedimientos de diagnóstico y regímenes terapéuticos. Los biomarcadores proporcionan los medios para indicar la respuesta terapéutica, el fracaso en la respuesta, el perfil de efectos secundarios desfavorable, el grado de cumplimiento de la medicación y el logro de niveles séricos de fármaco adecuados. Los biomarcadores pueden usarse para proporcionar una advertencia de respuesta adversa al fármaco. Los biomarcadores son útiles en el desarrollo de terapias personalizadas, ya que la evaluación de la respuesta se puede usar para ajustar finamente la dosificación, minimizar
45 el número de medicaciones prescritas, reducir el retraso en lograr la terapia eficaz y evitar reacciones adversas a fármacos. Por lo tanto, al monitorizar un biomarcador, el cuidado del sujeto se puede adaptar con precisión para que cumpla con las necesidades determinadas por el trastorno y el perfil farmacogenómico del sujeto, el biomarcador se puede usar, por lo tanto, para titular la dosis óptima, predecir una respuesta terapéutica positiva e identificar a aquellos
50 sujetos con alto riesgo de efectos secundarios graves. Los ensayos basados en biomarcadores proporcionan una evaluación de primera línea de sujetos 'nuevos', y proporcionan medidas objetivas para un diagnóstico preciso y rápido, no alcanzable usando las medidas actuales.

Los métodos de monitorización de biomarcadores, biosensores y kits también son vitales como herramientas de monitorización de sujetos, para permitir al médico determinar si la recaída es debida al empeoramiento del trastorno.
55 Si se evalúa que el tratamiento farmacológico es inadecuado, entonces la terapia puede reestablecerse o aumentarse; puede darse un cambio en la terapia si es apropiado. Como los biomarcadores son sensibles al estado del trastorno, proporcionan una indicación del impacto de la terapia farmacológica.

Las referencias a "sujeto" o "paciente" se usan indistintamente en la presente memoria. El sujeto puede ser un sujeto humano o animal. En una realización, el sujeto es un ser humano. En una realización, el sujeto es un animal (no humano). En una realización, el sujeto es un mamífero no humano, tal como un perro, ratón, rata o caballo, en particular un perro. Se pueden realizar el uso, paneles y métodos descritos en la presente memoria *in vitro* o *ex vivo*.

5 En una realización, se sospecha que el sujeto presenta una recaída de un cáncer vascular o hematológico. La enfermedad residual mínima (MRD) es el nombre dado a un pequeño número de células leucémicas (células cancerosas de la médula ósea) que permanecen en la persona durante el tratamiento, o después del tratamiento cuando el paciente está en remisión (es decir, pacientes sin síntomas o signos de enfermedad). Sin embargo, la MRD es la principal causa de recaída en el cáncer y la leucemia. Los métodos de la invención son por lo tanto útiles en la
10 monitorización de pacientes que se sospecha que presentan una recaída, particularmente pacientes que están en remisión del cáncer.

El sujeto ensayado usando los métodos descritos en la presente memoria puede presentar síntomas indicativos de cáncer hematológico, por ejemplo, anemia, leucocitosis y/o ganglios linfáticos hinchados. En una realización, el sujeto tiene un alto nivel de leucocitosis. Esto también puede denominarse "recuento alto de glóbulos blancos". Los cánceres hematológicos típicamente causan un aumento de la proliferación de glóbulos blancos o rojos anormales que dan como resultado un alto recuento de glóbulos blancos. Sin embargo, la leucocitosis no es suficiente para diagnosticar a un paciente con un cáncer hematológico (en particular leucemia) porque es frecuentemente un signo de una respuesta inflamatoria, lo más comúnmente el resultado de una infección. Por lo tanto, los métodos de la invención son capaces de proporcionar un método más específico para detectar pacientes que probablemente padecen un
15 cáncer hematológico.
20

La detección y/o cuantificación se puede comparar con un nivel de corte. Los valores de corte pueden predeterminarse analizando resultados de múltiples pacientes y controles, y determinando un valor adecuado para clasificar a un sujeto como con o sin la enfermedad. Por ejemplo, para enfermedades en donde el nivel de biomarcador es mayor en pacientes que padecen la enfermedad, entonces si el nivel detectado es mayor que el valor de corte, se indica que el
25 paciente padece la enfermedad. Alternativamente, para enfermedades en donde el nivel de biomarcador es menor en pacientes que padecen la enfermedad, entonces si el nivel detectado es menor que el valor de corte, se indica que el paciente padece la enfermedad. Las ventajas de usar valores de corte simples incluyen la facilidad con la que los médicos pueden comprender el ensayo y la eliminación de cualquier necesidad de software u otras ayudas en la interpretación de los resultados del ensayo. Los niveles de corte se pueden determinar usando métodos en la técnica.

30 La detección y/o cuantificación también se puede comparar con un control. Estará claro para los expertos en la técnica que los sujetos de control pueden seleccionarse en una variedad de bases que pueden incluir, por ejemplo, sujetos que se sabe que están libres de la enfermedad o pueden ser sujetos con una enfermedad diferente (por ejemplo, para la investigación del diagnóstico diferencial). El "control" puede comprender un sujeto sano, un sujeto no enfermo y/o un sujeto sin cáncer vascular o hematológico. La comparación con un control es bien conocida en el campo del diagnóstico.
35

Por lo tanto, en una realización, el método comprende adicionalmente comparar el nivel de dichos nucleosomas libres de células en dicha muestra de plasma con uno o más controles. Por ejemplo, el método puede comprender comparar el nivel de nucleosomas libres de células presente en una muestra de plasma obtenida del sujeto con el nivel de nucleosomas libres de células presente en una muestra de plasma obtenida de un sujeto normal. El control puede ser
40 un sujeto sano. Alternativamente, el control puede ser un sujeto enfermo, tal como un sujeto con una infección.

Alternativamente, el control es un sujeto con un cáncer que no es un cáncer vascular o hematológico, es decir, el sujeto de control tiene un cáncer que afecta a un órgano diferente en el cuerpo. Los datos proporcionados en la presente memoria muestran que los biomarcadores estaban significativamente elevados en pacientes con cáncer en la sangre en comparación con pacientes con otras formas de cáncer, por lo tanto, pueden usarse para diagnosticar
45 diferencialmente a pacientes con cánceres vasculares o hematológicos sobre pacientes con otras formas de cáncer. Por lo tanto, en un aspecto, el diagnóstico comprende el diagnóstico diferencial de cáncer vascular o hematológico sobre cáncer no vascular o no hematológico. Un "cáncer no vascular o no hematológico" es un cáncer que no es un cáncer de la sangre y no implica la proliferación de las células sanguíneas o células vasculares, tales como cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer esofágico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel (tal como melanoma), cáncer de tiroides, cáncer de lengua, cáncer uterino y/o cáncer cuello uterino.
50

El control puede ser un sujeto con un alto nivel de leucocitosis. Como se analiza en la presente memoria, la leucocitosis no es un síntoma que sea único para la leucemia. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden usarse para comparar un control con un alto nivel de leucocitosis que no es el resultado de un cáncer vascular o hematológico, tal como un control con inflamación, una infección y/o tomar medicación.

55 En una realización, el nivel de nucleosomas libres de células es elevado en comparación con el control.

Se entenderá que no es necesario medir los niveles de control con fines comparativos en cada ocasión. Por ejemplo, para controles sanos/no enfermos, una vez que se establece el "intervalo normal", puede usarse como punto de referencia para todos los ensayos posteriores. Se puede establecer un intervalo normal obteniendo muestras de

múltiples sujetos de control sin un cáncer vascular o hematológico y ensayando el nivel de biomarcador. Los resultados (es decir, los niveles de biomarcadores) para sujetos que se sospecha que tienen un cáncer vascular o hematológico pueden examinarse entonces para ver si están dentro, o fuera, del intervalo normal respectivo. El uso de un "intervalo normal" es práctica estándar para la detección de enfermedades.

- 5 En una realización, el método comprende adicionalmente determinar al menos un parámetro clínico para el paciente. Este parámetro puede usarse en la interpretación de los resultados. Los parámetros clínicos pueden incluir cualquier información clínica relevante, por ejemplo, sin limitación, sexo, peso, índice de masa corporal (IMC), estado de tabaquismo y hábitos dietéticos. Por lo tanto, en una realización, el parámetro clínico se selecciona del grupo que consiste en: edad, sexo e índice de masa corporal (IMC).
- 10 En una realización, el método de la invención se realiza para identificar a un sujeto con alto riesgo de tener un cáncer vascular o hematológico y, por lo tanto, necesita ensayos adicionales (es decir, investigaciones adicionales del cáncer). El ensayo adicional puede implicar uno o más de: biopsia (tal como biopsia de médula ósea o biopsia de ganglios linfáticos), ensayo citogenético, inmunofenotipado, escaneo CT, rayos X (en particular rayos X de pecho para identificar ganglios linfáticos hinchados) y/o punción lumbar.
- 15 Los métodos y biomarcadores descritos en la presente memoria pueden usarse para identificar si un paciente necesita una biopsia, en particular una biopsia de médula ósea o ganglio linfático. Por lo tanto, también se describe un método para identificar a un paciente que necesita una biopsia que comprende obtener una muestra de plasma de dicho paciente, detectar el nivel de nucleosomas libres de células en la muestra de plasma, y usar los resultados obtenidos del ensayo del panel para identificar si el paciente necesita una biopsia.

20 **Biomarcadores adicionales**

El nivel de nucleosomas libres de células puede detectarse o medirse como uno de un panel de mediciones. El panel puede comprender diferentes características epigenéticas del nucleosoma como se describió anteriormente en la presente memoria (por ejemplo, una isoforma de histona y un PTM). En una realización, el panel comprende una o más citoquinas, tales como una o más interleuquinas.

- 25 Las interleuquinas (IL) son un grupo de citoquinas, secretadas normalmente por leucocitos, que actúan como moléculas señal. Tienen papeles clave en la estimulación de respuestas inmunes e inflamación. Se identificaron por primera vez en la década de 1970 y se han designado numéricamente ya que se han descubierto más tipos de interleuquina. Los ejemplos de interleuquinas incluyen, pero no se limitan a: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14 e IL-15.
- 30 En una realización, la una o más interleuquinas se seleccionan del grupo que consiste en: interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-10 (IL-10) e interleuquina-1 β (IL-1 β).

La interleuquina puede ser IL-6. La interleuquina-6 (IL-6) es una citoquina con una amplia variedad de funciones biológicas. Es un potente inductor de la fiebre y de la respuesta de fase aguda. La secuencia de IL-6 humana es conocida en la técnica y se describe en el No de Acceso de UniProt. P05231. En una realización particular, la interleuquina puede ser IL-6 y el panel de mediciones puede comprender la medición de la isoforma de histona H3.1 e IL-6.

- 35 Alternativamente, o adicionalmente, la interleuquina puede ser IL-10. La interleuquina-10 (IL-10) es una citoquina antiinflamatoria con una amplia variedad de funciones biológicas. La secuencia de IL-10 humana es conocida en la técnica y se describe en el No de Acceso de UniProt. P22301. En una realización particular, la interleuquina puede ser IL-10 y el panel de mediciones puede comprender la medición de la modificación postraduccional de histona H3cit e IL-10.

- 40 Alternativamente, o adicionalmente, la interleuquina puede ser IL-1 β . La interleuquina-1 β (IL-1 β) es una citoquina proinflamatoria y está implicada en una variedad de actividades celulares, incluyendo proliferación, diferenciación y apoptosis celulares. En una realización particular, la interleuquina puede ser IL-1 β y el panel de mediciones puede comprender la medición de la isoforma de histona H3.1 e IL-1 β . Más particularmente, el panel puede comprender la medición de la isoforma de histona H3.1 e IL-1 β , en donde el cáncer vascular o hematológico es linfoma, tal como NHL.

- 45 Por ejemplo, la medición de nucleosomas libres de células se puede combinar con más de una medición de interleuquina, tal como IL-6 e IL-1 β o IL-10 e IL-1 β o IL-6 e IL-10. En una realización adicional, el panel de mediciones es H3.1, IL-6 e IL-1 β .

- 50 Los modelos pueden derivarse usando los biomarcadores. Los métodos para derivar modelos o algoritmos tales como los de las Tablas 5 y 6 de los Ejemplos son bien conocidos en la técnica y están disponibles paquetes de software adecuados. Las herramientas de software típicas para este propósito incluyen SPSS (Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales) y "R". Estos paquetes de software proporcionan un modelado de datos lineal y no lineal de datos clínicos.

55

Estará claro para los expertos en la técnica que cualquier combinación de los biomarcadores divulgados en la presente memoria puede usarse en paneles y algoritmos para la detección de cáncer vascular o hematológico, y que pueden añadirse marcadores adicionales a un panel que incluye estos marcadores.

5 Se entenderá que las realizaciones descritas en la presente memoria pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención, es decir, la realización descrita para los usos puede aplicarse igualmente a los métodos reivindicados y así sucesivamente.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

10 Se tomaron muestras de plasma de una cohorte de 116 sujetos humanos. Para cada sujeto, se recogió una extracción de sangre completa en un tubo vacutainer con EDTA y el tubo se invirtió 10 veces suavemente. La sangre completa se centrifugó durante 15 minutos a 1.500 g en 2 horas después de la extracción de la sangre. El plasma se transfirió a un criotubo y se congeló inmediatamente. En la cohorte, 62 sujetos estaban sanos, 25 sujetos tenían linfoma no de Hodgkin (NHL), 22 sujetos tenían leucemia mieloide aguda (AML) y 7 sujetos tenían leucemia linfoblástica aguda
 15 (ALL). Los sujetos con leucemia o linfoma podrían categorizarse adicionalmente como pacientes con cáncer en el diagnóstico (31 sujetos en total; 16 sujetos con NHL en el diagnóstico, 15 sujetos con leucemia en el diagnóstico), o pacientes con cáncer de recaída (15 sujetos en total; 6 sujetos con recaída de NHL, 9 sujetos con recaída de leucemia).

Las muestras se analizaron para determinar nucleosomas que contenían H3.1 mediante ELISA. Brevemente, las mediciones de nucleosomas que contienen la isoforma de histona H3.1 se realizaron de la siguiente manera: se añadieron 80 µl de tampón de ensayo y 20 µl de muestra de plasma o preparación de nucleosomas estándar a un pocillo de microtitulación recubierto con un anticuerpo dirigido para unirse a la histona H3.1. La placa de microtitulación se cubrió y se incubó con agitación suave durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Se desechó el contenido de los pocillos de microtitulación. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl de una solución de lavado y se añadieron 100 µl de un anticuerpo anti-nucleosoma biotinilado. La placa de microtitulación se cubrió de nuevo y se incubó con agitación suave durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se desechó el contenido de los pocillos de microtitulación. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl de una solución de lavado y se añadieron 100 µl de una solución de sustrato de HRP (peroxidasa de rábano picante). La placa de microtitulación se cubrió y se incubó con agitación suave durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia (DO) de los pocillos se midió a 405 nm. Los niveles de DO se usaron directamente o el nivel plasmático de nucleosomas que contenían histona H3.1 se interpoló a partir de una curva estándar.
 20
 25
 30

Los resultados de la DO se representaron gráficamente como una curva de Característica Operativa del Receptor (ROC). Los resultados se agruparon para todos los pacientes con cáncer frente a sanos, así como para todos los pacientes con linfoma frente a sanos y para todos los pacientes con leucemia (es decir, incluyendo ALL y AML) frente a sanos. Los resultados del área bajo la curva (AUC) se muestran en las Tablas 1 a 3.
 35

Tabla 1: Curvas Roc para la DO de H3.1 en plasma - Todos los pacientes

Parámetros	Cáncer frente a Sano	NHL frente a Sano	Leucemia frente a Sano
Tamaño	54 Cáncer frente a 62 Sanos	25 NHL frente a 62 Sanos	29 Leuc. frente a 62 Sanos
AUC	0,911	0,943	0,885
Sens. para 80 % de Espec.	81,5 %	88 %	75,9 %
Sens. para 90 % de Espec.	75,9 %	84 %	69 %
Sens. para el 95 % de Spec.	74,1 %	80 %	69 %
Sens. para 100 % de Espec.	66,7 %	72 %	62,1 %
R ²	66,6 %	72,9 %	62,2 %

Tabla 2: Curvas Roc para la DO de H3.1 en plasma - Pacientes en el diagnóstico

Parámetros	Cáncer en el diagnóstico frente a Sano	NHL en el diagnóstico frente a Sano	Leucemia en el diagnóstico frente a Sano
Tamaño	31 Cáncer frente a 62 Sanos	16 NHL frente a 62 Sanos	15 Leuc. frente a 62 Sanos
AUC	0,925	0,932	0,918
Sens. para 80 % de Espec.	83,9 %	87,5 %	80 %
Sens. para 90 % de Espec.	80,6 %	81,3 %	80 %
Sens. para el 95 % de Spec.	80,6 %	81,3 %	80 %
Sens. para 100 % de Espec.	74,2 %	75 %	73,3 %
R ²	71,1 %	70 %	70,1 %

Tabla 3: Curvas Roc para la DO de H3.1 en plasma – Pacientes con recaída

Parámetros	Recaída del cáncer frente a Sano	Recaída de NHL frente a Sano	Recaída de leucemia frente a Sano
Tamaño	15 Cáncer frente a 62 Sanos	6 NHL frente a 62 Sanos	9 Leuc. frente a 62 Sanos
AUC	0,878	0,954	0,828
Sens. para 80 % de Espec.	80 %	83,3 %	77,8 %
Sens. para 90 % de Espec.	73,3 %	83,3 %	66,7 %
Sens. para el 95 % de Spec.	73,3 %	83,3 %	66,7 %
Sens. para 100 % de Espec.	66,7 %	66,7 %	66,7 %
R ²	62,2 %	69,4 %	54,1 %

- 5 Los niveles de nucleosomas libres de células que contenían H3.1 fueron capaces de discriminar más del 75 % de los pacientes con cáncer en la sangre de donantes sanos con una especificidad del 90 %, como se muestra en la Tabla 1. Esto fue capaz de aumentar hasta más del 80 % con una especificidad del 90 % para pacientes con cáncer en el diagnóstico, como se muestra en la Tabla 2. Los resultados también indicaron que el biomarcador es particularmente eficaz en la identificación de pacientes con linfoma porque el 84 % de los pacientes con NHL se distinguieron de los sujetos sanos con una especificidad del 90 % (véase la Tabla 1).
- 10

En la **Figura 1**, se muestran las concentraciones de H3.1, derivadas de los valores de DO usando una curva estándar para la interpolación, en muestras de plasma para todos los pacientes con AML, ALL y NHL en comparación con el nivel en pacientes sanos. Existe una clara elevación en los niveles de H3.1 en pacientes con cánceres hematológicos

en comparación con sujetos sanos.

Los resultados muestran que los niveles de nucleosomas, particularmente los nucleosomas que contienen H3.1, se pueden usar para la detección de cáncer hematológico.

Ejemplo 2

5 El nivel de nucleosomas libres de células que contenían H3.1 en muestras de plasma humano ensayadas en el Ejemplo 1 se compararon adicionalmente con los niveles de H3.1 en muestras de plasma obtenidas de pacientes humanos con otras formas de cáncer, también recogidas como se describe en el Ejemplo 1.

10 Los resultados se muestran en la **Figura 2**. Sorprendentemente, se encontró que el nivel de H3.1 podría usarse para diferenciar entre sujetos con cáncer hematológico frente a pacientes con otras formas de cáncer. Los niveles de H3.1 fueron significativamente elevados en pacientes para cada tipo de cáncer en la sangre (ALL, AML y NHL) en comparación con los niveles de H3.1 en muestras de plasma de pacientes con cáncer de vejiga, hueso, cerebro, esófago, cabeza y cuello, piel, tiroides, lengua, útero y cuello uterino y melanoma.

Ejemplo 3

15 Los niveles de nucleosomas libres de células con modificaciones postraduccionales se ensayaron en las muestras de plasma humano descritas en el Ejemplo 1. Los métodos ELISA se realizaron de una manera similar al método ELISA para H3.1 como se describe en el Ejemplo 1, excepto que el anticuerpo dirigido a unirse a la histona H3.1 se reemplazó con un anticuerpo dirigido a una modificación de histona postraduccionales seleccionada de H3cit, H3K27Me3 y H4panAc. Los resultados se resumen en la Tabla 4. Los resultados también se presentan gráficamente para todos los cánceres de la sangre y para cada tipo de cáncer de la sangre (véanse las **Figuras 3-5**).

20 Tabla 4: Curvas Roc para nucleosomas con PTM en plasma - todos los cánceres de la sangre

Biomarcadores	AUC	Sensibilidad 80 % de Especif.	Sensibilidad 90 % de Especif.	Tamaño	R ²
DO H3cit	0,913	85,2 %	77,8 %	54 Cáncer frente a 62 Sanos	66 %
DO H3K27Me3	0,822	72,2 %	50 %	54 Cáncer frente a 62 Sanos	36,8 %
RLU H4panAc	0,847	77,8 %	68,5 %	54 Cáncer frente a 62 Sanos	55,8 %

25 Todas las modificaciones postraduccionales de nucleosomas ensayadas muestran una elevación significativa en pacientes con cánceres de la sangre en comparación con controles sanos. Incluso cuando los cánceres de la sangre están separados por tipo (ALL, AML, NHL), hay una elevación significativa de los niveles de nucleosomas libres de células H3cit, H3K27Me3 y H4panAc en muestras de plasma en comparación con controles sanos (véanse las **Figuras 3B, 4B y 5B**). Los niveles de nucleosomas con modificaciones postraduccionales estaban elevados, la mayor parte, en muestras de plasma obtenidas de pacientes con ALL.

Ejemplo 4

30 Los dos mejores marcadores de nucleosomas libres de células (H3.1 y H3cit) se combinaron juntos o en combinación con mediciones de diferentes interleuquinas. Los niveles de nucleosomas libres de células se midieron como se ha descrito anteriormente y los niveles de interleuquina en plasma se midieron usando métodos ELISA disponibles comercialmente.

35 Los resultados del ensayo se modelaron mediante análisis de regresión logística para entrenar el modelo o algoritmo con el AUC más alto para una comparación de pacientes humanos con cáncer en la sangre frente a donantes humanos normales. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Curvas Roc para paneles de biomarcadores combinados en plasma - todos los cánceres de la sangre[‡]

Modelos de Biomarcadores	AUC	Sensibilidad 80 % de Especif.	Sensibilidad 90 % de Especif.	R ²
Modelo 01: LnY = H3cit	0,913	85,2 %	77,8 %	66 %
Modelo 02: LnY = H3.1	0,911	81,5 %	75,9 %	66,6 %
Modelo 03: LnY = H3.1 + H3cit	0,921	88,9 %	81,5 %	68,1 %
Modelo 04: LnY = H3cit + H3K27me3	0,923	85,2 %	81,5 %	68,3 %
Modelo 05: LnY = H3.1 + hIL6	0,935	87 %	75,9 %	69,4 %
Modelo 06: LnY = H3cit + hIL10	0,930	87 %	79,6 %	69,6 %
Modelo 07: LnY = H3cit + hIL1 β + hIL10	0,935	90,7 %	85,2 %	73,2 %
Modelo 08: LnY = H3.1 + hIL1 β + hIL6	0,936	92,6 %	75,9 %	71 %

* Tamaño de la cohorte: 54 Cáncer frente a 62 Sanos

5 Todos los modelos fueron capaces de discriminar más del 75 % de los pacientes con cáncer en la sangre de donantes sanos al 90 % de especificidad, como se muestra en la Tabla 5. Los resultados muestran que los niveles de nucleosomas pueden combinarse con los niveles de interleuquina como un panel de ensayo eficaz con un algoritmo asociado para la detección de cáncer hematológico.

Ejemplo 5

10 Se modelaron muestras de plasma de sólo aquellos pacientes humanos con NHL mediante análisis de regresión logística tal como se describe en el Ejemplo 4. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Curvas Roc para paneles de biomarcadores combinados en plasma - cánceres NHL[‡]

Modelos de Biomarcadores	AUC	Sensibilidad 80 % de Especif.	Sensibilidad 90 % de Especif.	R ²
Modelo 01: LnY = H3cit	0,919	84 %	80 %	65,3 %
Modelo 02: LnY = H3.1	0,943	88 %	84 %	72,9 %
Modelo 03: LnY = H3.1 + hIL1 β	0,979	100 %	92 %	83,6 %

‡ Tamaño de la cohorte: 25 LNH frente a 62 Sanos

15 Todos los modelos fueron capaces de discriminar al 80 % o más pacientes con NHL de donantes sanos al 90 % de especificidad, como se muestra en la Tabla 6. En particular, la combinación de H3.1 e IL-1 β fue capaz de discriminar el 100 % de los pacientes con NHL al 80 % de especificidad. Los resultados muestran que los niveles de nucleosomas e interleuquinas se pueden usar como un panel de ensayo eficaz con un algoritmo asociado para la detección de NHL.

Ejemplo 6

20 Se tomaron muestras de plasma de 73 perros diagnosticados con hemangiosarcoma canino, 127 perros diagnosticados con linfoma canino y 134 perros control sin cáncer. Las muestras se analizaron para determinar nucleosomas que contenían H3.1 mediante ELISA.

Se encontró que los perros sanos tenían una concentración uniformemente baja de nucleosomas circulantes que contenían la isoforma de histona H3.1 de menos de 67,4 ng/ml (media 32 ng/ml, mediana 31 ng/ml).

5 Se encontró que los perros diagnosticados con linfoma tenían niveles muy elevados de nucleosomas circulantes que contenían la isoforma de histona H3.1 (media 570 ng/ml, mediana 211 ng/ml). Un diagrama de puntos y una curva ROC de los resultados obtenidos para el linfoma canino se muestran gráficamente en la Figura 6A y 6B, respectivamente. El AUC para la detección de linfoma fue del 87 %. Usando un valor de corte de 67,4 ng/ml, la especificidad del ensayo fue del 100 % con una sensibilidad del 74 %. El uso de un valor de corte más bajo de 48,1 ng/ml dio una sensibilidad del 81 % a una especificidad del 90 %.

10 También se encontró que los perros diagnosticados con hemangiosarcoma tenían niveles muy elevados de nucleosomas circulantes que contenían la isoforma de histona H3.1 (media 513 ng/ml, mediana 361 ng/ml). Un diagrama de puntos y una curva ROC de los resultados obtenidos para el hemangiosarcoma canino se muestran gráficamente en las Figuras 7A y 7B, respectivamente. El AUC para la detección de hemangiosarcoma fue del 97,6 %. Usando un valor de corte de 67,4 ng/ml, la especificidad del ensayo fue del 100 % con una sensibilidad del 89 %. El uso de un valor de corte inferior de 48,1 ng/ml dio una sensibilidad del 95 % a una especificidad del 90 %.

15 Como se encontró en la enfermedad humana, el nivel de nucleosomas circulantes observados para perros diagnosticados con linfoma o hemangiosarcoma también fue mucho mayor que el observado para otros tumores caninos investigados.

20 La mayoría de los ensayos para proteínas humanas no son transferibles a otros animales. Sin embargo, la estructura de los nucleosomas está muy conservada entre especies e incluso filos. Hemos mostrado que esto significa que este ensayo para nucleosomas H3.1 humanos es transferible a otras especies, incluyendo perros y caballos. Además, los resultados observados para cánceres vasculares y hematopoyéticos en sujetos caninos son notablemente similares a los resultados observados en sujetos humanos. Concluimos que los métodos de la invención son métodos altamente eficaces para la detección de cánceres vasculares y hematopoyéticos tanto humanos como animales.

Ejemplo 7

25 Se tomaron muestras de plasma en serie de 2 perros que se estaban sometiendo a tratamiento para hemangiosarcoma y 2 perros que se estaban sometiendo a tratamiento para linfoma. Se recogieron todas las muestras de los 4 perros y posteriormente se analizaron para determinar nucleosomas que contenían la isoforma de histona H3.1 después del último día de tratamiento en la Figura 8 de modo que la información no informaba de decisiones de tratamiento clínico, que se hicieron por fundamentos clínicos.

30 La proteína C reactiva (CRP) es un biomarcador muy conocido para la inflamación y ésta también se midió en las muestras como control para determinar si los niveles de nucleosomas simplemente reflejaban una respuesta inflamatoria o proporcionaban información adicional con respecto al estado del sujeto, pronóstico y respuesta al tratamiento.

35 El perro 1 (Figura 8A) se diagnosticó con hemangiosarcoma que se trató mediante un régimen de quimioterapia de 4 fármacos conocidos como CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) comenzando desde el día 1 hasta el día 129. El tratamiento fue exitoso y se determinó que el perro 1 estaba en remisión sobre fundamentos clínicos el día 160. El éxito del tratamiento con CHOP se refleja en la tendencia descendente en los niveles de nucleosomas durante el curso del tratamiento y la remisión de la enfermedad se predijo por los niveles de nucleosomas casi normales sobre el día 122. Los resultados demuestran que los niveles de nucleosomas son útiles como un indicador pronóstico y pueden usarse para guiar los regímenes de tratamiento y para monitorizar sujetos en remisión para la recaída de la enfermedad. El análisis de CRP no fue útil para fines clínicos.

45 El perro 2 (Figura 8B) se diagnosticó inicialmente con hemangiosarcoma en 2017 y se trató con doxorubicina y un agente inmunomodulador. Se monitorizó regularmente mediante exploración de CT de cuerpo entero cada 2-3 meses. Se observó que tenía recurrencia 2 años después y esto se refleja en un alto nivel de nucleosomas circulantes. La recurrencia se trató con éxito con doxorubicina, dacarbazina y un agente inmunomodulador, así como radiación pulmonar completa y radioterapia corporal estereotáctica (SBRT) y se determinó que el perro 2 estaba en remisión basándose en la imagenología de CT de cuerpo completo. El éxito de los diversos tratamientos se refleja en los niveles de nucleosomas casi normales medidos en enero de 2020. En febrero de 2020 se diagnosticó que el perro 2, basándose en la imagenología, tenía una respuesta completa, pero de manera interesante los niveles de nucleosomas medidos comenzaron a aumentar en febrero antes de que la imagenología fuera capaz de detectar la enfermedad progresiva en la siguiente exploración en abril de 2020. Los niveles de nucleosomas permanecieron altos cuando se observó una enfermedad progresiva en abril. Si se hubieran conocido los niveles de nucleosomas en el momento del tratamiento, se habría establecido una monitorización más intensa para este paciente en febrero. Los resultados demuestran que los niveles de nucleosomas pueden usarse para guiar los regímenes de tratamiento y para monitorizar sujetos en remisión para la recaída de la enfermedad. El análisis de CRP no fue útil para fines clínicos.

55 El perro 3 (Figura 9A) se diagnosticó inicialmente y se trató con éxito para linfoma en 2018, pero salió de la remisión y esto se reflejó en los niveles de nucleosomas medidos. Se trató el día 1 con vincristina para la enfermedad progresiva (PD) como parte de un régimen de quimioterapia CHOP. El tratamiento con vincristina condujo a una mejora en la

afección clínica a enfermedad estable (SD) que se reflejó en una caída en el nivel de nucleosomas como se muestra por los resultados en la Figura 9A. Sin embargo, el tratamiento con CHOP se interrumpió debido tanto a razones de toxicidad como a una falta de respuesta clínica observada robusta. El tratamiento con lomustina más L-asparaginasa (L-spar) se inició el día 22 y fue seguido de tratamientos adicionales con lomustina los días 34, 79 y 113. Los hallazgos clínicos mejoraron a la remisión parcial en los días 34 y 79 según se determinó a través de mediciones tumorales y luego a la respuesta completa (CR) al tratamiento en los días 113 y 145, momento en el que el perro 3 estaba en remisión y no se administró quimioterapia adicional. Los niveles de nucleosomas aumentaron entre los días 22-34 y luego disminuyeron consistentemente desde el día 34 en adelante, prediciendo el éxito del tratamiento con lomustina observado posteriormente clínicamente como respuesta completa en los días 113 y 145. Además, los niveles de nucleosomas cayeron en el intervalo observado para perros sanos el día 145 según los hallazgos clínicos. Los niveles de CRP estuvieron siempre dentro del intervalo normal y no fueron útiles para fines clínicos.

El perro 4 (Figura 9B) se diagnosticó con linfoma intraabdominal, hipercalcémico en Estadio Vb. Comenzó con un régimen de quimioterapia CHOP de vincristina y doxorubicina en el día 1 hasta el día 93 y se monitorizó su respuesta al tratamiento basándose en los niveles de calcio circulante. Los veterinarios apreciaron clínicamente que había algo de respuesta a la vincristina, pero no respuesta a doxorubicina. El tratamiento se cambió entonces de CHOP a lomustina más L-spar los días 108-164 a los que tampoco respondió. Como se había observado respuesta a la vincristina, se inició el tratamiento por COP (CHOP sin el uso de doxorubicina) el día 164 usando vincristina (no pudo tomarse una muestra de sangre el día 167). El perro 4 respondió a la terapia con COP y todavía estaba respondiendo al tratamiento en el momento de escribir este documento. Los niveles de nucleosomas medidos reflejan los hallazgos clínicos observados (Figura 9B). Hubo una disminución en el nivel de nucleosomas en la mayoría de los puntos de tiempo después del tratamiento con vincristina, lo que refleja la respuesta a esta terapia y un aumento en el nivel de nucleosomas después de cada dosis de doxorubicina, lo que refleja la falta de respuesta a este tratamiento. También se encontró clínicamente que el perro 4 tenía una respuesta parcial a ciclofosfamida, lo que también se reflejó en una concentración disminuida de nucleosomas. Sin embargo, los niveles de nucleosomas permanecieron por encima de los niveles normales, lo que indica la necesidad continua de un tratamiento adicional. Las mediciones de nucleosomas se correlacionan claramente con los hallazgos clínicos y se pueden usar para monitorizar la remisión de la enfermedad y para guiar la selección del tratamiento. Por ejemplo, los niveles de nucleosomas predijeron la falta de respuesta a la terapia con doxorubicina que podría haberse interrumpido antes si se hubiera notificado por los niveles de nucleosomas. El análisis de CRP no mostró ninguna variación significativa y no fue útil para fines clínicos.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una isoforma de histona H3.1 de un nucleosoma libre de células como biomarcador en una muestra de plasma, para el diagnóstico o detección de un cáncer vascular o hematológico.
- 5 2. El uso como se define en la reivindicación 1, en donde el nucleosoma libre de células es un mononucleosoma u oligonucleosoma.
3. El uso como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el cáncer hematológico se selecciona de leucemia, linfoma o mieloma.
4. El uso como se define en la reivindicación 3, en donde la leucemia se selecciona de leucemia linfocítica aguda (ALL) o leucemia mieloide aguda (AML), o en donde el linfoma es linfoma no de Hodgkin (NHL).
- 10 5. El uso como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el cáncer vascular se selecciona de angiosarcoma o hemangiosarcoma.
6. Un método para diagnosticar o detectar un cáncer vascular o hematológico que comprende las etapas de:
 - (i) poner en contacto una muestra de plasma obtenida del sujeto con un agente de unión para detectar o medir nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1; y
 - 15 (ii) utilizar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 detectada para diagnosticar al sujeto con el cáncer vascular o hematológico.
7. Un método para determinar el pronóstico de un sujeto con un cáncer vascular o hematológico, que comprende las etapas de:
 - (i) poner en contacto una muestra de plasma obtenida del sujeto con un agente de unión para detectar o medir nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1; y
 - 20 (ii) utilizar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 detectada como indicativo del pronóstico de dicho cáncer vascular o hematológico.
8. Un método para monitorizar la eficacia de una terapia en un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o está predispuesto a un cáncer vascular o hematológico, que comprende las etapas de:
 - (i) poner en contacto una muestra de plasma obtenida del sujeto con un agente de unión para detectar o medir nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1; y
 - 25 (ii) comparar el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 detectada con una muestra de plasma anterior tomada de dicho sujeto para determinar la eficacia de dicha terapia.
9. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde dicha detección o medición comprende un método de inmunoensayo, inmunoquímico, espectroscopía de masas, cromatográfico, inmunoprecipitación de cromatina o biosensor.
- 30 10. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde dicha detección o medición comprende un inmunoensayo de 2 sitios que emplea un agente de unión de detección anti-nucleosoma marcado en combinación con un agente de unión anti-histona H3.1 inmovilizado.
- 35 11. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el sujeto es un sujeto humano o animal.
12. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde se sospecha que el sujeto presenta recaída de un cáncer vascular o hematológico, y/o en donde el sujeto tiene un alto nivel de leucocitosis/un alto recuento de glóbulos blancos.
- 40 13. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, que comprende adicionalmente comparar el nivel de dichos nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 en dicha muestra de plasma con uno o más controles.
14. El método como se define en la reivindicación 13, en donde el control es un sujeto sano, un sujeto con un cáncer que no es un cáncer vascular o hematológico, o un sujeto con un alto nivel de leucocitosis.
- 45 15. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en donde el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 está elevado en comparación con el control.

16. El método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, en donde el nivel de nucleosomas libres de células que contienen la isoforma de histona H3.1 se detecta o mide como uno de un panel de mediciones, por ejemplo, en donde el panel comprende una o más interleuquinas tales como IL-6, IL-10 e IL-1 β .

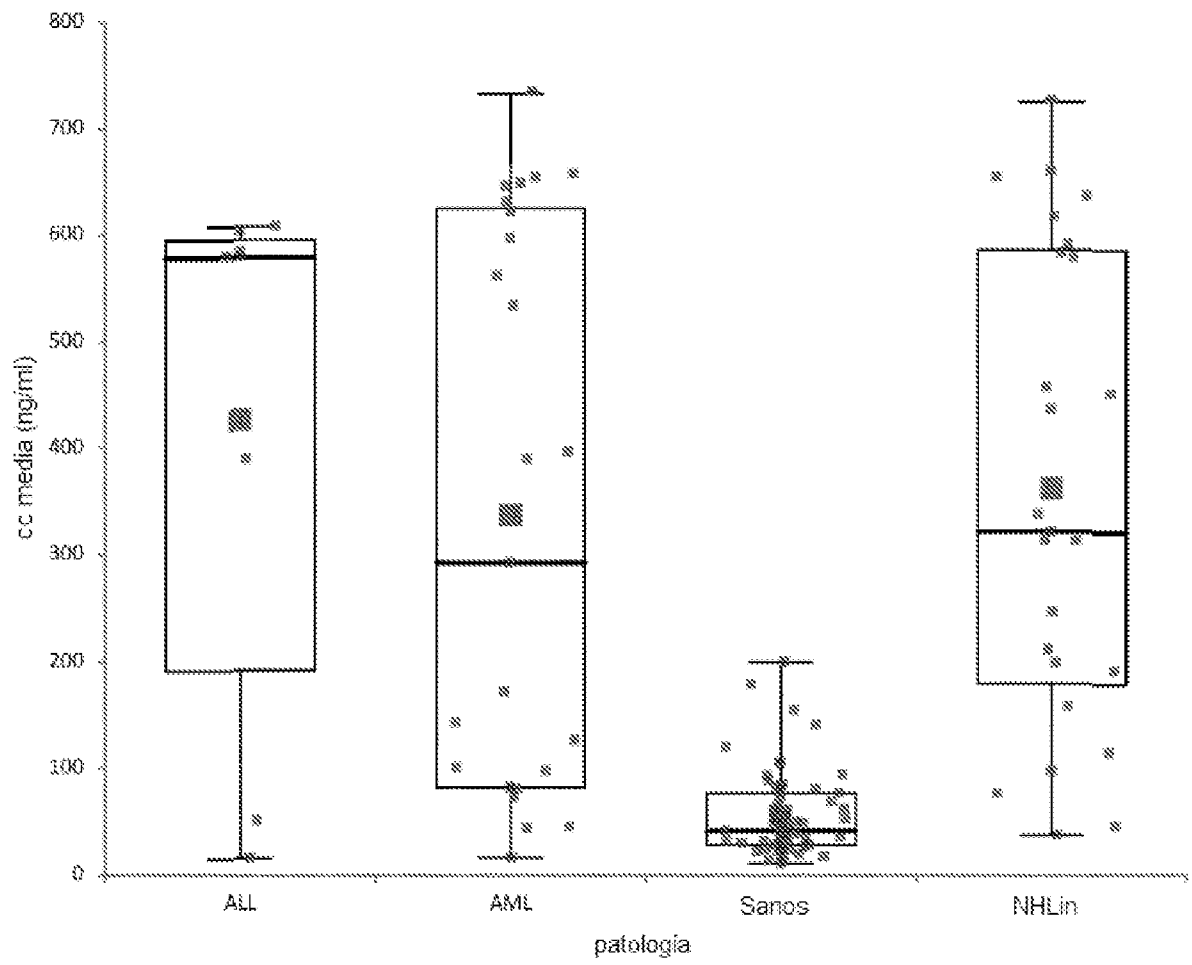


FIGURA 1

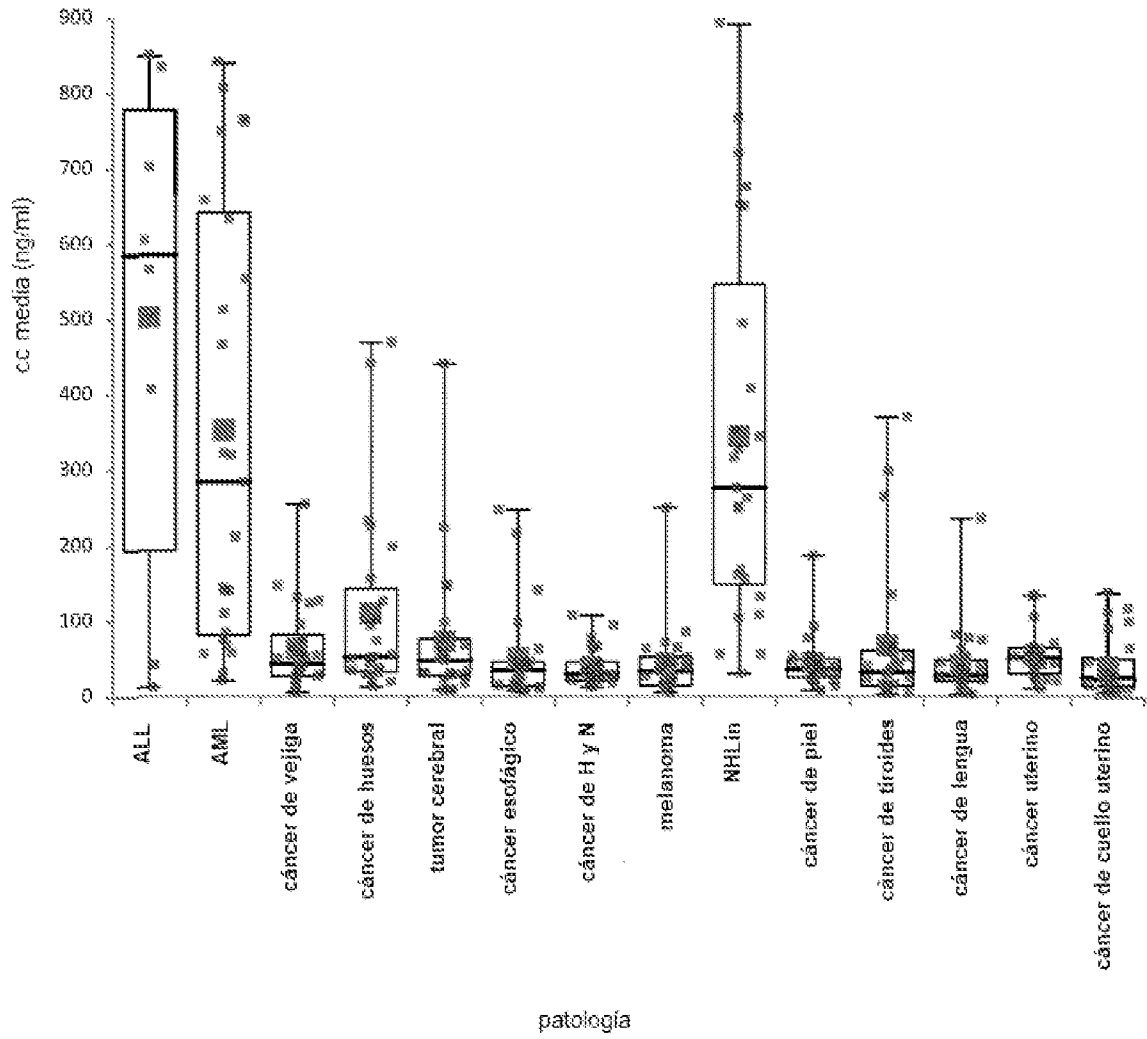
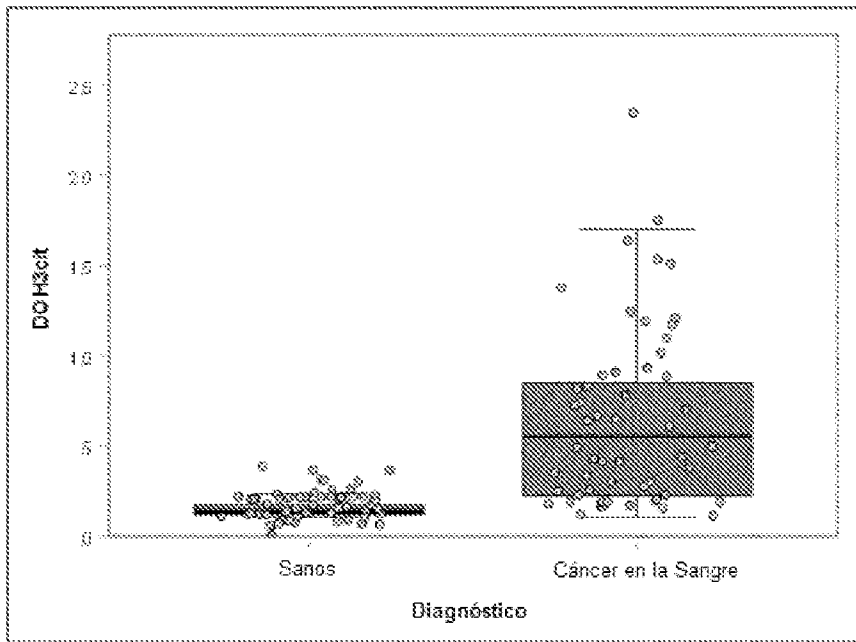


FIGURA 2

A



B

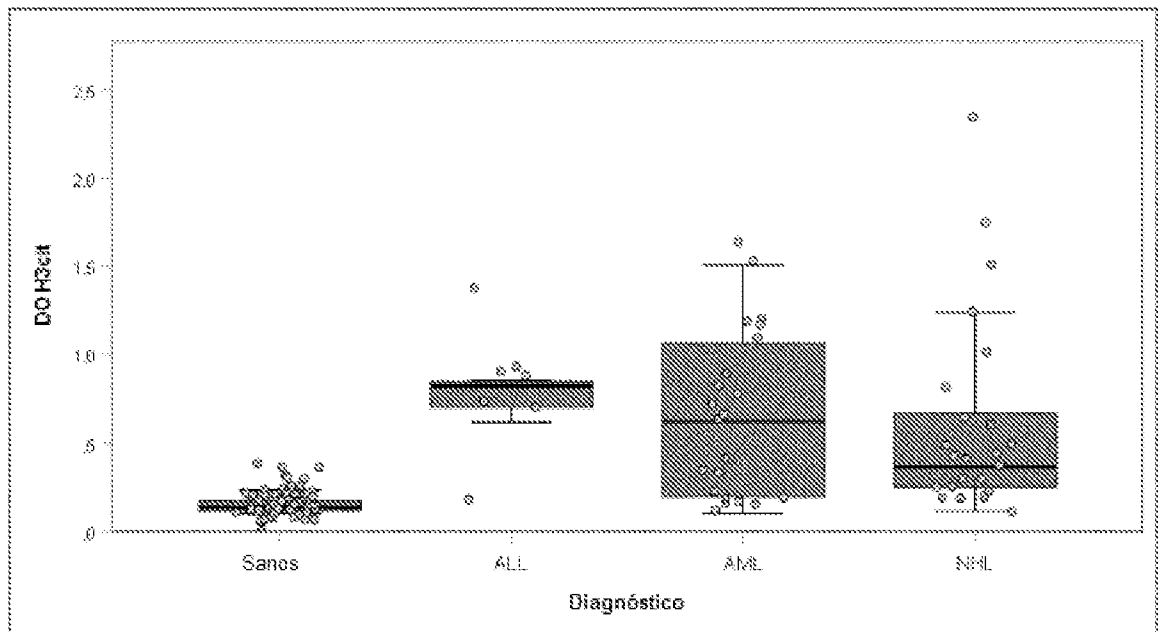
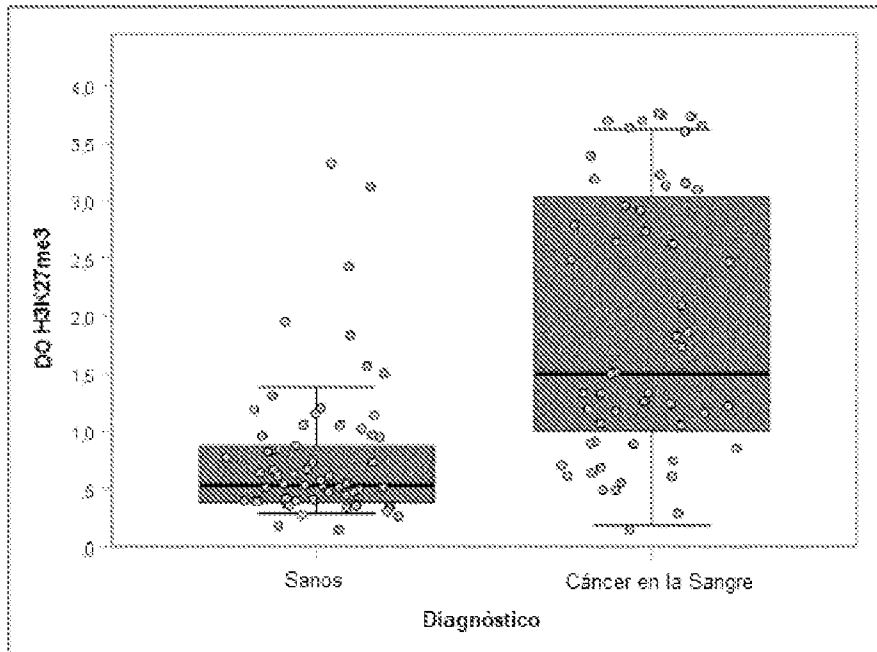


FIGURA 3

A



B

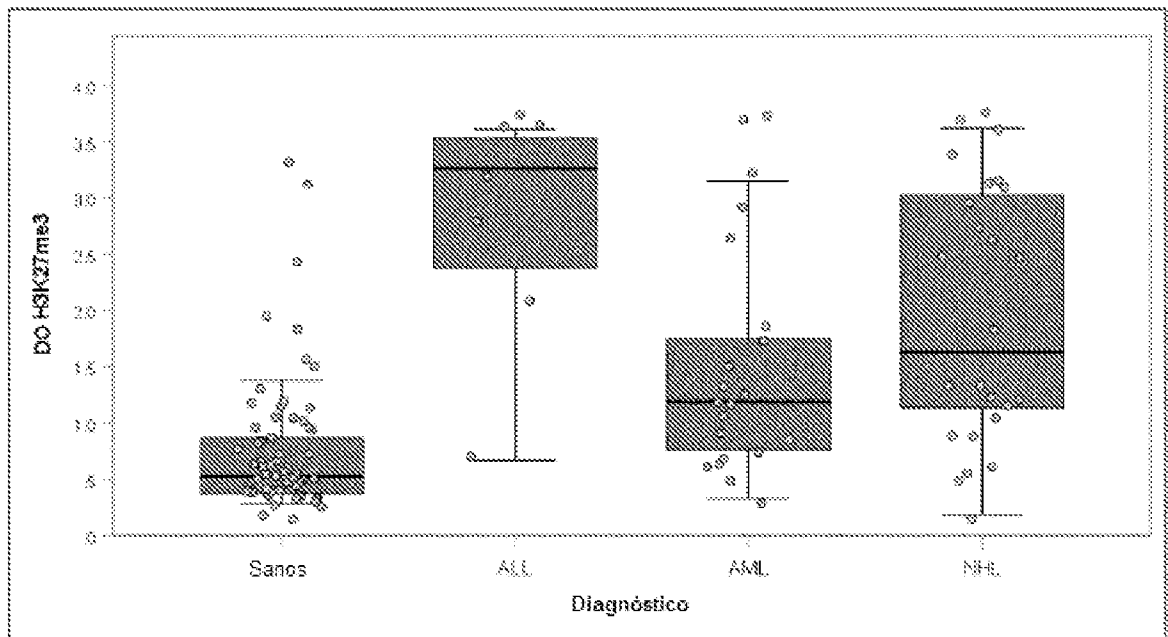
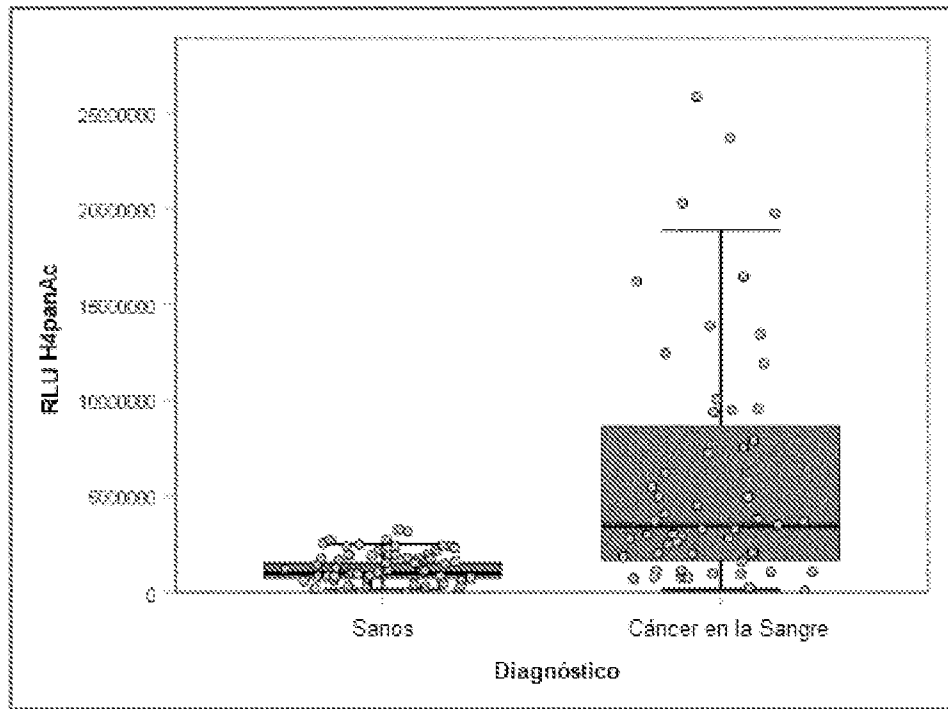


FIGURA 4

A



B

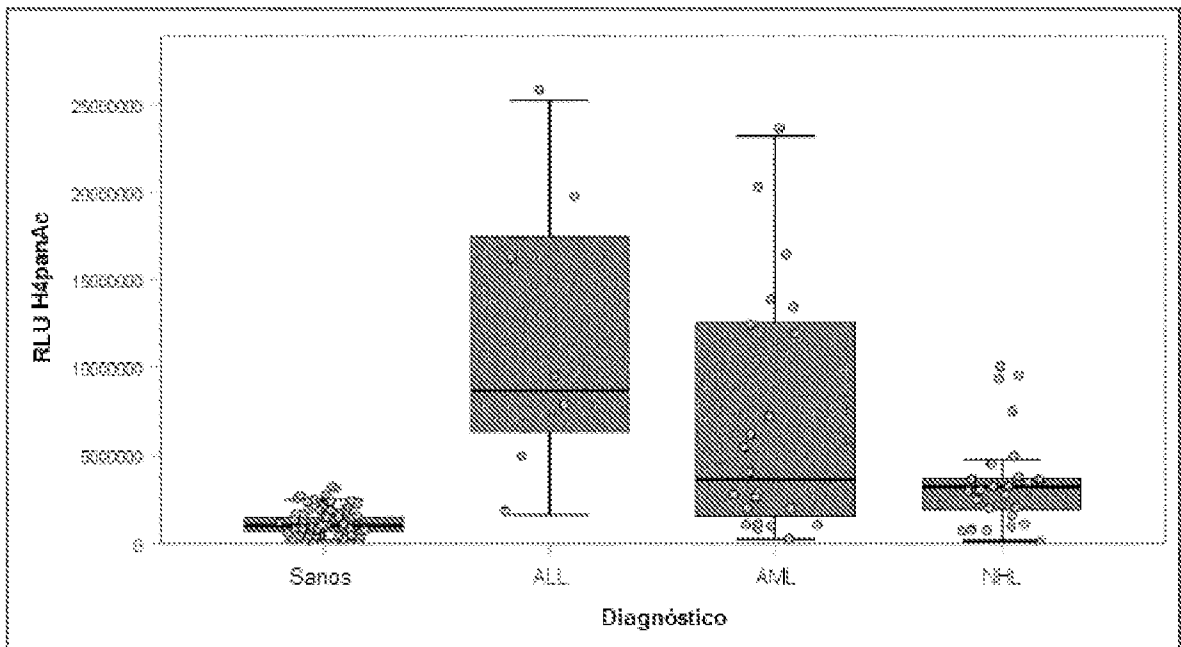
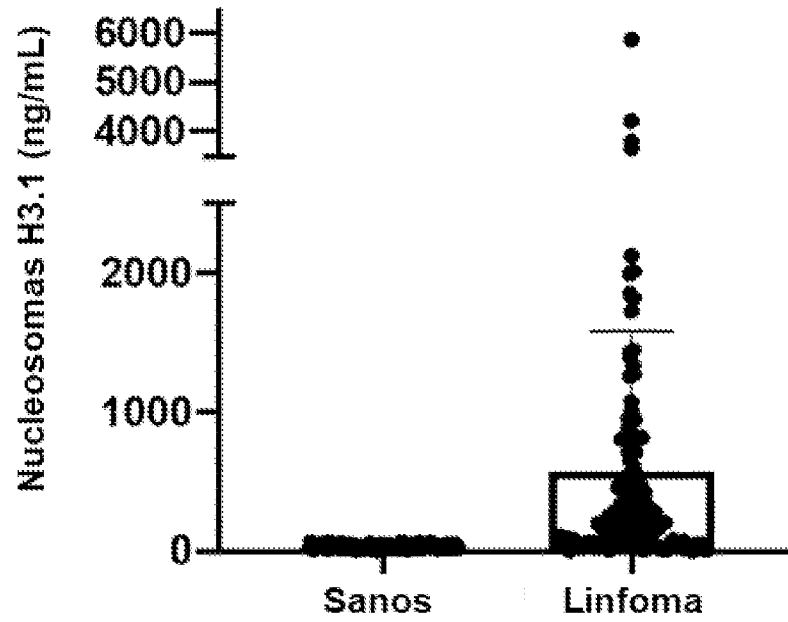


FIGURA 5

A



B

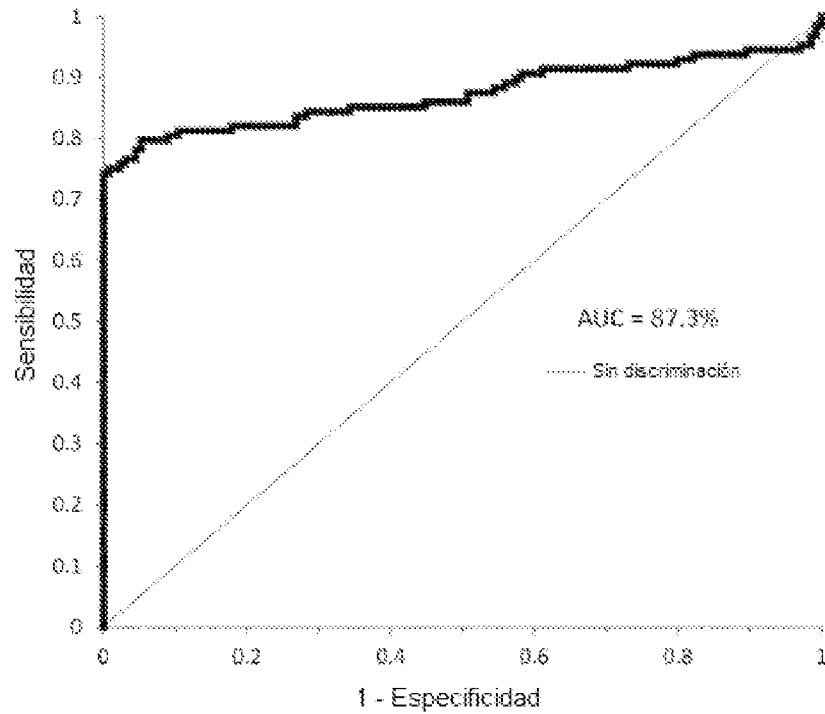
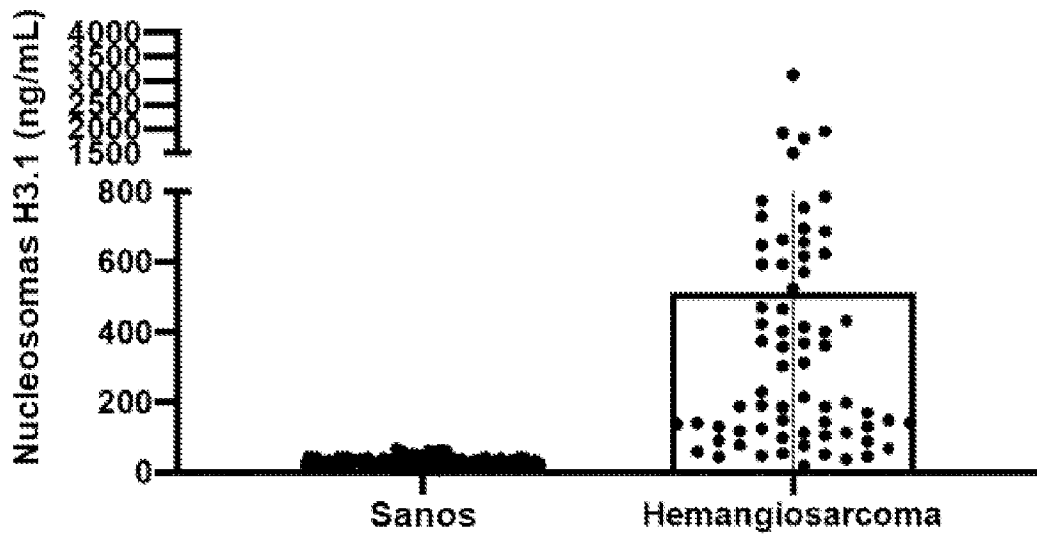


FIGURA 6

A



B

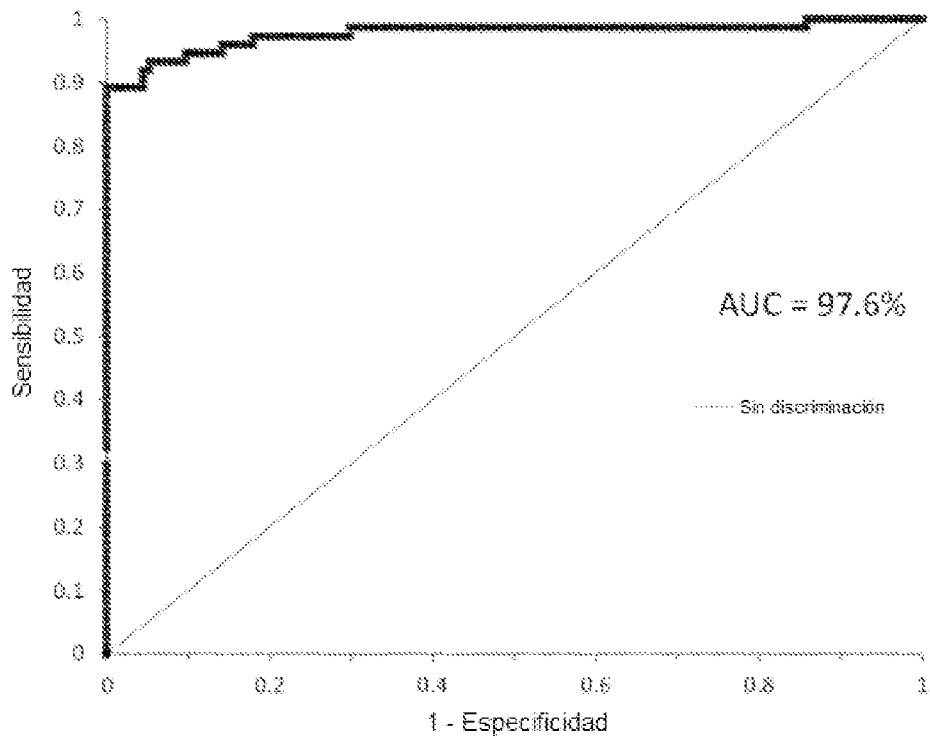
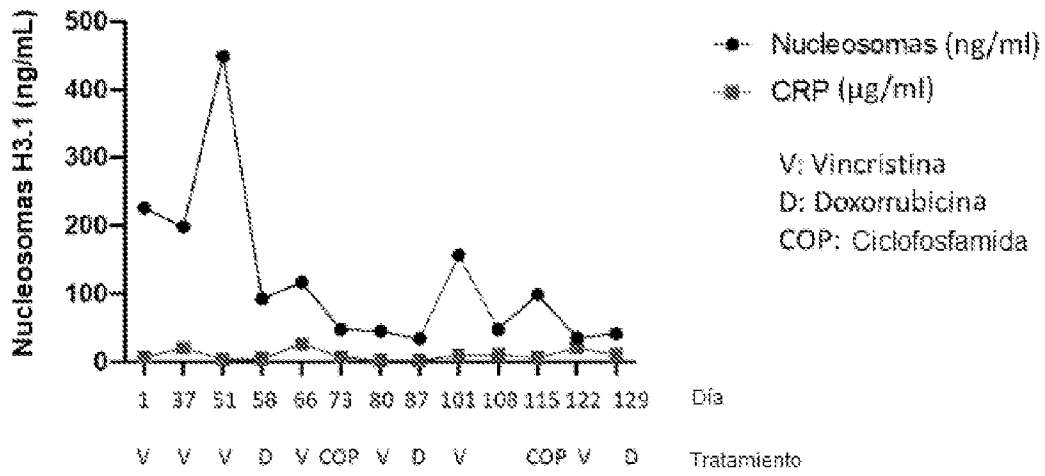


FIGURA 7

A Perro 1



B Perro 2

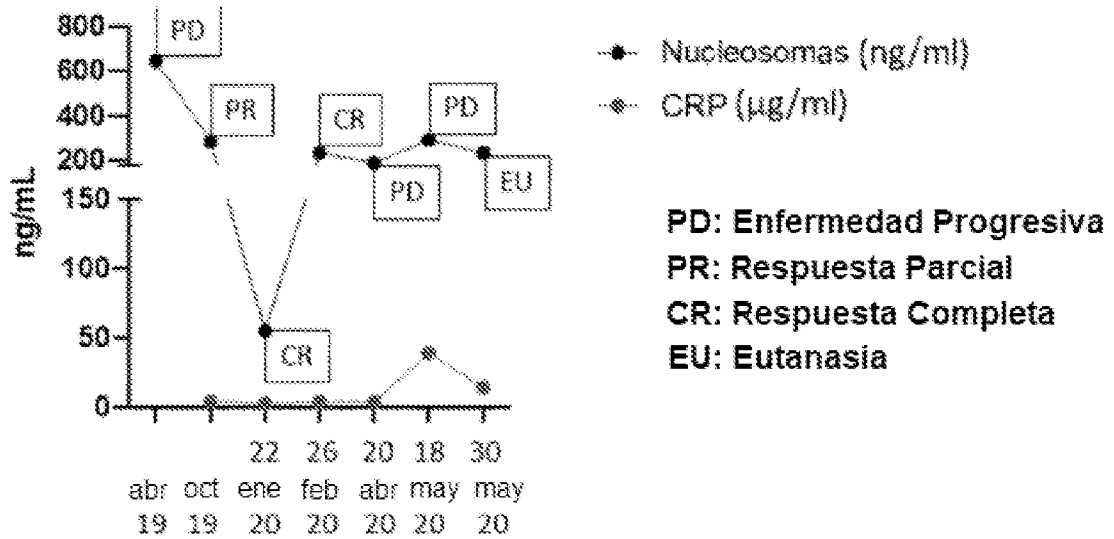
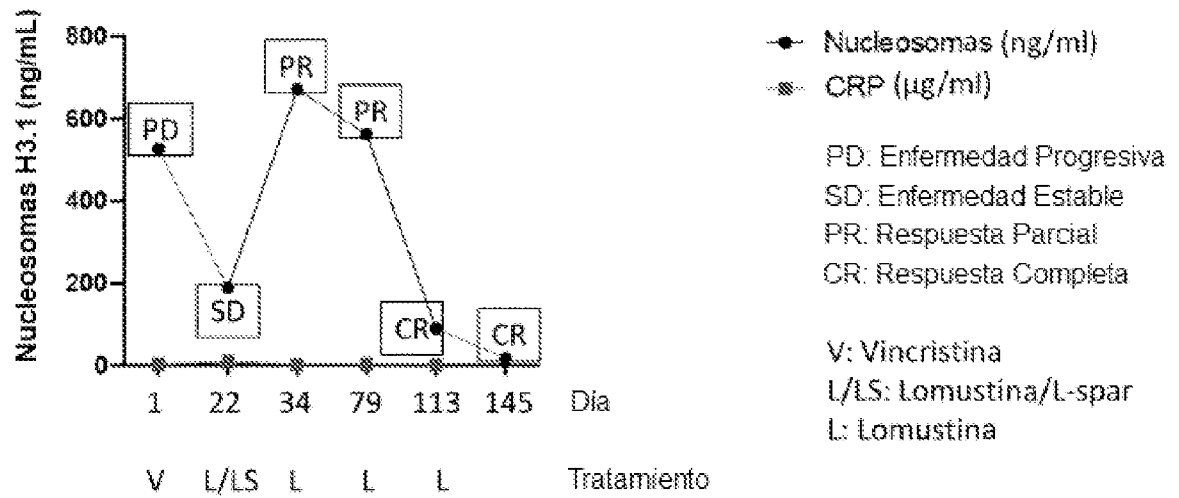


FIGURA 8

A Perro 3



B Perro 4

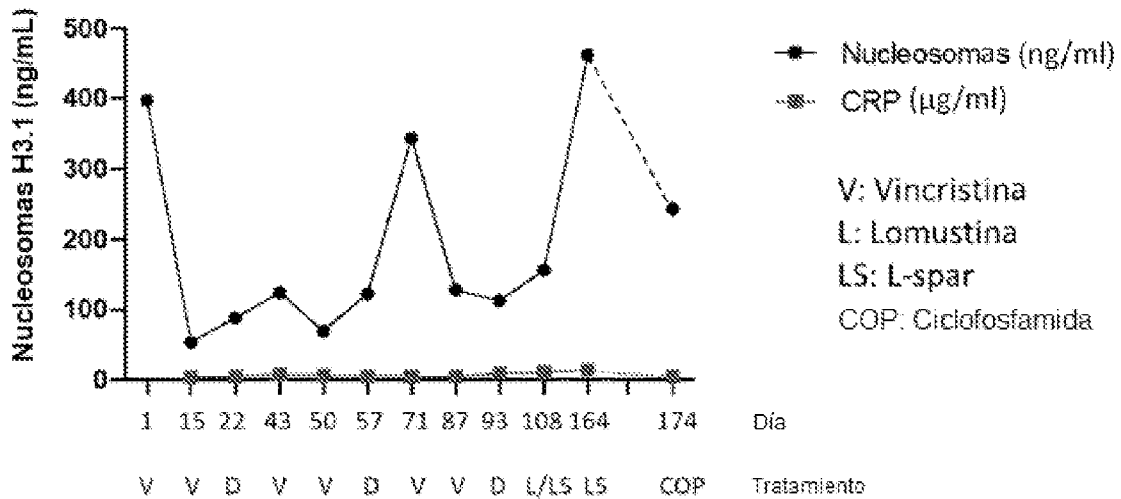


FIGURA 9