

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 830 800**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2016 PCT/GB2016/053305**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017 WO17068371**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2016 E 16787545 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2020 EP 3365684**

(54) Título: **Método para el enriquecimiento de nucleosomas libres de células**

(30) Prioridad:

21.10.2015 GB 201518665

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

04.06.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**MICALLEF, JACOB VINCENT y
ECCLESTON, MARK, EDWARD**

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 830 800 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

Método para el enriquecimiento de nucleosomas libres de células

Campo de la invención

La invención se refiere a un método para la purificación o enriquecimiento de nucleosomas libres de células de origen tumoral y ADN tumoral asociado de sangre, suero o plasma.

Antecedentes de la invención

El ADN celular existe como un complejo de proteína-ácido nucleico llamado cromatina. El nucleosoma es la unidad básica de la estructura de la cromatina y consiste en ADN bicatenario (ADNd) enrollado alrededor de un complejo proteico. El ADN se enrolla alrededor de nucleosomas consecutivos en una estructura que a menudo se dice que se asemeja a un "collar de perlas" y esto forma la estructura básica de la cromatina abierta o eucromatina. En la cromatina compactada o heterocromatina, este collar está enrollado y superenrollado en una estructura cerrada y compleja.

Cada nucleosoma en la cromatina consiste en un complejo proteico de ocho histonas centrales altamente conservadas (que comprenden un par de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4). Alrededor de este complejo se envuelven aproximadamente 146 pares de bases (pb) de ADN. Otra histona, H1 o H5, que está localizada en el nucleosoma fuera de las histonas centrales, actúa como un enlazador y está implicada en la compactación de la cromatina. Se informa que los nucleosomas libres de células comprenden predominantemente mononucleosomas junto con el ADN asociado producido como fragmentos de cromatina por digestión de la cromatina tras la muerte celular.

El recambio celular normal en adultos humanos implica la creación por división celular de unas 10^{11} células diariamente y la muerte de un número similar, principalmente por apoptosis. Durante el proceso de la apoptosis, la cromatina se degrada en mononucleosomas y oligonucleosomas, algunos de los cuales pueden encontrarse en la circulación. En condiciones normales, se reporta que el nivel de nucleosomas circulantes encontrado en sujetos sanos es bajo. Se encuentran niveles elevados en sujetos con una variedad de afecciones, incluyendo muchos cánceres, enfermedades autoinmunes, afecciones inflamatorias, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio (Holdenrieder y Stieber, 2009). Los nucleosomas de las células muertas también se pueden liberar en otros fluidos corporales, tales como la orina, las heces o el esputo.

Las anomalías del ADN son características de todas las enfermedades cancerosas. El ADN de las células cancerosas difiere del de las células sanas de muchas maneras, incluyendo, pero no limitado a, mutaciones puntuales, translocaciones, número de copias de genes, anomalías en microsatélites, integridad de la cadena de ADN y modificaciones de nucleótidos (por ejemplo, metilación de citosina en la posición 5). Estas alteraciones asociadas a tumores en la estructura o secuencia del ADN se investigan de forma rutinaria en células cancerosas o tejido extraído en una biopsia o cirugía con fines de diagnóstico clínico, pronóstico y selección de tratamiento. Las características genéticas y epigenéticas de los tumores varían entre diferentes tipos de tumores y entre diferentes pacientes con la misma enfermedad tumoral. Además, estas características varían a lo largo del tiempo dentro del mismo cáncer del mismo paciente con la progresión de la enfermedad y en el desarrollo de resistencias adquiridas a fármacos u otras terapias. Por lo tanto, la investigación en serie del ADN tumoral en las células extraídas durante la cirugía o la biopsia puede ayudar al médico a controlar la progresión de la enfermedad y detectar cualquier recidiva o resistencia al tratamiento adquirida en un estadio temprano (posiblemente muchos meses antes de la detección radiológica) y permitir cambios potencialmente exitosos en los cursos de tratamiento.

Sin embargo, los ensayos de ADN de tejidos tienen limitaciones, ya que los procedimientos de biopsia invasiva no se pueden realizar repetidamente en pacientes con fines de monitorización. Para algunos pacientes, es posible que la biopsia no se utilice en absoluto. La biopsia es cara de realizar, incómoda para el paciente, presenta un riesgo para el paciente y puede provocar complicaciones quirúrgicas. Además, un tumor en un paciente puede consistir en múltiples clones tumorales localizados dentro de diferentes áreas del mismo tumor o dentro de diferentes metástasis (en cáncer metastásico), de las cuales no pueden tomarse siempre muestras en una biopsia. Por lo tanto, una investigación de ADN de biopsia de tejido proporciona una instantánea del tumor, tanto en el tiempo como en el espacio, entre diferentes clones tumorales localizados dentro de diferentes áreas de un tumor en un momento particular en el tiempo.

La sangre de los pacientes con cáncer contiene ADN tumoral circulante (ADNct) que se cree que se origina a partir de la liberación de fragmentos de cromatina o nucleosomas en la circulación a partir de células cancerosas moribundas o muertas. La investigación de muestras concordantes de sangre y tejido de pacientes con cáncer muestra que las mutaciones asociadas al cáncer, presentes en el tumor de un paciente (pero no en sus células sanas) también están presentes en el ADNct en muestras de sangre tomadas del mismo paciente (Newman *et al*, 2014). De manera similar, las secuencias de ADN que están metiladas diferencialmente (alteradas epigenéticamente por metilación de residuos de citosina) en células cancerosas también pueden detectarse como secuencias metiladas en el ADNct en la circulación. Además, la proporción de ADN circulante libre de células (ADNcf) que está comprendido por ADNct está relacionada con

- la carga tumoral, por lo que la progresión de la enfermedad se puede monitorizar tanto cuantitativamente por la proporción de ADNct presente como cualitativamente por su composición genética y/o epigenética. El análisis del ADNct puede producir datos muy útiles y clínicamente precisos respecto al ADN que se origina de todos o muchos clones diferentes dentro del tumor y que, por tanto, integra espacialmente los clones tumorales. Además, el muestreo repetido a lo largo del tiempo es una opción mucho más práctica y económica. El análisis del (ADNct) tiene el potencial de revolucionar la detección y la monitorización de tumores, así como la detección de recidiva y resistencia adquirida a fármacos en un estadio temprano para la selección de tratamientos para tumores mediante la investigación del ADN tumoral sin procedimientos invasivos de biopsia de tejido. Dichos ensayos de ADNct se pueden utilizar para investigar todos los tipos de anomalías del ADN asociadas al cáncer (p. ej.; mutaciones puntuales, estado de modificación de nucleótidos, translocaciones, número de copias de genes, anomalías de microsatélites e integridad de la cadena de ADN) y tendrían aplicabilidad para el cribado de cáncer de rutina, la monitorización regular y más frecuente y la evaluación regular de los regímenes de tratamiento óptimos (Zhou *et al.* 2012).
- Se puede usar sangre, plasma o suero como sustrato para ensayos de ADNct y se puede emplear cualquier método de análisis del ADN incluyendo, sin limitación, secuenciación de ADN, análisis de secuenciación de ADN epigenético (p. ej., para secuencias que contienen 5-metilcitosina), PCR, BEAMing, NGS (genoma diana o completo), PCR digital, PCR en frío (coamplificación a menor temperatura de desnaturalización-PCR), MAP (pirofosforólisis activada por MIDI), PARE (análisis personalizado de extremos reorganizados) y espectrometría de masa.
- Como las anomalías del ADN son características de todas las enfermedades cancerosas y se ha observado ADNct para todas las enfermedades cancerosas en las que se ha investigado, los ensayos de ADNct tienen aplicabilidad en todas las enfermedades cancerosas. Los cánceres investigados incluyen, sin limitación, cáncer de vejiga, mama, colorrectal, melanoma, ovario, próstata, pulmón, hígado, endometrio, ovario, linfoma, oral, leucemias, cabeza y cuello y osteosarcoma (Crowley *et al.* 2013; Zhou *et al.* 2012; Jung *et al.* 2010). La naturaleza de los ensayos de ADNct se ilustrará ahora mediante la descripción de tres enfoques de ejemplo (no limitativos).
- El primer ejemplo implica la detección de una mutación de la secuencia génica asociada al cáncer en el ADNct. Los análisis de sangre que implican la detección de una sola mutación génica en el ADNct generalmente tienen una baja sensibilidad clínica. Hay dos razones para esto. En primer lugar, aunque todos los cánceres tienen mutaciones, la frecuencia de cualquier mutación particular en una enfermedad cancerosa particular suele ser baja. Por ejemplo, aunque las mutaciones en K-ras y p53 se consideran dos de las mutaciones cancerosas más frecuentes y se han estudiado en una amplia gama de cánceres, incluyendo los cánceres de vejiga, mama, colon, pulmón, hígado, páncreas, endometrio y ovario, se detectaron en el 23 %-64 % y el 17 %-54 % de las muestras de tejido canceroso, respectivamente. En segundo lugar, incluso si el tejido canceroso de un paciente contiene la mutación, el nivel o la concentración de ADNct mutado presente en la sangre del paciente puede ser bajo y difícil de detectar. Por ejemplo, las mutaciones en K-ras y p53 podrían detectarse en el ADNct del 0 %-75 % de los pacientes con tejido positivo para K-ras y p53. La suma de estos dos efectos significó que se detectaron mutaciones en K-ras o p53 en la sangre de menos del 40 % de los pacientes con cáncer (Jung *et al.* 2010).
- El segundo ejemplo implica la detección de múltiples mutaciones de secuencias génicas asociadas al cáncer en el ADNct. Aunque las mutaciones de cualquier gen en particular, tal como K-ras o p53, pueden estar presentes solo en una minoría de los cánceres, todos los cánceres contienen mutaciones, por lo que el estudio de un panel de mutaciones lo suficientemente grande debería, en principio, facilitar la detección de la mayoría o incluso de todos los tumores. Por tanto, una forma de aumentar la sensibilidad clínica de dichos ensayos es analizar una amplia gama de mutaciones en muchos genes. Newman *et al.* han adoptado este enfoque para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) e investigaron 521 exones y 13 secuencias de intrones de 139 genes mutados de forma recurrente. Las mutaciones estudiadas abarcaron múltiples clases de alteraciones genéticas asociadas al cáncer, incluyendo la variación de un solo nucleótido (SNV) y los genes de fusión. De esta manera, los autores informaron de la detección de más del 95 % de tumores en estadio II-IV y el 50 % de tumores en estadio I con una especificidad del 96 % en los análisis de sangre de ADNct (Newman *et al.* 2014).
- El tercer ejemplo implica la detección de alteraciones epigenéticas asociadas al cáncer en secuencias de genes particulares en el ADNct. Este enfoque se puede aplicar a cualquier modificación de ADN o nucleótidos. Un excelente ejemplo de este enfoque es la detección de genes que están metilados diferencialmente en los residuos de citosina en ciertos cánceres. Se ha investigado un gran número de genes con este propósito en una variedad de cánceres. Algunos de estos son SEPTIN-9, APC, DAPK, GSTP1, MGMT, p16, RASSF1A, T1G1, BRCA1, ERA, PRB, TMS1, MLH1, HLT, CDKN2A, SOCS1, SOCS2, PAX5, PGR, PTGS2 y RAR β 2 investigados en cánceres de vejiga, mama, colorrectal, melanoma, ovario y próstata. Un ejemplo ilustrativo de este enfoque es la detección de SEPTIN-9 metilado en ADNct para la detección de cáncer colorrectal (CRC) que, según se informó, detecta el 68 % de los casos de CRC con una especificidad clínica del 89 % (Grutzmann *et al.* 2008).
- La fracción de ADNct derivada de tumores de ADNcf circula como pequeños fragmentos de ADN de menos de 200 pb de longitud, consistente con lo esperado para los fragmentos de ADN que circulan en la forma de mononucleosomas (Newman

- et al, 2014). Se informa que los pacientes con cáncer tienen niveles más altos de ADNcf que los sujetos sanos. Los trabajadores en el campo han informado de rangos de 0-100 ng/ml (media de 30 ng/ml) de ADNcf para sujetos sanos y 0-1.000 ng/ml (media de 180 ng/ml) de ADNcf para sujetos con cáncer (Schwarzenbach et al, 2011). El ADNcf circulante consiste en moléculas de ADN de diversos tamaños hasta 20.000 pares de bases de longitud (Zhou et al, 2012). De acuerdo con la hipótesis de que el ADNct circula predominantemente como mononucleosomas, los niveles medidos de nucleosomas libres de células en la circulación son, como los niveles de ADN, más altos en pacientes con cáncer que en sujetos sanos (Holdenrieder et al, 2001). Sin embargo, los niveles elevados de nucleosomas circulantes no se usan *per se* clínicamente como biomarcadores de cáncer, ya que los nucleosomas son un producto no específico de la muerte celular y se observan niveles elevados para muchas afecciones que implican una muerte celular elevada, incluyendo el trauma agudo (Holdenrieder y Stieber, 2009). Como producto de la muerte celular, los niveles de nucleosomas circulantes pueden aumentar notablemente con el tratamiento con fármacos citotóxicos o radioterapia. Sin embargo, los nucleosomas también se aclaran de la circulación, por lo que los niveles pueden aumentar con el tratamiento y luego disminuir (Holdenrieder et al, 2001).
- Aunque el nivel de nucleosomas libres de células circulantes no se ha usado *per se* en la práctica clínica como un biomarcador sanguíneo en el cáncer, la composición epigenética de los nucleosomas libres de células circulantes en términos de su modificación de histonas, variante de histonas, modificación del ADN y contenido en aductos se ha investigado como biomarcadores sanguíneos en el cáncer (WO 2005/019826; WO 2013/030577; WO 2013/030579; WO 2013/084002).
- El origen biológico del ADNcf no se comprende bien. La fragmentación de la cromatina para producir mononucleosomas y oligonucleosomas es una característica de la muerte celular apoptótica. Se cree que las células necróticas producen moléculas de ADN más grandes de miles de pares de bases de longitud, pero la fragmentación del ADN también puede ocurrir en algunos casos de necrosis. Además, las secuencias de repetición de ADN comunes (p. ej., secuencias ALU o LINE1) pueden liberarse como fragmentos de ADN de 200-400 pares de bases a partir de células que experimentan muerte celular no apoptótica o necrótica (Schwarzenbach et al, 2011). Las células también pueden secretar fragmentos de ADN como una forma de comunicación intercelular. Se cree que el origen del ADNct está relacionado con la muerte de las células cancerosas. Los fragmentos de ADN pueden liberarse como nucleosomas a partir de células tumorales necróticas y/o apoptóticas. Sin embargo, las células necróticas y apoptóticas suelen ser fagocitadas por macrófagos u otras células depuradoras y los macrófagos que han engullido células necróticas o apoptóticas pueden liberar ADN (Schwarzenbach et al, 2011).
- Hay una variedad de métodos disponibles para extraer el ADNcf de sangre, suero o plasma y estos han sido comparados respecto al rendimiento del ADN extraído y a su eficiencia de extracción de fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Los métodos de extracción con fenol-cloroformo y yoduro de sodio proporcionan el mayor rendimiento y extraen pequeños fragmentos de ADN de menos de 200 pb de longitud. Se informa que otros métodos ensayados (incluyendo los métodos disponibles comercialmente) tienen rendimientos de extracción de ADN más bajos y no logran extraer pequeños fragmentos de ADN de menos de 200 pb de longitud (Fong et al, 2009).
- La extracción de ADNcf de sangre, suero o plasma para el análisis del ADNct generalmente se realiza utilizando productos de extracción de ADN disponibles comercialmente. Dichos métodos de extracción reivindican altas recuperaciones de ADN circulante. (>50 %) y se reivindica que algunos productos (por ejemplo, el kit de ácido nucleico circulante QIAamp producido por Qiagen) extraen fragmentos de ADN de pequeño tamaño. Los volúmenes de muestra típicos utilizados están en el rango de 1-5 mL de suero o plasma.
- Actualmente, no existen ensayos basados en ADNct de uso rutinario con fines de oncología clínica debido a una serie de limitaciones. Una limitación metodológica importante es el requisito de un ADN de alta calidad. Los métodos de muestreo de ADNct actuales producen muestras de ADNct de mala calidad debido a la naturaleza de la muestra. La principal dificultad radica en la presencia de grandes cantidades de ADNcf no tumoral en la circulación, lo que complica cualquier análisis del ADNct. Las estimaciones de diferentes trabajadores varían, pero la fracción de ADNct presente en la circulación puede ser demasiado baja para ser detectada o superior al 50 % de ADNcf. Sin embargo, para la mayoría de los pacientes con cáncer, la fracción de ADNct es una pequeña parte del ADNcf. Por ejemplo, estudios recientes informan que la fracción de ADNct aumenta con el tamaño del tumor en pacientes con cáncer de pulmón antes del tratamiento. El nivel más alto encontrado fue el 3,2 % en un paciente con una gran carga tumoral, pero se encontró que la mayoría de los pacientes tenían fracciones de ADNct inferiores al 0,1 % (Newman et al, 2014). Esto significa que, para muchas muestras de pacientes, se debe analizar un nivel muy bajo de ADNct en presencia de un nivel mucho más alto de ADN no derivado de tumores. Además, este ADN es del mismo sujeto y, por lo tanto, con una secuencia similar e interferirá en cualquier método para la cuantificación o análisis del ADNct.
- Un problema similar ocurre para la medición de los nucleosomas libres de células circulantes y/o la composición epigenética de los nucleosomas circulantes como biomarcadores de cáncer porque los nucleosomas *per se* son un indicador no específico de la muerte celular y se liberan como parte del proceso normal de renovación celular del cuerpo,

así como en afecciones asociadas con niveles elevados de muerte celular tales como enfermedades autoinmunes, accidente cerebrovascular, sepsis, postraumatismo, quemaduras, infarto de miocardio, accidente cerebral, durante el rechazo del injerto después de un trasplante de órganos y después de un ejercicio intenso. Por tanto, los nucleosomas de origen tumoral circulan junto con otros nucleosomas no tumorales de diversos orígenes celulares y tisulares. Estos nucleosomas no tumorales interferirán en cualquier método de cuantificación o análisis epigenético de nucleosomas de origen tumoral. Un efecto similar puede ocurrir en otros fluidos corporales. Las heces, por ejemplo, pueden contener nucleosomas y ADN asociado originados en las células de cáncer colorrectal junto con nucleosomas que se originan en células sanas de colon o recto. El esputo puede contener nucleosomas y ADN asociado originados en las células de cáncer de pulmón junto con nucleosomas que se originan en células pulmonares sanas. Se producirán efectos similares en otros fluidos corporales.

Sakamoto *et al.* (2010) *Cancer Epidemiology* demuestra un método de PCR específica de metilación que utiliza inmunoprecipitación con anticuerpo antihistona para la detección de ADN metilado en suero unido a histonas desacetiladas.

Deligezer *et al.* (2008) *Clinical Chemistry* describe la detección de cambios en la metilación del ADN dependientes de secuencia y específicos de tumor en el suero y plasma de pacientes con cáncer mediante ELISA, PCR e inmunoprecipitación de cromatina.

Scaffidi P. (2015) *Biochim Biophys Acta*. es un artículo de revisión que analiza las alteraciones y anomalías de la histona enlazadora H1 en el cáncer.

Por tanto, existe una gran necesidad de un método para el enriquecimiento de nucleosomas y ADN de origen tumoral a partir de muestras de sangre, suero o plasma y muestras de otros fluidos corporales. De manera similar, existe la necesidad de métodos analíticos para nucleosomas libres de células circulantes que sean capaces de distinguir los nucleosomas de origen tumoral y no tumoral para una detección mejorada de estados de enfermedad cancerosa.

Resumen de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método *in vitro* para analizar nucleosomas libres de células de origen tumoral a partir de una muestra biológica mediante purificación por afinidad en donde dicho método comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
- (ii) aislar los nucleosomas de la muestra que no están unidos al agente de unión a la histona H1; y
- (iii) analizar los nucleosomas aislados mediante inmunoensayo o espectroscopia de masa.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método *in vitro* para aislar ADN tumoral purificado de una muestra biológica, en donde dicho método comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
- (ii) aislar los nucleosomas que no están unidos al agente de unión a la histona H1;
- (iii) extraer el ADN de la muestra de nucleosomas aislados en la etapa (ii); y
- (iv) analizar el ADN extraído.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de inmunoensayo *in vitro* para detectar un epítopo epigenético de nucleosomas derivados de tumores en una muestra biológica, en donde dicho método comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra con un primer agente de unión que comprende un agente de unión a la histona H1;
- (ii) aislar los nucleosomas que no están unidos al primer agente de unión;
- (iii) poner en contacto los nucleosomas de la etapa (ii) con un segundo agente de unión que se une a dicho epítopo;
- (iv) detectar y/o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a dicho epítopo; y
- (v) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia del epítopo particular de nucleosomas derivados de tumor en la muestra.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para detectar cáncer en un sujeto animal o humano que comprende las etapas de:

(i) analizar una muestra biológica obtenida del sujeto para determinar los nucleosomas libres de células que contienen una característica epigenética y también contienen histona H1 mediante un inmunoensayo que usa dos agentes de unión, uno de los cuales está dirigido a unirse a la característica epigenética particular y el otro de los cuales está dirigido a unirse a la histona H1;

(ii) analizar la muestra para determinar los nucleosomas libres de células circulantes que contienen la característica epigenética particular, tanto con, como sin, histona H1, mediante un inmunoensayo que usa dos agentes de unión, uno de los cuales está dirigido a unirse a la característica epigenética y el otro de los cuales está dirigido a unirse a un epítopo de nucleosoma central común que incluye cualquier epítopo de la histona H2, H3 o H4, cualquier epítopo de ADN o cualquier otro epítopo presente en fragmentos de cromatina distintos de un epítopo de la histona H1; y

(iii) usar una combinación de los resultados del inmunoensayo obtenidos en las etapas (i) y (ii) como un biomarcador de combinación indicativo de la presencia de dicho cáncer en el sujeto.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un kit que comprende un agente de unión a la histona H1 en un método descrito en la presente memoria.

Breve descripción de las figuras

FIGURA 1: Relaciones de DO (DO2:DO1) que indican relaciones relativas de [nucleosomas derivados de tumor y no derivados de tumor]:[nucleosomas predominantemente no derivados de tumor] para 69 sujetos humanos.

Descripción detallada de la invención

La estructura de los nucleosomas en términos de su composición de señales epigenéticas puede variar en las células cancerosas en comparación con las células sanas. El uso de anticuerpos u otros agentes de unión dirigidos a unirse a señales epigenéticas que son más comunes en las células cancerosas que en las células sanas o viceversa permite el aislamiento de nucleosomas libres de células de origen tumoral (es decir, mediante selección positiva o negativa) en una muestra biológica tomada de un sujeto que contiene nucleosomas libres de células con una mezcla de orígenes celulares.

La parte central del nucleosoma consiste en 8 proteínas histonas que incluyen un par de proteínas histonas H2A, H2B, H3 y H4. La histona H1 (H1) no es una histona de la parte central, pero se encuentra en el exterior de la parte central y actúa como enlazador. En particular, H1 está implicada en el empaquetado de las subestructuras de "collares de cuentas" en una estructura de orden superior. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, los presentes inventores han identificado que los nucleosomas libres de células que se originan a partir de un tumor contienen con menos frecuencia histona H1 que los nucleosomas que se originan en células sanas. Por lo tanto, es más probable que los nucleosomas de origen tumoral consistan solo en las 8 proteínas histonas centrales H2A, H2B, H3 y H4 (más ADN y cualquier molécula aducida).

Por tanto, se puede considerar que los nucleosomas libres de células circulantes en la sangre que tienen un origen tumoral o no tumoral son cualitativamente diferentes en el sentido de que la mayoría de los nucleosomas de origen tumoral comprenden una estructura de nucleosoma central de 8 proteínas histonas junto con un fragmento de ADN asociado, mientras que la mayoría de los nucleosomas de origen no tumoral comprenden una estructura de nucleosoma central similar más un resto de proteína histona H1 adicional y un fragmento de ADN asociado. Esta diferencia cualitativa se puede usar como base de un método de selección negativa para el enriquecimiento de nucleosomas libres de células de origen tumoral en una muestra de fluido corporal recogida de un sujeto o paciente.

Anteriormente, hemos informado sobre métodos para el análisis epigenético de nucleosomas libres de células en sangre y otros fluidos corporales (WO2013/030577, WO2013/030578, WO2013/030579, WO2013/084002). Como se ha discutido anteriormente, los nucleosomas libres de células de origen tumoral se liberan en la circulación de sujetos con un tumor, pero estos se diluyen en nucleosomas libres de células que ya están presentes en la circulación debido al recambio celular normal. Cualquiera de dichos nucleosomas de origen no tumoral interferirá en el análisis genético o epigenético de los nucleosomas tumorales. La eliminación de nucleosomas libres de células de origen no tumoral de una muestra de fluido corporal conducirá a una mayor pureza de los nucleosomas libres de células de origen tumoral, lo que conducirá a mejores resultados para el análisis genético o epigenético de nucleosomas tumorales o fragmentos de cromatina en la muestra.

En un aspecto preferido de la invención, los nucleosomas libres de células circulantes de origen patológico se purifican y analizan para determinar las características epigenéticas mediante inmunoensayo o espectroscopía de masa. En este aspecto; se toma una muestra de sangre, suero, plasma u otro fluido corporal de un sujeto y la muestra se enriquece en nucleosomas libres de células de origen patológico mediante la eliminación de nucleosomas libres de células que contienen un componente de la histona H1. Los nucleosomas libres de células restantes se analizan para determinar una característica epigenética que sea indicativa de enfermedad usando un inmunoensayo o un método espectrofotométrico

de masa. Las características epigenéticas del nucleosoma que pueden analizarse incluyen cualquiera o todas de; modificaciones postraduccionales de histonas particulares, isoformas de histonas particulares, nucleótidos particulares o nucleótidos modificados (por ejemplo, modificaciones de nucleótidos metilados, hidroxil-metilados u otras). Las ventajas de los métodos de inmunoensayo y espectroscopía de masa incluyen el bajo costo, la alta sensibilidad y especificidad analíticas y el alto rendimiento.

5

En una realización, se proporciona un método *in vitro* para el aislamiento por purificación por afinidad y análisis epigenético de nucleosomas libres de células de origen patológico de una muestra biológica en donde dicho método comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
- 10 (ii) aislar los nucleosomas de la muestra que no están unidos al agente de unión a la histona H1 (es decir, nucleosomas no unidos); y
 - (iii) analizar la fracción de nucleosomas aislados para determinar la inclusión de un nucleótido modificado usando un método de inmunoensayo que implica un anticuerpo u otro agente de unión dirigido a unirse a un nucleótido modificado.
- 15 En otra realización, se proporciona un método *in vitro* para el aislamiento por purificación por afinidad y análisis epigenético de nucleosomas libres de células de origen patológico de una muestra biológica en donde dicho método comprende las etapas de:
 - (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
 - (ii) aislar los nucleosomas de la muestra que no están unidos al agente de unión a la histona H1 (es decir, nucleosomas no unidos); y
 - (iii) analizar la fracción de nucleosomas aislados para determinar la inclusión de histona modificada postraduccionalmente usando un método de inmunoensayo que implica un anticuerpo u otro agente de unión dirigido a unirse a una histona modificada postraduccionalmente.
- 25 En una realización adicional, se proporciona un método *in vitro* para el aislamiento por purificación por afinidad y análisis epigenético de nucleosomas libres de células de origen patológico de una muestra biológica en donde dicho método comprende las etapas de:
 - (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
 - (ii) aislar los nucleosomas de la muestra que no están unidos al agente de unión a la histona H1 (es decir, nucleosomas no unidos); y
 - (iii) analizar la fracción de nucleosomas aislados para determinar la inclusión de una isoforma de histona usando un método de inmunoensayo que implica un anticuerpo u otro agente de unión dirigido a unirse a una isoforma de histona.
- 30 En una realización adicional, se proporciona un método *in vitro* para el aislamiento por purificación por afinidad y análisis epigenético de nucleosomas libres de células de origen patológico de una muestra biológica en donde dicho método comprende las etapas de:
 - (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
 - (ii) aislar los nucleosomas de la muestra que no están unidos al agente de unión a la histona H1 (es decir, nucleosomas no unidos); y
 - (iii) analizar la fracción de nucleosomas aislados para determinar la unión a una proteína no histona aducida usando un método de inmunoensayo que implica un anticuerpo u otro agente de unión dirigido a unirse a una proteína no histona.
- 40 En una realización adicional, se proporciona un método *in vitro* para el aislamiento por purificación por afinidad y detección de nucleosomas libres de células de origen patológico a partir de una muestra biológica tomada de un paciente, en donde dicho método comprende las etapas de:
 - (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
 - (ii) aislar los nucleosomas de la muestra que no están unidos al agente de unión a la histona H1 (es decir, nucleosomas no unidos);
 - 45 (iii) cuantificar los nucleosomas aislados mediante inmunoensayo; y

(iv) usar la presencia o el nivel de nucleosomas libres de células que no incluyen un resto de la histona H1 como indicador del estado de la enfermedad del sujeto.

En un aspecto analítico preferido de la invención, se analiza o mide una característica epigenética de los nucleosomas libres de células circulantes presentes en una muestra en (i) nucleosomas que contienen histona H1 y en (ii) todos los nucleosomas tanto con, como sin, histona H1. La medición de una característica epigenética de los nucleosomas que contienen histona H1 (es decir, nucleosomas predominantemente no tumorales) se puede realizar mediante métodos conocidos en la técnica que incluyen, sin limitación, espectroscopía de masa o mediante un inmunoensayo que usa dos anticuerpos (u otros agentes de unión), uno de los cuales está dirigido a unirse a la característica epigenética de interés y el otro de los cuales está dirigido a unirse a la histona H1. La medición directa de una característica epigenética de nucleosomas que no contienen histona H1 (es decir, nucleosomas predominantemente tumorales) se realiza mejor después del enriquecimiento mediante la eliminación de nucleosomas asociados a H1 usando un método de purificación por afinidad como se describe en la presente memoria. Sin embargo, (todos) los nucleosomas libres de células circulantes, tanto con, como sin, histona H1 (es decir, nucleosomas tanto tumorales como no tumorales), pueden analizarse o medirse mediante espectroscopía de masa o mediante un inmunoensayo que usa dos anticuerpos (u otros agentes de unión), uno de los cuales está dirigido a unirse a la característica epigenética de interés y el otro de los cuales está dirigido a unirse a un epítopo de nucleosoma central común incluyendo cualquier epítopo de la histona H2, H3 o H4, cualquier epítopo de ADN o cualquier otro epítopo presente en fragmentos de cromatina que no sea un epítopo de la histona H1. En este aspecto de la invención, se pueden medir los nucleosomas libres de células circulantes que contienen la característica epigenética y que también incorporan histona H1 (es decir, nucleosomas no tumorales), así como todos los nucleosomas libres de células circulantes que contienen la característica epigenética, incluyendo tanto los nucleosomas con, como sin, histona H1 (es decir, tanto los nucleosomas tumorales como no tumorales). Estos dos análisis o mediciones se pueden usar conjuntamente como un indicador de la cantidad o proporción de nucleosomas libres de células circulantes presentes en una muestra que contienen la característica epigenética particular que no está asociada con la histona H1. Esa es la cantidad o proporción de esos nucleosomas que probablemente tengan un origen tumoral. Por ejemplo, se puede usar la diferencia entre las dos mediciones o se puede usar una relación de las dos mediciones.

En una realización preferida de este aspecto analítico de la invención, se proporciona un método *in vitro* para medir la proporción de nucleosomas libres de células circulantes que contienen un epítopo epigenético en una muestra biológica tomada de un sujeto que son de origen tumoral, que comprende las etapas de:

(i) realizar un primer inmunoensayo que comprende las etapas de;

- 30 (1A) poner en contacto la muestra con un primer agente de unión que se une a dicho epítopo epigenético;
 (1B) poner en contacto los nucleosomas o la muestra con un segundo agente de unión que se une a histona H1; y
 (1C) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a los nucleosomas en la muestra;

(ii) realizar un segundo inmunoensayo que comprende las etapas de;

- (2A) poner en contacto la muestra con un primer agente de unión que se une a dicho epítopo epigenético;

- 35 (2B) poner en contacto los nucleosomas o la muestra con un tercer agente de unión que se une a un epítopo de nucleosoma sin H1 o fragmento de cromatina; y
 (2C) detectar o cuantificar la unión de dicho tercer agente de unión a los nucleosomas en la muestra;
 (iii) combinar las mediciones de las etapas (1C) y (2C) como un indicador de la cantidad o proporción de nucleosomas libres de células en la muestra que contienen dicho epítopo epigenético y que son de origen tumoral.

- 40 En otra realización de este aspecto analítico de la invención, se proporciona un método *in vitro* para medir la proporción de nucleosomas libres de células circulantes, que contienen un epítopo epigenético en una muestra biológica tomada de un sujeto que son de origen tumoral, que comprende las etapas de;

(i) realizar un primer inmunoensayo que comprende las etapas de;

- (1A) poner en contacto la muestra con un primer agente de unión que se une a la histona H1;

- 45 (1B) poner en contacto los nucleosomas o la muestra con un segundo agente de unión que se une a dicho epítopo epigenético; y
 (1C) detectar o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a los nucleosomas en la muestra;

- (ii) realizar un segundo inmunoensayo que comprende las etapas de;
- (2A) poner en contacto la muestra con un primer agente de unión que se une a un epítopo de nucleosomas sin histona H1 o fragmento de cromatina;
- 5 (2B) poner en contacto los nucleosomas o la muestra con un tercer agente de unión que se une a dicho epítopo epigenético; y
- (2C) detectar o cuantificar la unión de dicho tercer agente de unión al nucleosoma en la muestra;
- (iii) combinar las mediciones de las etapas (1C) y (2C) como un indicador de la cantidad o proporción de nucleosomas libres de células en la muestra que contienen dicho epítopo epigenético y que son de origen tumoral.
- 10 Será evidente para los expertos en la técnica que el "primer" y el "segundo" inmunoensayos mencionados anteriormente se pueden realizar en cualquier orden o en paralelo o en formato multiplex. También será evidente que la permutación del primer y el segundo, o el primer y el tercero, agentes de unión usados en los dos inmunoensayos no necesita ser simétrica como se ha descrito anteriormente.
- 15 En realizaciones preferidas, el epítopo o característica epigenética se selecciona de (i) una isoforma de la histona H2, H3 o H4, (ii) una modificación postraduccional presente en la histona H2, H3 o H4, (iii) un nucleótido incluyendo un nucleótido modificado, (iv) una proteína que no es histona incorporada en o aducida a un fragmento de cromatina libre de células. En una realización adicional, el epítopo epigenético es un epítopo común presente en los nucleosomas *per se* y los dos inmunoensayos proporcionan un indicador de la presencia de nucleosomas tumorales *per se*.
- 20 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la cantidad o proporción de nucleosomas libres de células que contienen un epítopo epigenético particular que son de origen patológico puede usarse como un biomarcador de la presencia de la enfermedad en un sujeto o para evaluar a un sujeto para el estado de la enfermedad o la idoneidad de un régimen de tratamiento.
- 25 Hemos desarrollado con éxito un procedimiento analítico como se ha descrito anteriormente y en el EJEMPLO 15, en el que se midió un aducto de nucleosoma de proteína no histona mediante dos inmunoensayos y se derivó una relación de: [nucleosomas *per se* que contienen la proteína no histona]:[nucleosomas que contiene la histona H1 y la proteína no histona]. Por tanto, la relación derivada es un indicador de [todos los aductos nucleosoma-proteína]:[aductos de nucleosoma tumoral proteína]. Por tanto, para una muestra de sangre, suero o plasma obtenida de un sujeto, cuanto mayor sea la relación derivada para una muestra, más probable es que algunos de los nucleosomas tengan un origen tumoral. En 29 sujetos sanos, la relación de producción media del inmunoensayo (densidad óptica) encontrada fue de 8,7. En 29 sujetos diagnosticados con cáncer colorrectal, la relación media fue de 15,9. En 11 sujetos diagnosticados con cáncer pancreático, la relación media fue de 17,1. Esto demuestra que, de hecho, una relación creciente está asociada con nucleosomas de origen canceroso.
- 30 Además, los resultados individuales para cada sujeto se usaron como un biomarcador para el cáncer con niveles de punto de corte crecientes. Con un punto de corte de 12; la relación dio un resultado positivo para el 73 % (8 de 11) de los sujetos diagnosticados con cáncer pancreático y el 41 % (12 de 29) de los sujetos diagnosticados con cáncer colorrectal con una especificidad clínica del 79 % (6 resultados falsos positivos entre 29 sujetos sanos). Con un punto de corte de 22; la relación dio un resultado positivo para el 36 % (4 de 11) de los sujetos diagnosticados con cáncer pancreático y el 34 % (10 de 29) de los sujetos diagnosticados con cáncer colorrectal con una especificidad clínica del 93 % (2 resultados falsos positivos entre 29 sujetos sanos). Estos resultados demuestran que la relación descrita en la presente memoria puede usarse como biomarcador para enfermedades cancerosas.
- 35 40 Se entenderá que las referencias en la presente memoria a "agente de unión a la histona H1" (p. ej., en métodos de selección negativa) se refieren generalmente a agentes de unión que se unen a la proteína histona H1, incluyendo cualquier variante de la histona H1, isoformas o modificaciones de la misma. Por tanto, en una realización, el agente de unión a la histona H1 se selecciona de: un agente de unión que se une a la proteína histona H1, variante, isoforma o modificación de la misma.
- 45 50 En las realizaciones anteriores, la presencia o el nivel de nucleosomas libres de células enriquecidos de origen patológico *per se*, o la presencia o el nivel de nucleosomas libres de células enriquecidos de origen patológico que contienen un nucleótido modificado, modificación de histona postraduccional, isoforma de histona o aducto nucleosoma-proteína detectado se puede usar como un indicador del estado de la enfermedad, pronóstico de la enfermedad, monitorización de la enfermedad, monitorización del tratamiento o susceptibilidad de la enfermedad a tratamientos particulares o para otras aplicaciones clínicas.

Hemos informado previamente sobre métodos de inmunoensayo de nucleosomas adecuados para su uso en la presente invención, incluyendo los métodos descritos en WO2005/019826, WO2013/030577, WO2013/030578, WO2013/030579, WO2013/084002. Sin limitación, cualquiera de estos métodos puede emplearse en la presente invención.

Además, los inventores han identificado que cuando los nucleosomas que se originan de un tumor están asociados con H1, la H1 asociada con el nucleosoma está sujeta a modificaciones adicionales y/o puede contener diferentes variantes de H1 o isoformas de H1 respecto a las presentes en los nucleosomas que se originan en células sanas.

Las principales variantes o isoformas de la histona H1 incluyen, sin limitación, H1.0, H1.10 y H1X que se expresan en células somáticas en proliferación y en reposo, así como las variantes de H1 H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H.1.5 y H1.6 que se expresan en niveles elevados en células en división. Además, existen variantes específicas de la línea germinal incluyendo H1.8 que se expresa principalmente en el testículo y H1.7 que se expresa principalmente en el ovocito. La composición de las variantes de histonas en la cromatina está alterada en las células cancerosas y se informa que, de las isoformas de H1 comunes, la expresión de la isoforma de la histona H1.0 está regulada a la baja en las células cancerosas, mientras que las isoformas de la histona H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 y H1.5 se expresan en niveles elevados en las células cancerosas (Scaffidi; 2015).

La histona H1 puede modificarse postraduccionalmente en los residuos de aminoácidos localizados en las colas N y C-terminales, así como dentro del dominio globular de la proteína y estas modificaciones pueden estar asociadas con el cáncer (Izzo y Schneider; 2015). Se entenderá que la referencia en la presente memoria a "modificaciones de la histona H1" se refiere a modificaciones postraduccionales (PTM) de H1 que pueden incluir acetilación, metilación, que puede ser mono, di o trimetilación, fosforilación, ubiquitinación, ribosilación de ADP, citrulinación, hidroxilación, glicosilación, nitrosilación, glutaminación y/o isomerización. Un residuo de aminoácido de la histona que tiene una modificación puede ser cualquier residuo de Ser, Lys, Arg, His, Glu, Pro o Thr dentro de la secuencia de aminoácidos de la histona.

Por ejemplo, un residuo de lisina dentro de la secuencia central de la histona puede estar mono, di o trimetilado, acetilado o ubiquitinado, un residuo de arginina dentro de la secuencia central de la histona puede estar monometilado, dimetilado simétricamente o asimétricamente o convertido en citrulina, un residuo de serina o treonina dentro de la secuencia central de la histona puede estar fosforilado y/o se puede isomerizar un residuo de prolina dentro de la secuencia central.

Un experto en la técnica entenderá que la notación usada para describir una modificación de histona en particular indica qué histona se ha modificado, el o los aminoácidos particulares que se han modificado y el tipo de modificación que ha ocurrido. Por ejemplo, H1K64(Ac) denota la acetilación de la histona H1 en la lisina 64.

En una realización, el o los agentes de unión usados para la invención están dirigidos a unirse a una modificación de la histona H1 asociada con un nucleosoma libre de células. En una realización adicional, la modificación de la histona H1 se selecciona de fosforilación, acetilación, metilación, ubiquitinación y/o formilación. Las modificaciones de H1 pueden incluir: fosforilación en los sitios S2, T4, T11, S/T18, S27, T31, S36, S37, T39, S41, S44, S107, T138, T142, T146, T147, T154, T155, T165, S172, S173, T180, S/T187, S189; acetilación en los sitios: S2, K17, K26, K34, K46, K49, K52, K63, K64, K85, K88, K90, K93, K97, K109, K168, K169, K192, K209; metilación en los sitios: K26, K27, K34, K52, K64, K97, K106, K119, K148, K168, K169, K187; ubiquitinación en los sitios: K17, K21, K34, K46, K47, K64, K65, K75, K76, K85, K86, K90, K91, K97, K98, K106, K107; formilación en los sitios: K17, K34, K46, K63, K64, K67, K75, K85, K88, K90, K97, K110, K140, K141, K160. Por tanto, en una realización, la modificación de la histona H1 asociada con un nucleosoma libre de células comprende al menos una de las modificaciones de la histona H1 enumeradas en la presente memoria.

En una realización, el o los agentes de unión usados para la invención están dirigidos a unirse a una variante o isoforma de la histona H1 asociada con un nucleosoma libre de células. Las variantes e isoformas de H1 pueden incluir H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5 o H1.6 que se cree que se expresan durante la mitosis y H1.0, H1.10 y H1X que se expresan en las células somáticas en reposo. También se han identificado variantes de H1 adicionales en tejidos específicos, tales como las variantes H1t, H1T2, H1LS en los testículos, así como en tipos celulares específicos, tal como la variante H1.0 en células diferenciadas terminalmente. Por lo tanto, en una realización, la variante o isoforma de la histona H1 asociada con un nucleosoma libre de células comprende al menos una de las variantes o isoformas de la histona H1 enumeradas en la presente memoria.

Será evidente para los expertos en la técnica que el enriquecimiento de muestras biológicas tomadas de pacientes humanos o animales para nucleosomas de origen tumoral en función de su asociación cuantitativa con H1 o de la composición cualitativa de su isoforma de H1 y/o H1 PTM mejorará probablemente la discriminación del diagnóstico diferencial usando biomarcadores de nucleosoma o ADN. Por lo tanto, en una realización, la inmunoseparación de nucleosomas de origen sano o tumoral utiliza un agente de unión dirigido a unirse al menos a una modificación y/o variante y/o isoforma de la histona H1 asociada con un nucleosoma libre de células.

En una realización, se toma una muestra de fluido biológico de un sujeto y los nucleosomas libres de células de la muestra se enriquecen para nucleosomas de origen tumoral sobre la base de la composición de la histona H1 de los nucleosomas.

La muestra de fluido puede ser cualquier muestra de fluido biológico tonada de un sujeto incluyendo, sin limitación fluido cefalorraquídeo (CSF), sangre completa, suero sanguíneo, plasma, sangre menstrual, fluido endometrial, orina, saliva u otro fluido corporal (heces, fluido lagrimal, fluido sinovial, esputo), aliento, p. ej., como aliento condensado, o un extracto o purificación de las mismas, o dilución de las mismas. Las muestras biológicas también incluyen especímenes de un sujeto vivo, o tomados posmortem. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, cuando sea apropiado diluirse o concentrarse, y almacenarse de la manera habitual.

5 En una realización, los nucleosomas libres de células de origen tumoral se originan a partir de un cáncer seleccionado de:

cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de piel (tal como melanoma), cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de intestino, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, linfoma, 10 cáncer oral, cáncer de cabeza y cuello, leucemia y osteosarcoma.

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

Métodos

Selección negativa

15 Será evidente para los expertos en la técnica que la selección positiva por unión por afinidad de nucleosomas libres de células de origen tumoral, en una muestra de sangre que contiene nucleosomas originados de células tumorales y células sanas, basada en la isoforma de la histona H1 o el patrón de modificación postraduccional de la histona H1, solo es posible cuando los nucleosomas libres de células de origen tumoral retienen e incluyen el resto de la proteína H1. Sin embargo, la mayoría de los nucleosomas libres de células circulantes de origen tumoral no incluyen un resto H1. Por esta razón; la selección negativa es el método preferido para enriquecer los nucleosomas libres de células circulantes de origen tumoral.

20 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método *in vitro* para aislar/analizar nucleosomas libres de células de origen tumoral a partir de una muestra biológica por purificación por afinidad en donde dicho método comprende las etapas de:

(i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1 (incluyendo cualquier variante, isoforma o modificación de la histona H1);

25 (ii) aislar los nucleosomas de la muestra que no están unidos al agente de unión a la histona H1 (es decir, nucleosomas no unidos); y

(iii) analizar los nucleosomas aislados y/o el ADN asociado.

Según este aspecto de la invención, se proporciona un método *in vitro* para enriquecer una muestra biológica en nucleosomas de origen tumoral mediante la selección negativa de nucleosomas libres de células que contienen una proteína histona H1, o una o más variantes particulares de la histona H1, o una o más modificaciones particulares de la histona H1. En una realización, se usa un anticuerpo u otro agente de unión dirigido a unirse a la histona H1 o a las variantes de la histona H1 H1.0, H1.10 o H1X (o cualquier agente de unión dirigido a cualquier combinación de estas) para seleccionar y aislar los nucleosomas que contienen la variante de H1 y así se unen a nucleosomas originados de células sanas. Por tanto, este método elimina los nucleosomas originados de células sanas de la muestra que, por tanto, se enriquece en nucleosomas de origen tumoral. En una realización preferida, el agente de unión es un anticuerpo inmovilizado en una fase sólida para la inmunooextracción de nucleosomas de origen sano. Los nucleosomas y/o el ADN asociado que permanecen en la fase líquida pueden analizarse para determinar la secuencia genética, estructuras de señales epigenéticas u otras características.

30 40 Por tanto, según un aspecto de la invención, se proporciona un método *in vitro* para aislar/analizar nucleosomas libres de células de origen tumoral a partir de una muestra biológica por purificación por afinidad en donde dicho método comprende las etapas de:

(i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona 1 que se une a la proteína histona H1 *per se* o una variante de la histona H1 seleccionada de H1.0, H1.10 o H1.X;

(ii) aislar los nucleosomas de la muestra que no están unidos al agente de unión (es decir, nucleosomas no unidos); y

45 (iii) analizar los nucleosomas aislados y/o el ADN asociado.

En una realización, los nucleosomas aislados se analizan por inmunoensayo o espectroscopía de masa. El nivel o la cantidad de nucleosomas de origen tumoral presentes y/o cualquier característica genética molecular o epigenética de los nucleosomas de origen tumoral puede usarse para detectar cáncer en un sujeto o para evaluar el cáncer de un sujeto para cualquier propósito clínico. En una realización adicional, los nucleosomas aislados se analizan por inmunoensayo o

espectroscopía de masa para determinar la inclusión de una característica epigenética. En otra realización adicional, la característica epigenética comprende una modificación de histona postraduccional, una isoforma de histona, un nucleótido modificado o una proteína no histona aducida. En una realización adicional, el componente de ADN de los nucleosomas aislados se analiza para determinar la secuencia de bases del ADN.

- 5 Las referencias a "proteína histona H1" en los métodos de selección negativa descritos en la presente memoria incluyen la proteína histona H1 nativa o de tipo salvaje. Como se ha explicado anteriormente, los nucleosomas libres de células que se originan a partir de un tumor contienen con menos frecuencia histona H1 que los nucleosomas que se originan en células sanas, por lo tanto, esta realización permite el aislamiento de nucleosomas libres de células de origen tumoral mediante la detección de la presencia o ausencia de la proteína histona H1 nativa/de tipo salvaje.
- 10 Los nucleosomas libres de células de origen tumoral existen en fluidos biológicos como parte de una mezcla de nucleosomas con una variedad de orígenes y comprenden solo una proporción de los nucleosomas libres de células presentes. Sorprendentemente, se ha encontrado que el enriquecimiento o aislamiento de nucleosomas de origen tumoral puede realizarse mediante selección positiva o negativa usando un método de aislamiento de purificación por afinidad como se describe en la presente memoria.
- 15 Los niveles de nucleosomas circulantes pueden aumentar notablemente 2-5 días después de un aumento repentino de la muerte celular como resultado de una serie de causas dispares que incluyen traumatismo, accidente cerebrovascular o tratamiento con fármacos citotóxicos o radioterapia. Los niveles caen después durante un período de 2-3 días (Holdenrieder *et al*, 2001). Este efecto se debe a la inducción de la muerte celular seguida por el aclaramiento de la circulación (Holdenrieder y Stieber, 2009).
- 20 Es evidente que los nucleosomas liberados en la circulación de pacientes sin enfermedad tumoral (incluyendo, por ejemplo, debido a un traumatismo quirúrgico) no pueden tener un origen tumoral. Estos nucleosomas contribuirán al ADNcf pero no contendrán ADNct.
- 25 También será evidente que el término "nucleosoma" tal y como se usa en la presente memoria pretende incluir mononucleosomas y oligonucleosomas y cualquiera de dichos fragmentos de cromatina que pueda analizarse en medios fluidos. En una realización adicional, el nucleosoma libre de células es un mononucleosoma, oligonucleosoma u otro fragmento cromosómico.
- 30 Será evidente para los expertos en la técnica que el nivel de nucleosomas tumorales aislados como una proporción de nucleosomas presentes puede usarse como una medida de la proporción de ADN que comprende ADN tumoral en una muestra. Además, el nivel inverso es la proporción de ADN de origen sano en la muestra. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para detectar el nivel/proportión de ADNct en una muestra. Dicha medida es similar a las medidas de frecuencia alélica de mutaciones asociadas al cáncer en el ADNct y puede usarse como una medida de la carga tumoral y de la respuesta a la terapia.
- 35 En una realización de la invención, se aísla una preparación de nucleosoma tumoral total o parcialmente purificada de una muestra de un fluido biológico. En una realización, el método de purificación implica el aislamiento por afinidad de nucleosomas libres de células que contienen un epítopo de señal epigenética de histona o ADN característico de tejido sano mediante el empleo de un agente de unión que se une a dicho epítopo epigenético. Por tanto, la elución contiene la preparación de nucleosomas tumorales y/o su ADNct asociado que puede entonces analizarse.
- 40 Los métodos para poner en contacto y aislar los nucleosomas de una muestra, como se requiere en la presente memoria, son bien conocidos en la técnica y puede usarse cualquier método de separación adecuado. Por ejemplo, los métodos de separación pueden incluir cromatografía de afinidad o perlas de anticuerpos magnéticas. Si se utiliza una configuración de cromatografía en columna de afinidad, por ejemplo, se entenderá que la muestra se puede pasar a través de una columna de afinidad que comprende agentes de unión a H1. Se pueden recoger los nucleosomas unidos a la fase sólida o el flujo a través (es decir, los nucleosomas no unidos) para el análisis de ADNct dependiendo de si se emplea un método de selección positiva o negativa descrito en la presente memoria.
- 45 En una realización preferida, el aislamiento del nucleosoma y del ADNct tumoral se realiza mediante un método de purificación por afinidad inmunológica que emplea un agente de unión a la histona H1. Será evidente para los expertos en la técnica que cualquier agente de unión capaz de unirse específicamente a una histona H1 puede usarse para los métodos de purificación por afinidad de la invención. Dichos agentes de unión pueden incluir, sin limitación, anticuerpos, aptámeros o proteínas de unión (p. ej.; proteínas de unión a nucleosomas).
- 50 Los anticuerpos se pueden generar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen métodos de inmunización y biblioteca tales como presentación en fagos. La respuesta inmune puede inducirse contra, o la biblioteca puede seleccionarse para unirse a, el resto o antígeno de interés. Los anticuerpos dirigidos a unirse a la histona H1 se pueden generar contra una variedad de dichos restos que incluyen la secuencia de aminoácidos de la proteína H1 completa

y pueden contener opcionalmente modificaciones de histonas postraduccionales. La proteína se puede purificar a partir de células vivas o producirse sintéticamente. Alternativamente, se puede usar una secuencia de péptidos que represente una parte de la secuencia de aminoácidos de H1 y esta también puede contener opcionalmente modificaciones de histonas postraduccionales. También se pueden usar nucleosomas u otras fracciones de cromatina que contienen histona H1.

- 5 Será evidente para los expertos en la técnica que en los métodos de la invención se pueden emplear agentes de unión dirigidos a unirse a cualquier parte de o a toda la histona H1.

El análisis de los nucleosomas aislados de origen tumoral puede implicar cualquier método de análisis adecuado, muchos de los cuales se conocen en la técnica. Estos métodos incluyen, sin limitación, el análisis por inmunoensayo que usa un segundo anticuerpo u otro agente de unión a un epítopo de nucleosoma común tal como ADNdS o a una estructura epigenética de interés que incluye una modificación de histona, variante de histona, modificación de ADN u otra molécula aducida a un nucleosoma. Estos métodos incluyen todos los métodos descritos en WO 2005/019826, WO 2013/030577, WO 2013/030579 y WO 2013/084002 en donde se emplea un agente de unión a la histona H1 en lugar de un agente de unión antiepítopo de nucleosoma general. Estos métodos también incluyen métodos multiplex para el análisis de múltiples epítopos presentes en nucleosomas circulantes de origen tumoral.

10 15 El análisis de nucleosomas de origen tumoral aislados mediante un método de la invención también puede implicar cualquier método proteómico conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, métodos de electroforesis, métodos cromatográficos y cualquier método que implique espectrometría de masa, incluyendo métodos que implican cromatografía y espectrometría de masa y/o espectrometría de masa marcada con isótopos estables y/o métodos que implican la digestión de proteínas para producir péptidos para la identificación y/o la cuantificación por espectrometría de masa o cualquier método de espectrometría de masa combinatoria con cualquier otro método.

20 25 En una realización preferida de la invención, se prepara una preparación de nucleosomas circulantes enriquecida con nucleosomas de origen tumoral mediante purificación por afinidad de nucleosomas circulantes en una muestra de sangre, suero o plasma tomada de un paciente con cáncer y la composición epigenética de la preparación de nucleosomas se investiga mediante un método que implica espectrometría de masa. Por lo tanto, en una realización, el método comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
- (ii) separar las fracciones de nucleosomas que no están unidas al agente de unión a la histona H1 y aislar una de las fracciones; y
- (iii) analizar los nucleosomas aislados en la etapa (ii) usando un método que comprende espectrometría de masa.

30 35 Un experto en la técnica entenderá que, dependiendo del método de selección usado, se determinará qué fracción de nucleosomas se aísla (es decir, la fracción libre/eluida para el método de selección negativa descrito en la presente memoria).

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método *in vitro* para aislar ADN tumoral purificado de una muestra biológica, en donde dicho método comprende las etapas de:

- 35 40 (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
- (ii) aislar los nucleosomas que no están unidos al agente de unión;
- (iii) extraer el ADN de la muestra de nucleosomas aislados en la etapa (ii); y
- (iv) analizar el ADN extraído.

40 45 La investigación del ADN tumoral aislado o purificado puede implicar el análisis de cualquiera o todos los tipos de anomalías del ADN asociadas al cáncer, incluyendo, sin limitación, análisis epigenéticos, incluyendo la metilación de secuencias de ADN, mutaciones puntuales, translocaciones, número de copias de genes, anomalías de los microsatélites e integridad de la cadena de ADN. Además, se puede emplear cualquier método de análisis de ADN, incluyendo, sin limitación, secuenciación de ADN, análisis de secuenciación de ADN metilado, PCR, BEAMing, NGS (genoma diana o completo), PCR digital, PCR fría (coamplificación a temperatura de desnaturización más baja-PCR), MAP (pirofosforólisis activada por MIDI), PARE (análisis personalizado de extremos reorganizados) y espectrometría de masa.

En una realización de los métodos de la invención, la muestra biológica es sangre completa, suero sanguíneo, plasma, fluido cefalorraquídeo, orina, heces, espuma, saliva u otro fluido corporal, o aliento, aliento condensado, o un extracto o purificación del mismo, o dilución del mismo. En una realización adicional, la muestra biológica es sangre, suero o plasma. En otra realización adicional, la muestra biológica es suero.

Los métodos para la recogida de muestras biológicas son bien conocidos en la técnica y se entenderá que cualquiera de dichos métodos de recogida es adecuado para su uso con los métodos descritos en la presente memoria.

Marcadores epigenéticos adicionales

Una vez que se han aislado los nucleosomas enriquecidos en los de origen tumoral, pueden analizarse para determinar marcadores epigenéticos adicionales ("epítopos epigenéticos") o someterse a métodos de enriquecimiento adicionales.

Por lo tanto, según un aspecto de la invención, se proporciona un método de inmunoensayo *in vitro* para detectar un epítopo epigenético de nucleosomas derivados de tumores en una muestra biológica, en donde dicho método comprende las etapas de:

(i) poner en contacto la muestra con un primer agente de unión que se une a la histona H1 o a la variante de la histona H1 seleccionada de H1.0, H1.10 o H1.X;

(ii) aislar los nucleosomas que no están unidos al primer agente de unión (es decir, nucleosomas no unidos);

(iii) poner en contacto los nucleosomas obtenidos en la etapa (ii) con un segundo agente de unión que se une a dicho epítopo;

(iv) detectar y/o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a dicho epítopo; y

(v) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia del epítopo particular de nucleosomas derivados de tumor en la muestra.

En una realización, el epítopo se selecciona de una modificación de histona, un nucleótido modificado, una variante o isoforma de histona, o un aducto de nucleosoma o variante del mismo. En una realización adicional, el epítopo comprende una modificación de histona. En otra realización adicional, la modificación de histona comprende H3K27Ac y/o 5-metilcitosina.

En la bibliografía se ha descrito una variedad de nucleótidos modificados epigenéticamente y se sabe que en el cáncer están alterados los patrones de modificación epigenética en el ADN y/o residuos de nucleótidos de ADN. El mejor descrito de estos incluye la metilación de citosina en la posición 5. El ADN que contiene 5-metilcitosina se denomina a menudo "ADN metilado". Se estima que la metilación del ADN en las células cancerosas se reduce en aproximadamente un 50 %

en comparación con el ADN de las células sanas (Guerrero-Preston *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 1999). Sin embargo, se informa que el aumento asociado con el cáncer en el nivel de nucleosomas circulantes es de un 970 % de promedio (Holdenrieder *et al.*, 2001) y el aumento del ADNcf es de aproximadamente un 600 % (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Los ensayos de epítopos epigenéticos adicionales se pueden realizar de forma aislada o como parte de un panel de ensayos.

En una realización, la muestra de nucleosomas aislados obtenida a partir de los métodos descritos en la presente memoria se somete a etapas de enriquecimiento adicionales. Por lo tanto, en una realización, un método de la invención comprende adicionalmente poner en contacto los nucleosomas aislados con un agente de unión a la histona H3.1 y/o H3.2 y/o H3t. Se ha mostrado previamente que las variantes de la histona 3, H3.1, H3.2 y H3t, pueden usarse para el enriquecimiento de ADNct.

En esta realización, las etapas del método pueden comprender:

(i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;

(ii) separar las fracciones de nucleosomas que no están unidas al agente de unión a la histona H1 y aislar una de las fracciones;

(iii) poner en contacto la fracción aislada con un agente de unión a la histona H3.1 y/o H3.2 y/o H3t;

(iv) aislar los nucleosomas unidos de la muestra; y

(v) analizar los nucleosomas aislados y/o ADN asociado.

Se apreciará que cualquiera de los métodos mencionados anteriormente se puede usar como método independiente o en combinación con ensayos existentes.

Métodos de diagnóstico

Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse junto con métodos de diagnóstico. Por ejemplo, una muestra puede enriquecerse para aislar ADN o nucleosomas libres de células de origen tumoral usando los métodos descritos en la presente memoria y la muestra enriquecida puede usarse entonces en un método de diagnóstico detectando marcadores epigenéticos adicionales que están asociados con la enfermedad.

Por lo tanto, según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método *in vitro* para diagnosticar o detectar cáncer en un sujeto animal o humano que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
- (ii) separar las fracciones de nucleosomas que no están unidas al agente de unión a la histona H1 y aislar una de las fracciones;
- (iii) poner en contacto los nucleosomas aislados obtenidos en la etapa (ii) con un segundo agente de unión que se une a un epítopo epigenético de los nucleosomas derivados de tumor;
- (iv) detectar y/o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a dicho epítopo; y
- (v) usar el nivel medido de biomarcador(es) como indicativo de la presencia de dicha enfermedad en el sujeto.

La detección y/o cuantificación puede realizarse 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 de 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 valorando el inicio y la progresión o para evaluar la mejoría o regresión de la enfermedad. Los usos y métodos de detección, monitorización y diagnóstico también son útiles en métodos para la evaluación del cribado clínico, pronóstico, elección de terapia y evaluación del beneficio terapéutico, es decir, para el cribado de fármacos y el desarrollo de fármacos.

Los métodos de diagnóstico descritos en la presente memoria pueden comprender además comparar el nivel del segundo agente de unión presente en la muestra biológica con uno o más controles. En una realización, la muestra biológica de uno o más controles se toma de paciente(s) sano(s) (o "normales") y/o paciente(s) con una enfermedad benigna asociada. En una realización adicional, la muestra biológica de uno o más controles se toma de paciente(s) sano(s).

Como se describe en la presente memoria, los métodos de la invención pueden combinar el uso de dos inmunoensayos. Por lo tanto, según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método *in vitro* para diagnosticar o detectar cáncer en un sujeto animal o humano que comprende las etapas de:

- (i) analizar la muestra para determinar los nucleosomas libres de células que contienen una característica epigenética y también contienen histona H1 mediante un inmunoensayo que usa dos agentes de unión, uno de los cuales está dirigido a unirse a la característica epigenética particular y el otro de los cuales está dirigido a unirse a la histona H1;
- (ii) analizar la muestra para determinar los nucleosomas libres de células que contienen la característica epigenética particular, tanto con, como sin, histona H1, mediante un inmunoensayo que usa dos agentes de unión, uno de los cuales está dirigido a unirse a la característica epigenética y el otro de los cuales está dirigido a unirse a un epítopo de nucleosoma central común que incluye cualquier epítopo de la histona H2, H3 o H4, cualquier epítopo de ADN o cualquier otro epítopo presente en fragmentos de cromatina distintos de un epítopo de la histona H1; y
- (iii) usar una combinación de los resultados del inmunoensayo obtenidos en las etapas (i) y (ii) como un biomarcador de combinación indicativo de la presencia de dicho cáncer en el sujeto.

Métodos de tratamiento

También se describe en la presente memoria un método para tratar cáncer, en un sujeto animal o humano, que comprende las siguientes etapas:

- (i) poner en contacto una muestra biológica obtenida del sujeto con un agente de unión a la histona H1;
- (ii) separar las fracciones de nucleosomas que están libres o unidas al agente de unión a la histona H1 y aislar una de las fracciones;

(iii) poner en contacto los nucleosomas aislados obtenidos en la etapa (ii) con un segundo agente de unión que se une a un epítopo de nucleosomas derivados de tumores;

(iv) detectar y/o medir el nivel de unión de dicho segundo agente de unión a dicho epítopo;

5 (v) usar el nivel medido de biomarcador(es) en la etapa (iv) como indicativo de la presencia de dicha enfermedad en el sujeto; y

(vi) tratar quirúrgicamente o administrar un agente terapéutico a un sujeto diagnosticado en la etapa (v) como un paciente que tiene dicha enfermedad.

Como se describe en la presente memoria, será evidente qué fracción se aísla dependiendo del agente de unión a la histona H1 usado y si se requiere un método de selección negativa o positiva.

10 Como se describe en la presente memoria, los métodos pueden combinar el uso de dos inmunoensayos. Por lo tanto, en la presente memoria se describe además un método para tratar cáncer, en un sujeto animal o humano, que comprende las siguientes etapas:

(i) obtener una muestra biológica del sujeto;

15 (ii) analizar la muestra para determinar los nucleosomas libres de células que contienen una característica epigenética y también contienen la histona H1 mediante un inmunoensayo que usa dos agentes de unión, uno de los cuales está dirigido a unirse a la característica epigenética particular y el otro de los cuales está dirigido a unirse a la histona H1;

20 (iii) analizar la muestra para determinar los nucleosomas libres de células que contienen la característica epigenética particular, tanto con, como sin, la histona H1, mediante un inmunoensayo que usa dos agentes de unión, uno de los cuales está dirigido a unirse a la característica epigenética y el otro de los cuales está dirigido a unirse a un epítopo de nucleosoma central común que incluye cualquier epítopo de la histona H2, H3 o H4, cualquier epítopo del ADN o cualquier otro epítopo presente en fragmentos de cromatina distintos de un epítopo de la histona H1;

(iv) usar el nivel medido de biomarcador(es) en las etapas (ii) y (iii) como indicativo de la presencia de dicho cáncer en el sujeto; y

25 (v) tratar quirúrgicamente o administrar un agente terapéutico a un sujeto diagnosticado en la etapa (iv) como un paciente que tiene dicho cáncer.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender además comparar el nivel del o de los biomarcadores presentes en la muestra biológica con uno o más controles. En una realización, la muestra biológica de uno o más controles se toma de paciente(s) sano(s) (o "normales") y/o paciente(s) con una enfermedad benigna asociada. En una realización adicional, la muestra biológica de uno o más controles se toma de paciente(s) sano(s).

30 Por lo tanto, en la presente memoria se describe además un método para tratar cáncer en un individuo que lo necesita, que comprende la etapa de administrar un agente terapéutico a un paciente identificado por tener diferentes niveles del o de los biomarcadores como se define en la presente memoria en una muestra biológica en comparación con los niveles de dicho o dichos biomarcadores en una muestra biológica obtenida de un sujeto de control.

35 En una realización de la descripción, el cáncer se selecciona de: cáncer de mama, vejiga, colorrectal, piel (tal como melanoma), ovario, próstata, pulmón, pancreático, intestino, hígado, endometrio, linfoma, oral, de cabeza y cuello, leucemia y osteosarcoma.

40 Los agentes terapéuticos y los métodos de cirugía usados para tratar dichas enfermedades son bien conocidos por un experto en la técnica. Los métodos de tratamiento para el cáncer incluyen, pero no están limitados a, cirugía, quimioterapia, radioterapia u otros agentes terapéuticos (tales como fármacos o terapias biológicas, tales como anticuerpos monoclonales).

Usos

45 Según un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un uso de un agente de unión a la histona H1 para detectar, aislar y/o purificar nucleosomas libres de células de origen tumoral de una muestra biológica. Alternativamente, en la presente memoria se describe un uso de un agente de unión a la histona H1 para detectar, aislar y/o purificar nucleosomas libres de células de tejido sano de una muestra biológica. Como se describe en la presente memoria, la presencia o ausencia de la histona H1 o la presencia de ciertas variantes y modificaciones de la histona H1 se han asociado con nucleosomas libres de células que se originan en tumores o tejido sano, por lo tanto, los agentes de unión a la histona H1 pueden usarse como un biomarcador para detectar dichos nucleosomas.

En una realización de la descripción, los nucleosomas libres de células se aíslan y/o purifican.

Kits

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un kit que comprende un agente de unión a la histona H1 en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

5 Se entenderá que las realizaciones descritas en la presente memoria pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención.

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

Ejemplo 1

Un anticuerpo dirigido a unirse específicamente a la variante de la histona H1 H1.0, H1.10 o H1.X se biotinila e inmoviliza en perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynal) mediante el método recomendado por el fabricante. Las perlas se lavan varias veces con tampón de carga usando un sistema de separación magnética. El suero o plasma extraído de un paciente con cáncer se diluye en tampón de carga y se añade a las perlas. Los nucleosomas que se originan en células sanas que contienen la variante de la histona H1 se adsorben en las perlas. Los nucleosomas de origen tumoral (que no contienen la variante de la histona H1) permanecen en disolución. Las perlas se eliminan mediante separación magnética para dejar una disolución de nucleosomas de origen tumoral. El ADNct asociado a los nucleosomas se extrae por el método de fenol/cloroformo u otros métodos de extracción estándar. El ADN extraído puede analizarse para detectar características genéticas o epigenéticas del cáncer.

Ejemplo 2

Un anticuerpo dirigido a unirse específicamente a la variante de la histona H1 H1.0, H1.10 o H1.X se inmoviliza en un soporte sólido para producir una columna de cromatografía de purificación por afinidad mediante el método recomendado por el fabricante en fase sólida. El suero o plasma extraído de un paciente con cáncer se diluye en tampón de carga y se añade a la columna. Los nucleosomas que se originan en células sanas que contienen la variante de la histona H1 se adsorben en la columna. Los nucleosomas de origen tumoral (que no contienen la variante de la histona H1) permanecen en disolución y pasan a través de la columna y se recogen como eluato. El ADNct asociado a los nucleosomas se extrae por el método de fenol/cloroformo u otros métodos de extracción estándar. El ADN extraído puede analizarse para detectar características genéticas o epigenéticas del cáncer.

Ejemplo 3

Se aísla una disolución de nucleosomas de origen tumoral usando un anticuerpo anti-variante de H1 inmovilizado en fase sólida como en el EJEMPLO 1 o EJEMPLO 2. Los nucleosomas aislados presentes en disolución se analizan mediante inmunoensayo o mediante métodos proteómicos que incluyen espectroscopía de masa.

30 Ejemplo 4

Un anticuerpo dirigido a unirse específicamente a la variante de la histona H1 H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5 o H1.6 se biotinila e inmoviliza en perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynal) mediante el método recomendado por el fabricante. Las perlas se lavan varias veces con tampón de carga usando un sistema de separación magnética. El suero o plasma extraído de un paciente con cáncer se diluye en tampón de carga y se añade a las perlas. Los nucleosomas de origen tumoral que contienen la variante de la histona H1 se adsorben en las perlas. Las perlas se aíslan de la disolución mediante separación magnética. El ADNct asociado a los nucleosomas se extrae por el método de fenol/cloroformo u otros métodos de extracción estándar de las perlas en fase sólida. El ADN extraído puede analizarse para detectar características genéticas o epigenéticas del cáncer.

Ejemplo 5

40 Un anticuerpo dirigido a unirse específicamente a la variante de la histona H1 H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5 o H1.6 se inmoviliza en un soporte sólido para producir una columna de cromatografía de purificación por afinidad mediante el método recomendado por el fabricante en fase sólida. El suero o plasma extraído de un paciente con cáncer se diluye en tampón de carga y se añade a la columna. Los nucleosomas de origen tumoral que contienen la variante de la histona H1 se adsorben en la columna. Los nucleosomas de origen celular sano (que no contienen la variante de la histona H1) permanecen en disolución y pasan a través de la columna. La columna se lava y el ADNct asociado a los nucleosomas se extrae por el método de fenol/cloroformo u otros métodos de extracción estándar. El ADN extraído puede analizarse para detectar características genéticas o epigenéticas del cáncer.

Ejemplo 6

Se aísla una preparación de nucleosomas de origen tumoral unidos en fase sólida usando un anti-variante H1 en fase sólida como en el EJEMPLO 4 o EJEMPLO 5. Los nucleosomas aislados se analizan mediante inmunoensayo o mediante métodos proteómicos que incluyen espectroscopía de masa.

5 Ejemplo 7

Un anticuerpo dirigido a unirse específicamente a la histona H1 *per se* se biotinila e inmoviliza en perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynal) mediante el método recomendado por el fabricante. Las perlas se lavan varias veces con tampón de carga usando un sistema de separación magnética. El suero o plasma extraído de un paciente con cáncer se diluye en tampón de carga y se añade a las perlas. Los nucleosomas que contienen la histona H1 se adsorben en las perlas. Los nucleosomas de origen tumoral (que no contienen la histona H1) permanecen en disolución. Las perlas se aíslan de la disolución mediante separación magnética. Una vez que se han eliminado las perlas, los nucleosomas aislados presentes en disolución se analizan mediante inmunoensayo o mediante métodos proteómicos que incluyen espectroscopía de masa.

Ejemplo 8

15 Un anticuerpo dirigido a unirse específicamente a la histona H1 *per se* se inmoviliza en un soporte sólido para producir una columna de cromatografía de purificación por afinidad mediante el método recomendado por el fabricante en fase sólida. El suero o plasma extraído de un paciente con cáncer se diluye en tampón de carga y se añade a la columna. Los nucleosomas que contienen la histona H1 se adsorben en la columna. Los nucleosomas de origen tumoral (que no contienen la histona H1) permanecen en disolución y pasan a través de la columna. La disolución de nucleosomas de origen tumoral se recoge como eluato. Los nucleosomas aislados presentes en disolución se analizan mediante ELISA o mediante métodos proteómicos que incluyen espectroscopía de masa.

Ejemplo 9

20 Se prepara una disolución de nucleosomas de origen tumoral como en el EJEMPLO 7 o EJEMPLO 8. El ADNct asociado a los nucleosomas se extrae de la disolución mediante el método de fenol/cloroformo u otros métodos de extracción estándar. El ADN extraído puede analizarse para detectar características genéticas o epigenéticas del cáncer.

Ejemplo 10

25 Los nucleosomas de origen tumoral en una muestra de fluido corporal tomada de un sujeto se aíslan usando un anticuerpo anti-H1 inmovilizado en fase sólida como en cualquiera de los ejemplos EJEMPLO 1-9. Los nucleosomas aislados y/o el ADN asociado presentes en disolución se analizan mediante métodos conocidos en la técnica.

30 Ejemplo 11

35 Un anticuerpo dirigido a unirse específicamente a la histona H1 *per se*, o a una variante de la histona H1, se biotinila e inmoviliza en perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynal) mediante el método recomendado por el fabricante. Las perlas se lavan varias veces con tampón de carga usando un sistema de separación magnética. El suero o plasma extraído de un paciente con cáncer se diluye en tampón de carga y se añade a las perlas. Los nucleosomas que se originan en células sanas que contienen la variante de la histona H1 se adsorben en las perlas. Los nucleosomas de origen tumoral (que no contienen la variante de la histona H1) permanecen en disolución. Las perlas se eliminan mediante separación magnética para dejar una disolución de nucleosomas predominantemente de origen tumoral. La disolución de nucleosomas tumorales se ensaya entonces para determinar el ADN metilado usando un método ELISA para el nucleótido 5-metilcitosina asociado a nucleosomas usando un anticuerpos de captura en fase sólida de anti-epítopo de la histona H2, H3 y/o H4 o anti-nucleosoma que se une a nucleosomas intactos y un anticuerpo de detección monoclonal anti-5-metilcitosina biotinilado como sigue: una disolución de anticuerpo anti-histona H2, H3 o H4 en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 se añade a pocillos de microtitulación (100 µL/pocillo) y se incuba toda la noche a 4 °C para recubrir los pocillos con anticuerpo de captura. Se decanta el anticuerpo antihistona en exceso. Se añade una disolución de albúmina de suero bovina (20 g/L) a los pocillos (200 µL/pocillo) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los sitios de unión a proteína en exceso en los pocillos. Se decantó la disolución de albúmina de suero bovina en exceso y los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (200 µL/pocillo, tampón TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contenía Tween 20 al 1 %). Se añaden a los pocillos la muestra (10 µL/pocillo) y el tampón de ensayo (50 µL/pocillo, TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contiene NaCl al 0,9 %, desoxicolato de sodio al 0,05 % y sustituto de Nonidet P40 al 1 %) incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decanta la mezcla de muestra y tampón de ensayo y los pocillos se lavan tres veces con tampón de lavado (200 µL/pocillo). Se añade una disolución de anticuerpo de detección anti-5-metilcitosina biotinilado (50 µL/pocillo) y se incuba durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decanta el anticuerpo de detección en exceso y los pocillos se lavan de nuevo tres veces con tampón de lavado

(200 µL/pocillo). Se añade una disolución que contiene conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (50 µL/pocillo) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decanta el conjugado en exceso y los pocillos se lavan de nuevo tres veces con tampón de lavado (200 µL/pocillo). Se añade una disolución de sustrato coloreado (100 µL/pocillo, sal de diamonio del ácido 2,2'-azinobis[3-etylbenzotiazolin-6-sulfónico]) y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se midió la densidad óptica (DO) de los pocillos a una longitud de onda de 405 nm usando un lector estándar de placas de microtitulación. Se observa una curva de respuesta a la dosis de color creciente con concentración creciente de anti-5-metilcitosina asociada a nucleosomas con una baja señal de fondo observada en ausencia de 5-metilcitosina (suero fetal de ternera). La señal ELISA positiva indica que la 5-metilcitosina detectada por el ELISA se incorpora en los nucleosomas intactos que comprenden tanto la proteína histona, pero no la histona H1, como el ADN, ya que (i) los nucleosomas que contienen la histona H1 se han eliminado mediante purificación por afinidad, (ii) el anticuerpo de captura se une a los epítopos de la histona H2, H3 y/o H4 en la muestra y (iii) el anticuerpo de detección se une al componente 5-metilcitosina del ADN.

Ejemplo 12

Los nucleosomas de origen tumoral en una muestra de fluido corporal tomada de un sujeto se aíslan usando un anticuerpo anti-H1 inmovilizado en fase sólida como en el EJEMPLO 11. Los nucleosomas aislados se analizan mediante el método ELISA descrito en el EJEMPLO 11, pero usando un anticuerpo de detección monoclonal anti-histona modificada biotinilado; por ejemplo, un anticuerpo dirigido a unirse a H3K9(Me)3.

Ejemplo 13

Los nucleosomas de origen tumoral en una muestra de fluido corporal tomada de un sujeto se aíslan usando un anticuerpo anti-H1 inmovilizado en fase sólida como en el EJEMPLO 11. Los nucleosomas aislados se analizan mediante el método ELISA descrito en el EJEMPLO 11, pero usando un anticuerpo de detección monoclonal anti-isoforma de histona biotinilado; por ejemplo, un anticuerpo dirigido a unirse a H2AZ.

Ejemplo 14

Los nucleosomas de origen tumoral en una muestra de fluido corporal tomada de un sujeto se aíslan usando un anticuerpo anti-H1 inmovilizado en fase sólida como en el EJEMPLO 11. Los nucleosomas aislados se analizan mediante el método ELISA descrito en el EJEMPLO 11, pero usando un monoclonal biotinilado dirigido a unirse a una proteína no histona aducida a un nucleosoma libre de células circulante aislado; por ejemplo, un anticuerpo dirigido a unirse al receptor de andrógenos. Los resultados muestran que los nucleosomas libres de células de origen tumoral aducidos a la proteína en cuestión están presentes en la circulación sanguínea (u otro fluido corporal) del sujeto.

Ejemplo 15

Se obtuvieron muestras de suero de 29 sujetos sanos, 29 sujetos diagnosticados con cáncer colorrectal y 11 sujetos diagnosticados con cáncer pancreático.

Los pocillos de microtitulación de plástico se recubrieron con un anticuerpo dirigido a unirse a una proteína de cromatina no histona y se bloquearon de acuerdo con procedimientos estándar. Un anticuerpo dirigido a unirse a la histona H1 *per se* y un anticuerpo dirigido a unirse a una histona central común presente en todos o la mayoría de los nucleosomas se marcaron mediante biotinilación. Se llevaron a cabo dos inmunoensayos en cada muestra.

En el primer inmunoensayo; se añadieron a los pocillos la muestra (10 µL/pocillo) y tampón de ensayo (50 µL/pocillo, TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contenía NaCl al 0,9 %, desoxicolato de sodio al 0,05 % y sustituto de Nonidet P40 al 1 %) incubados 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó la mezcla de muestra y tampón de ensayo y los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (200 µL/pocillo). Se añadió una disolución de anticuerpo de detección anti-histona H1 biotinilado (50 µL/pocillo) y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el anticuerpo de detección en exceso y los pocillos se lavaron de nuevo tres veces con tampón de lavado (200 µL/pocillo). Se añadió una disolución que contenía conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (50 µL/pocillo) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el conjugado en exceso y los pocillos se lavaron de nuevo tres veces con tampón de lavado (200 µL/pocillo). Se añadió una disolución de sustrato coloreado (100 µL/pocillo, sal de diamonio del ácido 2,2'-azinobis[3-etylbenzotiazolin-6-sulfónico]) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se midió la densidad óptica (DO1) del inmunoensayo 1 de los pocillos a una longitud de onda de 405 nm usando un lector estándar de placas de microtitulación. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y se utilizó un resultado medio.

En el segundo inmunoensayo; se añadieron a los pocillos la muestra (10 µL/pocillo) y tampón de ensayo (50 µL/pocillo, TRIS/HCl 0,05 M pH 7,5 que contenía NaCl al 0,9 %, desoxicolato de sodio al 0,05 % y sustituto de Nonidet P40 al 1 %) incubados 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó la mezcla de muestra y tampón de ensayo

y los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (200 µL/pocillo). Se añadió una disolución de anticuerpo de detección anti-nucleosoma central biotinilado (50 µL/pocillo) y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el anticuerpo de detección en exceso y los pocillos se lavaron de nuevo tres veces con tampón de lavado (200 µL/pocillo). Se añadió una solución que contenía conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (50 µL/pocillo) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se decantó el conjugado en exceso y los pocillos se lavaron de nuevo tres veces con tampón de lavado (200 µL/pocillo). Se añadió una disolución de sustrato coloreado (100 µL/pocillo, sal de diamonio del ácido 2,2'-azinobis[3-etylbenzotiazolin-6-sulfónico]) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se midió la densidad óptica (DO2) del inmunoensayo 2 de los pocillos a una longitud de onda de 405 nm usando un lector estándar de placas de microtitulación. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y se utilizó un resultado medio.

Para cada muestra, se calculó la relación DO2:DO1. Los resultados de la relación DO2:DO1 para los 69 sujetos se muestran en la Figura 1. Para los 29 sujetos sanos, la relación media de inmunoensayo encontrada fue de 8,7. Para los 29 sujetos diagnosticados con cáncer colorrectal, la relación media fue de 15,9. Para los 11 sujetos diagnosticados con cáncer pancreático, la relación media fue de 17,1. Esto demuestra que una relación creciente estaba asociada con nucleosomas de origen canceroso.

Además, los resultados individuales para cada sujeto se usaron como un biomarcador para el cáncer con niveles de punto de corte crecientes. Con un punto de corte de 12; la relación dio un resultado positivo para el 73 % (8 de 11) de los sujetos diagnosticados con cáncer pancreático y el 41 % (12 de 29) de los sujetos diagnosticados con cáncer colorrectal con una especificidad clínica del 79 % (6 resultados falsos positivos entre 29 sujetos sanos). Con un punto de corte de 22; la relación dio un resultado positivo para el 36 % (4 de 11) de los sujetos diagnosticados con cáncer pancreático y el 34 % (10 de 29) de los sujetos diagnosticados con cáncer colorrectal con una especificidad clínica del 93 % (2 resultados falsos positivos entre 29 sujetos sanos). Los resultados de la Figura 1 muestran que los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para detectar cáncer. Estos resultados también demuestran que los resultados de los inmunoensayos combinados como se describen en la presente memoria pueden usarse como un biomarcador de combinación para enfermedades cancerosas.

REFERENCIAS

- Crowley *et al*, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 472-484, 2013.
- Fong *et al*, Clinical Chemistry 55(3), 587-589, 2009.
- Grutzmann *et al*, PLoS ONE 3(11): e3759. doi:10.1371/journal.pone.0003759, 2008.
- Guerrero-Preston *et al*, Epigenetics 2(4), 223-226, 2007.
- Holdenrieder *et al*, Int J Cancer 95, 114-120, 2001.
- Holdenrieder y Stieber, Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences; 46(1): 1-24, 2009.
- Izzo y Schneider, (2015) Biochimica et Biophysica Acta S1874-9399 (15) 189-3
- Jung *et al*, Clinica Chimica Acta, 411, 1611-1624, 2010.
- Karczarski *et al*, Clinical Proteomics, 11:24, 2014.
- Newman *et al*, Nature Medicine 20(5), 548-554, 2014.
- Scaffidi, (2015) BBA - Gene Reg. Mechanisms: doi: 10.1016/j.bbagr.2015.09.008
- Schwarzenbach *et al*, Nature Reviews Cancer, 11(6), 426-437, 2011.
- Soares *et al*, Cancer 85(1), 112-118, 1999.
- Zhou *et al*, Seminars in Oncology, 39(4), 440-448, 2012.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para analizar los nucleosomas libres de células de origen tumoral a partir de una muestra biológica mediante purificación por afinidad en donde dicho método comprende las etapas de:
 - (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
 - 5 (ii) aislar los nucleosomas de la muestra que no están unidos al agente de unión a la histona H1; y
 - (iii) analizar los nucleosomas aislados mediante inmunoensayo o espectroscopia de masa.
2. El método *in vitro* de la reivindicación 1, en donde el agente de unión a la histona H1 se selecciona de: un agente de unión que se une a la proteína histona H1, variante, isoforma o modificación de la misma.
- 10 3. El método *in vitro* de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el agente de unión a la histona H1 se selecciona de: un agente de unión que se une a la proteína histona H1 o a una variante de la histona H1 seleccionada de H1.0, H1.10 o H1.X.
- 15 4. El método *in vitro* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los nucleosomas aislados se analizan mediante inmunoensayo o espectroscopia de masa para determinar la inclusión de una característica epigenética seleccionada de: una modificación de histona postraduccional, una isoforma de histona, un nucleótido modificado o una proteína no histona aducida.
5. Un método *in vitro* para aislar ADN tumoral purificado a partir de una muestra biológica, en donde dicho método comprende las etapas de:
 - (i) poner en contacto la muestra con un agente de unión a la histona H1;
 - (ii) aislar los nucleosomas que no están unidos al agente de unión a la histona H1;
 - 20 (iii) extraer el ADN de la muestra de nucleosomas aislados en la etapa (ii); y
 - (iv) analizar el ADN extraído.
- 25 6. El método *in vitro* según la reivindicación 5, en donde la etapa de analizar el ADN extraído comprende: secuenciación del ADN, análisis de secuenciación del ADN metilado, PCR, BEAMing, NGS (genoma diana o completo), PCR digital, PCR en frío (coamplificación a menor temperatura de desnaturización-PCR), MAP (pirofosforólisis activada por MIDI), PARE (análisis personalizado de extremos reorganizados) o espectrometría de masa.
7. El método *in vitro* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende adicionalmente poner en contacto los nucleosomas aislados con un agente de unión a la histona H3.1 y/o H3.2 y/o H3t.
8. Un método de inmunoensayo *in vitro* para detectar un epítopo epigenético de nucleosomas derivados de tumores en una muestra biológica, en donde dicho método comprende las etapas de:
 - 30 (i) poner en contacto la muestra con un primer agente de unión que comprende un agente de unión a la histona H1;
 - (ii) aislar los nucleosomas que no están unidos al primer agente de unión;
 - (iii) poner en contacto los nucleosomas de la etapa (ii) con un segundo agente de unión que se une a dicho epítopo;
 - (iv) detectar y/o cuantificar la unión de dicho segundo agente de unión a dicho epítopo; y
 - 35 (v) usar la presencia o el grado de dicha unión como una medida de la presencia del epítopo particular de nucleosomas derivados de tumor en la muestra.
9. El método *in vitro* según la reivindicación 8, en donde el epítopo comprende: una modificación de histona (tal como H3K27Ac); un nucleótido modificado (tal como 5-metilcitosina); una variante o isoforma de la histona H2A, H2B, H3 o H4; o un aducto de nucleosoma o una variante del mismo.
- 40 10. El método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la muestra biológica comprende sangre, suero, plasma, sangre menstrual, fluido cefalorraquídeo (CSF), fluido endometrial, orina, saliva u otro fluido corporal (heces, fluido lagrimal, fluido sinovial, esputo), aliento, p. ej., como aliento condensado, o un extracto o purificación de los mismos, o dilución de los mismos.

11. El método *in vitro* de la reivindicación 10, en donde la muestra biológica comprende una muestra de sangre, suero o plasma.
12. Un método para detectar cáncer en un sujeto animal o humano que comprende las etapas de:
 - (i) analizar una muestra biológica obtenida del sujeto para determinar los nucleosomas libres de células que contienen una característica epigenética y también contienen la histona H1 mediante un inmunoensayo que usa dos agentes de unión, uno de los cuales está dirigido a unirse a la característica epigenética particular y el otro de los cuales está dirigido a unirse a la histona H1;
 - (ii) analizar la muestra para determinar los nucleosomas libres de células circulantes que contienen la característica epigenética particular, tanto con, como sin, histona H1, mediante un inmunoensayo que usa dos agentes de unión, uno de los cuales está dirigido a unirse a la característica epigenética y el otro de los cuales está dirigido a unirse a un epítopo de nucleosoma central común que incluye cualquier epítopo de la histona H2, H3 o H4, cualquier epítopo de ADN o cualquier otro epítopo presente en fragmentos de cromatina distintos de un epítopo de la histona H1; y
 - (iii) usar una combinación de los resultados del inmunoensayo obtenidos en las etapas (i) y (ii) como un biomarcador de combinación indicativo de la presencia de dicho cáncer en el sujeto.
13. El método de la reivindicación 12, en donde el cáncer se selecciona de: cáncer de mama, vejiga, colorrectal, piel (tal como melanoma), ovario, próstata, pulmón, pancreático, intestino, hígado, endometrio, linfoma, oral, de cabeza y cuello, leucemia y osteosarcoma.
14. Uso de un kit que comprende un agente de unión a la histona H1 en un método descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

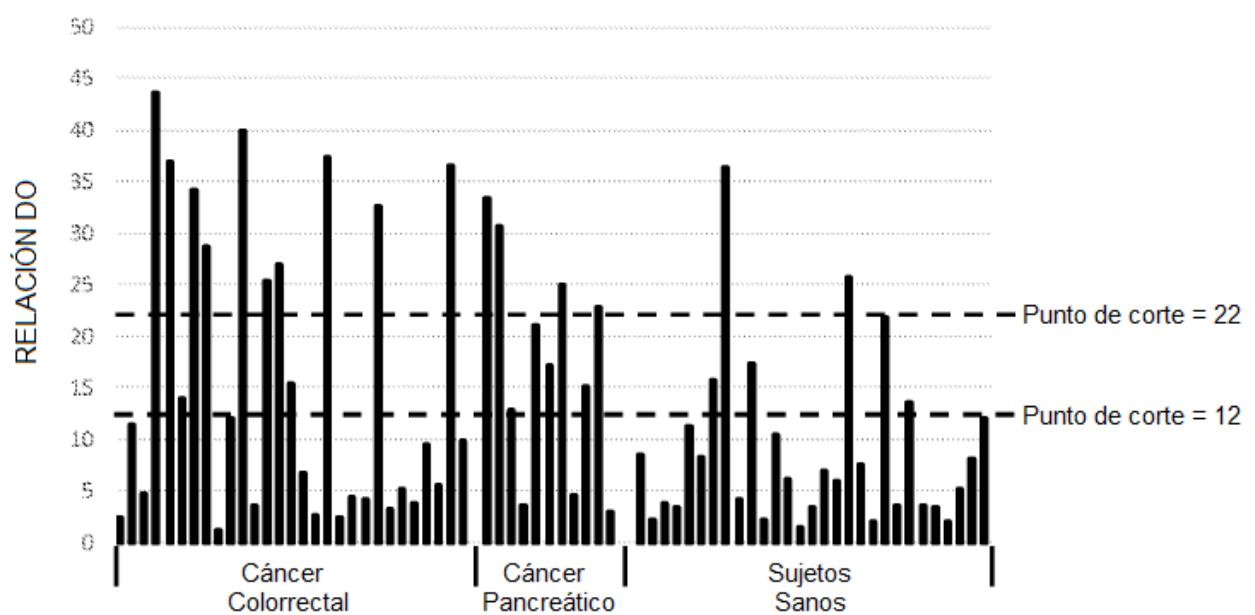


FIGURA 1