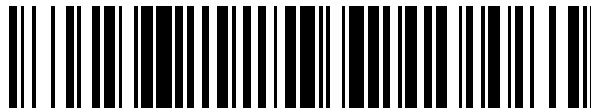


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 973**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2008 E 08796656 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2181332**

54 Título: **Micro-ARN asociado a exosoma como marcador de diagnóstico**

30 Prioridad:

25.07.2007 US 951812 P
05.05.2008 US 50438 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.08.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
Office Of Technology Transfer Med Center Three
201 E. Jefferson Street Suite 215
Louisville, KY 40202, US**

72 Inventor/es:

**TAYLOR, DOUGLAS D. y
GERCEL-TAYLOR, CICEK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 420 973 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

Micro-ARN asociado a exosoma como marcador de diagnóstico

Solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de las Solicitudes Provisionales de Estados Unidos N° de Serie 60/951.812 presentada el 25 de julio 2007 y 61/050.438 presentada el 5 de mayo de 2008, las divulgaciones completas de las cuales se incorporan en el presente documento por esta referencia.

Campo técnico

10 La materia objeto desvelada en el presente documento se refiere a procedimientos para diagnóstico y pronóstico de cáncer y resultados de embarazo adversos. En particular, la materia objeto desvelada en el presente documento se refiere a procedimientos de diagnóstico y pronóstico basados en la determinación de cantidades de uno o más micro-ARN derivados de exosomas correlacionados con cáncer o resultados de embarazo adversos en una muestra biológica de un sujeto.

Antecedentes

15 La identificación de biomarcadores de cáncer adecuados para la detección y diagnóstico temprano de cáncer es muy prometedora para mejorar los resultados clínicos de sujetos. Es especialmente importante para sujetos que presenten síntomas imprecisos o no los presenten o con tumores que sean relativamente inaccesibles al examen físico. A pesar de esfuerzos considerables dirigidos a la detección temprana, se han desarrollado pocos ensayos de exploración fiables y rentables que puedan diagnosticar cáncer en un estadio temprano.

20 Por ejemplo, el cáncer ovárico sigue siendo el sexto cáncer más común en mujeres en todo el mundo, provocando aproximadamente 125.000 muertes anualmente (Sankaranarayanan y Ferlay, 2006). La mayoría de las mujeres con cáncer ovárico se diagnostican en un estadio avanzado, diagnosticándose al 75 % enfermedad extra-ovárica (Berek y col, 2003). En comparación con otros cánceres asociados con mujeres, el 73 % de cánceres de endometrio, 55 % de cánceres de mama y 50 % de cánceres cervicales se diagnostican con enfermedad en estadio I (Menon y Jacobs, 2000). Mientras que la supervivencia a los 5 años de pacientes con cáncer ovárico de estadio I excede el 90 %
25 %, solamente el 21 % de los pacientes con cáncer ovárico de estadio avanzado sobreviven 5 años después del diagnóstico inicial (Berek y col, 2003). Puesto que la supervivencia a largo plazo no ha cambiado significativamente en las últimas décadas, las mejores perspectivas para mejora adicional de la supervivencia de cáncer ovárico residen en el diagnóstico temprano (Menon y Jacobs, 2000).

30 El único biomarcador actualmente aprobado para la detección de cáncer ovárico es CA125 y su cuantificación por ELISA ha sido el "patrón oro" para la detección de cáncer ovárico desde su introducción en 1983. La evaluación de CA125 se usa normalmente en el tratamiento de enfermedades, tanto para detección de enfermedad así como para supervisión de reaparición de enfermedad; sin embargo, el uso de CA125 está limitado con respecto a detección de cáncer de estadio temprano (sensibilidad del 50 al 60 %). La cuantificación de CA125 sólo está aprobada para y demostrada uniformemente para supervisión de remisión. CA125 no es sensible ni específico para detección de
35 cáncer ovárico *de novo*, puesto que está elevado en > 50 % de mujeres con enfermedad de estadio I, aunque está elevado en más del 80 % de pacientes con cáncer ovárico de estadio avanzado. CA125 tiene escasa especificidad, lo que se muestra por su elevación en asociación con enfermedad de colon y mama benigna y maligna, irritantes peritoneales y enfermedades ginecológicas benignas, entre otros.

40 Se han introducido nuevas estrategias que facilitan el análisis proteómico simplificando drásticamente la separación de muestras pre-analítica y acoplamiento con espectrometría de masas (EM) para investigación de descubrimiento de biomarcadores. La espectrometría de masas de desorción/ionización por láser-tiempo de vuelo potenciada en superficie (SELDI-TOF-MS) ha recibido mucha atención para su uso en la resolución de proteínas en muestras de
45 ensayo biológicas uniendo a matrices de microplacas de proteínas bioquímicamente definidas. En una tecnología, se examinan cuatro proteínas del suero por ELISA, mientras que otra tecnología usa espectrometría de masas de siete componentes del suero específicos o patrones peptídicos generales en suero del paciente para definir la presencia de cáncer. La realización de perfil de SELDI-TOF-MS se ha usado exitosamente para diferenciar el cáncer ovárico, de mama, de próstata y de hígado de los controles.

50 Se ha demostrado que la realización de perfil de SELDI-TOF-MS del suero es significativamente mejor que el biomarcador de suero convencional actual CA125 para distinguir pacientes con cáncer ovárico de los que tienen enfermedad ovárica benigna y de controles sanos. Los estudios han demostrado que la selección de una combinación de múltiples proteínas resueltas por SELDI-TOF-MS puede tener potencial como un enfoque de diagnóstico. Un ensayo de exploración eficaz para cáncer ovárico necesita conseguir una alta sensibilidad y especificidad, y actualmente, diferentes tecnologías proteómicas así como las herramientas analíticas computacionales usadas para diferenciar picos generan diferentes hallazgos. Estos estudios iniciales sobre
55 informaciones de perfiles SELDI-TOF-MS son prometedores, y el concepto es reproducible en una serie de fondos diferentes; sin embargo, la traducción de este enfoque a un ensayo de diagnóstico rutinario sigue siendo difícil.

Se ha calculado que, para ser un ensayo de exploración eficaz, un ensayo necesita alcanzar un mínimo de un 99,6 % de especificidad. Para conseguir este nivel de especificidad, se necesitan incorporar múltiples componentes de las características del tumor en nuevos ensayos de diagnóstico para la detección eficaz debido a la naturaleza multifactorial de los cánceres ováricos, así como otros. Una desventaja de las técnicas de espectrometría de masas es que algunas muestras de importancia pueden enmascarse por proteínas más abundantes en la EM así como en el análisis del resultado espectrométrico. La pre-purificación por varias técnicas tales como cromatografía líquida de alto rendimiento y selección positiva o negativa mediante unión de afinidad pueden retirar grupos particulares de proteínas. El mayor reto en la mayoría de los enfoques de espectrometría de masas actuales es el intervalo dinámico más que la sensibilidad. Aunque la retirada de proteínas o péptidos prevalentes puede aumentar en gran medida el contenido de información que pueda adquirirse de muestras particulares, proteínas prevalentes tales como albúmina pueden actuar como vehículos de subconjuntos de proteínas de importancia diagnóstica. Son necesarios estudios adicionales con tamaños de muestras mayores y unión cuidadosa de los conjuntos de validación independientes antes de que deban tenerse en cuenta consideraciones de aplicación de esta plataforma para exploración con respecto al cáncer ovárico o cualquier otra indicación.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar biomarcadores mejorados en casi todos los cánceres y otros trastornos, incluyendo el riesgo aumentado de resultados de embarazo adversos. Los ensayos basados en sangre siguen siendo un objetivo atractivo debido a la disponibilidad y facilidad de la recogida de muestras. El diagnóstico definitivo más temprano de cáncer y riesgo aumentado para resultados de embarazo adversos facilitaría tratamiento más temprano y potencialmente más eficaz de los pacientes. Como tal, existe una necesidad no satisfecha de nuevos biomarcadores que individualmente, o en combinación con otros biomarcadores o modalidades de diagnóstico, proporcionen la sensibilidad y especificidad requeridas para detección y pronóstico temprano de cáncer y resultados de embarazo adversos. En particular, se necesitan ensayos sencillos con respecto a biomarcadores de cáncer y resultados de embarazo adversos realizados en líquidos biológicos fácilmente accesibles.

En Iorio M.V. y col. "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer", *Cancer Research*, volumen 65, nº. 16, 2005, páginas 7065-70, los autores describen que los miARN se expresan de forma aberrante en tumores de cáncer de mama frente a tejido de mama normal.

En Valadi H. y col, "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells", *Nature Cell Biology*, volumen 9, nº 6, 2007, páginas 654-59, los autores describen que los exosomas contienen ARNm y microARN, que puede transportarse entre células mediante los exosomas, y puede ser funcional en la nueva localización.

En Taylor D.D. y col.: "Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling", *Journal of Immunology*, volumen. 176, 2006, páginas 1534-1542, los autores describen que se encuentran concentraciones mayores de exosomas en la circulación materna de embarazos que dan a luz a término frente a embarazos que dan a luz de forma prematura. Los exosomas de embarazos que dan a luz a término también muestran mayores niveles de supresión inmunitaria.

En Pineles, y col, "Distinct subsets of microRNAs are expressed differently in the human placentas of patients with pre-eclampsia", *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, volumen 196, nº 3, 2007, páginas 261 e1 - 261. e6, los autores notifican expresión aumentada de miARN placentarios específicos en preeclampsia en neonatos que son pequeños para su edad gestacional, así como los que no.

Sumario

Este sumario enumera varias realizaciones de la materia objeto desvelada en el presente documento, y en muchos casos enumera variaciones y permutaciones de estas realizaciones. Este sumario es meramente a modo de ejemplo de las numerosas y variadas realizaciones. La mención de una o más características representativas de una realización dada es de modo similar a modo de ejemplo.

Dicha realización puede existir normalmente con o sin la característica o las características mencionadas; de forma similar, estas características pueden aplicarse a otras realizaciones de la materia objeto desvelada en el presente documento, bien enumeradas en este sumario o no. Para evitar repetición excesiva, este sumario no enumera ni sugiere todas las posibles combinaciones de dichas características.

En algunas realizaciones de la materia objeto desvelada en el presente documento, se proporciona un procedimiento para diagnosticar un cáncer en un sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende proporcionar una muestra biológica de un sujeto; aislar exosomas derivados de cáncer que comprenden microARN (miARN) de la muestra biológica; determinar una cantidad de uno o más de los miARN; y comparar la cantidad del o los miARN con uno o más niveles de control de miARN. Después se diagnostica que el sujeto tiene cáncer si hay una diferencia medible en la cantidad del o los miARN de los exosomas derivados de cáncer en comparación con el o los niveles de control de miARN. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además seleccionar un tratamiento o modificar un tratamiento para el cáncer basándose en la cantidad del o los miARN determinados.

5 En otras realizaciones de la materia objeto desvelada en el presente documento, se proporciona un procedimiento para evaluar la eficacia del tratamiento y/o progresión de un cáncer en un sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende aislar exosomas derivados de cáncer que comprenden miARN de una serie de muestras biológicas obtenidas durante un periodo de tiempo de un sujeto; determinar una cantidad de uno o más de los miARN en cada una de las muestras biológicas de la serie; y determinar cualquier cambio medible en las cantidades del o los miARN en cada una de las muestras biológicas de la serie para evaluar de este modo la eficacia del tratamiento y/o progresión del cáncer en el sujeto.

10 En otras realizaciones más de la materia objeto desvelada en el presente documento, se proporciona un procedimiento para caracterizar un cáncer en un sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende proporcionar una muestra biológica de un sujeto; aislar exosomas derivados de cáncer que comprenden miARN de la muestra biológica; determinar una cantidad de uno o más de los miARN; y comparar la cantidad del o los miARN con uno o más niveles de control de miARN. El cáncer se caracteriza después basándose en una diferencia medible en la cantidad del o los miARN de los exosomas derivados de cáncer en comparación con el o los niveles de control de miARN. En algunas realizaciones, la caracterización del cáncer comprende determinar un tipo, un grado y/o un estadio del cáncer. Además, en algunas realizaciones, la determinación de la cantidad del o los miARN comprende determinar una cantidad total del miARN en los exosomas derivados de cáncer.

15 En algunas realizaciones de estos procedimientos, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer ovárico, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma y cáncer pancreático.

20 Además, en algunas de estas realizaciones, el aislamiento de los exosomas derivados de cáncer comprende además usar cromatografía de exclusión por tamaño para aislar los exosomas derivados de cáncer. En algunas realizaciones, el aislamiento de los exosomas derivados de cáncer comprende centrifugar una fracción de cromatografía que comprende los exosomas derivados de cáncer. La fracción de cromatografía puede ser en algunas realizaciones una fracción de volumen hueco.

25 Además, en algunas realizaciones, los exosomas derivados de cáncer se separan de exosomas no derivados de cáncer por captura inmunoabsorbente usando un anticuerpo anti-antígeno de cáncer, tal como por ejemplo un anticuerpo anti-molécula de adhesión de células epiteliales (anti-EpCAM).

30 En algunos de estos procedimientos, la determinación de la cantidad del o los miARN comprende marcar el o los miARN, y en algunas realizaciones, capturar después el o los miARN con una o más sondas polinucleotídicas que se unen cada una selectivamente al o los miARN. En otras realizaciones de estos procedimientos, la determinación de la cantidad del o los miARN comprende usar una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para cuantificar la cantidad del o los miARN. Además, en algunas realizaciones de estos procedimientos, los miARN son uno o más miARN expuestos en la Tabla 2, incluyendo por ejemplo uno o más miARN seleccionados del grupo que consiste en miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205 y miR-214.

35 En otras realizaciones más de la materia objeto desvelada en el presente documento, se proporciona un procedimiento para diagnosticar resultados de embarazo adversos en un sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende proporcionar una muestra biológica de un sujeto; aislar exosomas que comprenden miARN de la muestra biológica; determinar una cantidad de uno o más de los miARN; y comparar la cantidad del o los miARN con uno o más niveles de control de miARN. Se diagnostica el resultado de embarazo adverso para el sujeto si hay una diferencia medible en la cantidad del o los miARN de los exosomas en comparación con el o los niveles de control de miARN. En algunas realizaciones, el resultado de embarazo adverso es un trastorno seleccionado del grupo que consiste en ruptura prematura de membranas, preeclampsia, nacimiento prematuro, restricción de crecimiento intrauterino y pérdida de embarazo recurrente.

40 En algunas de las realizaciones desveladas en el presente documento el sujeto es humano. Además, en algunas de las realizaciones desveladas en el presente documento la muestra biológica comprende leche, sangre, suero, plasma, líquido ascítico, líquido quístico, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, orina, saliva, esputo o combinaciones de los mismos.

45 En consecuencia, es un objetivo de la materia objeto desvelada en el presente documento utilizar miARN asociados a exosoma como marcadores de diagnóstico. Este objetivo se consigue en parte o totalmente por la materia objeto desvelada en el presente documento.

50 Un objetivo de la materia objeto desvelada en el presente documento que se ha indicado anteriormente en el presente documento, y que se consigue completamente o en parte por la materia objeto desvelada en el presente documento, otros objetivos y ventajas resultarán evidentes para los expertos habituales en la materia después de un estudio de la siguiente descripción de la materia objeto desvelada en el presente documento, figuras y ejemplos no limitantes.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra metodología a modo de ejemplo para aislar cromatográficamente exosomas derivados de cáncer y miARN de los exosomas, determinar cantidades del miARN por micro-matriz, y analizar los datos para determinar si está presente cáncer en el sujeto ensayado.

La Figura 2 es un diagrama esquemático que muestra metodología a modo de ejemplo para aislar exosomas derivados de cáncer y miARN de los exosomas, determinar cantidades del miARN mediante PCR en tiempo real y analizar los datos para determinar si está presente cáncer y el estadio de cáncer en el sujeto ensayado.

La Figura 3A es un gráfico que muestra los niveles de exosomas derivados de tumor en circulación comparados con el estadio de cáncer ovárico. Los exosomas se aislaron de sueros obtenidos de controles de sexo femenino de edad coincidente (n = 10), mujeres de edad coincidente con enfermedad ovárica benigna (n = 10) y mujeres diagnosticadas con cáncer ovárico (n = 10 para cada estadio). Los niveles de exosomas se presentan como concentraciones proteicas.

La Figura 3B es una microfotografía electrónica de exosomas en circulación aislados por perlas magnéticas. Se cortaron secciones ultrafinas (65 nm) y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynold. Las secciones se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1210.

La Figura 4A es un gráfico que muestra la presencia de ARN pequeño asociado con exosomas positivos para EpCAM de pacientes con cáncer ovárico. Se muestra en un análisis representativo del ARN aislado de exosomas tumorales usando bioanalizador Agilent 2100.

La Figura 4B es una fotografía de una separación en gel de agarosa (1 %) de ARN total de exosomas en circulación y tumores correspondientes. Este ARN total se usó como el material de partida para realización de perfiles de miARN.

La Figura 5 es una serie de gráficos que muestran intensidades con respecto a miARN específicos derivados de los tumores ováricos de estadio avanzado (□) y de exosomas positivos para EpCAM (■) aislados del suero de estos mismos pacientes. Se ha demostrado que miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205, miR-214 son marcadores regulados positivamente para cáncer ovárico. Cada barra representa las intensidades medias de muestras por duplicado presentándose los resultados de cuatro pacientes representativos.

La Figura 6 es un gráfico que muestra las intensidades para miARN específicos derivados de exosomas positivos para EpCAM aislados de la sangre periférica (2,5 ml) de los pacientes con enfermedad ovárica benigna y pacientes con cáncer ovárico. Los pacientes con cáncer ovárico se separaron entre los estadios I, II y III. Las barras representan la media ± desviación típica de las intensidades normalizadas de cada grupo de pacientes (n = 10 para cada grupo).

Las Figuras 7A y 7B son gráficas que muestran una comparación de miARN exosómicos específicos derivados del suero de un paciente con cáncer ovárico, inmediatamente después de la extracción de sangre de 24, 48 y 96 horas después con sueros almacenados a 4 °C (Figura 7A) o después de 7 a 28 días, almacenados a -70 °C (Figura 7B). Se aislaron exosomas tumorales por MACS usando anti-EpCAM.

La Figura 8 es un diagrama esquemático que muestra metodología a modo de ejemplo para aislar exosomas derivados de cáncer y miARN de los exosomas, determinar las cantidades del miARN por micro-matriz y analizar los datos para determinar si está presente cáncer en el sujeto ensayado.

La Figura 9 es una serie de gráficos que muestran intensidades con respecto a miARN específicos derivados de los tumores de pulmón de estadio avanzado (gris claro) y de exosomas positivos para EpCAM (gris oscuro) aislados del suero de estos mismos pacientes. Cada barra presenta las intensidades medias de muestras por duplicado, presentándose los resultados de cuatro pacientes representativos.

Descripción detallada

Los detalles de una o más realizaciones de la materia objeto desvelada en el presente documento se exponen en la descripción adjunta posteriormente. Otras características, objetos y ventajas de la materia objeto desvelada en el presente documento resultarán evidentes a partir de la memoria descriptiva, figuras y reivindicaciones. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias observadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, tendrá prioridad.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la materia objeto desvelada en el presente documento. Aunque puede usarse cualquier procedimiento, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la materia objeto desvelada en el presente documento; se describen ahora procedimientos y materiales representativos.

Siguiendo la convención de leyes de patentes de larga duración, los términos “un” y “el” se refieren a “uno o más” cuando se usan en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un péptido” incluye una pluralidad de tales péptidos y así sucesivamente.

A no ser que se indique de otro modo, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción y así sucesivamente usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. En consecuencia, a no ser que se indique lo

contrario, los parámetros numéricos expuestos en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener por la materia objeto desvelada en el presente documento.

5 Como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente”, cuando hace referencia a un valor o a una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje pretende abarcar variaciones en algunas realizaciones $\pm 20\%$, en algunas realizaciones $\pm 10\%$, en algunas realizaciones $\pm 5\%$, en algunas realizaciones $\pm 1\%$, en algunas realizaciones $\pm 0,5\%$, y en algunas realizaciones $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos desvelados.

10 Durante los últimos 5 años, las tecnologías de perfiles de expresión han identificado nuevos biomarcadores con aplicaciones de diagnóstico. Uno de dichos grupos de biomarcadores es una clase de ARN no codificantes pequeños, denominados microARN (miARN) (lorio y col. 2007; De Cecco y col, 2004; Calin y Croce, 2006). Los microARN, ARN no codificantes pequeños (22-25 nucleótidos de longitud), suprimen la traducción de ARNm diana uniéndose a su región 3' no traducida (Esquela-Kerscher y Slack, 2006; Bartel, 2004). El silenciamiento post-transcripcional de genes diana por miARN puede producirse por escisión de ARNm homólogo o por inhibición específica de síntesis de proteínas.

15 Todos los tumores analizados por perfiles de miARN han mostrado identificaciones de miARN significativamente definidas, en comparación con células normales del mismo tejido (lorio y col, 2007; Calin y Croce, 2006a; Calin y Croce, 2006b). Lu y col, (2005) realizaron un análisis de leucemias y cánceres sólidos y determinaron que los perfiles de expresión de miARN podrían clasificar cánceres humanos por linaje de desarrollo y estado de diferenciación. Las expresiones de miARN individuales e identificaciones de miARN específicas se han ligado ahora al diagnóstico y pronóstico de muchos cánceres humanos.

20 Usando muestras de ensayo tisulares, lorio y col. (2007) demostraron que, en comparación con el ovario normal, los miARN específicos se expresaban de forma aberrante en cáncer ovárico, siendo *miR-141*, *miR-200a*, *miR-200b* y *miR-200c* los sobreexpresados de forma más significativa. Demostraron adicionalmente que la hipometilación en tumores ováricos dio como resultado la modulación positiva de *miR-21*, *miR-203* y *miR-205*, en comparación con ovario normal. Dos de estos miARN modulados positivamente, *miR-200a* y *miR-200c*, se potenciaron en los tres tipos histológicos examinados (células serosas, endometrioides y claras), mientras que la modulación positiva de *miR-200b* y *miR-141* estaba compartida por los tipos histológicos endometriode y seroso. En general, las identificaciones de miARN obtenidas comparando diferentes tipos histológicos de cánceres ováricos (seroso, endometriode, célula clara y mixto) con el tejido normal fueron solapantes en la mayoría de los casos. Su análisis de tumores ováricos también demostró la ausencia de miARN expresados diferencialmente en relación con el estadio o grado tumoral, lo que podría haber resultado de que su conjunto de muestras derivara principalmente de tumores de estadio avanzado.

25 Entre los miARN modulados positivamente de forma más significativa, *miR-200a* y *miR-141* pertenecen a la misma familia, *miR-200b* se localiza en el cromosoma 1 p36.33 en la misma región que *miR-200a* y *miR-200c* se localiza en el cromosoma 12p13.31 en la misma región de *miR-141* (lorio y col. (2007)). Esta asociación coincidiría con los hallazgos de Zhang y col. (2006), que propusieron que la modulación positiva de miARN específicos podría ser la amplificación de los genes de miARN. Usando hibridación genómica comparativa basada en matrices de alta resolución, una proporción aberrantemente alta de loci que contenían genes de miARN mostraron alteraciones del número de copias de ADN. En cáncer ovárico, el 37,1 % de los loci genómicos que contenían genes de miARN se asociaron con alteraciones del número de copias de ADN (Zhang y col, 2006). En cáncer de mama y melanoma, una proporción aún mayor de estos loci mostraron números de copias de ADN alterados (72,8 % y 85,9 %, respectivamente) (Zhang y col. 2006). Como resultado, los patrones de expresión, o identificaciones, de miARN parecen ser más característicos de los orígenes del desarrollo de tumores que los patrones de expresión de ARNm y pueden estar asociados con diagnóstico, determinación de estadio, progresión, pronóstico y respuesta al tratamiento. Sin embargo, como las herramientas de diagnóstico de cáncer, antes de la materia objeto desvelada en el presente documento, los análisis de identificaciones de miARN se han limitado a biopsias tisulares.

30 Una característica recientemente descrita de células cancerosas es su capacidad para liberar o desprender partes vesiculares intactas de la membrana plasmática (denominadas “exosomas” en el presente documento, y también conocidas en la técnica como fragmentos de membrana, vesículas de membrana, o microvesículas). Se desvelan en el presente documento datos que identifican sorprendentemente por primera vez miARN asociados con exosomas que se originan de células cancerosas (es decir, “exosomas derivados de cáncer”). La materia objeto desvelada en el presente documento desvela además por primera vez que el miARN aislado de exosomas derivados de cáncer muestra niveles de expresión en sujetos que padecen cáncer que difieren (por ejemplo, aumentado o reducido) de los niveles de expresión de miARN medidos en sujetos sin cáncer (denominados en el presente documento “niveles de control de miARN”). Además, la materia objeto desvelada en el presente documento posibilita el aislamiento de exosomas derivados de cáncer de líquidos biológicos fácilmente accesibles de un sujeto de ensayo. Como tal, la materia objeto desvelada en el presente documento posibilita por primera vez procedimientos para diagnóstico y pronóstico de cáncer basados en la recogida y medición de niveles de miARN de exosomas derivados de cáncer de muestras biológicas fácilmente accesibles, y sin necesitar la toma de muestras directa de células cancerosas.

Los "exosomas" son microvesículas liberadas de una diversidad de células diferentes, incluyendo células cancerosas (es decir, "exosomas derivados de cáncer"). Estas vesículas pequeñas (50-100 nm de diámetro) derivan de endosomas multivesiculares grandes y se secretan al medio extracelular. Los mecanismos precisos de liberación/desprendimiento de exosomas siguen sin estar claros; sin embargo, esta liberación es un fenómeno que requiere energía, modulado por señales extracelulares. Parecen formarse por invaginación y gemación de la membrana limitante de endosomas tardíos, dando como resultado vesículas que contienen citosol y que exponen el dominio extracelular de proteínas celulares unidas a membrana en su superficie. Usando microscopía electrónica, los estudios han mostrado perfiles de fusión de endosomas multivesiculares con la membrana plasmática, que conducen a la secreción de las vesículas internas al ambiente extracelular. La tasa de liberación de exosomas aumenta significativamente en la mayoría de las células neoplásicas y se produce de forma continua. La liberación aumentada de exosomas y su acumulación parece ser importante en el proceso de transformación maligna. Además de células cancerosas, se ha demostrado que la liberación de exosomas también está asociada con células de origen embrionario (tales como de la placenta) y células linfoides activadas.

Aunque el desprendimiento extracelular de exosomas se produce en otros tipos de células, en condiciones fisiológicas específicas, la acumulación de exosomas de células no neoplásicas se observa en pocas ocasiones *in vivo*. Por el contrario, los exosomas liberados por células tumorales se acumulan en fluidos biológicos, incluyendo en sueros, líquido ascítico y líquidos pleurales. La liberación de exosomas y su acumulación parecen ser características importantes de la transformación maligna. Los exosomas derivados de cáncer desprendidos no reflejan la composición general de la membrana plasmática de la célula tumoral inicial, sino que representan "micromapas", con expresión potenciada de antígenos tumorales.

La liberación de exosomas parece ser una característica importante de la comunicación intercelular. Puesto que los exosomas liberados expresan moléculas con actividad biológica (tales como ligando Fas, PD-1, MICA/B, mdr1, MMPs, CD44, y antígenos autorreactivos), la capacidad de estas microvesículas para modular las funciones de linfocitos y monocitos se ha analizado en varios modelos. Se ha teorizado que estos exosomas liberados modulan las funciones de los linfocitos imitando la "muerte celular inducida por activación" (AICD). Las células linfoides parecen liberar exosomas después de la activación y éstas parecen desempeñar un papel esencial en la inmunorregulación, evitando respuestas inmunitarias excesivas y el desarrollo de la autoinmunidad. Se ha postulado que la liberación de exosomas por células tumorales es una reexpresión de los exosomas de células fetales y que ambos constituyen rutas para evitar la inmunovigilancia.

Los microARN son ARN no codificantes pequeños, de origen natural, que son de aproximadamente 17 a aproximadamente 25 bases nucleotídicas (nt) de longitud en su forma biológicamente activa. Los miARN regulan post-transcripcionalmente la expresión génica reprimiendo la traducción de ARNm diana. Se cree que los miARN actúan como reguladores negativos, es decir cantidades mayores de un miARN específico se correlacionarán con niveles menores de expresión del gen diana.

Hay tres formas de miARN existentes *in vivo*, miARN primarios (pri-miARN), miARN prematuros (pre-miARN) y miARN maduros. Los miARN primarios (pri-miARN) se expresan como transcritos de estructura de tallo-bucle de aproximadamente varios cientos de bases hasta más de 1 kb. Los transcritos de pri-miARN se escinden en el núcleo por una endonucleasa RNasa II llamado Drosha que escinde ambas cadenas del tallo cerca de la base del bucle tallo. Drosha escinde la doble cadena de ARN con cortes escalonados, dejando un fosfato 5' y saliente de 2 nt en el extremo 3'. El producto de escisión, el miARN prematuro (pre-miARN) es de aproximadamente 60 a aproximadamente 110 nt de longitud con una estructura en horquilla formada con un plegamiento hacia atrás. El pre-miARN se transporta del núcleo al citoplasma por Ran-GTP y exportina-5. Los pre-miRNAs se procesan adicionalmente en el citoplasma por otra endonucleasa RNasa II denominada Dicer. Dicer reconoce el fosfato 5' y saliente 3' y escinde el bucle en el punto de unión tallo-bucle para formar dobles cadenas de miARN. La doble cadena de miARN se une al complejo silenciador inducido por ARN (RISC), en el que la cadena antisentido preferentemente se degrada y el miARN maduro de cadena sentido dirige RISC a su sitio diana. El miARN maduro es la forma biológicamente activa del miARN y es de aproximadamente 17 a aproximadamente 25 nt de longitud.

Los microARN actúan tomando parte en formación de pares de bases (perfecta o imperfecta) con secuencias específicas en sus mensajes de genes diana (ARNm). El miARN degrada o reprime la traducción del ARNm, provocando que la expresión de los genes diana se regule negativamente, se reprima o se silencie post-transcripcionalmente. En animales, los miARN no tienen necesariamente homologías perfectas con sus sitios diana, y las homologías parciales conducen a represión traduccional, mientras que en plantas, en las que los miARN tienden a mostrar homologías completas con los sitios diana, prevalece la degradación del mensaje (ARNm).

Los microARN están ampliamente distribuidos en el genoma, dominan la regulación génica, y participan activamente en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Por ejemplo, se ha descubierto que la modalidad reguladora de ciertos miARN controla la proliferación, diferenciación y apoptosis celular; y los perfiles de miARN anómalos se asocian con oncogénesis. Adicionalmente, se sugiere que la infección viral provoca un aumento de miARN dirigidos a silenciar genes "pro-supervivencia celular", y una reducción de miARN que reprimen genes asociados con la apoptosis (muerte celular programada), inclinando de este modo el equilibrio hacia el aumento de la señalización de apoptosis.

Miles de ARNm están bajo esta presión selectiva por cientos de especies de miARN identificadas hasta la fecha. Este proceso de selección contribuye decisivamente a la amortiguación de grupos específicos de expresiones génicas que, por ejemplo, pueden no necesitarse ya, para permitir que las células canalicen su dirección de programa fisiológico a una nueva ruta de expresión génica. La amortiguación dependiente de miARN de grupos diana de expresión génica es una regulación robusta y rápida para permitir que las células se aparten de un programa viejo, y se desplacen a uno nuevo. Un ejemplo típico de esto se demuestra durante el desarrollo embrionario, cuando se dirige un grupo particular de células para convertirse en tipos celulares especializados únicos tales como neuronas, cardiomiocitos, músculo, etc.

Se cree que los niveles de expresión de aproximadamente un tercio de los genes humanos están regulados por miARN, y que la regulación por miARN de expresiones génicas únicas está ligada a la ruta de señalización particular para cada tipo celular específico. Por ejemplo, la ruta de señalización de apoptosis puede estar dictada por un grupo de miARN dirigidos a desestabilizar mensajes génicos pro-supervivencia, permitiendo que los genes pro-apoptóticos alternativos ganen dominancia y de este modo activen el programa de muerte. Otro ejemplo es el control del crecimiento canceroso; un reciente descubrimiento ha demostrado que los miARN pueden ser también esenciales al evitar que las células se vuelvan neoplásicas. Por ejemplo, se ha descubierto que dos oncogenes, cMyc y cRas comparten el control por una especie de miARN, cuya expresión está regulada negativamente en cáncer. En otras palabras, la falta de este miARN permite la expresión incontrolada de cMyc y cRas, permitiendo de este modo que estos dos genes estén abundantemente presentes en células cancerosas, permitiéndoles adquirir capacidad de proliferación de células incontrolada, y sientan las bases para el crecimiento neoplásico. Adicionalmente, se ha indicado que una mutación de miARN es responsable de un fenotipo de muscularidad en ovejas de origen belga, lo que sugiere que podrían descubrirse mutaciones asociadas con trastornos genéticos en miARN, cuando no se han descubierto pruebas de mutaciones en regiones promotoras, áreas codificantes y sitios de corte.

Es posible que una orquestación coordinada de múltiples rutas actúe para controlar un estado celular particular, en el que pueden estar implicados ciertos "ejes" moleculares, que se manipulan funcionalmente por órdenes jerárquicos y redundancia del control molecular. De hecho, docenas de miARN pueden funcionar para asegurar que estos "ejes" puedan ejercer funciones principales o secundarias en células, simplemente reprimiendo la expresión de sí mismos o sus oponentes funcionales. Por lo tanto, un producto génico puede actuar como un "eje" principal para una ruta de señalización en un tipo de célula, y en otro tipo de célula, puede ser un "eje" secundario o puede no usarse en absoluto. El control por microARN de las expresiones génicas de "ejes" puede ser entonces un mecanismo expeditivo para proporcionar dicha versatilidad para que diversas moléculas actúen como "ejes" principales o secundarios, o nada en absoluto, para diferentes tipos de modalidades operativas celulares.

Dado el papel de los miARN en la regulación génica, y en muchos procesos fisiológicos y patológicos, es deseable obtener información acerca de sus modos interactivos y sus patrones de expresión. Los sistemas y procedimientos de cuantificación e identificación de qué grupos de miARN potenciales están funcionando en un tipo celular particular, o en asociación con un proceso o condición particular de interés, pueden proporcionar información útil para entender cómo evoluciona y se mantiene cada estado celular y cómo se incita el mantenimiento disfuncional por reducciones o aumentos inapropiados de conjuntos únicos de miARN para regular la expresión de genes clave. Dicho entendimiento puede resultar útil en el diagnóstico y caracterización de varios trastornos, incluyendo cáncer y resultados de embarazo adversos.

Como herramientas de diagnóstico clínico potenciales se ha demostrado que los miARN son determinantes importantes y precisos para muchos si no todos los cánceres. Pruebas crecientes muestran que la expresión de genes de miARN está desregulada en cáncer humano. La expresión de miARN es altamente específica para tejidos y estadios del desarrollo y ha permitido recientemente la clasificación molecular de tumores. Hasta la fecha, todos los tumores analizados por perfiles de miARN han mostrado perfiles de miARN significativamente diferentes en comparación con células normales del mismo tejido. La realización de perfiles de miARN por citometría de flujo demostró que los perfiles de expresión de miARN clasifican cánceres humanos según el linaje del desarrollo y estado de diferenciación de los tumores. Se ha demostrado que la infra o sobreexpresión específica se correlaciona con tipos tumorales particulares. La sobreexpresión de microARN podría dar como resultado regulación negativa de genes supresores de tumores, mientras que su infraexpresión podría conducir a regulación positiva de los oncogenes. Usando análisis de micro-matrices a gran escala, las células cancerosas mostraron perfiles de miARN definidos en comparación con células normales con 36 de los 228 genes de miARN sobreexpresados y 21 regulados negativamente en células cancerosas frente a células normales. Los análisis de agrupamiento jerárquico mostraron que esta identificación de miARN permitía que las muestras tumorales se agruparan basándose en su tejido de origen. Se han realizado estudios de realización de perfiles en todo el genoma en diversos tipos de cáncer, incluyendo CLL, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma papilar tiroideo, carcinoma hepatocelular, cáncer ovárico, cáncer de colon y tumores pancreáticos endocrinos. En un estudio de 104 pares coincidentes de tejido ovárico canceroso primario y no canceroso, se observaron 43 miARN expresados diferencialmente; 28 estaban regulados negativamente y 15 estaban sobreexpresados en tumores.

Los análisis estadísticos de datos de micro-matrices obtenidos por dos procedimientos diferentes, análisis de significación de micro-matrices (SAM) y análisis de predicción de micro-matrices (PAM) de seis tumores sólidos (carcinomas ováricos, de mama, de colon, gástricos y prostáticos y tumores pancreáticos endocrinos), demostraron una identificación común compuesta de 21 miARN expresados diferencialmente en al menos tres tipos tumorales. A

- la cabeza de la lista estaba miR-21, que se sobreexpresaba en seis tipos de células cancerosas y miR-17-5p y miR-191, que se sobreexpresaban en cinco. Puesto que el origen embriológico de los tumores analizados era diferente, la significación de dichos hallazgos podría ser que estos miARN comunes participan en rutas de señalización fundamentales alteradas en muchos tipos de tumor. Apoyando la función de estos genes en tumorigénesis, se descubrió que las dianas predichas para los miARN expresados diferencialmente estaban significativamente enriquecidas para los que se dirigen a supresores de tumores y oncogenes conocidos. Además, se mostró que miR-21, el único miARN sobreexpresado en los seis tipos de cáncer analizados, se dirigía directamente al supresor de tumores PTEN, que codifica una fosfatasa que inhibe las rutas de crecimiento y/o supervivencia. La función de PTEN está alterada en tumores avanzados de diversos tipos, incluyendo de mama, ovárico, gástrico y de próstata.
- En algunas realizaciones de la materia objeto desvelada en el presente documento, se proporciona un procedimiento para diagnosticar un cáncer en un sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende aislar exosomas derivados del cáncer que comprenden miARN de una muestra biológica obtenida de un sujeto; determinar una cantidad de uno o más de los miARN; y comparar la cantidad del o los miARN con uno o más niveles de control de miARN. Puede después diagnosticarse que el sujeto tiene el cáncer si hay una diferencia medible en la cantidad del o los miARN de los exosomas derivados de cáncer en la muestra en comparación con el o los niveles de control. Una lista no limitante de miARN a modo de ejemplo que pueden medirse se proporciona en las Tablas 1 y 2. En algunas realizaciones, los miARN medidos se seleccionan de los miARN enumerados en la Tabla 2, y en algunas realizaciones particulares, los miARN medidos son miARN seleccionados del grupo que consiste en miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205 y miR-214.
- El término “cáncer” se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasia o tumores malignos hallados en animales, incluyendo leucemias, carcinomas y sarcomas. Son ejemplos de cánceres cáncer del cerebro, vejiga, mama, cuello uterino, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, pulmón de células no pequeñas, melanoma, mesotelioma, ovario, páncreas, próstata, sarcoma, estómago y útero.
- Se pretende que “leucemia” incluya en general enfermedades progresivas, malignas de los órganos formadores de sangre y se caracteriza generalmente por una proliferación y desarrollo alterado de leucocitos y sus precursores en la sangre y médula ósea. Las enfermedades leucémicas incluyen, por ejemplo, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de linfocitos T del adulto, leucemia aleucémica, una leucemia leucocitémica, leucemia basófila, leucemia de blastocitos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutánea, leucemia embrionaria, leucemia eosinófila, leucemia de Gross, leucemia por tricoleucitos, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmácica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica y leucemia de células indiferenciadas.
- El término “carcinoma” se refiere a un nuevo crecimiento maligno compuesto de células epiteliales que tienden a infiltrarse en los tejidos circundantes y dan lugar a metástasis. Los carcinomas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, carcinoma acinar, carcinoma acinoso, carcinoma adenoquístico, carcinoma adenoide quístico, carcinoma adenomatoso, carcinoma de la corteza adrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma de células basales, carcinoma basocelular, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoescamosas, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma cerebriforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinoma coloide, carcinoma de comedón, carcinoma de corpus, carcinoma cribiforme, carcinoma en coraza, carcinoma cutáneo, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma ductal, carcinoma duro, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma epienoide, carcinoma epitelial adenoide, carcinoma exofítico, carcinoma de úlcera, carcinoma fibroso, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes, carcinoma gigantocelular, carcinoma glandular, carcinoma, de células granulosas, carcinoma de matriz del pelo, carcinoma hematoide, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células de Hurthle, carcinoma hialino, carcinoma hipernefroide, carcinoma embrionario infantil, carcinoma *in situ*, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma de Krompecher, carcinoma de células de Kulchitzky, carcinoma de células grandes, carcinoma lenticular, carcinoma lipomatoso, carcinoma linfoepitelial, carcinoma medular, carcinoma melanótico, carcinoma blando, carcinoma mucinoso, carcinoma mucoso, carcinoma mucoelular, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma mucosum, carcinoma mucoso, carcinoma mixomatoso, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células en granos de avena, carcinoma osificante, carcinoma osteoide, carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinomas preinvasivo, carcinoma de células espinosas, carcinoma pultáceo, carcinoma de células renales del riñón, carcinoma de células de reserva, carcinoma sarcomatoso, carcinoma de Schneider, carcinoma cirroso, carcinoma escrotal, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma simple, carcinoma de células pequeñas, carcinoma solanoide, carcinoma de células esferoides, carcinoma de células fusiformes, carcinoma esponjoso, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma en hilo, carcinoma telangiectásico, carcinoma telangiectoides, carcinoma de células transicionales, carcinoma tuberosum, carcinoma tuberoso, carcinoma verrugoso y carcinoma vellosos.

El término “sarcoma” generalmente se refiere a un tumor que está compuesto de una sustancia como el tejido conectivo embrionario y está generalmente compuesto de células empaquetadas estrechamente incluidas en una sustancia fibrilar u homogénea. Los sarcomas incluyen, por ejemplo, condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Abemethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma de partes blandas alveolares, sarcoma ameloblástico, sarcoma botrioide, sarcoma cloroma, coriocarcinoma, sarcoma embrionario, sarcoma de tumor de Wilms, sarcoma endometrial, sarcoma estromal, sarcoma de Ewing, sarcoma fascicular, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado múltiple idiopático, sarcoma inmunoblástico de linfocitos B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de linfocitos T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma mesenquimoma maligno, sarcoma perióstico, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma seroquístico, sarcoma sinovial, y sarcoma telangiectásico.

Se entiende que el término “melanoma” significa un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. Los melanomas incluyen, por ejemplo, melanoma acral-lentiginoso, melanoma amelanótico, melanoma juvenil benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma de Harding-Passey, melanoma juvenil, melanoma de lentigo maligno, melanoma maligno, melanoma nodular, melanoma subungueal y melanoma de extensión superficial.

En algunas realizaciones particulares, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer ovárico, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma y cáncer pancreático.

La expresión “muestra biológica” como se usa en el presente documento se refiere a una muestra que comprende una biomolécula y/o deriva de un sujeto. Las biomoléculas representativas incluyen, pero sin limitación ADN total, ARN, miARN, ARNm y polipéptidos. La muestra biológica puede utilizarse para la detección de la presencia y/o nivel de expresión de un miARN de interés asociado con exosomas derivados de cáncer. Puede usarse cualquier célula, grupo de células, fragmento celular o producto celular con los procedimientos de la materia objeto reivindicada en el presente documento, aunque son más adecuados líquidos biológicos y órganos que se predeciría que contienen exosomas derivados de cáncer que muestran expresión diferencial de miARN en comparación con controles normales. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra biológica obtenida de forma relativamente fácil, tal como por ejemplo sangre o un componente de la misma. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende leche, sangre, suero, plasma, líquido ascítico, líquido quístico, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, orina, saliva, esputo o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, puede utilizarse cromatografía de exclusión por tamaño para aislar los exosomas derivados de cáncer. Véase, por ejemplo, Figuras 1 y 2. Se conocen en este campo técnicas de cromatografía de exclusión por tamaño. Se proporcionan técnicas no limitantes a modo de ejemplo en los presentes ejemplos. En algunas realizaciones, se aísla un volumen de fracción hueca y comprende los exosomas de interés. Además, en algunas realizaciones, los exosomas derivados de cáncer pueden aislarse adicionalmente después de separación cromatográfica por técnicas de centrifugación (de una o más fracciones cromatográficas), como se conoce generalmente en la técnica. En algunas realizaciones, por ejemplo, puede utilizarse centrifugación de gradiente de densidad para aislar adicionalmente los exosomas. Además, en algunas realizaciones, puede ser deseable separar adicionalmente los exosomas aislados derivados de cáncer de exosomas de otro origen. Por ejemplo, los exosomas derivados de cáncer pueden separarse de exosomas no derivados de cáncer por captura inmunoabsorbente usando un anticuerpo anti-antígeno de cáncer. Véase, por ejemplo, Figura 8. Los anticuerpos anti-antígenos de cáncer a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti-molécula de adhesión de células epiteliales (anti-EpCAM), utilizados como, por ejemplo, se expone en los presentes Ejemplos.

Los términos “diagnosticar” y “diagnóstico” como se usan en el presente documento se refieren a procedimientos por los que el experto en la materia puede estimar e incluso determinar si un sujeto padece o no una enfermedad o afección dada. El experto en la materia con frecuencia realiza un diagnóstico basándose en uno o más indicadores de diagnóstico, tales como, por ejemplo, un biomarcador (por ejemplo, un nivel de expresión de miARN), la cantidad (incluyendo presencia o ausencia) del cual es indicativa de la presencia, gravedad o ausencia de la afección.

Junto con el diagnóstico, el pronóstico de cáncer clínico también es un área de gran preocupación e interés. Es importante conocer la agresividad de las células cancerosas y la probabilidad de reaparición del tumor para planear la terapia más eficaz. Algunos cánceres, por ejemplo, se tratan por varias estrategias alternativas. En algunos casos se utiliza radioterapia sistémica y local-regional mientras que en otros casos se emplean intervención quirúrgica y/o quimioterapia. Las decisiones de tratamiento actuales para sujetos con cáncer individual puede basarse en (1) el número de ganglios linfáticos implicados en enfermedad, (2) estado del marcador o los marcadores de cáncer, (3) tamaño del tumor primario, y (4) estadio de la enfermedad en el diagnóstico. Sin embargo, incluso con estos factores, no es posible la predicción precisa de la evolución de la enfermedad para todos los sujetos con cáncer. Si puede realizarse un pronóstico más preciso, puede seleccionarse la terapia apropiada, y en algunos casos terapia menos grave, para el paciente. La medición de los niveles de miARN de exosomas derivados de cáncer desvelados en el presente documento puede ser útil para clasificar los sujetos de acuerdo con el avance del cáncer que se beneficiarán de terapias particulares y se diferencian de otros sujetos en los que pueden ser más apropiadas terapias alternativas o adicionales. Como tal, en algunas realizaciones de la materia objeto desvelada en el presente

documento, se proporciona un procedimiento para caracterizar un cáncer en un sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende aislar exosomas derivados de cáncer que comprenden micro-ARN (miARN) de una muestra biológica obtenida de un sujeto; determinar una cantidad de uno o más de los miARN; y comparar la cantidad del o los miARN con uno o más niveles de control de miARN. En algunas realizaciones, el cáncer puede caracterizarse basándose en una diferencia medible en la cantidad del o los miARN de los exosomas derivados de cáncer en comparación con uno o más niveles de control de miARN. En algunas realizaciones, la caracterización del cáncer comprende determinar un tipo, un grado y/o un estadio del cáncer.

“Realizar un diagnóstico” o “diagnosticar”, como se usan en el presente documento, incluyen además realizar un pronóstico, que puede posibilitar predecir un resultado clínico (con o sin tratamiento médico), seleccionar un tratamiento apropiado (o si el tratamiento sería eficaz) o supervisar un tratamiento actual y potencialmente cambiar el tratamiento, basándose en la medida de los niveles de miARN de diagnóstico exosómico derivado de cáncer. Además, en algunas realizaciones de la materia objeto desvelada en el presente documento, pueden realizarse múltiples determinaciones de cantidades de uno o más miARN lo largo del tiempo para facilitar el diagnóstico (incluyendo pronóstico), evaluar la eficacia del tratamiento y/o progresión de un cáncer. Un cambio temporal en uno o más niveles de miARN exosómico derivado de cáncer (es decir, cantidades de miARN en una muestra biológica) puede usarse para predecir un resultado clínico, supervisar la progresión del cáncer y/o eficacia de terapias de cáncer administradas. En dicha realización por ejemplo, se puede observar una reducción de la cantidad de miARN particulares en una muestra biológica a lo largo del tiempo durante el transcurso de una terapia, indicando de este modo la eficacia del tratamiento.

La materia objeto desvelada en el presente documento proporciona además en algunas realizaciones un procedimiento para evaluar la eficacia del tratamiento y/o progresión de un cáncer en un sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende aislar exosomas derivados de cáncer que comprenden miARN de una serie de muestras biológicas obtenidas durante un periodo de tiempo de un sujeto; determinar una cantidad de uno o más de los miARN en cada una de las muestras biológicas de la serie; y determinar cualquier cambio medible en las cantidades del o los miARN en cada una de las muestras biológicas de la serie para evaluar de este modo la eficacia del tratamiento y/o progresión del cáncer en el sujeto. Puede usarse cualquier cambio en las cantidades de miARN medidos a lo largo del periodo de tiempo para predecir el resultado clínico, determinar si iniciar o continuar la terapia para el cáncer y si una terapia actual trata eficazmente el cáncer. Por ejemplo, puede seleccionarse un primer punto temporal antes del inicio de un tratamiento y puede seleccionarse un segundo punto temporal en algún momento después del inicio del tratamiento. Los niveles de miARN pueden medirse en cada una de las muestras tomadas de diferentes momentos y observarse las diferencias cualitativas y/o cuantitativas. Un cambio en las cantidades de uno o más de los niveles de miARN medidos de la primera y segunda muestras puede correlacionarse con pronóstico, determinación de la eficacia del tratamiento y/o progresión de la enfermedad en el sujeto.

Los términos “correlacionado” y “que se correlaciona”, como se usan en el presente documento en referencia al uso de niveles de miARN de diagnóstico y pronóstico asociados con cáncer, se refiere a comparar la presencia o cantidad de los niveles de miARN en un sujeto con su presencia o cantidad en sujetos que se sabe que padecen cáncer, o en sujetos que se sabe que están libres de cáncer, es decir, “sujetos normales” o “sujetos de control”. Por ejemplo, puede compararse un nivel de uno o más miARN en una muestra biológica con un nivel de miARN para cada uno de los miARN específicos ensayados y que se ha determinado que están correlacionados con un cáncer. Se dice que el o los niveles de miARN de la muestra están correlacionados con un diagnóstico; es decir, el experto en la materia puede usar el nivel o los niveles de miARN para determinar si el sujeto padece el cáncer y responder en consecuencia. Como alternativa, el nivel o los niveles de miARN de la muestra pueden compararse con el nivel o los niveles de miARN de control que se sabe que están asociados con un buen resultado (por ejemplo, la ausencia de cáncer), tal como un nivel medio hallado en una población de sujetos normales.

En ciertas realizaciones, un nivel de miARN de diagnóstico o pronóstico se correlaciona con un cáncer simplemente por su presencia o ausencia. En otras realizaciones, puede establecerse un nivel umbral de un nivel de miARN de diagnóstico o pronóstico, y el nivel del miARN en una muestra del sujeto puede compararse simplemente con el nivel umbral.

Como se ha observado, en algunas realizaciones, pueden realizarse múltiples determinaciones de uno o más niveles de miARN de diagnóstico o pronóstico, y puede usarse un cambio temporal en los niveles para determinar un diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, puede determinarse el nivel o los niveles de miARN específicos en un momento inicial, y de nuevo en un segundo momento. En dichas realizaciones, un aumento del nivel o los niveles de miARN desde el momento inicial al segundo momento puede ser diagnóstico del cáncer, o un pronóstico dado. De forma similar, una reducción del nivel o los niveles de miARN del momento inicial al segundo momento puede ser indicativa del cáncer o un pronóstico dado. Además, el grado de cambio de uno o más niveles de miARN puede estar relacionado con la gravedad del cáncer y/o línea temporal de progresión de enfermedad y acontecimientos adversos futuros.

El experto en la materia entenderá que, aunque en ciertas realizaciones pueden realizarse mediciones comparativas del mismo nivel o niveles de miARN en múltiples puntos temporales, también se pueden medir el nivel o los niveles de miARN dados en un punto temporal, y el segundo nivel o niveles de miARN en un segundo punto temporal, y una comparación de estos niveles puede proporcionar información de diagnóstico.

La frase “determinar el pronóstico” como se usa en el presente documento se refiere a procedimientos por los que el experto en la materia puede predecir la evolución o resultado de una afección en un sujeto. El término “pronóstico” no se refiere a la capacidad para predecir la evolución o resultado de una afección con un 100 % de precisión, o incluso que es predeciblemente más o menos probable que se produzca un transcurso o resultado dado basándose en la presencia, ausencia o niveles de un biomarcador. En su lugar, el experto en la materia entenderá que el término “pronóstico” se refiere a una probabilidad aumentada de que se produzca una cierta evolución o resultado; es decir, que es más probable que se produzca una evolución o resultado en un sujeto que muestra una condición dada, en comparación con los individuos que no muestran la condición. Por ejemplo, en individuos que no muestran la condición (por ejemplo, que no expresan el nivel o los niveles de miARN o que expresan el nivel o los niveles de miARN a un nivel reducido), la probabilidad de un resultado dado (por ejemplo, padecer cáncer) puede ser muy baja (por ejemplo, < 1 %) o incluso nula. Por el contrario, en individuos que muestran la condición (por ejemplo, que expresan el nivel o los niveles de miARN o que expresan el nivel de los niveles de miARN a un nivel aumentado en gran medida sobre un nivel de control), la probabilidad de un resultado dado (por ejemplo, padecer una forma/estadio de cáncer) pueden ser alta. En ciertas realizaciones, un pronóstico es aproximadamente un 5 % de probabilidad de un resultado esperado dado, aproximadamente un 7 % de probabilidad, aproximadamente un 10 % de probabilidad, aproximadamente un 12 % de probabilidad, aproximadamente un 15 % de probabilidad, aproximadamente un 20 % de probabilidad, aproximadamente un 25 % de probabilidad, aproximadamente un 30 % de probabilidad, aproximadamente un 40 % de probabilidad, aproximadamente un 50 % de probabilidad, aproximadamente un 60 % de probabilidad, aproximadamente un 75 % de probabilidad, aproximadamente un 90 % de probabilidad, o aproximadamente un 95 % de probabilidad.

El experto en la materia entenderá que la asociación de un indicador de pronóstico con una predisposición a un resultado adverso es un análisis estadístico. Por ejemplo, el nivel o los niveles de miARN (por ejemplo, cantidad de uno o más miARN en una muestra) de más o menos que un nivel de control en algunas realizaciones puede señalar que es más probable que un sujeto padezca un cáncer que los sujetos con un nivel menor o igual que el nivel de control, como se determina por un nivel de significación estadística. Adicionalmente, un cambio en el nivel o los niveles de miARN desde los niveles de línea basal puede reflejar el pronóstico del sujeto, y el grado de cambio en el nivel de marcador puede estar relacionado con la gravedad de los acontecimientos adversos. La significación estadística se determina con frecuencia comparando dos o más poblaciones, y determinando un intervalo de confianza y/o un p valor. Véase, por ejemplo, Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad. Son intervalos de confianza a modo de ejemplo de la presente materia objeto 90 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % y 99,99 %, mientras que son p valores a modo de ejemplo 0,1, 0,05, 0,025, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001 y 0,0001.

En otras realizaciones, puede establecerse un grado de umbral de cambio en el nivel de un nivel o niveles de miARN de pronóstico o diagnóstico, y el grado de cambio en el nivel del indicador en una muestra biológica puede simplemente compararse con el grado de umbral de cambio en el nivel. Un cambio de umbral preferido en el nivel para el nivel o los niveles de miARN de la materia objeto develada en el presente documento es de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 100 % y aproximadamente 150 %. En otras realizaciones más, puede establecerse un “nomograma”, por el que un nivel de indicador de pronóstico o diagnóstico puede relacionarse directamente con una disposición asociada hacia un resultado dado. El experto en la materia está familiarizado con el uso de dichos nomogramas para relacionar dos valores numéricos con el entendimiento de que la incertidumbre en esta medición es la misma que la incertidumbre en la concentración de marcador debido a que se hace referencia a mediciones de muestras individuales, no a medias poblacionales.

La identidad y cantidad relativa de miARN en una muestra pueden usarse para proporcionar perfiles de miARN para una muestra particular. Un perfil de miARN para una muestra incluye información acerca de las identidades de miARN contenidos en la muestra, niveles cuantitativos de miARN contenidos en la muestra y/o cambios en los niveles cuantitativos de miARN en relación con otra muestra. Por ejemplo, un perfil de miARN para una muestra incluye información acerca de las identidades, niveles cuantitativos, y/o cambios en los niveles cuantitativos de miARN asociados con un cáncer particular.

Además, con respecto a los procedimientos de diagnóstico de la materia objeto desvelada en el presente documento, un sujeto preferido es un sujeto vertebrado. Un vertebrado preferido es de sangre caliente; un vertebrado de sangre caliente preferido es un mamífero. Un mamífero preferido es más preferentemente un ser humano. Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” incluye sujetos tanto humanos como animales. Por lo tanto, se proporcionan usos terapéuticos veterinarios de acuerdo con la materia objeto desvelada en el presente documento.

Como tal, la materia objeto desvelada en el presente documento posibilita el diagnóstico de mamíferos tales como seres humanos, así como los mamíferos de importancia debido a que están amenazados, tales como los tigres siberianos; de importancia económica, tales como animales criados en granjas para consumo por seres humanos; y/o animales de importancia social para seres humanos, tales como animales mantenidos como mascotas o en zoos. Ejemplos de dichos animales incluyen, pero sin limitación: carnívoros tales como gatos y perros; porcinos, incluyendo cerdos, porcinos y jabalíes; ruminantes y/o ungulados tales como vacas, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos,

cabras, bisontes y camellos; y caballos. También se proporciona el tratamiento de pájaros, incluyendo el tratamiento de los tipos de pájaros que están amenazados y/o se mantienen en zoos, así como aves, y más particularmente aves domesticadas, es decir, aves de corral, tales como pavos, pollos, patos, gansos, pintadas y similares, ya que también son económicamente importantes para los seres humanos. Por lo tanto, también se proporciona el tratamiento de ganado, incluyendo, pero sin limitación, cerdos domesticados, rumiantes, ungulados, caballos (incluyendo caballos de carrera), aves de corral y similares.

Como se ha observado anteriormente en el presente documento, la materia objeto desvelada en el presente documento posibilita la determinación de la cantidad de miARN exosómicos derivados de cáncer correlacionados con cáncer dentro de líquidos biológicos de un sujeto, y en particular, de muestras serológicas de un sujeto, tal como por ejemplo sangre. Esto proporciona la ventaja de muestras biológicas para ensayos que se adquieren fácilmente del sujeto. La cantidad de uno o más miARN de interés en la muestra biológica puede determinarse después utilizando cualquiera de varias metodologías generalmente conocidas en la técnica y compararse con los niveles de control de miARN.

La "cantidad" de uno o más miARN determinada se refiere a una medición cualitativa (por ejemplo, presente o no en la muestra medida) y/o cuantitativa (por ejemplo, cuánta está presente) del o los miARN. El "nivel de control" es una cantidad (incluyendo la presencia o ausencia cualitativa) o intervalo de cantidades de uno o más miARN hallados en una muestra biológica comparable en sujetos que no padecen cáncer. Como un ejemplo no limitante para calcular el nivel de control, la cantidad de uno o más miARN de interés presentes en una muestra biológica normal (por ejemplo, sangre) puede calcularse y extrapolarse para sujetos completos.

Una metodología a modo de ejemplo para medir los niveles de miARN de exosomas en una muestra biológica es la técnica de micro-matrices, que es una herramienta potente aplicada en los estudios de expresión génica. Esta técnica proporciona muchos polinucleótidos con información de secuencia conocida como sondas para hallar e hibridar con las cadenas complementarias en una muestra para capturar de este modo las cadenas complementarias por unión selectiva. Las Figuras 1 y 8 proporcionan diagramas de flujo de protocolos a modo de ejemplo para aislar y medir los miARN derivados de exosomas por micro-matriz.

La expresión "unión selectiva" como se usa en el presente documento se refiere a una medida de la capacidad de una sonda para hibridar con un polinucleótido diana con especificidad. Por lo tanto, la sonda comprende una secuencia polinucleotídica que es complementaria, o esencialmente complementaria, de al menos una parte de la secuencia polinucleotídica diana. Son secuencias de ácido nucleico que son "complementarias" las que forman pares de bases de acuerdo con las reglas de complementariedad de Watson-Crick convencionales. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencias complementarias" significa secuencias de ácidos nucleicos que son sustancialmente complementarias, como puede evaluarse por la misma comparación de nucleótidos expuesta anteriormente, o como se define que puede hibridarse con el segmento de ácido nucleico en cuestión en condiciones relativamente rigurosas tales como las descritas en el presente documento. Un ejemplo particular de un segmento de ácido nucleico complementario contemplado es un oligonucleótido antisentido. Con respecto a sondas desveladas en el presente documento que tienen afinidad de unión por miARN, la sonda puede ser 100 % complementaria con la secuencia polinucleotídica diana. Sin embargo, no es necesario que la sonda sea completamente complementaria del polinucleótido diana a lo largo de la longitud completa del polinucleótido diana siempre que la sonda pueda unirse al polinucleótido diana con especificidad y capturarlo de la muestra.

La hibridación de ácido nucleico se verá afectada por condiciones tales como concentración salina, temperatura o disolventes orgánicos, además de la composición de base, longitud de las hebras complementarias, y el número de emparejamientos erróneos de bases de nucleótidos entre los ácidos nucleicos que hibridan, como apreciará fácilmente el experto en la materia. Las condiciones de temperatura rigurosas generalmente incluirán temperaturas de más de 30 °C, normalmente más de 37 °C y preferentemente más de 45 °C. Las condiciones salinas rigurosas serán de forma ordinaria menos de 1000 mM, normalmente menos de 500 mM y preferentemente menos de 200 mM. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medida de cualquier parámetro individual. La determinación de condiciones de hibridación apropiadas para identificar y/o aislar secuencias que contienen altos niveles de homología se conoce bien en la técnica. Para los fines de especificar las condiciones de alta rigurosidad, las condiciones preferidas son una concentración salina de aproximadamente 200 mM y una temperatura de aproximadamente 45 °C.

El trabajo de extracción de datos se completa por bioinformática, incluyendo microplacas de exploración, adquisición de señales, procesamiento de imágenes, normalización, tratamiento estadístico y comparación de datos así como análisis de ruta. Como tal, la micro-matriz puede realizar el perfil de cientos y miles de polinucleótidos simultáneamente con alto rendimiento de producción. El análisis por perfiles de micro-matriz de la expresión de ARNm ha proporcionado con éxito datos valiosos para los estudios de expresión génica en investigación básica. Y la técnica se ha puesto en práctica adicionalmente en la industria farmacéutica y en diagnóstico clínico. Estando disponibles cantidades crecientes de datos de miARN, y acumulándose pruebas de la importancia de miARN en la regulación génica, la micro-matriz se convierte en una técnica útil para estudios de miARN de alto rendimiento.

El análisis de miARN correlacionado con cáncer puede llevarse a cabo por separado o simultáneamente con múltiples sondas polinucleotídicas dentro de una muestra de ensayo. Por ejemplo, pueden combinarse varias

sondas en un ensayo para procesamiento eficaz de múltiples muestras y para proporcionar potencialmente mayor precisión de diagnóstico y/o pronóstico. Además, un experto en la materia reconocería el valor de ensayar múltiples muestras (por ejemplo, en puntos temporales sucesivos) del mismo sujeto. Dichos ensayos de muestras en serie puede permitir la identificación de cambios en los niveles de miARN a lo largo del tiempo. Los aumentos o reducciones de los niveles de miARN, así como la ausencia de cambio en los niveles, puede proporcionar información útil acerca del estado de enfermedad.

En algunas realizaciones, puede construirse un panel que consiste en sondas polinucleotídicas que se unen selectivamente a miARN exosómicos derivados de cáncer correlacionados con uno o más cánceres para proporcionar información relevante relacionada con el diagnóstico o pronóstico de cáncer y tratamiento de sujetos con cáncer. Dicho panel puede construirse, por ejemplo, usando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o 1000 sondas polinucleotídicas individuales. El análisis de una única sonda o subconjuntos de sondas que comprenden un panel mayor de sondas podría llevarlo a cabo un experto en la técnica para optimizar la sensibilidad o especificidad clínica en diversas situaciones clínicas. Estas incluyen, pero sin limitación, situaciones ambulatorias, de cuidados urgentes, cuidados críticos, de cuidados intensivos, unidad de supervisión, sujeto interno, sujeto externo, consulta del médico, clínica médica y exploración sanitaria. Además, un experto en la materia puede usar una única sonda o un subconjunto de sondas adicionales que comprenden un panel mayor de sondas en combinación con un ajuste del umbral de diagnóstico en cada una de las situaciones anteriormente mencionadas para optimizar la sensibilidad y especificidad clínica. La sensibilidad clínica de un ensayo se define como el porcentaje de los que tienen la enfermedad que el ensayo predice correctamente, y la especificidad de un ensayo se define como el porcentaje de los que no tienen la enfermedad que el ensayo predice correctamente.

En algunas realizaciones, determinar la cantidad del o los miARN comprende marcar el o los miARN. Los miARN marcados pueden después capturarse con una o más sondas polinucleotídicas que se unen selectivamente cada una al o los miARN.

Como se usa en el presente documento, los términos “marcador” y “marcado” se refieren a la unión de un resto, capaz de detección por procedimientos espectroscópicos, radiológicos u otros, con una molécula sonda. Por lo tanto, los términos “marcador” o “marcado” se refieren a la incorporación o unión, opcionalmente de forma covalente o no covalente, de un marcador detectable en/sobre una molécula, tal como un polinucleótido. Se conocen en la técnica y pueden usarse diversos procedimientos de marcaje de polipéptidos. Los ejemplos de marcadores para polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos, marcadores fluorescentes, átomos pesados, marcadores enzimáticos o genes indicadores, grupos quimioluminiscentes, grupos de biotínulo, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos, dominios de unión a metales, marcadores epitópicos, etc.). En algunas realizaciones, los marcadores se unen por ramas espaciadoras de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

El análisis de los niveles de miARN utilizando sondas polinucleotídicas puede llevarse a cabo también en una diversidad de formatos físicos. Por ejemplo, el uso de placas de microtitulación o automatización puede usarse para facilitar el procesamiento de grandes números de muestras de ensayo. Como alternativa, podrían desarrollarse formatos de muestras individuales para facilitar el tratamiento inmediato y diagnóstico de manera oportuna.

En algunas realizaciones, la pluralidad de sondas polinucleotídicas están cada una unida a un sustrato. En algunas realizaciones, el sustrato comprende una pluralidad de direcciones. Cada dirección puede asociarse con al menos una de las sondas polinucleotídicas de la matriz. Una matriz es “direccionable” cuando tiene múltiples regiones de diferentes restos (por ejemplo, diferentes secuencias polinucleotídicas) de modo que una región (es decir, un “elemento” o “punto” de la matriz) en una localización predeterminada particular (es decir, una “dirección”) en la matriz detecte una diana o clase de dianas particular (aunque un elemento puede de forma casual detectar no dianas de ese elemento). Los elementos de la matriz normalmente, pero no necesariamente, se separan por espacios intermedios. En el caso de una matriz, puede hacerse referencia al miARN “diana” como un resto en una fase móvil (normalmente fluida), para detectar por sondas (“sondas diana”) que están unidas al sustrato en las diversas regiones.

Pueden fabricarse matrices biopoliméricas (por ejemplo, micro-matrices polinucleotídicas) depositando biopolímeros previamente obtenidos (tales como de síntesis o fuentes naturales) en un sustrato, o mediante procedimientos de síntesis *in situ*. Los procedimientos para depositar biopolímeros obtenidos incluyen, pero sin limitación, cargarlos tocando con una clavija o capilar en una superficie, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.807.522 o deposición disparando por inyección por pulsos tal como de un cabezal de chorro de tinta, tal como se describe en las publicaciones de PCT WO 95/25116 y WO 98/41531, y en otras partes. Los procedimientos de fabricación *in situ* incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.449.754 para sintetizar matrices peptídicas, y en la Patente de Estados Unidos N° 6.180.351 y el documento WO 98/41531 y las referencias citadas en dichos documentos para polinucleótidos, y también pueden usar inyecciones por pulsos para depositar reactivos. Se desvelan detalles adicionales para fabricar matrices biopoliméricas depositando biopolímeros obtenidos previamente o por el procedimiento *in situ* en las Patentes de Estados Unidos N° 6.242.266, 6.232.072, 6.180.351 y 6.171.797. Al fabricar matrices depositando biopolímeros previamente obtenidos o por procedimientos *in situ*,

normalmente cada región en la superficie de sustrato en la que se formará o se ha formado una matriz (“regiones de matriz”) está completamente expuesta a uno o más reactivos. Por ejemplo, en uno de los métodos las regiones de matriz se expondrán con frecuencia a uno o más reactivos para formar una capa adecuada en la superficie que se une tanto al sustrato como al biopolímero o biomonomero. En fabricación *in situ* las regiones de matriz también se expondrán normalmente a los reactivos oxidantes, desbloqueantes y opcionalmente protectores. De forma similar, particularmente en la fabricación por depósito de biopolímeros previamente obtenidos, puede ser deseable exponer las regiones de matriz a un reactivo de bloqueo adecuado para bloquear las localizaciones en la superficie en la que no hay elementos que no se unan específicamente a diana.

La determinación de la cantidad de miARN exosómicos derivados de cáncer puede como alternativa, o además del análisis de micro-matrices, comprender reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR), por ejemplo tal como se desvela en detalle en los presentes Ejemplos. La PCR en tiempo real (RT-PCR) puede proporcionar datos precisos y rápidos con respecto a la presencia y cantidad de miARN presentes en una muestra. La Figura 2 proporciona un diagrama de flujo de un protocolo a modo de ejemplo para aislar y medir miARN derivados de exosomas por RT-PCR. Se exponen detalles adicionales de metodologías a modo de ejemplo en los presentes Ejemplos.

En algunas realizaciones de la materia objeto desvelada en el presente documento, se proporciona un procedimiento para diagnosticar resultados de embarazos adversos potenciales en un sujeto. La metodología desvelada en detalle anteriormente en el presente documento para aislar exosomas que comprenden miARN y determinar la cantidad de miARN puede aplicarse de forma similar para cuantificar miARN particulares asociados con resultados de embarazo adversos, con algunas modificaciones como se describe ahora.

Para predecir resultados de embarazo adversos, los exosomas en circulación derivados de la placenta pueden aislarse de una muestra biológica, tal como por ejemplo sangre, o componentes de la misma. La placenta, aunque deriva del feto, es el único tejido fetal que de hecho está en contacto con el sistema materno. Como tales, los exosomas producidos por las células placentarias pueden circular dentro del torrente sanguíneo de la madre. Para aislamiento de exosomas derivados de placenta, pueden utilizarse anticuerpos anti-EpCAM (como se usa para aislamiento de exosomas tumorales) o anticuerpos anti-fosfatasa alcalina de tipo placentario (PLAP) fijados en perlas magnéticas (véase, por ejemplo, Figura 8).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el procedimiento comprende aislar exosomas que comprenden micro-ARN (miARN) de una muestra biológica obtenida de un sujeto. Se determina después una cantidad de uno o más de los miARN y se compara con uno o más de los niveles de control de miARN. Puede después diagnosticarse que el sujeto está en riesgo de un resultado de embarazo adverso si hay una diferencia medible en la cantidad del o los miARN de los exosomas en comparación con uno o más niveles de control de miARN. En algunas realizaciones, el resultado de embarazo adverso es un trastorno seleccionado del grupo que consiste en preeclampsia, nacimiento prematuro (por ejemplo, parto antes de las 32 semanas de gestación), ruptura prematura de las membranas, restricción del crecimiento intrauterino y pérdida de embarazo recurrente.

La práctica de la materia objeto desvelada en el presente documento puede emplear, a no ser que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (1989), 2ª ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Capítulos 16 y 17; *Patente de Estados Unidos N° 4.683.195*; *DNA Cloning*, Volúmenes I y II, Glover, ed., 1985; *Oligonucleotide Synthesis*, M. J. Gait, ed., 1984; *Nucleic Acid Hybridization*, D. Hames y S. J. Higgins, eds., 1984; *Transcription and Translation*, B. D. Hames y S. J. Higgins, eds., 1984; *Culture of Animal Cells*, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987; *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, 1986; *Perbal (1984), A Practical Guide To Molecular Cloning: Véase Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, J. H. Miller y M. P. Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1987; *Methods in Enzymology*, Volúmenes. 154 y 155, Wu y col, Eds., Academic Press Inc., N. Y.; *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987; *Handbook of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV, D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986.

Ejemplos

Los siguientes Ejemplos se han incluido para ilustrar modos de la materia objeto desvelada en el presente documento. A la luz de la presente divulgación y el nivel general de experiencia en la técnica, los expertos apreciarán que se pretende que los siguientes Ejemplos sean solamente ejemplares y que puedan emplearse numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin alejarse del alcance de la materia objeto desvelada en el presente documento.

La materia objeto desvelada en el presente documento desvela que puede encontrarse miARN y aislarse de exosomas en fluidos biológicos. El miARN aislado puede utilizarse como una herramienta de diagnóstico para cáncer y resultados de embarazo adversos. Los presentes ejemplos proporcionan apoyo para estas aplicaciones.

Materiales y procedimientos para los Ejemplos 1-5

Muestras de pacientes y líneas celulares

5 Estos ejemplos utilizaron como fluidos biológicos a modo de ejemplo sueros derivados de mujeres diagnosticadas con adenocarcinoma papilar seroso del ovario (n = 50, n = 10 para estadio I, n = 10 para estadio II, n = 20 para
 10 estadio III y n = 10 para estadio IV), mujeres de edad coincidente con adenoma ovárico benigno (n = 10), y mujeres de edad coincidente sin pruebas de enfermedad ovárica (n = 10). Los controles, pacientes con enfermedad ovárica benigna y cáncer ovárico de estadios III y IV se seleccionaron basándose en coincidencia de edad con pacientes con cáncer ovárico en estadio temprano. Estos ejemplos incluyen además datos de investigaciones de cultivos celulares de tumores primarios, establecidos de 6 mujeres con adenocarcinoma quístico de estadio IIIc del ovario, y sus muestras de suero prequirúrgico correspondientes. Todos estos materiales se obtuvieron con consentimiento informado aprobado por el Comité de Estudios Humanos Universitario de la Universidad de Louisville.

15 Los cultivos de células tumorales ováricas primarias se establecieron en el laboratorio de los inventores y se designaron UL-1, UL-2, UL-3, UL-6, UL-B, y UL-O. UL-2 y UL-3 derivaron de cánceres ováricos hereditarios, mientras que UL-1, UL-6, UL-B, y UL-O derivaron de cánceres espontáneos. Estas células tumorales ováricas se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal sin exosomas (por ultrafiltración) al 10 %, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 200 mM, estreptomycin 100 mg/ml y penicilina 100 UI/ml en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada. La viabilidad celular se evaluó por exclusión de azul de tripano y todos los cultivos utilizados fueron > 95 % viables.

Aislamiento de exosomas en circulación

20 Los exosomas derivados de tumor se aislaron específicamente por un procedimiento de separación de células activadas magnética modificada (MACS), usando anti-molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM). Los estudios previos de los inventores han demostrado que los exosomas de tumores epiteliales expresan EpCAM en su superficie y pueden usarse para su aislamiento selectivo. Las muestras de suero (2,5 ml) de controles normales, pacientes con enfermedad benigna, y pacientes con cáncer ovárico de estadio temprano se incubaron con anti-
 25 EpCAM acoplado a microperlas magnéticas (50 µl). Estas se mezclaron e incubaron durante 2 horas a 4 °C. Se colocó una microcolumna de LD en el campo magnético de un separador MACS y la columna se aclaró con 500 µl de solución salina tamponada con Tris (TBS). Los complejos inmunitarios magnéticos se aplicaron a la columna y el material no unido (no marcado) la atravesó y se descartó. La columna se lavó cuatro veces con 500 µl de TBS. Los exosomas seleccionados específicamente se recuperaron retirando la columna del separador y colocándola en un tubo de recogida. Se añadió TBS (1 ml) a la columna y los exosomas marcados magnéticamente se obtuvieron aplicando el émbolo proporcionado con la columna. Las microperlas/exosomas aislados se diluyeron en tampón de elución de IgG (Pierce Chemical Co, Rockford, IL) y el complejo se centrifugó a 10.000 rpm para separar las microperlas de los exosomas (sobrenadante). El sobrenadante se centrifugó después a 100.000 g durante 1 hora a 4
 30 °C. Los exosomas sedimentados se resuspendieron en 250 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y estos exosomas derivados de tumores se ensayaron con respecto a proteína total. La cantidad de proteína se determinó por el procedimiento de microensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), usando albúmina de suero bovino (BSA) como un patrón.

Microscopía electrónica de transmisión

40 Por microscopía electrónica de transmisión, los exosomas sedimentados se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % (p/v) en PBS, se deshidrataron y se incluyeron en Epon. Se cortaron secciones ultrafinas (65 nm) y se tiñeron con uranil acetato y citrato de plomo de Reynold. Las secciones se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1210.

Aislamiento y realización de perfiles de miARN

45 Se aisló ARN total de las células tumorales y exosomas usando el kit de aislamiento de miARN mirVana de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ambion, Austin, TX). La calidad de ARN, rendimiento y tamaño de las fracciones de miARN se analizaron usando bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Foster City, CA). Los miARN aislados se marcaron en el extremo 3' con Cy3 usando el kit de marcaje de matriz de miARN mirVana (Ambion) y el kit de colorante reactivo post-marcaje (Amersham Bioscience, Pittsburgh, PA). Se realizó el perfil de microARN por duplicado por Ocean Ridge Biosciences (Jupiter, FL) usando micro-matrices que contenían sondas para 467 miARN maduros humanos. Este análisis usó matrices de miARN desarrolladas a petición que abarcaban los 467 miARN presentes en la miRBase v9.0 del Instituto Sanger, que consiste en oligonucleótidos de 35-44 unidades, fabricados por Invitrogen y aplicados puntualmente por duplicado. Después de hibridación, las matrices de miARN se exploraron usando un explorador de marices GenePix 4000A (Axon Instruments, Union City, CA) y los datos sin procesar se normalizaron y analizaron usando Software GeneSpring 7.0 (Silicon Genetics, Redwood City, CA). Se realizó normalización expresando cada repetición de miARN en relación con miARN de control (Ambion) añadido a cada muestra, permitiendo comparaciones entre matrices. Se calcularon el umbral y el percentil 95 de controles negativos (TPT95) basándose en señal de hibridación de sondas de control negativo que incluían: 38 sondas de control con emparejamientos erróneos y redistribuidas y 87 sondas de *C. elegans* no conservadas. Para definir la

sensibilidad, se añadió miARN sintético NCode a una relación de masa de 1/500.000 en reacciones de marcaje y se detectó la intensidad de señal. Para especificidad, se usaron sondas perfectamente coincidentes para miR-93, miR-27a y miR-152 y 2 emparejamientos erróneos para cada una. Las sondas de emparejamiento erróneo de 2 pares de bases demostraron una señal por debajo o a TPT95 en todas las matrices.

- 5 Para evaluar la estabilidad del perfil exosómico con almacenamiento y manipulaciones, se obtuvieron sueros de pacientes con cáncer ovárico y se separaron alícuotas en cuatro muestras de 4 ml. Los exosomas tumorales se aislaron de la primera alícuota por el procedimiento de MACS inmediatamente y el ARN total se aisló y se almacenó a -70 °C hasta el aislamiento de todas las muestras. Las muestras de suero restantes se almacenaron a 4 °C para aislamiento de exosomas posterior. Los exosomas tumorales se aislaron de la segunda alícuota después de 24
10 horas, de la tercera alícuota después de 48 horas y de la cuarta muestra después de 96 horas a 4 °C. Se aisló ARN de cada preparación de exosoma y se almacenó. En un estudio similar, se almacenaron 3 alícuotas de suero adicionales a -70 °C durante 7 a 28 días, antes de los aislamientos de exosoma y ARN para imitar el uso de muestras de ensayo acumuladas.

Consideraciones estadísticas generales

- 15 Los datos se analizaron usando el paquete de software estadístico, SAS9.1 (SAS Institute, Cary, NC). Los niveles de exosomas en circulación para cada grupo de pacientes se definieron como media \pm desviación típica de al menos dos experimentos separados realizados por triplicado. Se realizaron comparaciones entre estos grupos mediante ANOVA de una vía, seguido de las comparaciones múltiples de Tukey post-ensayo que comparan cada población. Se calculó la cuantificación relativa de expresión de miARN con el procedimiento de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystems
20 User Bulletin N° 2) y los datos se analizaron como log₁₀ de la cantidad relativa (RQ) del miARN diana, normalizada con respecto a miARN de control añadido a cada muestra, permitiendo comparaciones entre las matrices. Se calcularon las distribuciones y correlaciones de miARN junto con intervalos de confianza para cada subconjunto. La significación estadística se estableció como $p \leq 0,05$.

Ejemplo 1

- 25 Presencia de exosomas positivos para EPCAM en circulación en mujeres con enfermedad ovárica benigna y maligna

Se aislaron específicamente exosomas positivos para EpCAM usando perlas magnéticas anti-EpCAM y estos exosomas en circulación se ensayaron con respecto a proteína total y se representaron frente a estadio de enfermedad (Figura 3A). Los niveles de exosomas positivos para EpCAM en voluntarios normales de edad
30 coincidente (control) fueron de $0,039 \pm 0,030$ mg/ml de proteína exosómica, que representaba el fondo del ensayo. Los pacientes diagnosticados con enfermedad ovárica benigna poseían $0,149 \pm 0,065$ mg/ml de proteína exosómica, lo que era significativamente elevado sobre los controles. Los pacientes diagnosticados con cáncer ovárico mostraron todos niveles significativamente elevados de exosomas positivos para EpCAM (en comparación con enfermedad benigna o controles). Las mujeres con cáncer ovárico de estadio I mostraron $0,320 \pm 0,056$ mg/ml de
35 proteína exosómica en circulación, lo que era significativamente mayor que tanto los controles como la enfermedad benigna ($p < 0,01$). Los niveles de exosomas en circulación aumentaron a medida que el estadio progresaba, teniendo el cáncer de estadio II $0,640 \pm 0,053$ mg/ml, poseyendo el estadio III $0,995 \pm 0,084$ mg/ml y presentando el estadio IV $1,42 \pm 0,228$ mg/ml. Los niveles de exosomas asociados con estos tres estadios fueron significativamente mayores que en mujeres con enfermedad benigna o controles ($p < 0,001$). Las fracciones resultantes se analizaron
40 adicionalmente por microscopía electrónica, lo que demostró estructuras vesiculares características de exosomas (Figura 3B). La naturaleza exosómica de este material se confirmó adicionalmente por la presencia de tetraspaninas, antígenos de clase I, fosfatasa alcalina de tipo placentario por inmunotransferencia de Western.

Ejemplo 2

Asociación de ARN pequeño con exosomas derivados de tumor

- 45 Para identificar si estos exosomas aislados contenían ARN pequeños, se examinaron usando un bio-analizador 2100 (Figura 4). Este análisis identificó la presencia de una población significativa de ARN pequeño en ausencia de ARN 18S y 28S, generalmente observada con ARN derivado de células. Este material se usó posteriormente para realización de perfiles de miARN.

Ejemplo 3

- 50 Realización de perfiles de miARN derivado de células frente a derivado de exosomas

La presencia y niveles de miARN específicos de miARN tanto derivado de células como derivado de exosomas se determinó usando análisis de micro-matriz (Figura 1) explorando con respecto a 467 miARN. Se muestran resultados a modo de ejemplo en la Tabla 1. Los perfiles de miARN de los tumores ováricos de los inventores confirmaron las alteraciones, previamente presentadas (lorio y col, 2007). Además, los inventores demostraron que
55 de los 467 miARN, 218 estaban por encima del umbral normalizado, calculado basándose en el percentil 95 de la señal de sonda de control negativo tanto en las células como en los exosomas (Tabla 2). De los 218 miARN

positivos, los niveles de 175 no eran significativamente diferentes entre las células tumorales ováricas y sus exosomas correspondientes. Por comparación, 12 estaban presentes a una proporción mayor en las células, mientras que 31 estaban presentes a niveles elevados dentro de los exosomas. Previamente, se demostró que los miARN específicos estaban sobreexpresados en células de cáncer ovárico humano (miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200c, miR-200b, miR-203, miR-205 y miR-214). Para correlacionar estos hallazgos con material derivado de exosomas, se aislaron fracciones de ARN de las células tumorales originales y exosomas tumorales en circulación de los mismos pacientes (Figura 5). Usando análisis de micro-matriz, las comparaciones entre perfiles de miARN derivados de tumor y miARN exosómicos derivados de sangre periférica indicaron que no eran significativamente diferentes. Además, los niveles de perfiles de miARN derivados de tumor mostraron una fuerte correlación con los niveles de miARN exosómicos derivados de sangre periférica (para miR-21, $r = 0,77$; miR-141, $r = 0,88$; miR-200a, $r = 0,76$, miR-200b, $r = 0,85$; miR-200c, $r = 0,83$, miR-203, $r = 0,85$; miR-205, $r = 0,91$, y miR-214, $r = 0,71$).

TABLA 1

Comparación cuantitativa de miRNA en exosomas en circulación y células tumorales de sujetos con cáncer*					
		Ex Pac1	Células Pac1	Ex Pac2	Células Pac2
Nombre	ID	866A	866B	866C	866D
hsa-miR-296	1098	5,05	4,33	4,24	4,79
hsa-miR-330	1002	2,98	3,09	4,1	1,08
hsa-miR-20a	1007	11,46	11,35	12	11,93
hsa-miR-28	1024	9,4	10,05	9,19	9,23
hsa-miR-302c	1032	-0,58	3,08	3,5	1,08
hsa-miR-302a	1036	2,17	3,66	3,47	4,33
hsa-miR-214	1057	6,58	3,93	6,17	2,99
hsa-miR-99b	1063	9,59	10,08	9,86	9,16
hsa-miR-99a	1068	3,81	4,53	7,34	6,46
hsa-miR-10a	1072	10,1	10,76	9,63	9,55
hsa-let-7d	1085	12,53	13,32	12,65	12,5
hsa-miR-138	1089	5,37	5,26	4,18	3,61
hsa-miR-140	1106	3,23	4,3	2,01	0,58
hsa-miR-23a	1114	14,51	15,08	14,99	14,78
hsa-miR-215	1122	0,71	1,79	0,51	1,38
hsa-miR-183	1127	9,08	9,63	8,99	8,9
hsa-miR-32	1135	2	2,49	2,42	0,58
hsa-miR-25	1139	11,34	11,3	12,23	12,01
hsa-miR-218	1143	2,71	3,37	4,61	5,33
hsa-miR-107	1163	11,68	12,18	11,29	11,31
hsa-miR-145	1168	1,74	2,38	3,47	1,38
hsa-miR-181a	1172	11,9	12,62	11,35	11,15
hsa-miR-125a	1193	12,34	13,07	11,67	11,84

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-222	1198	12,37	12,53	11,77	10,99
hsa-miR-372	1105	-0,58	3,08	2,51	1,08
hsa-miR-142-3p	1253	2,72	3,06	4,59	3,91
hsa-miR-198	1258	4,2	3,92	3,32	3,67
hsa-miR-196a	1263	4,78	5,07	3,42	4,04
hsa-miR-16	1272	12,28	12,05	12,98	12,6
hsa-miR-200a	1287	8,29	8,72	7,17	7,44
hsa-miR-18a	1292	6,41	6,66	7,98	8,5
hsa-miR-101	1297	4,62	4,87	5,55	6,01
hsa-miR-195	1311	6,09	6,58	6,03	6,43
hsa-miR-136	1203	3,69	3,77	3,52	3,65
hsa-miR-153	1225	1,71	2,08	0,51	0,58
hsa-miR-31	1227	8,97	9,49	9,6	9,32
hsa-miR-33	1274	2,01	3,66	3,58	3,75
hsa-miR-147	1278	4,65	2,95	3,47	3,17
hsa-miR-106b	1282	9,47	9,19	10,59	10,38
hsa-miR-212	1288	2,67	1,81	2,89	3,75
hsa-miR-15a	1312	9,92	10,12	10,79	11,06
hsa-miR-135b	1331	4,51	4,03	4,42	4,07
hsa-miR-92	1335	12,29	12,63	12,62	12,26
hsa-miR-342	1349	9,14	9,62	8,36	8,39
hsa-miR-205	1368	6,15	5,74	15,25	14,33
hsa-miR-150	1385	4,02	2,87	3,33	1,38
hsa-miR-149	1392	6,23	5,65	5,92	4,79
hsa-let-7b	1431	12,73	12,43	13,73	14,06
hsa-miR-370	1445	4,14	3,7	4,37	2,58
hsa-miR-206	1449	5,22	4,34	5,58	4,91
hsa-miR-128a	1350	7,54	7,9	8,06	8,01
hsa-miR-197	1487	11,05	9,76	10,03	9,28
hsa-miR-182	1506	10,11	10,89	10,09	10,41
hsa-miR-553	1750	2,77	2,95	4,05	3,17
hsa-miR-519d	1766	2,17	3,28	0,51	3,04
hsa-miR-520g	1770	-0,58	1,9	3,51	2,49

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-520e	1774	-0,58	1,79	0,51	3,75
hsa-miR-329	1778	2,67	2,08	3,32	2,91
hsa-miR-634	1782	6,69	2,64	3,32	1,08
hsa-miR-614	1786	1,21	-0,01	1,31	2,91
hsa-miR-223	1467	2,71	2,49	4,17	3,17
hsa-miR-485-5p	1863	4,27	2,49	2,6	0,58
hsa-miR-369-5p	1867	2	1,49	0,51	0,58
hsa-miR-575	1871	2,75	2,69	4,36	3,75
hsa-miR-663	1891	5,41	5	6,17	5,76
hsa-miR-520f_hsa-miR-520c	1802	1,61	1,79	2,97	3,15
hsa-miR-382	1806	4,48	4,14	4,04	3,25
hsa-miR-655	1920	1,21	2,3	2,1	3,17
hsa-miR-545	1932	2,5	2,66	2,92	3,58
hsa-miR-502	1940	3,46	4,16	4,99	3,75
hsa-miR-200a *	1952	5,35	5,86	3,42	2,25
hsa-miR-640	1956	2,24	-0,51	2,51	0,58
hsa-miR-514	1972	2	2,95	1,01	1,38
hsa-miR-548b	1988	1,92	-0,01	2,51	0,58
hsa-miR-609	1899	2,55	2,58	3,6	3,54
hsa-miR-377	1929	1,74	-0,01	2,6	0,58
hsa-miR-433	1937	2,71	2,19	3,74	1,08
hsa-miR-500	1957	4,67	4,88	6,34	5,8
hsa-miR-652	1961	6,26	6,6	5,52	5,05
hsa-miR-518c	1981	0,92	1,81	3,68	1,38
hsa-miR-561	1985	-0,58	2,49	0,51	1,38
hsa-miR-551a	2018	3,77	3,27	4,06	3,91
hsa-miR-525	2034	-0,58	2,06	3,1	0,58
hsa-miR-570	2054	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-617	2062	2	2,49	0,51	2,91
hsa-miR-556	2070	-0,58	1,81	1,31	1,08
hsa-miR-551b	2074	1,37	1,79	3,97	3,38
hsa-miR-424	1993	5,87	5,84	4,54	4,79
hsa-miR-612	1997	2,87	0,29	2,83	0,58

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-130a	2005	8,07	8,66	9,08	9,2
hsa-miR-429	2134	5,68	5,39	3,89	4,83
hsa-miR-365	2138	8,7	8,73	7,51	7,31
hsa-miR-29a	2154	13,45	13,83	12,21	12,27
hsa-miR-503	2162	5,44	6,25	1,31	4,39
hsa-miR-624	2166	-0,58	1,99	0,51	3,39
hsa-miR-550	2097	4,34	4,26	3,89	2,58
hsa-miR-581	2227	2,32	1,65	2,31	0,58
hsa-miR-422a	2263	8,33	8,48	9,59	9,25
hsa-miR-449	2267	2,91	2,48	1,31	0,58
hsa-miR-585	2271	3,58	3,74	4,51	4,12
hsa-miR-92b	2182	7,86	8,04	7,75	7,13
hsa-miR-629	2316	6,12	5,93	6,82	7,03
hsa-miR-580	2320	-0,58	1,49	0,51	2,58
hsa-miR-448	2324	1,74	-0,51	2,83	0,58
hsa-miR-592	2332	0,21	2,95	2,83	0,58
hsa-miR-671	2839	4,15	3,98	4,21	0,58
hsa-miR-767-3p	2863	1,42	2,3	2,51	0,58
hsa-miR-608	2279	3,74	1,29	2,47	0,58
hsa-miR-210	2291	9,13	8,6	8,39	7,96
hsa-miR-26a	2299	12,6	12,61	12,27	12,73
hsa-miR-493-5p	2329	2	2,65	2,17	1,08
hsa-miR-202 *	2337	2,55	2,08	3,32	1,88
hsa-miR-454-5p	2840	11,51	11,6	12,87	13,07
hsa-miR-770-5p	2844	2,24	-0,01	1,01	0,58
hsa-miR-769-3p	2865	3,8	3,74	3,01	2,88
hsa-miR-758	2869	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-765	2864	5,35	5,13	6,08	5,77
hsa-miR-301	1103	3,96	4,08	4,04	4,68
hsa-miR-191	1017	9,84	10,87	11,01	10,9
hsa-miR-93	1029	9,68	9,58	10,93	9,75
hsa-let-7f	1033	11,59	12,43	11,79	11,94
hsa-miR-373	1037	3,54	2,4	4,51	3,08

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-200b	1042	10,9	11,07	10,17	9,02
hsa-miR-100	1064	7,25	6,69	7,81	5,54
hsa-miR-324-3p	1082	5,67	4,71	5,64	3,99
hsa-miR-34b	1096	3,27	3,49	3,83	4,54
hsa-miR-324-5p	1115	3,84	2,29	4,16	4,49
hsa-miR-199a *	1124	1,82	2,24	1,01	4,17
hsa-miR-103	1164	11,27	10,65	11,3	9,18
hsa-miR-220	1173	3,67	3,04	4,26	3,99
hsa-miR-151	1199	9,73	9,47	10,22	10,45
hsa-miR-186	1141	4,72	4,93	3,86	4,49
hsa-miR-128b	1153	6,29	6,26	6,7	6,1
hsa-miR-130b	1165	7,72	6,96	7,99	6,49
hsa-miR-338	1174	2,42	2,66	2,67	2,91
hsa-miR-199b	1178	1,98	-0,01	3,67	3,46
hsa-miR-125b	1182	9,34	8,81	9,86	8,11
hsa-miR-122a	1243	5,11	3,49	4,97	4,71
hsa-miR-30d	1251	11,72	11,93	11,32	11,69
hsa-miR-203	1260	1,42	2,9	9,1	9,56
hsa-let-7c	1268	11,91	12,72	13,09	12,47
hsa-miR-216	1294	2	2,45	2,71	3,38
hsa-miR-15b	1313	11,75	12,27	12,66	12,77
hsa-miR-192	1205	7,05	8,48	6	6,14
hsa-miR-133a	1215	3,27	3,07	3,82	4,11
hsa-miR-126	1380	6,42	6,42	5,94	7,51
hsa-miR-326	1393	3,32	0,29	0,51	3,17
hsa-miR-98	1423	6,58	7,21	6,9	7,33
hsa-let-7 g	1432	10,8	11,21	10,01	10,06
hsa-miR-190	1437	3,16	3,57	4,02	4,29
hsa-miR-189	1442	2,59	2,79	2,92	3,38
hsa-miR-137	1339	2,66	3,06	4,36	3,88
hsa-miR-105	1345	2,37	2,48	4,32	3,17
hsa-miR-96	1507	4,66	4,17	4,58	4,58
hsa-miR-519e	1767	-0,08	2,3	2,83	1,08

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-520a	1771	1,42	1,99	3,1	0,58
hsa-miR-451	1783	1	-0,51	3,32	2,58
hsa-miR-523	1787	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-299-5p	1458	1,74	2,06	2,51	0,58
hsa-miR-95	1482	3,94	3,78	2,71	3,08
hsa-miR-593	1832	4,92	1,08	4,1	2,91
hsa-miR-574	1840	11,34	9,36	11,12	9,45
hsa-miR-202	1864	2,59	1,9	2,97	3,67
hsa-miR-519b	1799	-0,08	3,49	3,97	3,83
hsa-miR-520d	1803	2,58	3,56	3,89	4,36
hsa-miR-622	1829	1,42	2,66	0,51	1,38
hsa-miR-483	1845	8,06	3,91	7,36	4,34
hsa-miR-383	1865	2,17	1,95	0,51	1,88
hsa-miR-29b	1869	6,67	6,05	5,9	6,65
hsa-miR-613	1881	2,42	-0,01	1,31	0,58
hsa-miR-453	1904	3,93	3,59	4,76	4,17
hsa-miR-23b	1930	13,2	13,81	12,99	13,61
hsa-miR-501	1942	2,87	2,72	1,31	3,25
hsa-miR-517C	1946	3,01	3,02	4,36	4,39
hsa-miR-625	1897	6,54	7,16	5,67	5,65
hsa-miR-630	1905	2,74	1,49	2,92	3,49
hsa-miR-644	1913	0,21	2,29	2,51	2,91
hsa-miR-527	2039	3,42	1,87	2,51	1,08
hsa-miR-589	2055	-0,08	-0,51	1,31	0,58
hsa-miR-508	2071	2,81	2,79	3,21	4,04
hsa-miR-449b	2083	2,41	2,48	3,97	2,58
hsa-miR-603	1990	4,74	2,84	3,76	0,58
hsa-miR-200c	2131	4,25	3,75	13,3	13,7
hsa-miR-29c	2155	2,75	3,24	3,6	4,2
hsa-miR-411	2167	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-455	2179	2,87	2,52	2,6	0,58
hsa-miR-378	2208	2,24	2,3	3,6	2,58
hsa-miR-638	2212	7,37	6,34	8,56	7,57

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-518F *	2220	-0,58	-0,51	3,17	3,67
hsa-let-7i	2244	12,8	13,03	10,86	10,79
hsa-miR-422b	2264	9,17	8,72	10,51	10,23
hsa-miR-193b	2268	9,68	8,44	8,63	7,54
hsa-miR-491	2272	1,74	0,79	2,81	0,58
hsa-miR-484	2191	8,32	7,81	8,29	7,72
hsa-miR-623	2203	1,74	2,45	0,51	0,58
hsa-miR-486	2209	3,86	3,3	4,2	4,6
hsa-miR-639	2213	1,87	1,49	2,31	1,38
hsa-miR-517a_hsa-miR-517b	2217	2,11	2,56	3,87	3,28
hsa-miR-645	2221	3,12	1,29	0,51	2,58
hsa-miR-146b	2237	5,56	5,29	4,21	5,59
hsa-miR-571	2249	3,33	2,99	4,1	2,91
hsa-miR-191 *	2257	2,42	2,95	1,31	0,58
hsa-miR-7	2261	2,44	3,02	2,51	3,54
hsa-miR-647	2269	4,95	4,27	5,5	6,01
hsa-miR-637	2273	4,65	2,84	4,9	4,17
hsa-miR-30b	2280	9,94	9,87	9,86	9,66
hsa-miR-431	2288	1,74	-0,01	0,51	2,58
hsa-miR-452	2292	4,68	5,15	5,14	5,85
hsa-miR-361	2296	10,36	11,32	10,53	10,83
hsa-miR-576	2314	1,87	-0,51	2,83	0,58
hsa-miR-432	2326	3,74	3,47	3,51	2,58
hsa-miR-375	2342	3,42	2,15	0,51	3,75
hsa-miR-766	2841	9,66	6,37	8,18	7,59
hsa-miR-768-3p	2845	9,89	9,61	9,2	9,48
hsa-miR-769-5p	2861	4,03	4,07	4,47	3,46
hsa-miR-513	2301	3,8	2,56	3,97	4,38
hsa-miR-362	2017	2,93	4,53	4,88	4,38
hsa-miR-565	2045	7,04	4,89	5,13	6,45
hsa-m R-30e-3p	2053	8,97	9,4	7,84	7,61
hsa-miR-320	1005	12,75	13,28	13,11	13,09
hsa-miR-132	1014	4,94	6,57	6,22	7,04

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-193a	1018	4,56	4,32	3,66	4,58
hsa-miR-22	1022	8,71	8,95	8,69	8,79
hsa-miR-224	1026	6,69	7,1	6,4	6,96
hsa-let-7a	1030	13,37	14,07	14,63	14,91
hsa-miR-302d	1034	2,32	2,74	3,76	3,28
hsa-miR-369-3p	1038	2,72	2,38	4,68	3,83
hsa-miR-106a	1006	12,01	12,48	12,09	12,36
hsa-miR-181c	1015	5,67	6,09	4,64	4,27
hsa-miR-17-5p	1031	11,57	11,85	11,34	11,83
hsa-miR-302b	1035	-0,08	2,66	3,26	4,04
hsa-miR-19b	1039	10,14	10,07	11,3	11,47
hsa-miR-24	1044	12,91	13,2	13,13	13,4
hsa-miR-17-3p	1079	4,95	5,02	4,83	5,34
hsa-miR-221	1088	13,67	13,73	12,88	12,76
hsa-miR-335	1146	-0,58	-0,51	6,66	7,68
hsa-miR-199a	1167	2,31	-0,51	0,51	3,17
hsa-miR-126 *	1171	3,12	1,95	3,68	3,15
hsa-miR-337	1175	2,22	-0,51	3,97	2,91
hsa-miR-181 *	1179	5,67	5,34	5,91	5,76
hsa-miR-331	1183	6,46	5,25	5,55	4,95
hsa-miR-340	1187	2,96	2,99	3,86	4,17
hsa-miR-188	1116	3,94	3,31	3,86	4,39
hsa-miR-9	1231	2,96	3,25	4	4,53
hsa-miR-34a	1235	6,95	6,56	7,17	7,33
hsa-miR-30c	1252	13,78	13,97	12,46	12,24
hsa-miR-19a	1271	5,93	5,76	8,01	8,36
hsa-miR-371	1276	3,67	2,19	3,36	3,38
hsa-miR-10b	1301	6,91	7,36	7,73	8,03
hsa-miR-21	1315	13,13	13,2	12,28	12,88
hsa-miR-217	1206	2,53	2,49	0,51	3,57
hsa-miR-302b *	1210	1,87	2,49	2,51	2,99
hsa-miR-135a	1216	2,41	3,62	3,47	3,89
hsa-miR-148a	1361	3	1,45	6,87	7,35

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-339	1366	4,85	4,26	5,12	5,2
hsa-miR-187	1381	3,69	2,4	4,21	3,75
hsa-miR-346	1390	5,77	3,2	4,09	4,87
hsa-miR-146a	1409	9,7	9,88	7,17	7,56
hsa-miR-143	1415	-0,58	-0,51	2,51	3,75
hsa-miR-219	1426	2	1,81	3,32	4,04
hsa-miR-185	1451	8,4	8,73	9,33	9,46
hsa-miR-328	1455	7,15	4,5	4,92	4,33
hsa-miR-196b	1321	4,65	4,44	5,08	5,68
hsa-miR-204	1489	0,71	2,49	0,51	1,38
hsa-miR-133b	1498	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-129	1512	6,33	6,08	7,2	8,02
hsa-miR-649	1756	3,32	2,93	3,17	2,17
hsa-miR-522	1776	2,87	3,4	5,74	5,87
hsa-miR-618	1788	2,22	1,65	0,51	1,08
hsa-miR-30a-5p	1460	12,45	12,55	11,09	11,04
hsa-miR-27a	1485	11,64	11,67	11,97	12,27
hsa-miR-30a-3p	1505	12,22	12,57	10	10,48
hsa-miR-494	1753	4,47	3,87	6,12	5,48
hsa-miR-20b	1769	10,41	10,8	10,92	11,2
hsa-miR-521	1785	3,42	0,49	3,31	3,75
hsa-miR-363	1822	-0,58	-0,51	3,32	1,08
hsa-miR-181b	1830	11,53	11,96	10,84	11,02
hsa-miR-18a *	1850	4,52	2,99	4,97	3,83
hsa-miR-423	1874	8,9	8,85	9,09	8,46
hsa-miR-595	1805	9,11	6,55	8,47	6,49
hsa-miR-487b	1817	4,65	4,3	5,22	5,53
hsa-miR-425-3p	1943	4,14	4,02	3,39	3,96
hsa-miR-594	1951	10,94	10,48	11,55	11,22
hsa-miR-532	1959	5,87	5,79	6,62	6,14
hsa-miR-544	1971	1,08	2,49	1,01	2,91
hsa-miR-512-3p	1910	2,56	2,74	4,41	3,83
hsa-miR-526a	2036	-0,58	-0,51	5,78	5,87

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-619	2044	2,01	1,49	1,01	4,08
hsa-miR-578	2048	3,54	2,79	3,17	2,38
hsa-miR-492	2060	-0,08	1,49	2,71	2,67
hsa-miR-590	2064	3,27	3,4	5,51	5,08
hsa-miR-515-3p	2068	1,74	2,88	3,51	1,08
hsa-miR-539	2080	2,74	1,81	2,51	4,28
hsa-miR-497	1995	3,05	3,11	3,26	0,58
hsa-miR-152	2007	7,72	8,44	6,59	7,2
hsa-miR-181d	2011	8,56	8,9	7,83	7,49
hsa-miR-660	2144	5,3	5,36	6,62	6,8
hsa-miR-584	2176	10,1	10,43	7,6	7,99
hsa-miR-511	2109	2,59	-0,01	2,83	2,91
hsa-miR-141	2117	-0,58	-0,51	7,91	8,21
hsa-miR-18b	2125	5,18	5,41	6,65	6,98
hsa-miR-582	2141	-0,58	-0,51	4,9	4,87
hsa-miR-586	2173	2,11	1,49	2,47	1,08
hsa-miR-505	2184	5,06	5,45	4,16	4,58
hsa-miR-642	2200	4,22	1,15	2,42	0,58
hsa-miR-628	2222	3,59	2,19	2,17	3,83
hsa-miR-425-5p	2234	8,86	9,29	9,01	8,92
hsa-miR-661	2274	2,42	1,81	0,51	0,58
hsa-miR-421	2185	4,06	5,49	6,41	6,43
hsa-miR-27b	2303	10,82	11,2	11,39	11,55
hsa-miR-651	2335	1,71	1,69	3,39	2,91
hsa-miR-557	2339	3,37	2,49	3,51	0,58
hsa-miR-801	2846	5,97	3,08	4,59	1,88
hsa-miR-768-5p	2854	8,68	8,01	8,5	8,38
hsa-miR-454-3p	2858	3	3,37	4,32	3,78
hsa-miR-498	2298	2,87	-0,51	0,51	2,67
hsa-miR-148b	1362	6,83	6,76	6,82	6,69
hsa-miR-194	1416	8,57	8,28	4,64	5,81
hsa-let-7e	1421	7,42	9,18	8,74	9,52
hsa-miR-345	1444	4,63	4,62	3,68	3,17

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-155	1476	8,21	9,31	4,32	6,17
hsa-miR-374	1480	1,42	1,79	0,51	1,38
hsa-miR-26b	1484	9,52	10	9,72	10,43

* Se restó el fondo de los datos sin procesar, se transformaron por Log2 y se normalizaron, La intensidad para cada sonda oligo se basa en promediar puntos duplicados, El umbral normalizado se calcula basándose en log2 (5*devt de fondo sin puntos + señal de sonda de control negativo media trim)

TABLA 2

Asociación de miARN con exosomas tumorales derivados de sangre periférica en comparación con miARN aislado de sus tumores correspondientes		
Asociación de microARN con exosomas tumorales derivados de sangre periférica en comparación con microARN aislado de sus tumores correspondientes.		
Elevado en células	Igual entre células y exosomas	Elevado en exosomas
miR-218, miR-196a, miR-195, miR-15a y miR-519d, miR-382, miR-503, miR-34b, MIR-520d, miR-29c, miR-135a, miR-155	miR-296, miR-20a, miR-28, miR-302a, miR-99a, miR-99b, miR-10a, let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, vamos-7f, let-7g, let-7i, miR-138, miR-23a, miR-183, miR-25, miR-107, miR-181, miR-125a, miR-222, miR-198, miR-16, miR-200a, miR-18a y miR-101, miR-136, miR-31, miR-106b, miR-92, miR-342, miR-128a, miR-182, miR-663, miR-502, miR-500, miR-652, miR-424, miR-130, miR-429, miR-365, miR-29a, miR-550, miR-422a, miR-585, miR-92b, miR-629, miR-671, miR-210, miR-26a, miR-454-5p, miR-769-3p, miR-765, miR-301, miR-191, miR-93, miR-200b, miR-100, miR-324-5p, miR-220, miR-151, miR-186, miR-128b, miR-130b, miR-125b, miR-122a, miR-30d, miR-203, miR-15b, miR-192, miR-133a, miR-126, miR-98, miR-190, miR-137, miR-105, miR-96, miR-95, miR-519b, miR-29b, miR-453, miR-23b, MIR-517C, miR-625, miR-200c, miR-193a, miR-22, miR-224, miR-369-3p, miR-106a, miR-181c, miR-17-5p, miR-19b, miR-24, miR-17-3p, miR-221, miR-335, miR-126, miR-181, miR-331, miR-188, miR-9, miR-34a, miR-30c, miR-19a, miR-371, miR-10b, miR-21, miR-148a, miR-339, miR-187, miR-346, miR-146a, miR-185, miR-328, miR-196b, miR-129, miR-522, miR-30a-5p, miR-27a, miR-30a-3p, miR-494, miR-20b, miR-521, miR-181b, miR-423, miR-487b, miR-425-3p, miR-594, miR-532, miR-512-3p, miR-526a, miR-578, miR-638, miR-422b, miR-484, miR-486, miR-645, miR-146b, miR-571, miR-647, miR-637, miR-30b, miR-452, miR-361, miR-432, miR-375, miR-766, miR-768-3p, miR-769-5p, miR-513, miR-362, miR-565, miR-30e-3p, miR-320, miR-590, miR-152, miR-181d, miR-660, miR-584, miR-141, miR-18b y miR-582, miR-505, miR-628, miR-425-5p, miR-421, miR-27b, MIR-768-5p, miR-454-3p, miR-148b, miR-194, miR-345, miR-26b	miR-214, miR-140, miR-147, miR-135b, miR-205, miR-150, miR-149, miR-370, miR-206, miR-197, miR-634, miR-485-5p, miR-612, miR-608, miR-202, miR-373, miR-324-3p, miR-103, miR-593, miR-574, miR-483, miR-527, miR-603, miR-649, miR-18a y miR-595, miR-193b, miR-642, miR-557, miR-801, let-7

Ejemplo 4

Correlación de miARN exosómico con presencia y estadio de enfermedad

Las comparaciones previas de los inventores entre exosomas tumorales y en circulación se realizaron con pacientes de estadio avanzado. Para comparar las asociaciones de miARN específicos con la presencia de enfermedad a lo largo de diversos estadios, se determinaron las intensidades medias de miARN exosómicos. La presencia de los 8 miARN de diagnóstico entre pacientes con estadio I, II y III no fue significativamente diferente para la mayoría de estos miARN (Figura 6). miR-200c y miR-214 fueron menores en pacientes con estadio I, en comparación con estadios II y III. Sin embargo, en todos los casos, estos miARN estuvieron significativamente elevados sobre los niveles detectados en exosomas derivados de enfermedad benigna. La fracción de ARN pequeña no pudo demostrarse en controles normales y los intentos de evaluar la presencia de miARN fueron negativos.

Ejemplo 5

Estabilidad de perfiles de miARN exosómico

Puesto que se ha demostrado en el presente documento que la medición de miARN exosómico en circulación es diagnóstica, se abordó a continuación la cuestión técnica de su estabilidad. Cuando se realizaron los perfiles de miARN en muestras de suero almacenadas durante periodos de tiempo cortos a 4 °C (hasta 96 horas) y se compararon las intensidades (Figura 7A), no se observaron diferencias significativas en los 3 miARN de diagnóstico analizados. Cuando las muestras de suero se almacenaron a -70 °C durante intervalos de tiempo más largos, las intensidades de estos miARN en las micromatrices no fueron significativamente diferentes (Figura 7B). Estos resultados indican que los niveles de estos miARN exosómicos eran estables y no cambian significativamente con el almacenamiento.

Análisis de los Ejemplos 1-5

Puede usarse la realización de perfiles de expresión de microARN como herramientas de diagnóstico para cánceres que actualmente carecen de marcadores moleculares fiables, tales como cáncer ovárico. Aunque estudios previos han indicado que las identificaciones de miARN podrían actuar como marcadores de diagnóstico y pronóstico para cáncer ovárico, estos datos se basaron en su expresión en muestras de ensayo tisulares. Los presentes ejemplos proporcionan datos que demuestran por primera vez asociación de miARN con exosomas derivados de tumor en circulación. En estudios previos, se ha demostrado que los miARN se expresan de forma aberrante en cánceres ováricos tumorales y la expresión de miARN global podría diferenciar tejidos normales frente a cancerosos (Lorio y col., 2007). El estudio de Lu y col. (2005) demostró el uso de identificaciones de miARN como un avance importante en el diagnóstico del cáncer. Su trabajo indicó que la identificación basada en miARN de cánceres era superior en el diagnóstico correcto del cáncer de primarios desconocidos que la clasificación de ARNm. Sin embargo, antes de la materia objeto desvelada en el presente documento, no era posible usar los perfiles de miARN en ausencia de una masa para biopsiar.

La caracterización microscópica electrónica original por parte de los inventores de exosomas indicó que estos eran huecos (es decir ausencia de estructuras de tipo viral) (Taylor & Black, 1986). Como resultado, el grupo de los inventores, junto con otros, se centraron en componentes proteicos externos de exosomas y las consecuencias biológicas de la exposición a exosomas. En los presentes ejemplos, sin embargo, los inventores demuestran sorprendentemente por primera vez la presencia de especies de ARN pequeño asociadas con exosomas tumorales en circulación (Figura 4). Este ARN pequeño carece del 18S y 28S asociado con ARN de células. Además, el análisis de micromatrices desvelado en el presente documento demostró que al menos parte del ARN pequeño identificado es miARN.

Los perfiles de expresión de miARN de las células tumorales ováricas de los inventores confirmaron las aberraciones de miARN presentadas en estudios previos. Los análisis tanto de exosomas tumorales en circulación como de las células tumorales de los mismos pacientes demostraron que ambos eran positivos para el 46 % de los miARN ensayados (218/467). Cuando se normalizaron las intensidades del miARN, la mayoría de estos de miARN se expresaron a niveles similares entre las células y exosomas o estaban elevados dentro de los exosomas (175 no era significativamente diferentes y 31 estaban elevados dentro de exosomas). Por lo tanto, los miARN expresados de forma aberrante, usados para establecer identificaciones específicas de cáncer, aparecen en compartimentos tanto celulares como exosómicos de pacientes con cáncer ovárico.

La comparación de los inventores de miARN específicos, que se ha demostrado previamente que son diagnósticos, indicó un alto grado de correlación entre el miARN del tumor y sus exosomas correspondientes (que varían de 0,71 a 0,90). Esta alta correlación se mantiene incluso para miARN que parecían estar presentes a proporciones mayores en los exosomas, tales como para miR-214. La elevación uniforme de miARN específicos en exosomas ha conducido a la sugerencia de que la compartimentalización de miARN en exosomas, para al menos algunos miARN, es un proceso activo (selectivo). Dicho proceso podría estar mediado por componentes, tales como nucleolina o nucleofosmina, que se expresan de forma aberrante en exosomas tumorales.

Puesto que estos resultados demostraron que la realización de perfiles de miARN exosómicos puede usarse como un sustituto de miARN tisular y el objetivo en la exploración sería la identificación de enfermedad en estadio temprano, se examinó la capacidad para detectar miARN exosómicos en circulación en enfermedades en estadio temprano. Las expresiones de miARN exosómicos de los miARN de diagnóstico entre pacientes con cánceres ováricos de estadio temprano frente a tardío no fueron significativamente diferentes para la mayoría de estos miARN (Figura 6). MiR-200C y miR-214 fueron menores en pacientes con estadio I, en comparación con estadio II y III; sin embargo, en todos los casos, estos miARN estaban significativamente elevados sobre los niveles detectados en exosomas derivados de enfermedad benigna. La fracción de ARN pequeño no pudo demostrarse en controles normales y los intentos de evaluar la presencia de miARN fueron negativos. Por lo tanto, la ausencia de exosomas y/o ARN pequeño exosómico se asocia con individuos normales, que no portan cáncer y el miARN exosómico que refleja perfiles de miARN tisulares normales parece estar asociado con enfermedad benigna. La similitud a lo largo de los estadios de cáncer ovárico es probablemente el resultado de la estandarización de las cantidades de ARN pequeño exosómico de partida y la normalización de los datos de matrices resultantes. A pesar de esta estandarización y normalización, los perfiles obtenidos con miARN exosómico de pacientes con enfermedad benigna siguen siendo definidos. Estos resultados demuestran que los análisis de miARN específicos asociados con exosomas en circulación pueden aplicarse a todos los estadios de cáncer ovárico y que las enfermedades benignas y malignas parecen distinguibles basándose en los niveles de los 8 miARN específicos observados en el presente documento.

Las identificaciones de miARN de exosomas son paralelas a las de los perfiles de expresión de miARN de las células tumorales iniciales, lo que indica que pueden realizarse perfiles de miARN en ausencia de tejido y reflejar con precisión el perfil del tumor. Los inventores también han observado que los exosomas derivados de tumor de pacientes con cáncer de pulmón contienen miARN que es similar a las identificaciones de miARN de tumor correspondientes (véase Ejemplo 6). Pueden aislarse exosomas derivados de tumor en circulación usando marcadores tumorales tales como EpCAM, seguido de análisis de miARN asociado a exosoma. Puesto que este enfoque no es invasivo, porque no requiere que se biopsie una masa, puede utilizarse el perfil de miARN exosómico como una herramienta de exploración para detección de muchos cánceres diferentes. Ya que se han identificado miARN específicos asociados con tejidos tumorales que predicen el pronóstico, incluyendo resistencia terapéutica (tales como let-7i, miR-16, miR-21 y miR-214) (Yang y col., 2008; Blower col. 2008), su presencia en exosomas tumorales también puede evaluarse para definir adicionalmente la utilidad de los perfiles de miARN exosómicos como un indicador de pronóstico. El uso de perfiles de miARN exosómico puede extender este enfoque a la exploración de individuos asintomáticos, así como para supervisar la reaparición de enfermedad.

Ejemplo 6

Correlación de miARN con exosomas tumorales de pulmón derivados de sangre periférica en comparación con miARN aislado de sus tumores de pulmón correspondientes

En estudios que demuestran identificaciones de miARN de diagnóstico de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), se sobreexpresaron miARN específicos en comparación con tejido pulmonar normal (miR-17-3p, miR-21, miR-106a, miR-146, miR-155, miR-191, miR-192, miR-203, miR-205, miR-210, miR-212 y miR-214). Para correlacionar estos hallazgos con material derivado de pacientes, las fracciones de miARN se aislaron y se realizaron sus perfiles de exosomas tumorales en circulación y el tumor original usando procedimientos desvelados anteriormente en el presente documento y mostrados en la Figura 8. Los miARN aislados se marcaron en el extremo 3' con Cy3 usando el Kit de Marcaje de Matriz de miARN mirVana. Se realizaron los perfiles de miARN por duplicado, usando micromatrices que contienen sondas para 467 miARN maduros humanos. Después de la hibridación, las matrices de miARN se exploraron usando un explorador de matrices GenePix 4000A y los datos sin procesar se normalizaron y analizaron usando Software GeneSpring 7.0 (Silicon Genetics, Redwood City, CA). Se realizó normalización expresando cada repetición de miARN en relación con microARN de control (Ambion) añadido a cada muestra, permitiendo comparaciones entre microplacas.

Las comparaciones entre exosomas de tumor derivados de circulación periférica y tumores indicaron que las identificaciones de miARN no eran significativamente diferentes (Figura 9). Este enfoque confirmó que al menos los 12 miARN específicos estaban elevados en NSCLC y que las asociaciones de estos 12 se reflejaron en los exosomas derivados de tumores en circulación. Por lo tanto, la evaluación de estos miARN pueden usarse como un sustituto de sus niveles en el tumor y por lo tanto son diagnósticos con respecto a la ausencia de cáncer, en este caso particular NSCLC.

Ejemplo 7

Realización de perfiles de miARN exosómico derivado de placenta para correlación con resultados de embarazo adversos

Para determinar si los exosomas en circulación comprenden miARN que puede ser diagnóstico de resultados de embarazo adversos (por ejemplo, nacimiento prematuro), se recogieron muestras de suero de sujetos embarazadas y se aislaron fracciones de exosomas derivadas de tejidos placentarios usando anticuerpos antifosfatasa alcalina placentaria ligados con perlas magnéticas. Se aislaron miARN y se realizaron sus perfiles a partir de los exosomas

derivados de placenta en circulación aislados y directamente del tejido placentario del mismo sujeto como se ha desvelado anteriormente en el presente documento y como se muestra en la Figura 8. Brevemente, los miARN aislados se marcaron en el extremo 3' con Cy3 usando el Kit de Marcaje de Matriz de miARN mirVana. Se realizó el perfil de miARN por duplicado, usando micromatrices que contenían sondas para 467 miARN maduros humanos. Después de hibridación, las matrices de miARN se exploraron usando un explorador de matrices GenePix 4000A y los datos sin procesar se normalizaron y analizaron usando Software GeneSpring 7.0 (Silicon Genetics, Redwood City, CA). Se realizó normalización expresando cada repetición de miARN en relación con microARN de control (Ambion) añadido a cada muestra, permitiendo comparaciones entre microplacas.

- 5
- 10 Se exponen resultados en la Tabla 3. Las muestras DT1 son miARN aislado de tejido placentario de mujeres que dieron a luz a término. Las muestras DT2 son miARN aislado de exosomas derivados de placentas de mujeres que dieron a luz a término. Las muestras DT3 son miARN aislado de tejido placentario de mujeres que dieron a luz de forma prematura (parto antes de 32 semanas de gestación). Las muestras DT4 son miARN aislado de exosomas derivados de placentas de mujeres que dieron a luz de forma prematura. Las celdas sombreadas indican presencia en la muestra de miARN ensayado.
- 15 Estos datos demuestran que se consiguió la realización de perfil de miARN de exosomas derivados de placenta y que estos datos se correlacionan con perfiles de miARN de la placenta. Como tales, los perfiles de miARN de miARN aislado de exosomas producidos por células placentarias pueden utilizarse para fines de diagnóstico de resultados de embarazo adversos.

Tabla 3

- 20 Detección y cuantificación de miARN de exosomas placentarios derivados de sangre periférica y tejido placentario relacionado*

Umbral normalizado		3,11	3,14	4,26	4,85
TPT95 normalizado		4,61	5,07	5,53	5,20
		DT1	DT2	DT3	DT4
Nombre	ID	866a	866B	866C	866D
hsa-miR-296	1098	5,05	4,33	4,24	4,79
hsa-miR-330	1002	2,98	3,09	4,1	1,08
hsa-miR-20a	1007	11,46	11,35	12	11,93
hsa-miR-28	1024	9,4	10,05	9,19	9,23
hsa-miR-302c	1032	-0,58	3,08	3,5	1,08
hsa-miR-302a	1036	2,17	3,66	3,47	4,33
hsa-miR-214	1057	6,58	3,93	6,17	2,99
hsa-miR-99b	1063	9,59	10,08	9,86	9,16
hsa-miR-99a	1068	3,81	4,53	7,34	6,46
hsa-miR-10a	1072	10,1	10,76	9,63	9,55
hsa-let-7d	1085	12,53	13,32	12,65	12,5
hsa-miR-138	1089	5,37	5,26	4,18	3,61
hsa-miR-140	1106	3,23	4,3	2,01	0,58
hsa-miR-23a	1114	14,51	15,08	14,99	14,78
hsa-miR-215	1122	0,71	1,79	0,51	1,38
hsa-miR-183	1127	9,08	9,63	8,99	8,9
hsa-miR-32	1135	2	2,49	2,42	0,58
hsa-miR-25	1139	11,34	11,3	12,23	12,01

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-218	1143	2,71	3,37	4,61	5,33
hsa-miR-107	1163	11,68	12,18	11,29	11,31
hsa-miR-145	1168	1,74	2,38	3,47	1,38
hsa-miR-181a	1172	11,9	12,62	11,35	11,15
hsa-miR-125a	1193	12,34	13,07	11,67	11,84
hsa-miR-222	1198	12,37	12,53	11,77	10,99
hsa-miR-372	1105	-0,58	3,08	2,51	1,08
hsa-miR-9*	1232	-0,58	-0,01	0,51	0,58
hsa-miR-142-3p	1253	2,72	3,06	4,59	3,91
hsa-miR-198	1258	4,2	3,92	3,32	3,67
hsa-miR-196a	1263	4,78	5,07	3,42	4,04
hsa-miR-16	1272	12,28	12,05	12,98	12,6
hsa-miR-200a	1287	8,29	8,72	7,17	7,44
hsa-miR-18a	1292	6,41	6,66	7,98	8,5
hsa-miR-101	1297	4,62	4,87	5,55	6,01
hsa-miR-195	1311	6,09	6,58	6,03	6,43
hsa-miR-136	1203	3,69	3,77	3,52	3,65
hsa-miR-153	1225	1,71	2,08	0,51	0,58
hsa-miR-31	1227	8,97	9,49	9,6	9,32
hsa-miR-184	1242	-0,08	-0,51	3,1	0,58
hsa-miR-33	1274	2,01	3,66	3,58	3,75
hsa-miR-147	1278	4,65	2,95	3,47	3,17
hsa-miR-106b	1282	9,47	9,19	10,59	10,38
hsa-miR-212	1288	2,67	1,81	2,89	3,75
hsa-miR-15a	1312	9,92	10,12	10,79	11,06
hsa-miR-135b	1331	4,51	4,03	4,42	4,07
hsa-miR-92	1335	12,29	12,63	12,62	12,26
hsa-miR-342	1349	9,14	9,62	8,36	8,39
hsa-miR-205	1368	6,15	5,74	15,25	14,33
hsa-miR-150	1385	4,02	2,87	3,33	1,38
hsa-miR-149	1392	6,23	5,65	5,92	4,79
hsa-let-7b	1431	12,73	12,43	13,73	14,06
hsa-miR-370	1445	4,14	3,7	4,37	2,58
hsa-miR-206	1449	5,22	4,34	5,58	4,91
hsa-miR-128a	1350	7,54	7,9	8,06	8,01

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-197	1487	11,05	9,76	10,03	9,28
hsa-miR-182	1506	10,11	10,89	10,09	10,41
hsa-miR-553	1750	2,77	2,95	4,05	3,17
hsa-miR-606	1758	-0,58	-0,51	1,01	0,58
hsa-miR-518f	1762	1	-0,01	2,51	0,58
hsa-miR-519d	1766	2,17	3,28	0,51	3,04
hsa-miR-520g	1770	-0,58	1,9	3,51	2,49
hsa-miR-520e	1774	-0,58	1,79	0,51	3,75
hsa-miR-329	1778	2,67	2,08	3,32	2,91
hsa-miR-634	1782	6,69	2,64	3,32	1,08
hsa-miR-614	1786	1,21	-0,01	1,31	2,91
hsa-miR-596	1794	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-182*	1457	-0,08	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-223	1467	2,71	2,49	4,17	3,17
hsa-miR-512-5p	1843	-0,58	0,79	2,51	0,58
hsa-miR-643	1855	-0,08	-0,51	0,51	2,91
hsa-miR-591	1859	0,21	1,29	0,51	0,58
hsa-miR-485-5p	1863	4,27	2,49	2,6	0,58
hsa-miR-369-5p	1867	2	1,49	0,51	0,58
hsa-miR-575	1871	2,75	2,69	4,36	3,75
hsa-miR-626	1879	-0,58	0,29	0,51	0,58
hsa-miR-650	1883	-0,08	-0,51	3,68	0,58
hsa-miR-663	1891	5,41	5	6,17	5,76
hsa-miR-520f_hsa-miR-520c	1802	1,61	1,79	2,97	3,15
hsa-miR-382	1806	4,48	4,14	4,04	3,25
hsa-miR-656	1810	-0,58	0,29	2,83	0,58
hsa-miR-605	1814	1,08	-0,51	1,31	0,58
hsa-miR-655	1920	1,21	2,3	2,1	3,17
hsa-miR-545	1932	2,5	2,66	2,92	3,58
hsa-miR-502	1940	3,46	4,16	4,99	3,75
hsa-miR-200a*	1952	5,35	5,86	3,42	2,25
hsa-miR-640	1956	2,24	-0,51	2,51	0,58
hsa-miR-620	1960	-0,58	-0,51	0,51	1,08
hsa-miR-514	1972	2	2,95	1,01	1,38
hsa-miR-583	1980	-0,58	-0,51	0,51	0,58

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-548b	1988	1,92	-0,01	2,51	0,58
hsa-miR-609	1899	2,55	2,58	3,6	3,54
hsa-miR-563	1903	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-377	1929	1,74	-0,01	2,6	0,58
hsa-miR-376a	1933	-0,58	0,29	0,51	0,58
hsa-miR-433	1937	2,71	2,19	3,74	1,08
hsa-miR-500	1957	4,67	4,88	6,34	5,8
hsa-miR-652	1961	6,26	6,6	5,52	5,05
hsa-miR-384	1969	-0,58	2,3	0,51	0,58
hsa-miR-548d	1977	-0,58	2,3	0,51	0,58
hsa-miR-518c	1981	0,92	1,81	3,68	1,38
hsa-miR-561	1985	-0,58	2,49	0,51	1,38
hsa-miR-551a	2018	3,77	3,27	4,06	3,91
hsa-miR-554	2026	-0,08	0,29	1,01	1,08
hsa-miR-510	2030	2,59	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-525	2034	-0,58	2,06	3,1	0,58
hsa-miR-570	2054	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-617	2062	2	2,49	0,51	2,91
hsa-miR-556	2070	-0,58	1,81	1,31	1,08
hsa-miR-551b	2074	1,37	1,79	3,97	3,38
hsa-miR-424	1993	5,87	5,84	4,54	4,79
hsa-miR-612	1997	2,87	0,29	2,83	0,58
hsa-miR-130a	2005	8,07	8,66	9,08	9,2
hsa-miR-569	2110	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-302a*	2114	-0,58	1,95	0,51	0,58
hsa-miR-499	2122	-0,58	-0,01	1,01	0,58
hsa-miR-429	2134	5,68	5,39	3,89	4,83
hsa-miR-365	2138	8,7	8,73	7,51	7,31
hsa-miR-598	2150	-0,58	0,29	0,51	0,58
hsa-miR-29a	2154	13,45	13,83	12,21	12,27
hsa-miR-503	2162	5,44	6,25	1,31	4,39
hsa-miR-624	2166	-0,58	1,99	0,51	3,39
hsa-miR-409-5p	2089	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-550	2097	4,34	4,26	3,89	2,58
hsa-miR-627	2101	-0,58	1,49	0,51	0,58

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-33b	2105	-0,58	0,29	0,51	0,58
hsa-miR-581	2227	2,32	1,65	2,31	0,58
hsa-miR-493-3p	2231	2,17	0,29	0,51	0,58
hsa-miR-610	2239	457	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-516-3p	2259	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-422a	2263	8,33	8,48	9,59	9,25
hsa-miR-449	2267	2,91	2,48	1,31	0,58
hsa-miR-585	2271	3,58	3,74	4,51	4,12
hsa-miR-379	2275	2,22	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-92b	2182	7,86	8,04	7,75	7,13
hsa-miR-629	2316	6,12	5,93	6,82	7,03
hsa-miR-580	2320	-0,58	1,49	0,51	2,58
hsa-miR-448	2324	1,74	-0,51	2,83	0,58
hsa-miR-659	2328	-0,58	0,29	0,51	0,58
hsa-miR-592	2332	0,21	2,95	2,83	0,58
hsa-miR-587	2336	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-671	2839	4,15	3,98	4,21	0,58
hsa-miR-802	2851	1,42	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-767-3p	2863	1,42	2,3	2,51	0,58
hsa-miR-608	2279	13,74	1,29	2,47	0,58
hsa-miR-668	2287	1,21	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-210	2291	9,13	8,6	8,39	7,96
hsa-miR-26a	2299	12,6	12,61	12,27	12,73
hsa-miR-493-5p	2329	2	2,65	2,17	1,08
hsa-miR-202*	2337	2,55	2,08	3,32	1,88
hsa-miR-454-5p	2840	11,51	11,6	12,87	13,07
hsa-miR-770-5p	2844	2,24	-0,01	1,01	0,58
hsa-miR-767-5p	2848	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-769-3p	2865	3,8	3,74	3,01	2,88
hsa-miR-758	2869	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-765	2864	5,35	5,13	6,08	5,77
hsa-miR-301	1103	3,96	4,08	4,04	4,68
hsa-miR-191	1017	9,84	10,87	11,01	10,9
hsa-miR-93	1029	9,68	9,58	10,93	9,75
hsa-let-7f	1033	11,59	12,43	11,79	11,94

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-373	1037	3,54	2,4	4,51	3,08
hsa-miR-200b	1042	10,9	11,07	10,17	9,02
hsa-miR-100	1064	7,25	6,69	7,81	5,54
hsa-miR-324-3p	1082	5,67	4,71	5,64	3,99
hsa-miR-34b	1096	3,27	3,49	3,83	4,54
hsa-miR-324-5p	1115	3,84	2,29	4,16	4,49
hsa-miR-199a*	1124	1,82	2,24	1,01	4,17
hsa-miR-103	1164	11,27	10,65	11,3	9,18
hsa-miR-142-5p	1169	-0,58	-0,51	2,31	0,58
hsa-miR-220	1173	3,67	3,04	4,26	3,99
hsa-miR-151	1199	9,73	9,47	10,22	10,45
hsa-miR-186	1141	4,72	4,93	3,86	4,49
hsa-miR-128b	1153	6,29	6,26	6,7	6,1
hsa-miR-130b	1165	7,72	6,96	7,99	6,49
hsa-miR-338	1174	2,42	2,66	2,67	2,91
hsa-miR-199b	1178	1,98	-0,01	3,67	3,46
hsa-miR-125b	1182	9,34	8,81	9,86	8,11
hsa-miR-124a	1213	1,74	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-122a	1243	5,11	3,49	4,97	4,71
hsa-miR-30d	1251	11,72	11,93	11,32	11,69
hsa-miR-203	1260	1,42	2,9	9,1	9,56
hsa-let-7c	1268	11,91	12,72	13,09	12,47
hsa-miR-216	1294	2	2,45	2,71	3,38
hsa-miR-144	1300	0,71	0,49	1,01	2,91
hsa-miR-15b	1313	11,75	12,27	12,66	12,77
hsa-miR-192	1205	7,05	8,48	6	6,14
hsa-miR-133a	1215	3,27	3,07	3,82	4,11
hsa-miR-126	1380	6,42	6,42	5,94	7,51
hsa-miR-326	1393	3,32	0,29	0,51	3,17
hsa-miR-98	1423	6,58	7,21	6,9	7,33
hsa-let-7g	1432	10,8	11,21	10,01	10,06
hsa-miR-190	1437	3,16	3,57	4,02	4,29
hsa-miR-189	1442	2,59	2,79	2,92	3,38
hsa-miR-137	1339	2,66	3,06	4,36	3,88
hsa-miR-105	1345	2,37	2,48	4,32	3,17

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-96	1507	4,66	4,17	4,58	4,58
hsa-miR-518b	1759	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-519e	1767	-0,08	2,3	2,83	1,08
hsa-miR-520a	1771	1,42	1,99	3,1	0,58
hsa-miR-552	1779	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-451	1783	1	-0,51	3,32	2,58
hsa-miR-523	1787	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-518e	1795	-0,08	-0,51	2,83	0,58
hsa-miR-299-5p	1458	1,74	2,06	2,51	0,58
hsa-miR-95	1482	3,94	3,78	2,71	3,08
hsa-miR-520h	1824	1,74	1,08	0,51	0,58
hsa-miR-593	1832	4,92	1,08	4,1	2,91
hsa-miR-574	1840	11,34	9,36	11,12	9,45
hsa-miR-641	1856	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-504	1860	-0,58	1,81	0,51	0,58
hsa-miR-202	1864	2,59	1,9	2,97	3,67
hsa-miR-564	1884	0,42	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-604	1892	1,71	-0,51	2,83	0,58
hsa-miR-519b	1799	-0,08	3,49	3,97	3,83
hsa-miR-520d	1803	2,58	3,56	3,89	4,36
hsa-miR-602	1825	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-622	1829	1,42	2,66	0,51	1,38
hsa-miR-483	1845	8,06	3,91	7,36	4,34
hsa-miR-600	1853	0,21	-0,01	0,51	2,38
hsa-miR-631	1861	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-383	1865	2,17	1,95	0,51	1,88
hsa-miR-29b	1869	6,67	6,05	5,9	6,65
hsa-miR-613	1881	2,42	-0,01	1,31	0,58
hsa-miR-453	1904	3,93	3,59	4,76	4,17
hsa-miR-489	1908	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-23b	1930	13,2	13,81	12,99	13,61
hsa-miR-376b	1934	-0,58	-0,01	0,51	0,58
hsa-miR-501	1942	2,87	2,72	1,31	3,25
hsa-miR-517c	1946	3,01	3,02	-4,36:	4,39
hsa-miR-516-5p	1950	-0,08	-0,51	1,01	0,58

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-548c	1978	-0,58	-0,51	1,01	1,08
hsa-miR-625	1897	6,54	7,16	5,67	5,65
hsa-miR-630	1905	2,74	1,49	2,92	3,49
hsa-miR-644	1913	0,21	2,29	2,51	2,91
hsa-miR-488	2015	-0,58	0,29	0,51	0,58
hsa-miR-633	2023	1,42	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-527	2039	3,42	1,87	2,51	1,08
hsa-miR-589	2055	-0,08	-0,51	1,31	0,58
hsa-miR-508	2071	2,81	2,79	3,21	4,04
hsa-miR-566	2075	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-449b	2083	2,41	2,48	3,97	2,58
hsa-miR-603	1990	4,74	2,84	3,76	0,58
hsa-miR-607	2111	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-559	2115	-0,58	0,29	0,51	0,58
hsa-miR-506	2123	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-200c	2131	4,25	3,75	13,3	13,7
hsa-miR-29c	2155	2,75	3,24	3,6	4,2
hsa-miR-411	2167	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-381	2171	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-455	2179	2,87	2,52	2,6	0,58
hsa-miR-363*	2086	1,42	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-380-5p	2090	0,21	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-567	2094	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-378	2208	2,24	2,3	3,6	2,58
hsa-miR-638	2212	7,37	6,34	8,56	7,57
hsa-miR-542-5p	2216	1,42	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-518f*	2220	-0,58	-0,51	3,17	3,67
hsa-miR-549	2232	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-558	2240	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-let-7i	2244	12,8	13,03	10,86	10,79
hsa-miR-560	2256	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-636	2260	-0,58	-0,51	0,51	3,17
hsa-miR-422b	2264	9,17	8,72	10,51	10,23
hsa-miR-193b	2268	9,68	8,44	8,63	7,54
hsa-miR-491	2272	1,74	0,79	2,81	0,58

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-484	2191	8,32	7,81	8,29	7,72
hsa-miR-662	2199	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-623	2203	1,74	2,45	0,51	0,58
hsa-miR-486	2209	3,86	3,3	4,2	4,6
hsa-miR-639	2213	1,87	1,49	2,31	1,38
hsa-miR-517a_hsa-miR-517b	2217	2,11	2,56	3,87	3,28
hsa-miR-645	2221	3,12	1,29	0,51	2,58
hsa-miR-653	2229	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-146b	2237	5,56	5,29	4,21	5,59
hsa-miR-571	2249	3,33	2,99	4,1	2,91
hsa-miR-191*	2257	2,42	2,95	1,31	0,58
hsa-miR-7	2261	2,44	3,02	2,51	3,54
hsa-miR-647	2269	4,95	4,27	5,5	6,01
hsa-miR-637	2273	4,65	2,84	4,9	4,17
hsa-miR-30b	2280	9,94	9,87	9,86	9,66
hsa-miR-431	2288	1,74	-0,01	0,51	2,58
hsa-miR-452	2292	4,68	5,15	5,14	5,85
hsa-miR-361	2296	10,36	11,32	10,53	10,83
hsa-miR-576	2314	1,87	-0,51	2,83	0,58
hsa-miR-432	2326	3,74	3,47	3,51	2,58
hsa-miR-375	2342	3,42	2,15	0,51	3,75
hsa-miR-766	2841	9,66	6,37	8,18	7,59
hsa-miR-768-3p	2845	9,89	9,61	9,2	9,48
hsa-miR-769-5p	2861	4,03	4,07	4,47	3,46
hsa-miR-542-3p	2289	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-513	2301	3,8	2,56	3,97	4,38
hsa-miR-362	2017	2,93	4,53	4:88;	4,38
hsa-miR-325	2025	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-520a*	2033	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-517*	2037	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-565	2045	7,04	4,89	5,13	6,45
hsa-miR-526b	2049	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-30e-3p	2053	8,97	9,4	7,84	7,61
hsa-miR-601	2088	2,87	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-519a	2104	-0,58	1,49	0,51	1,08

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-632	2108	-0,08	2,3	0,51	0,58
hsa-miR-320	1005	12,75	13,28	13,11	13,09
hsa-miR-132	1014	4,94	6,57	6,22	7,04
hsa-miR-193a	1018	4,56	4,32	3,66	4,58
hsa-miR-22	1022	8,71	8,95	8,69	8,79
hsa-miR-224	1026	6,69	7,1	6,4	6,96
hsa-let-7a	1030	13,37	14,07	14,63	14,91
hsa-miR-302d	1034	2,32	2,74	3,76	3,28
hsa-miR-369-3p	1038	2,72	2,38	4,68	3,83
hsa-miR-154*	1047	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-368	1059	1,42	0,49	0,51	0,58
hsa-miR-373*	1078	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-34c	1095	1,42	1,49	0,51	2,99
hsa-miR-154	1101	1,61	-0,51	1,31	2,75
hsa-miR-106a	1006	12,01	12,48	12,09	12,36
hsa-miR-l81c	1015	5,67	6,09	4,64	4,27
hsa-miR-17-5p	1031	11,57	11,85	11,34	11,83
hsa-miR-302b	1035	-0,08	2,66	3,26	4,04
hsa-miR-l9b	1039	10,14	10,07	11,3	11,47
hsa-miR-24	1044	12,91	13,2	13,13	13,4
hsa-miR-367	1052	2,17	-0,01	1,01	0,58
hsa-miR-17-3p	1079	4,95	5,02	4,83	5,34
hsa-miR-221	1088	13,67	13,73	12,88	12,76
hsa-miR-335	1146	-0,58	-0,51	6,66	7,68
hsa-miR-323	1154	-0,58	1,81	0,51	0,58
hsa-miR-199a	1167	2,31	-0,51	0,51	3,17
hsa-miR-126*	1171	3,12	1,95	3,68	3,15
hsa-miR-337	1175	2,22	-0,51	3,97	2,91
hsa-miR-l81a*	1179	5,67	5,34	5,91	5,76
hsa-miR-331	1183	6,46	5,25	5,55	4,95
hsa-miR-340	1187	2,96	2,99	3,86	4,17
hsa-miR-208	1108	1,42	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-188	1116	3,94	3,31:	3,86	4,39
hsa-miR-9	1231	2,96	3,25	4	4,53
hsa-miR-34a	1235	6,95	6,56	7,17	7,33

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-30c	1252	13,78	13,97	12,46	12,24
hsa-miR-19a	1271	5,93	5,76	8,01	8,36
hsa-miR-371	1276	3,67	2,19	3,36	3,38
hsa-miR-10b	1301	6,91	7,36	7,73	8,03
hsa-miR-21	1315	13,13	13,2	12,28	12,88
hsa-miR-217	1206	2,53	2,49	0,51	3,57
hsa-miR-302b*	1210	1,87	2,49	2,51	2,99
hsa-miR-135a	1216	2,41	3,62	3,47	3,89
hsa-miR-148a	1361	3	1,45	6,87	7,35
hsa-miR-339	1366	4,85	4,26	5,12	5,2
hsa-miR-187	1381	3,69	2,4	4,21	3,75
hsa-miR-346	1390	5,77	3,2	4,09	4,87
hsa-miR-146a	1409	9,7	9,88	7,17	7,56
hsa-miR-143	1415	-0,58	-0,51	2,51	3,75
hsa-miR-219	1426	2	1,81	3,32	4,04
hsa-miR-185	1451	8,4	8,73	9,33	9,46
hsa-miR-328	1455	7,15	4,5	4,92	4,33
hsa-miR-196b	1321	4,65	4,44	5,08	5,68
hsa-miR-204	1489	0,71	2,49	0,51	1,38
hsa-miR-133b	1498	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-129	1512	6,33	6,08	7,2	8,02
hsa-miR-649	1756	3,32	2,93	3,17	2,17
hsa-miR-518a	1760	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-562	1764	-0,58	-0,51	0,51	1,08
hsa-miR-526b*	1772	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-522	1776	2,87	3,4	5,74	5,87
hsa-miR-490	1784	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-618	1788	2,22	1,65	0,51	1,08
hsa-miR-525*	1796	-0,58	1,49	1,31	0,58
hsa-miR-30a-5p	1460	12,45	12,55	11,09	11,04
hsa-miR-302c*	1474	0,42	-0,01	0,51	0,58
hsa-miR-27a	1485	11,64	11,67	11,97	12,27
hsa-miR-30a-3p	1505	12,22	12,57	10	10,48
hsa-miR-494	1753	4,47	3,87	6,12	5,48
hsa-miR-518d	1761	-0,58	2,08	0,51	0,58

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-519c	1765	-0,08	0,29	0,51	3,75
hsa-miR-20b	1769	10,41	10,8	10,92	11,2
hsa-miR-520b	1773	-0,08	1,49	1,01	2,58
hsa-miR-495	1777	-0,58	-0,51	0,51	2,91
hsa-miR-521	1785	3,42	0,49	3,31	3,75
hsa-miR-646	1793	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-648	1804	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-410	1808	1,42	-0,51	0,51	1,08
hsa-miR-487a	1812	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-409-3p	1820	-0,58	-0,51	1,01	0,58
hsa-miR-363	1822	-0,58	-0,51	3,32	1,08
hsa-miR-181b	1830	1,531	11,96	10,84	11,02
hsa-miR-616	1842	2,22	-0,51	0,51	2,49
hsa-miR-18a*	1850	4,52	2,99	4,97	3,83
hsa-miR-635	1854	-0,58	-0,51	1,31	0,58
hsa-miR-423	1874	8,9	8,85	9,09	8,46
hsa-miR-611	1882	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-524	1797	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-595	1805	9,11	6,55	8,47	6,49
hsa-miR-487b	1817	4,65	4,3	5,22	5,53
hsa-miR-425-3p	1943	4,14	4,02	3,39	3,96
hsa-miR-594	1951	10,94	10,48	11,55	11,22
hsa-miR-532	1959	5,87	5,79	6,62	6,14
hsa-miR-568	1963	-0,58	-0,51	0,51	1,38
hsa-miR-496	1967	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-544	1971	1,08	2,49	1,01	2,91
hsa-miR-509	1975	-0,08	-0,51	0,51	3,75
hsa-miR-548a	1979	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-658	1894	-0,58	-0,51	1,01	0,58
hsa-miR-555	1898	1,42	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-657	1902	-0,58	-0,51	0,51	1,38
hsa-miR-512-3p	1910	2,56	2,74	4,41	3,83
hsa-miR-524*	2024	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-515-5p	2032	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-526a	2036	-0,58	-0,51	5,78	5,87

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-619	2044	2,01	1,49	1,01	4,08
hsa-miR-578	2048	3,54	2,79	3,17	2,38
hsa-miR-573	2056	-0,58	2,08	0,51	0,58
hsa-miR-492	2060	-0,08	1,49	2,71	2,67
hsa-miR-590	2064	3,27	3,4	5,51	5,08
hsa-miR-515-3p	2068	1,74	2,88	3,51	1,08
hsa-miR-621	2076	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-539	2080	2,74	1,81	2,51	4,28
hsa-miR-497	1995	3,05	3,11	3,26	0,58
hsa-miR-152	2007	7,72	8,44	6,59	7,2
hsa-miR-181d	2011	8,56	8,9	7,83	7,49
hsa-miR-660	2144	5,3	5,36	6,62	6,8
hsa-miR-526c	2152	-0,58	-0,51	2,42	0,58
hsa-miR-584	2176	10,1	10,43	7,6	7,99
hsa-miR-299-3p	2180	1,42	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-376a*	2087	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-597	2107	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-511	2109	2,59	-0,01	2,83	2,91
hsa-miR-599	2113	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-141	2117	-0,58	-0,51	7,91	8,21
hsa-miR-18b	2125	5,18	5,41	6,65	6,98
hsa-miR-582	2141	-0,58	-0,51	4,9	4,87
hsa-miR-577	2153	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-586	2173	2,11	1,49	2,47	1,08
hsa-miR-380-3p	2177	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-505	2184	5,06	5,45	4,16	4,58
hsa-miR-485-3p	2196	3,74	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-642	2200	4,22	1,15	2,42	0,58
hsa-miR-615	2204	3,94	-0,01	0,51	0,58
hsa-miR-572	2206	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-520d*	2218	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-628	2222	3,59	2,19	2,17	3,83
hsa-miR-518c*	2226	0,21	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-425-5p	2234	8,86	9,29	9,01	8,92
hsa-miR-432*	2266	-0,58	-0,51	0,51	0,58

ES 2 420 973 T3

hsa-miR-661	2274	2,42	1,81	0,51	0,58
hsa-miR-421	2185	4,06	5,49	6,41	6,43
hsa-miR-452*	2193	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-27b	2303	10,82	11,2	11,39	11,55
hsa-miR-412	2307	2,59	-0,01	0,51	2,58
hsa-miR-579	2311	-0,58	-0,01	0,51	0,58
hsa-miR-519e*	2315	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-588	2327	1,42	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-651	2335	1,71	1,69	3,39	2,91
hsa-miR-557	2339	3,37	2,49	3,51	0,58
hsa-miR-507	2343	-0,58	0,29	0,51	3,39
hsa-miR-801	2846	5,97	3,08	4,59	1,88
hsa-miR-768-5p	2854	8,68	8,01	8,5	8,38
hsa-miR-454-3p	2858	3	3:37	4,32	3,78
hsa-miR-654	2278	2,22	-0,51	1,31	0,58
hsa-miR-498	2298	2,87	-0,51	0,51	2,67
hsa-miR-148b	1362	6,83	6,76	6,82	6,69
hsa-miR-211	1367	3,56	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-127	1377	1,8	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-139	1384	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-194	1416	8,57	8,28	4,64	5,81
hsa-let-7e	1421	7,42	9,18	8,74	9,52
hsa-miR-345	1444	4,63	4,62	3,68	3,17
hsa-miR-1	1448	-0,58	0,29	0,51	0,58
hsa-miR-30e-5p	1461	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-134	1470	-0,58	-0,51	0,51	0,58
hsa-miR-155	1476	8,21	9,31	4,32	6,17
hsa-miR-374	1480	1,42	1,79	0,51	1,38
hsa-miR-26b	1484	9,52	10	9i72	10,43

* Se restó el fondo de los datos sin procesar, se transformaron por Log2 y se normalizaron

La intensidad para cada sonda oligo se basa en promediar los puntos duplicados

Se muestran los datos para las 467 sondas oligo humanas

El umbral normalizado se calcula basándose en el $\log_2(5 \times \text{devt de fondo sin puntos} + \text{señal de sonda de control negativo media trim})$

El umbral normalizado se calcula basándose en el percentil 95 de la señal de sonda de control negativo

Un total de 236 Sondas Humanas están por Encima del Umbral en al menos 1 muestra.

Un total de 158 Sondas Humanas están por Encima de TPT95 en al menos 1 muestra.

5

10 Los presentes ejemplos demuestran la aplicación exitosa de un ensayo de diagnóstico para cáncer y resultados de embarazo adversos que tiene una especificidad, sensibilidad y valor predictivo positivo mejorado en gran medida

sobre los diagnósticos disponibles en la actualidad y también proporciona información adicional sobre el estadio, grado y respuesta terapéutica que no está disponible en ningún otro formato de ensayo.

Referencias

- 5 Andre F, Scharzt NE, Movassagh M, y col. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 2002; 360: 295-305.
- Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, y col. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 114-21.
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
- 10 Berek JS, Schultes BC, Nicodemus CF. Biologic and immunologic therapies for ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21 (s10): 168-74.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res* 2006a; 66: 7390-94.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Rev Cancer* 2006b; 6: 857-66.
- 15 Choi DS, Lee JM, Park GW, y col. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *J Proteome Res* 2007; 6: 4646-55.
- De Cecco L, Marchionni L, Gariboldi M, Reid JF, Lagonigro MS, Caramuta S, y col. Gene expression profiling of advanced ovarian cancer: Characterization of a molecular signature involving fibroblast growth factor 2. *Oncogene* 2004; 23: 8171-83.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 259-69.
- 20 Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activation platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha granules. *Blood* 1999; 94: 3791-9.
- Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, y col. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 8699-707.
- 25 J.M. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 20121-7.
- Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, Kubo M, y col. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res* 2005; 25: 3703-7.
- 30 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, y col. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-8.
- Mears R, Craven RA, Hanrahan S, y col. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004; 4: 4019-31.
- 35 Menon U, Jacobs IJ. Recent developments in ovarian cancer screening. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; 12: 39-42.
- Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation, and death. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 5: 563-8.
- Olver C, Vidal M, Proteomic analysis of secreted exosomes. *Subcell Biochem*. 2007; 43: 99-131.
- 40 Paul E, Blower PE, Chung JH, Verducci JS, Lin S, Park JK, Dai Z, Liu CG, Schmittgen TD, Reinhold WC, Croce CM, Weinstein JN, Sadee W. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells. *Mol Cancer Therap* 2008; 7: 1-9.
- Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 1997; 8: 2631-45.
- 45 Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, y col. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20: 847-56.
- Sabapatha A, Gercel-Taylor C, Taylor DD. Specific isolation of placental-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J. Reprod Immunol* 2006, 56: 345-55.
- 50 Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Pract Res Clin Obstet & Gynaecol* 2006; 20: 207-25.
- Taylor DD, Doellgast GJ. Quantitation of horoxidise-antibody binding to membrane fragments using column chromatography. *Anal Biochem* 1979; 98: 53-9.
- Taylor DD, Homesley HD, Doellgast GJ. Binding of specific peroxidise-labeled antibody to placental-type alkaline phosphatase on tumor-derived membrane fragments. *Cancer Res* 1980; 40: 4964-69.
- 55 Taylor DD, Black PH. Shedding of plasma membrane fragments: Neoplastic and developmental importance. In: *Developmental Biology*, (M. Steinberg, ed.) vol. 3, 1986: 33-57.
- Taylor DD, Gercel-Taylor C. Tumour-derived exosomes as mediates of T-cell signaling defects. *Brit J Cancer* 2005; 92: 305-11.
- 60 Taylor, D.D., Bohler, H.C., Gercel-Taylor, C. Pregnancy-linked suppression of TcR signaling pathways by a circulating factor absent in recurrent spontaneous pregnancy loss. *Molecular Immunology* 2006, 43: 1872-80.
- Valadi, H, Ekstrom K, Bossius A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNA and micro-RNA is a novel mechanism of genetic exchange. *Nature Cell. Biol.* 2007; 9: 652-9.
- Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, Villa A y col. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T

lymphocytes. *Cancer Res* 2006; 66: 9290-8.

Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, O'Donnell JD, Wang J, Wenham WM, Coppola D, Kruk PA, Nicosia SV, Cheng JQ. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res* 2008; 68: 425-33.

5 Zhang L, Huang J, Yang N, y col. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 9136-41.

Cláusulas

1. Un procedimiento para diagnosticar un cáncer de un sujeto, que comprende:
 - 10 (a) proporcionar una muestra biológica de un sujeto;
 - (b) aislar exosomas derivados de cáncer que comprenden microARN (miARN) de la muestra biológica;
 - (c) determinar una cantidad de uno o más de los miARN; y
 - (d) comparar la cantidad del o los miARN con uno o más niveles de control de miARN, en el que se diagnostica que el sujeto tiene cáncer si hay una diferencia medible en la cantidad del o los miARN de los exosomas derivados de cáncer en comparación con el o los niveles de control de miARN.
- 15 2. El procedimiento de la cláusula 1, en el que el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer ovárico, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma y cáncer pancreático.
3. El procedimiento de la cláusula 1, en el que el sujeto es humano.
4. El procedimiento de la cláusula 1, en el que la muestra biológica comprende leche, sangre, suero, plasma, líquido ascítico, líquido quístico, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, orina, saliva, esputo o combinaciones de los mismos.
- 20 5. El procedimiento de la cláusula 1, en el que aislar los exosomas derivados de cáncer comprende usar cromatografía de exclusión por tamaño para aislar los exosomas derivados de cáncer.
6. El procedimiento de la cláusula 5, en el que aislar los exosomas derivados de cáncer comprende además centrifugar una fracción de cromatografía que comprende los exosomas derivados de cáncer.
- 25 7. El procedimiento de la cláusula 6, en el que la fracción de cromatografía es una fracción de volumen hueco.
8. El procedimiento de la cláusula 5, en el que los exosomas derivados de cáncer se separan de exosomas no derivados de cáncer por captura inmunoabsorbente usando un anticuerpo antiantígeno de cáncer.
9. El procedimiento de la cláusula 8, en el que el anticuerpo antiantígeno de cáncer es un anticuerpo antimolécula de adhesión celular epitelial (anti-EpCAM).
- 30 10. El procedimiento de la cláusula 1, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende marcar el o los miARN.
11. El procedimiento de la cláusula 1, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende capturar el o los miARN con una o más sondas polinucleotídicas que se unen cada una selectivamente al o los miARN.
- 35 12. El procedimiento de la cláusula 1, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende usar una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para cuantificar la cantidad del o los miARN.
13. El procedimiento de la cláusula 1, en el que el o los miARN son uno o más miARN expuestos en la Tabla 2.
14. El procedimiento de la cláusula 1, en el que el o los miARN se seleccionan del grupo que consiste en miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205 y miR-214.
- 40 15. El procedimiento de la cláusula 1, que comprende además seleccionar un tratamiento o modificar un tratamiento para el cáncer basándose en la cantidad del o los miARN determinados.
16. Un procedimiento para evaluar la eficacia de tratamiento y/o progresión de un cáncer en un sujeto, que comprende:
 - 45 (a) proporcionar una serie de muestras biológicas durante un periodo de tiempo de un sujeto;
 - (b) aislar exosomas derivados de cáncer que comprenden microARN (miARN) de la serie de muestras biológicas;
 - (c) determinar una cantidad de uno o más de los miARN en cada una de las muestras biológicas de la serie; y
 - (d) determinar cualquier cambio medible en las cantidades del o los miARN en cada una de las muestras biológicas de la serie para evaluar de este modo la eficacia del tratamiento y/o progresión del cáncer en el
 - 50 sujeto.
17. El procedimiento de la cláusula 16, en el que el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer ovárico, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma y cáncer pancreático.
18. El procedimiento de la cláusula 16, en el que el sujeto es humano.
- 55 19. El procedimiento de la cláusula 16, en el que la serie de muestras biológicas comprende una primera muestra biológica recogida antes del inicio del tratamiento para el cáncer y/o aparición del cáncer y una segunda muestra biológica recogida después del inicio del tratamiento o aparición.
20. El procedimiento de la cláusula 16, en el que la muestra biológica comprende leche, sangre, suero, plasma, líquido ascítico, líquido quístico, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, orina, saliva, esputo o combinaciones de los mismos.
- 60 21. El procedimiento de la cláusula 16, en el que aislar los exosomas derivados de cáncer comprende usar

- cromatografía de exclusión por tamaño para aislar los exosomas derivados de cáncer.
22. El procedimiento de la cláusula 21, en el que aislar los exosomas derivados de cáncer comprende además centrifugar una fracción de cromatografía que comprende los exosomas derivados de cáncer.
23. El procedimiento de la cláusula 22, en el que la fracción de cromatografía es una fracción de volumen hueco.
- 5 24. El procedimiento de la cláusula 21, en el que los exosomas derivados de cáncer se separan de exosomas no derivados de cáncer por captura inmunoabsorbente usando un anticuerpo antiantígeno de cáncer.
25. El procedimiento de la cláusula 24, en el que el anticuerpo antiantígeno de cáncer es un anticuerpo antimolécula de adhesión de células epiteliales (anti-EpCAM).
- 10 26. El procedimiento de la cláusula 16, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende marcar el o los miARN.
27. El procedimiento de la cláusula 16, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende capturar el o los miARN con una o más sondas polinucleotídicas que se unen selectivamente cada una al o los miARN.
28. El procedimiento de la cláusula 16, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende usar una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para cuantificar la cantidad del o los miARN.
- 15 29. El procedimiento de la cláusula 16, en el que el o los miARN son uno o más miARN expuestos en la Tabla 2.
30. El procedimiento de la cláusula 16, en el que el o los miARN se seleccionan del grupo que consiste en miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205 y miR-214.
31. Un procedimiento para caracterizar un cáncer en un sujeto, que comprende:
- 20 (a) proporcionar una muestra biológica de un sujeto;
- (b) aislar exosomas derivados de cáncer que comprenden microARN (miARN) de la muestra biológica;
- (c) determinar una cantidad de uno o más de los miARN; y
- (d) comparar la cantidad del o los miARN con uno o más niveles de control de miARN, en el que el cáncer se caracteriza basándose en una diferencia medible de la cantidad del o los miARN de los exosomas derivados de cáncer en comparación con el o los niveles de control de miARN.
- 25 32. El procedimiento de la cláusula 31, en el que caracterizar el cáncer comprende determinar un tipo, un grado y/o un estadio del cáncer.
33. El procedimiento de la cláusula 32, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende determinar una cantidad total del miARN en los exosomas derivados de cáncer.
- 30 34. El procedimiento de la cláusula 31, en el que el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer ovárico, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma y cáncer pancreático.
- 35 35. El procedimiento de la cláusula 31, en el que el sujeto es humano.
36. El procedimiento de la cláusula 31, en el que la muestra biológica comprende leche, sangre, suero, plasma, líquido ascítico, líquido quístico, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, orina, saliva, esputo o combinaciones de los mismos.
37. El procedimiento de la cláusula 31, en el que aislar los exosomas derivados de cáncer comprende usar cromatografía de exclusión por tamaño para aislar los exosomas derivados de cáncer.
38. El procedimiento de la cláusula 37, en el que aislar los exosomas derivados de cáncer comprende además centrifugar una fracción de cromatografía que comprende los exosomas derivados de cáncer.
- 40 39. El procedimiento de la cláusula 38, en el que la fracción de cromatografía es una fracción de volumen hueco.
40. El procedimiento de la cláusula 31, en el que los exosomas derivados de cáncer se separan de exosomas no derivados de cáncer por captura inmunoabsorbente usando un anticuerpo antiantígeno de cáncer.
41. El procedimiento de la cláusula 40, en el que el anticuerpo antiantígeno de cáncer es un anticuerpo antimolécula de adhesión de células epiteliales (anti-EpCAM).
- 45 42. El procedimiento de la cláusula 31, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende marcar el o los miARN.
43. El procedimiento de la cláusula 31, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende capturar el o los miARN con una o más sondas polinucleotídicas que se unen selectivamente cada una al o los miARN.
44. El procedimiento de la cláusula 31, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende usar una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para cuantificar la cantidad del o los miARN.
- 50 45. El procedimiento de la cláusula 31, en el que el o los miARN son uno o más miARN expuestos en la Tabla 2.
46. El procedimiento de la cláusula 31, en el que el o los miARN se seleccionan del grupo que consiste en miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205 y miR-214.
47. El procedimiento de la cláusula 31, que comprende además seleccionar un tratamiento o modificar un tratamiento para el cáncer basándose en la cantidad del o los miARN determinados.
- 55 48. Un procedimiento para diagnosticar resultados de embarazo adversos en un sujeto, que comprende:
- (a) proporcionar una muestra biológica de un sujeto;
- (b) aislar exosomas que comprenden microARN (miARN) de la muestra biológica;
- (c) determinar una cantidad del o los miARN; y
- 60 (d) comparar la cantidad del o los miARN con uno o más niveles de control de miARN, en el que se diagnostica al sujeto resultado de embarazo adverso si hay una diferencia medible en la cantidad del o los miARN de los exosomas en comparación con el o los niveles de control de miARN.
49. El procedimiento de la cláusula 48, en el que el resultado de embarazo adverso es un trastorno seleccionado del

grupo que consiste en ruptura prematura de membranas, preeclampsia, nacimiento prematuro, restricción de crecimiento intrauterino y pérdida de embarazo recurrente.

50. El procedimiento de la cláusula 48, en el que el sujeto es humano.

51. El procedimiento de la cláusula 48, en el que la muestra biológica comprende leche, sangre, suero, plasma, líquido ascítico, líquido quístico, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, orina, saliva, esputo o combinaciones de los mismos.

52. El procedimiento de la cláusula 48, en el que aislar los exosomas comprende usar cromatografía de exclusión por tamaño para aislar los exosomas.

53. El procedimiento de la cláusula 52, en el que aislar los exosomas comprende además centrifugar una fracción de cromatografía que comprende los exosomas.

54. El procedimiento de la cláusula 53, en el que la fracción de cromatografía es una fracción de volumen hueco.

55. El procedimiento de la cláusula 48, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende marcar el o los miARN.

56. El procedimiento de la cláusula 48, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende capturar el o los miARN con una o más sondas polinucleotídicas que se unen selectivamente cada una al o los miARN.

57. El procedimiento de la cláusula 48, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende usar una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para cuantificar la cantidad del o los miARN.

58. El procedimiento de la cláusula 48, que comprende además seleccionar un tratamiento o modificar un tratamiento para el resultado de embarazo adverso basándose en la cantidad del o los miARN determinados.

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar, caracterizar o evaluar la eficacia de tratamiento y/o progresión de un cáncer en un sujeto, que comprende:
- 5 a. aislar exosomas que comprenden microARN (miARN) de una muestra biológica o cada una de una serie de muestras biológicas obtenidas del sujeto;
- b. determinar una cantidad de uno o más de los miARN en los exosomas aislados; y
- c. comparar la cantidad del o los miARN con uno o más niveles de control de miARN, en el que una diferencia en la cantidad del o los miARN de los exosomas en comparación con el o los niveles de control de miARN se usa para determinar el diagnóstico, la caracterización o la evaluación.
- 10 2. Un procedimiento para diagnosticar, predecir o evaluar el riesgo de un resultado de embarazo adverso en un sujeto, que comprende:
- a. aislar exosomas que comprenden microARN (miARN) de una muestra biológica o cada una de una serie de muestras biológicas obtenidas del sujeto;
- 15 b. determinar una cantidad de uno o más de los miARN en los exosomas aislados; y
- c. comparar la cantidad del o los miARN con uno o más niveles de control de miARN, en el que una diferencia en la cantidad del o los miARN de los exosomas en comparación con el o los niveles de control de miARN se usa para determinar el diagnóstico, la caracterización o la evaluación.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer ovárico, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma y cáncer pancreático.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el sujeto es humano.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra biológica o cada una de la serie de muestras biológicas comprende leche, sangre, suero, plasma, líquido ascítico, líquido quístico, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, orina, saliva, esputo o combinaciones de los mismos.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que aislar los exosomas comprende usar cromatografía de exclusión por tamaño para aislar los exosomas, comprendiendo además opcionalmente centrifugar una fracción de cromatografía que comprende los exosomas, en el que la fracción de cromatografía comprende opcionalmente una fracción de volumen hueco.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 6 cuando depende de la reivindicación 1, en el que los exosomas son exosomas derivados de cáncer y los exosomas derivados de cáncer se separan de exosomas no derivados de cáncer por captura inmunoabsorbente usando un anticuerpo anti-antígeno de cáncer, opcionalmente en el que el anticuerpo anti-antígeno de cáncer es un anticuerpo anti-molécula de adhesión de células epiteliales (anti-EpCAM).
- 35 8. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que determinar la cantidad del o los miARN comprende marcar el o los miARN, capturar el o los miARN con una o más sondas polinucleotídicas que se unen selectivamente cada una al o los miARN, usar una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para cuantificar la cantidad del o los miARN, o determinar una cantidad total del miARN en los exosomas.
- 40 9. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el procedimiento se usa para diagnosticar, caracterizar o evaluar la eficacia del tratamiento y/o la progresión de un cáncer y el o los miARN se exponen en la Tabla 1 o la Tabla 2, o se seleccionan del grupo que consiste en miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205 y miR-214; o en el que el procedimiento se usa para diagnosticar, caracterizar, evaluar el riesgo de, o evaluar la eficacia de tratamiento y/o la progresión de un resultado de embarazo adverso y el o los miARN se exponen en la Tabla 3.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que comprende además seleccionar un tratamiento, modificar un tratamiento, evaluar la eficacia del tratamiento o evaluar la progresión para el cáncer o el resultado de embarazo adverso basándose en la cantidad del o los miARN determinados.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la serie de muestras biológicas comprende una primera muestra biológica recogida antes del inicio del tratamiento para el cáncer y/o de la aparición del cáncer y una segunda muestra biológica recogida después del inicio del tratamiento o de la aparición.
- 50 12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que caracterizar el cáncer comprende determinar un tipo, un grado y/o un estadio del cáncer.
13. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el resultado de embarazo adverso es un trastorno seleccionado del grupo que consiste en ruptura prematura de membranas, preeclampsia, nacimiento prematuro, restricción del crecimiento intrauterino y pérdida de embarazo recurrente.

14. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el control se selecciona del grupo que consiste en
- a. el nivel de al menos un producto génico de miARN de un sujeto que no tiene el trastorno, y
 - b. el nivel del al menos un producto génico de miARN de una muestra del sujeto que no presenta tal trastorno.
- 5 15. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que comprende además identificar una correlación entre la expresión de miARN y el cáncer o el resultado de embarazo adverso, que comprende:
- a. marcar el miR aislado de una muestra de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene el cáncer o el resultado de embarazo adverso;
 - b. hibridar el miARN con una matriz de miARN;
 - c. determinar la hibridación de miARN con la matriz; y
 - 10 d. identificar miARN diferencialmente expresado en una muestra representativa del cáncer o del resultado de embarazo adverso en comparación con una referencia, en el que identificar miARN expresado diferencialmente comprende opcionalmente generar un perfil de miARN para la muestra y evaluar el perfil de miARN para determinar si miARN en la muestra se expresa diferencialmente en comparación con una muestra normal.

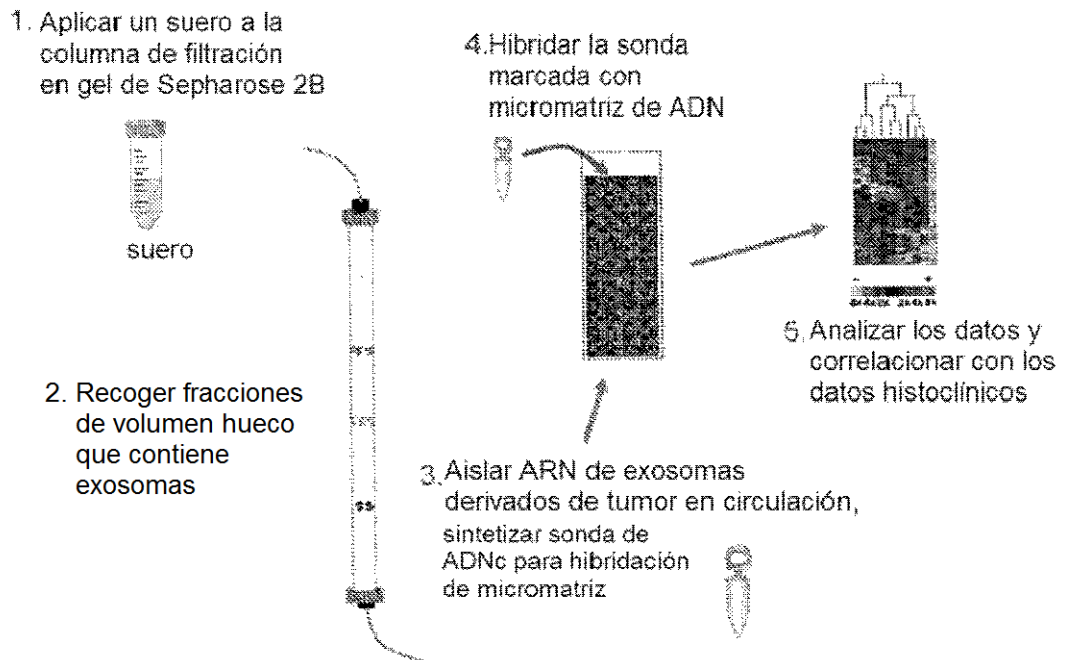


FIGURA 1

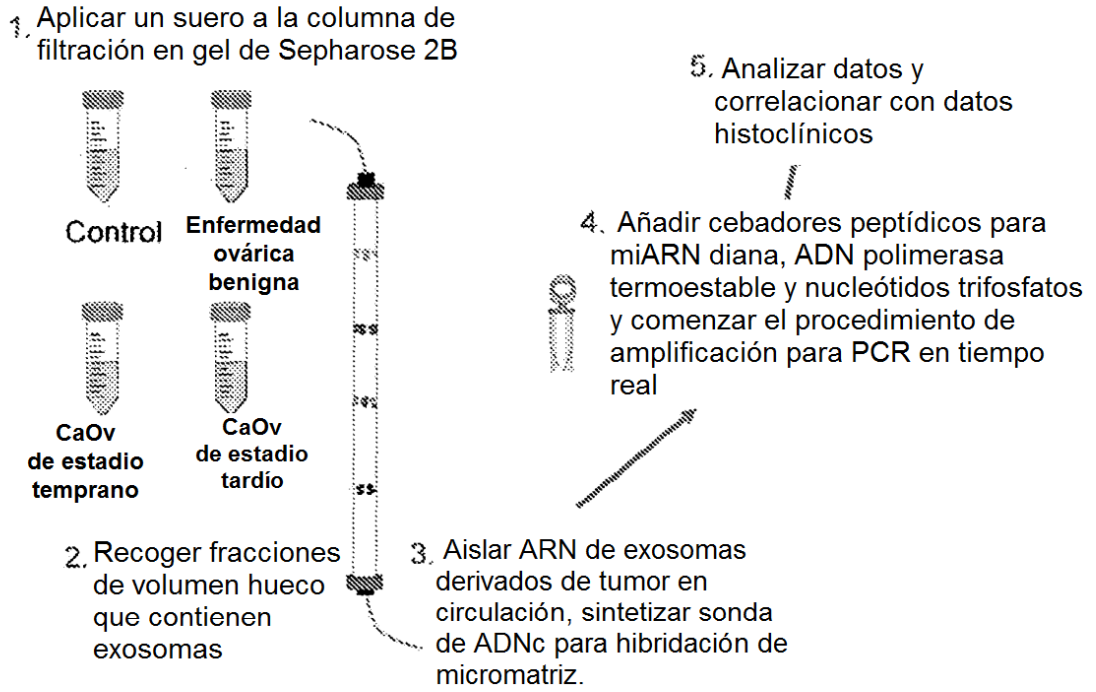


FIGURA 2

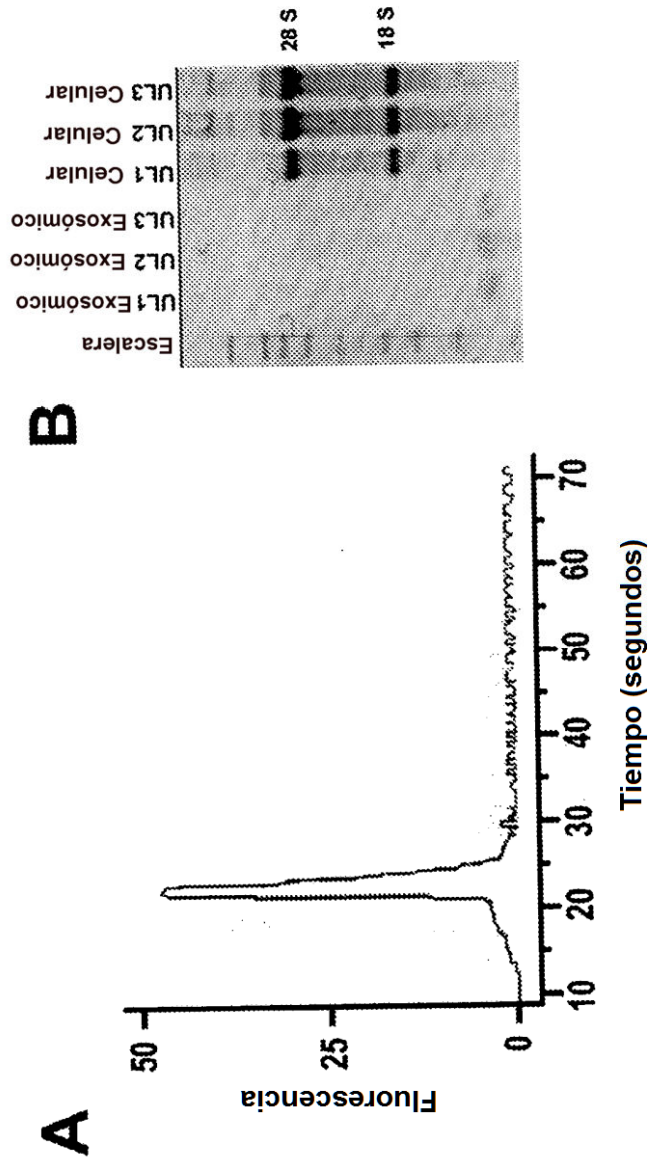


FIGURA 4

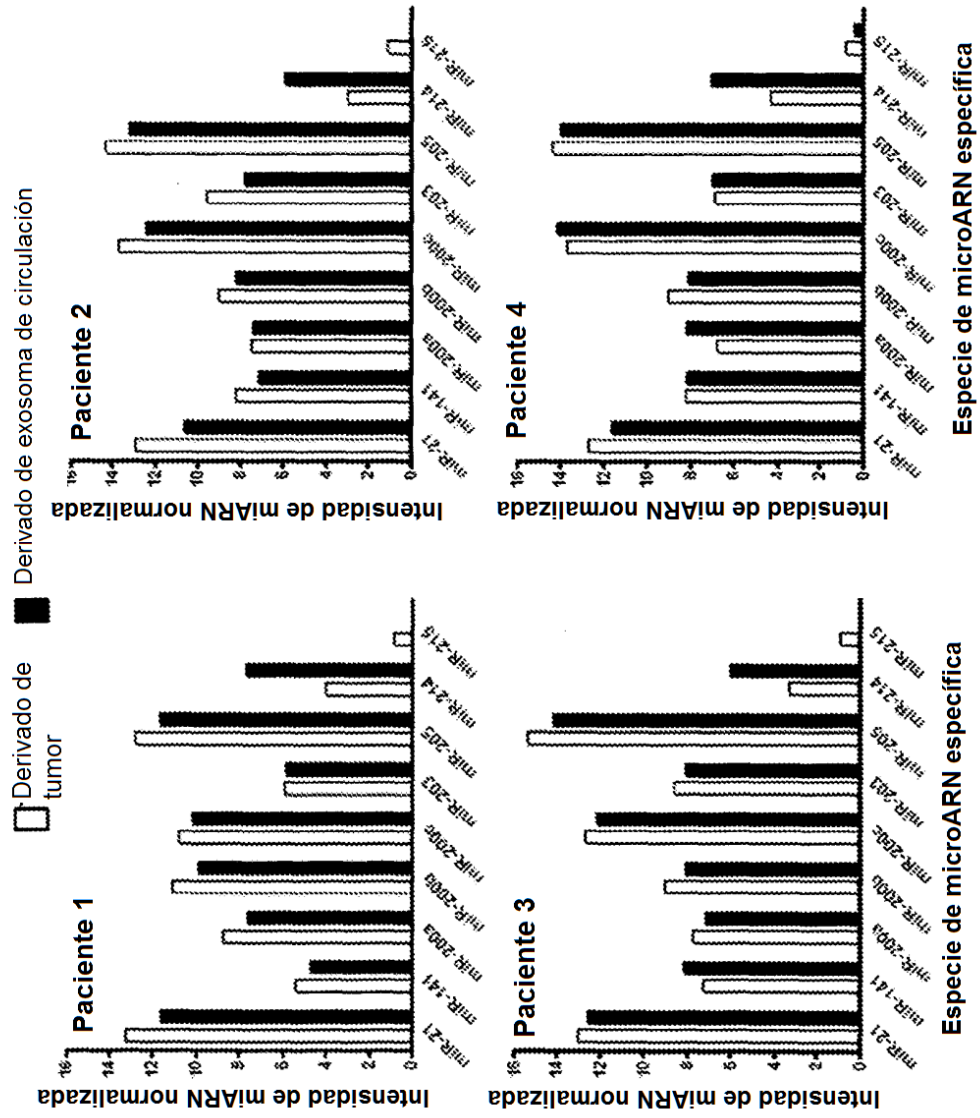


FIGURA 5

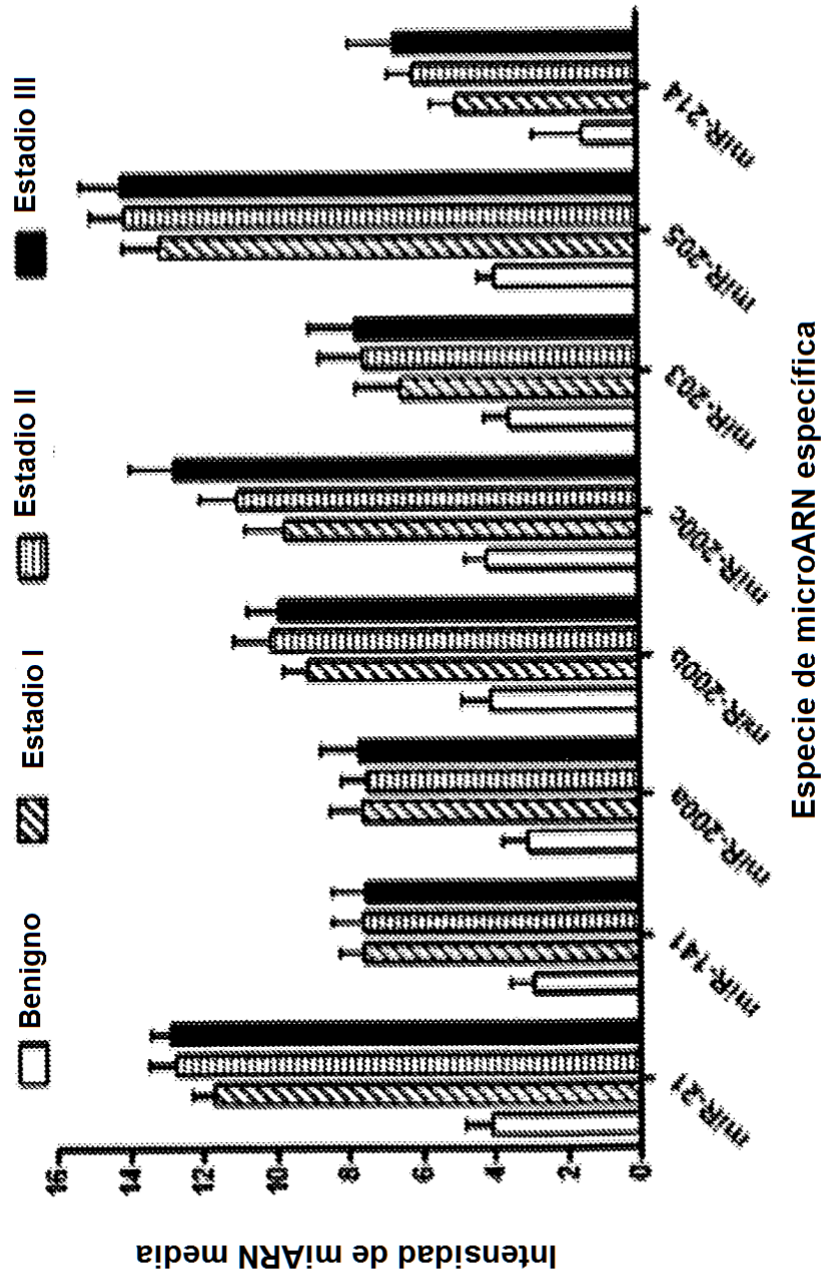


FIGURA 6

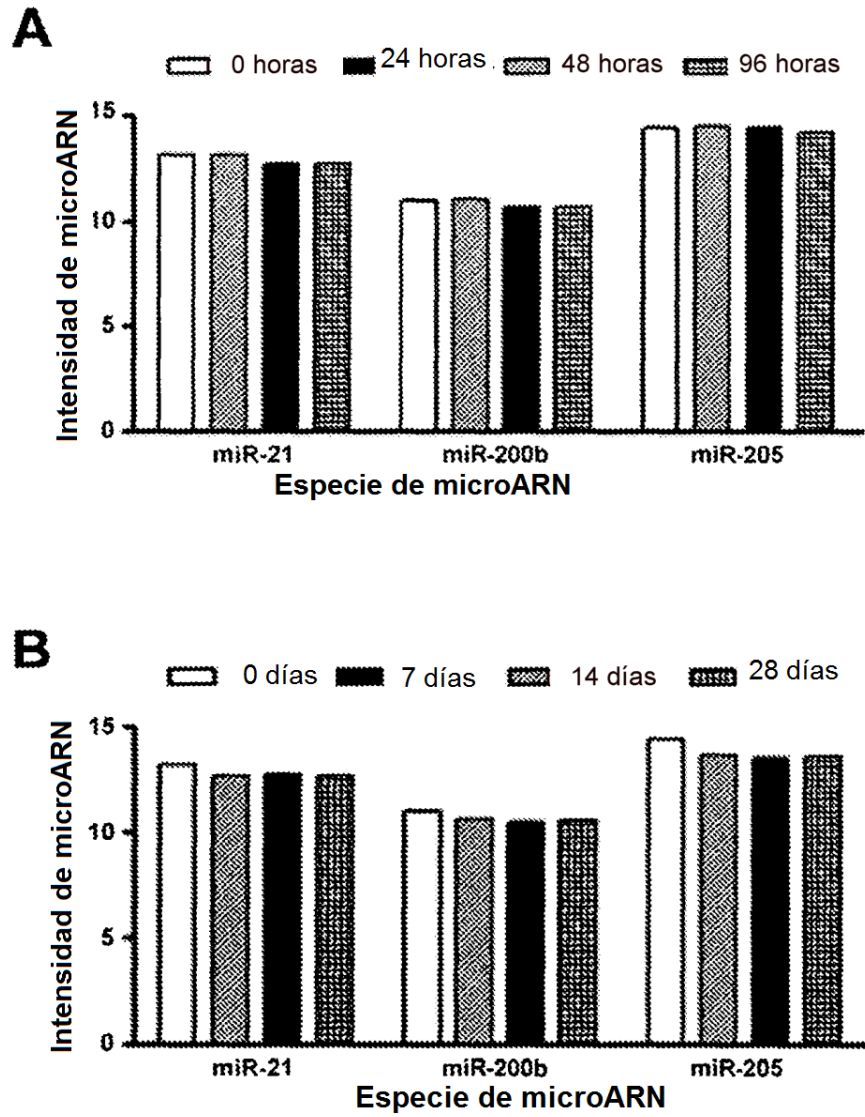


FIGURA 7

Aislamiento de microARN exosómico

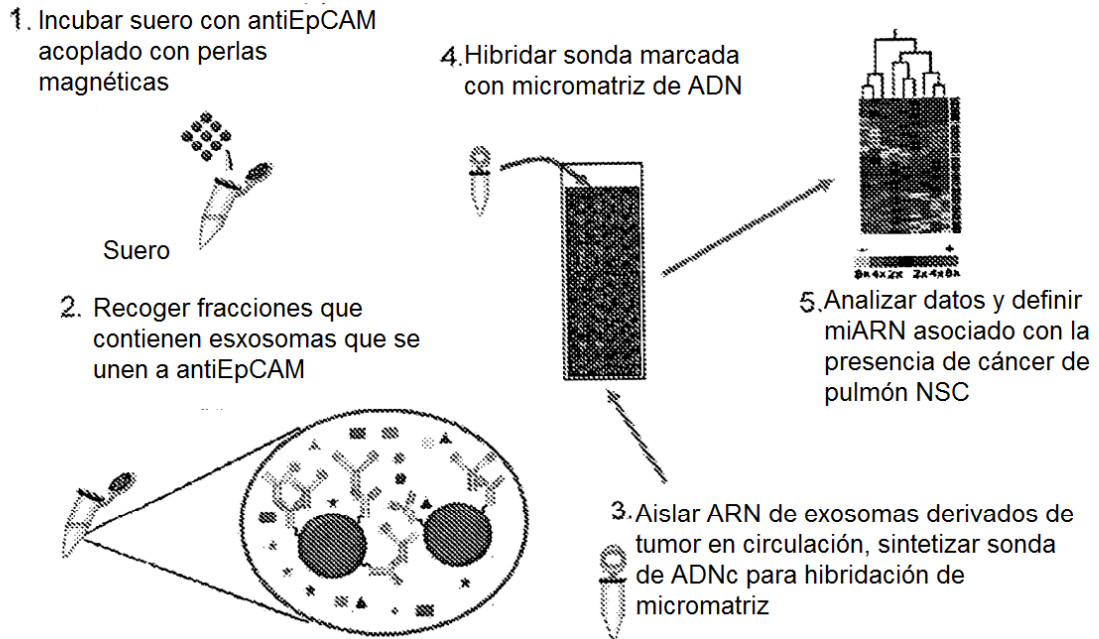


FIGURA 8

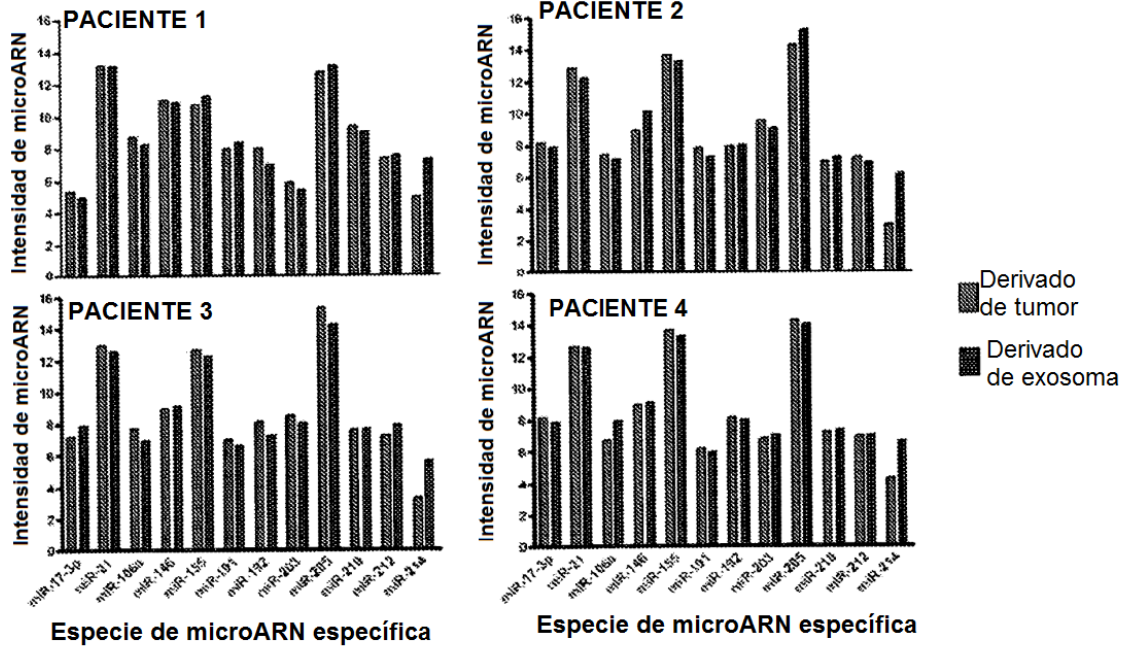


FIGURA 9