

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 715**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2010 E 10800649 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2454588**

54 Título: **Análisis de ácido nucleico**

30 Prioridad:

**16.07.2009 US 226025 P**

**16.07.2009 US 226106 P**

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

**08.10.2015**

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION  
(100.0%)**

**55 Fruit Street  
Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**RUSSO, LEILEATA M.;  
MIRANDA, KEVIN C. y  
SKOG, JOHAN**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 547 715 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**

Análisis de ácido nucleico

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con los campos generales del análisis de ácido nucleico en sujetos humanos u otros sujetos animales, particularmente la adquisición y análisis de ácidos nucleicos de alta calidad a partir de una muestra biológica, y en particular, de microvesículas.

Antecedentes

10 Las microvesículas pequeñas desprendidas por células se conocen como "exosomas" (Thery et al., 2002). Se reporta que los exosomas tienen un diámetro de aproximadamente 30-100 nm y se desprenden de muchos tipos de células diferentes, bajo condiciones normales y patológicas (Thery et al., 2002). Los exosomas se forman clásicamente de la invaginación hacia adentro y pinzamiento de la última membrana endosómica. Esto da como resultado la formación de un cuerpo multivesicular (MVB) cargado con vesículas bicapa lípidas pequeñas (~40-100 nm de diámetro), cada una de las cuales contiene una muestra de citoplasma de la célula progenitora (Stoorvogel et al., 2002). La fusión del MVB con la membrana celular resulta en la liberación de estos exosomas de la célula, y su suministro en la sangre, orina u otros fluidos corporales.

15 Otra categoría de vesículas derivadas de células se conoce como "desprendimiento de microvesículas" (Cocucci et al., 2009). Estas microvesículas, formadas por gemación directa de la membrana plasmática de la célula, son más heterogéneas en tamaño que los exosomas, y exosomas similares, también contienen una muestra del citoplasma de la célula progenitora. Los exosomas y microvesículas desprendidos se aíslan utilizando técnicas de aislamiento por ultracentrifugación y ultrafiltración, y por lo tanto, se denominarán colectivamente aquí como microvesículas.

20 Estudios recientes revelan que los ácidos nucleicos dentro de microvesículas tienen una función como biomarcadores. Por ejemplo, Skog et. al. describen, entre otras cosas, el uso de ácidos nucleicos extraídos de microvesículas en suero de pacientes GBM para diagnóstico médico, pronóstico y evaluación de terapia (Skog et al., 2008). Se considera que el uso de ácidos nucleicos extraídos de microvesículas evitan potencialmente la necesidad de biopsias, destacando el enorme potencial diagnóstico de la biología de microvesículas (Skog et al., 2008). Se pueden utilizar exosomas de orina para aislar biomarcadores para cáncer de próstata (Milson et al., 2005, 100, 1603-1607).

25 En investigación y desarrollo, así como en aplicaciones comerciales de biomarcadores de ácidos nucleicos, es deseable extraer ácidos nucleicos de alta calidad de las muestras biológicas de una manera consistente y confiable. Se describen aquí composiciones de extracciones de ácido nucleico de alta calidad de microvesículas y otras muestras biológicas, métodos de fabricación de dichas extracciones, y métodos de uso de estos ácidos nucleicos de alta calidad en diversas aplicaciones.

Breve resumen de la invención

30 En un aspecto, la invención es un método para obtener y analizar ARN a partir de una muestra de orina, que comprende las etapas de:

- (a) obtener una muestra de orina y procesar previamente la muestra de orina mediante filtración a través de un filtro de 0.8 µm;
- 40 (b) obtener una fracción de microvesícula de la muestra de orina procesada previamente mediante ultracentrifugación o concentración por filtración;
- (c) lavar la fracción de microvesícula;
- (d) extraer ARN de la fracción de microvesícula;
- (e) medir la calidad del ARN de la fracción de microvesícula al determinar la cantidad de rARN 18S y 28S en la extracción con el propósito de evaluar la calidad de la extracción de ARN, donde la detección de rARN 18S y 28S en la extracción de ARN indica que la extracción de ARN tiene alto rendimiento y/o alta integridad; y
- 45 (f) analizar uno o más ARN a partir de la extracción de ARN de la etapa e) que se ha evaluado como alto rendimiento y/o alta integridad.

También se describe una extracción de ácido nucleico novedosa de una o más microvesículas aisladas de una muestra biológica eucariota, en donde rARN 18S y rARN 28S son detectables en la extracción. Preferiblemente, la

relación cuantitativa de rARN 18S con rARN 28S detectable en extracciones novedosas está dentro del rango de aproximadamente 1: 1 a aproximadamente 1:2; y es preferiblemente aproximadamente 1:2. Las muestras biológicas de las cuales se puede obtener la extracción novedosa incluyen, entre otras cosas, cualquier fluido corporal, preferiblemente orina, suero o plasma, y preferiblemente, son de un mamífero, particularmente un humano. Para las muestras de fluido corporal con una concentración de proteína de menos de 10 mg/ml, tal como orina, la extracción de ácido nucleico novedosa puede comprender adicionalmente una extracción de ácido nucleico que tiene unas cifras de integridad de ARN (en todos los casos, como se obtiene en un Agilent BioAnalyzer o un equivalente del mismo) de más de o igual a 5 y/o puede comprender adicionalmente un rendimiento de ácido nucleico de 20 ml de muestra biológica de más de o igual a 50 pg/ml. De forma similar, para las muestras de fluido corporal con una concentración de proteína de más de 10 mg/ml, tal como suero o plasma, la extracción de ácido nucleico novedosa puede comprender adicionalmente unas cifras de integridad de ARN de más de o igual a 3 y/o puede comprender adicionalmente un rendimiento de ácido nucleico de 1 ml de muestra biológica que es mayor que o igual a 50 pg/ml.

Adicionalmente se describe un perfil novedoso de ácido nucleico de una o más microvesículas aisladas de una muestra biológica eucariota, en donde rARN 18S y rARN 28S son detectables en el perfil. Preferiblemente, la relación cuantitativa de rARN 18S con rARN 28S detectable en el perfil novedoso está dentro del rango de aproximadamente 1: 1 a aproximadamente 1:2; y es preferiblemente aproximadamente 1:2. Las muestras biológicas de las cuales se puede obtener el perfil novedoso incluyen, entre otras cosas, cualquier fluido corporal, preferiblemente orina, suero o plasma, y preferiblemente, es de un mamífero, particularmente un humano. Para las muestras de fluido corporal con una concentración de proteína de menos de 10 mg/ml, tal como orina, el perfil novedoso puede comprender adicionalmente unas cifras de integridad de ARN de más de o igual a 5 y/o puede comprender adicionalmente un rendimiento de ácido nucleico de 20 ml de muestra biológica de más de o igual a 50 pg/ml. De forma similar, para las muestras de fluido corporal con una concentración de proteína de más de 10 mg/ml, tal como suero o plasma, el perfil novedoso puede comprender adicionalmente unas cifras de integridad de ARN de más de o igual a 3 y/o puede comprender adicionalmente un rendimiento de ácido nucleico de 1 ml de muestra biológica que es mayor que o igual a 50 pg/ml.

También se describe un método para evaluar la calidad de una extracción de ácido nucleico de microvesículas aisladas de una muestra biológica eucariota, que comprende las etapas de: (a) extraer ARN de microvesículas; y (b) medir la calidad del ARN al determinar la cantidad de rARN 18S y 28S en la extracción. Preferiblemente, la relación cuantitativa de rARN 18S con rARN 28S determinada en el método novedoso está dentro del rango de aproximadamente 1: 1 a aproximadamente 1:2; y es preferiblemente aproximadamente 1:2. Las muestras biológicas en las que se puede realizar el método novedoso incluyen, entre otras cosas, cualquier fluido corporal, preferiblemente orina, suero o plasma, y preferiblemente, es de un mamífero, particularmente un humano. Para las muestras de fluido corporal con una concentración de proteína de menos de 10 mg/ml, tal como orina, el método novedoso puede resultar adicionalmente en la extracción de ácido nucleico que tiene unas cifras de integridad de ARN de más de o igual a 5 y/o puede resultar adicionalmente en un rendimiento de ácido nucleico de 20 ml de muestra biológica de más de o igual a 50 pg/ml. De forma similar, para las muestras de fluido corporal con una concentración de proteína de más de 10 mg/ml, tal como suero o plasma, el método novedoso puede resultar adicionalmente en la extracción de ácido nucleico que tiene unas cifras de integridad de más de o igual a 3 y/o puede resultar adicionalmente en un rendimiento de ácido nucleico de 1 ml de muestra biológica que es mayor que o igual a 50 pg/ml.

Se describe adicionalmente un método para obtener ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas de: (a) obtener una muestra biológica; (b) realizar una operación potenciación de extracción en la muestra biológica; y (c) extraer ácido nucleico de la muestra biológica. La operación potenciación de extracción está comprendida de: (a) la adición de uno o más agentes potenciadores a la muestra biológica; o (b) la realización de una o más etapas de potenciación antes de extracción de ácido nucleico; o (c) una combinación de agentes potenciadores y etapas de potenciación. Los agentes potenciadores pueden incluir: (i) inhibidor de RNasa; (ii) proteasa; (iii) agente de reducción; (iv) sustrato señuelo, tal como ARN sintético; (v) receptor soluble; (vi) ARN de interferencia pequeño; (vii) molécula de unión a ARN, tal como anticuerpo anti-ARN, proteína chaperona, o una proteína FNasa inhibidora; (ix) sustancia de desnaturalización de RNasa, tal como solución de alta osmolaridad o detergente. Las etapas de potenciación de extracción pueden incluir: (x) lavado; (xi) RNasa de separación de tamaño de la muestra; (xii) efectuar desnaturalización de RNasa a través de un cambio físico, tal como al reducir la temperatura, o ejecutar un ciclo de congelado/descongelado. El método novedoso se puede realizar en una muestra biológica que incluye, entre otras cosas, cualquier fluido corporal, preferiblemente orina, suero o plasma, y preferiblemente, es de un mamífero, particularmente un humano. Se puede obtener un derivado de la muestra biológica y se sujeta a operación potenciación de extracción antes de extraer ácido nucleico. Preferiblemente, el derivado es una fracción de microvesícula de la muestra biológica. La fracción de microvesícula se puede obtener mediante una técnica de concentración por filtración, sin embargo también se pueden utilizar otras técnicas de aislamiento. El derivado se puede tratar con una ribonucleasa, desoxirribonucleasa, o una combinación de las mismas, antes de la realización de la operación de extracción mejorada. La operación potenciación de extracción puede incluir la adición de un inhibidor RNasa a la muestra biológica, o al derivado, antes de extraer ácido nucleico; preferiblemente el inhibidor RNasa tiene una concentración de más de 0.027 AU (1X) para una muestra igual a o mayor de 1 µl; alternativamente, mayor que o igual a 0.135 AU (5X) para una muestra igual a o mayor de 1 µl; alternativamente, mayor que o igual a 0.27 AU (10X) para una muestra igual a o mayor de 1 µl; alternativamente, mayor que o igual a 0.675 AU (25X) para una muestra igual a o mayor de 1 µl; y

alternativamente, mayor que o igual a 1.35 AU (50X) para una muestra igual a o mayor de 1 µl, en donde la concentración de proteasa 1X se refiere a una condición enzimática en donde 0.027 AU o más proteasa se utiliza para tratar microvesículas aisladas de 1 µl o más fluido corporal; la concentración de proteasa 5X se refiere a una condición enzimática en donde 0.135 AU o más de proteasa se utiliza para tratar microvesículas aisladas de 1 µl o más de fluido corporal; la concentración de proteasa 10X se refiere a una condición enzimática en donde 0.27 AU o más proteasa se utiliza para tratar microvesículas aisladas de 1 µl o más de fluido corporal; la concentración de proteasa 25X se refiere a una condición enzimática en donde 0.675 AU o más proteasa se utiliza para tratar microvesículas aisladas de 1 µl o más de fluido corporal; la concentración de proteasa 50X se refiere a una condición enzimática en donde 1.35 AU o más proteasa se utiliza para tratar microvesículas aisladas de 1 µl o más de fluido corporal. Preferiblemente, el inhibidor RNasa es una proteasa.

También se describe un equipo novedoso para obtener ácidos nucleicos a partir de microvesículas, comprendidas en uno o más recipientes: (a) un agente de mejora de extracción de ácido nucleico; (b) DNasa, RNasa, o ambos; y (c) un regulador de lisis. El equipo novedoso puede comprender adicionalmente instrucciones para utilizar el equipo. El agente de mejora de extracción de ácido nucleico puede incluir: (a) inhibidor de RNasa; (b) proteasa; (c) agente de reducción; (d) sustrato señuelo; (e) receptor soluble; (f) ARN de interferencia pequeño; (g) molécula de unión a ARN; (h) sustancia de desnaturalización de RNasa; o (i) cualquier combinación de cualquiera de los anteriores agentes como una mezcla o individualmente.

Adicionalmente se describe un método novedoso para analizar ARN de microvesículas, que comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de microvesículas; (b) tratar la muestra con DNasa para eliminar todo o sustancialmente todo el ADN ubicado afuera de o sobre la superficie de las microvesículas en la muestra; (c) extraer ARN de la muestra; y (d) analizar el ARN extraído. El método novedoso se puede realizar en una muestra biológica que incluye, entre otras cosas, cualquier fluido corporal, preferiblemente orina, suero o plasma, y preferiblemente, es de un mamífero, particularmente un humano.

Adicionalmente se describe un método novedoso para diagnosticar, monitorizar, o tratar un sujeto, que comprende las etapas de: (a) aislar una fracción de microvesícula a partir de una muestra de orina de un sujeto; (b) detectar la presencia o ausencia de un biomarcador dentro de la fracción de microvesícula; en donde biomarcador se selecciona del grupo que consiste de (i) una especie de ácido nucleico, (ii) el nivel de expresión de un ácido nucleico, (iii) una variante de ácido nucleico, y (iv) cualquier combinación de cualquiera de los anteriores y en donde el biomarcador se asocia con la presencia o ausencia de una enfermedad u otra afección médica, o la viabilidad de una opción de tratamiento. El biomarcador puede ser una transcripción de mARN; por ejemplo, la transcripción de mARN se puede seleccionar del grupo que consiste de: NPHS2 (podocina), LGALS 1 (Galectina-1), HSPG2 (proteoglicano de sulfato de heparina); CUBN (cubilina), LRP2 (megalina), AQP1 (acuaporina 1), CA4 (anhidrasa carbónica 4), CLCN5 (proteína de canal de cloruro 5), BDKRB 1 (receptor de bradiquinina B1), CALCR (receptor de calcitonina), SCNN1D (subunidad de canal de sodio sensible a amilorida delta), SLC12A3 (cotransportador de cloruro de sodio sensible a tiazida), AQP2 (acuaporina 2), ATP6V 1 B 1 (subunidad V-ATPasa B1), SLC 12AI (contrtransportador de Na-K-Cl específico a riñón a través de RT-PCR de mARN de RiboArnped); más preferiblemente, la transcripción de mARN es AQP2 (acuaporina 2) o ATP6VIB1 (subunidad V-ATPasa B1). El biomarcador y la enfermedad u otra afección médica se puede seleccionar del grupo que consiste de (a) NPHS2 (podocina) y enfermedad glomerular, tal como síndrome nefrítico resistente a esteroides; (b) CUBN (cubilina) y proteinuria, tal como en el síndrome de Imlerslund-Gräsbeck; y (c) AQP2 (acuaporina 2) y diabetes insípida.

También se describe una molécula de polinucleótido aislada que comprende una primera secuencia de nucleótidos que es por lo menos 90% idéntica a una segunda secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOS: 1-29; un polinucleótido aislado que comprende un segmento de una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NOS: 1-29; o un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de por lo menos 13 nucleótidos que son los mismos como cualquier secuencia de 13 nucleótidos en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-29. En particular, las moléculas de polinucleótido anteriores pueden ser un desoxirribonucleótido o a ribonucleótido. Adicionalmente se describe un vector que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aislado anteriores. También se describe una célula anfitriona que comprende cualquiera de los vectores anteriores o cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas anteriores.

Adicionalmente se describe un método novedoso para evaluar la calidad de una extracción de ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende: (a) proporcionar una muestra biológica; (b) obtener una extracción de ácidos nucleicos de la muestra biológica; (c) medir la cantidad de una molécula polinucleótidos que comprende un segmento que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionados de la SEQ NOS: 1-29 en la extracción; y (d) comparar la cantidad de la moléculas de polinucleótidos contra un estándar para evaluar la calidad de la extracción de ácido nucleico. El método novedoso se puede realizar sobre cualquier muestra biológica, por ejemplo, un fluido corporal, en particular, orina, suero o plasma, preferiblemente de un mamífero tal como un humano. Este método novedoso se puede utilizar en conjunto con cualquiera de las extracciones de ácido nucleico novedosas anteriores o métodos de extracción novedosos. En particular, el estándar utilizado para evaluar la calidad de la extracción de ácido nucleico se puede derivar al medir la cantidad de una molécula polinucleótidos que comprende un segmento que tiene la secuencia de nucleótidos seleccionada de la SEQ NOS: 1-29 en la extracción de ácidos nucleicos de más de 5 muestra biológicas.

Breve descripción de los dibujos

## ES 2 547 715 T3

- 5 La FIGURA 1, fotogramas a hasta f, son fotos de microscopio de electrones de cuerpos multivesiculares urinarios. Los cuerpos multivesiculares (MVB) se pueden identificar en varias regiones de la nefrona y recolectarse en conductos (véase flechas). Podo - podocito, PT - túbulo próximo, TDL - extremidad descendente delgada, TAL - miembro ascendente delgado, CD-PC - célula principal de conducto colector, CD-IC - célula intercalada de conducto colector. Barra de escala = 200 nm para a, c, d, e, f; 500 nm para b.
- La FIGURA 2 es una fotografía de microscopio de electrones de microvesículas de orina aisladas. Microvesículas de orina humanas aisladas a través de ultracentrifugación diferencial y formación de imágenes a través de TEM utilizando ácido fosfotúngstico como mancha. Barra de escala = 200 nm.
- 10 La FIGURA 3 es una gráfica que representa perfiles de ARN generados con un método de filtro MWCO de 100 kDa. Se utiliza un Agilent BioAnalyzer para generar la gráfica.
- La FIGURA 4 es una gráfica que representa perfiles de ARN generados con un método de ultracentrifugación. Se utiliza un Agilent BioAnalyzer para generar la gráfica.
- 15 La FIGURA 5 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados con un método de procesamiento previo de tres etapas de x300g de giro, x17,000 g de giro, y filtración de 0.8  $\mu\text{m}$  (A), o con un método de procesamiento previo de una etapa de solo una filtración de 0.8  $\mu\text{m}$  (B), en cada caso seguido por ultracentrifugación. Se utiliza un Agilent BioAnalyzer para generar la gráficas.
- 20 La FIGURA 6 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados con un método de procesamiento previo de tres etapas de x300g de giro, x17,000g de giro, y filtración de 0.8  $\mu\text{m}$  (A), con un método de procesamiento previo de una etapa de solo una filtración de 0.8  $\mu\text{m}$  (B), en cada caso seguido por concentración por filtración. Se utiliza un Agilent BioAnalyzer para generar la gráficas.
- La FIGURA 7 es un diagrama de flujo que representa un nuevo método de extracción de ácido nucleico de orina con una operación potenciación de extracción.
- 25 La FIGURA 8 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados con métodos utilizando proteasas concentradas 5X versus 10X. Se aíslan microvesículas a través de concentradores de filtración de 20 ml de muestras de orina. La gráfica A representa el perfil obtenido con proteasa 5X. La gráfica B representa el perfil obtenido con proteasa 10X. Una concentración de proteasa 1X se refiere a una condición enzimática en donde se utiliza 0.027 AU o más proteasa para tratar microvesículas aisladas de 1  $\mu\text{l}$  o más de fluido corporal. Una concentración de proteasa 5X se refiere a una condición enzimática en donde se utiliza 0.135 AU o más proteasa para tratar microvesículas aisladas de 1  $\mu\text{l}$  o más de fluido corporal. Un mAU es la actividad de proteasa que libera aminoácidos positivos para folina y péptidos que corresponden a 1  $\mu\text{mol}$  de tirosina por minuto.
- 30 La FIGURA 9 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados con métodos que utilizan proteasas concentradas 25X versus 50X. Se aíslan microvesículas a través de concentradores de filtración desde 40 ml de muestras de orina. La gráfica A representa el perfil obtenido con proteasa 25X. La gráfica B representa el perfil obtenido con proteasa 50X. La proteasa 1X se refiere a 0.027 AU. Un mAU es la actividad de proteasa que libera aminoácidos positivos para folina y péptidos que corresponden a 1  $\mu\text{mol}$  de tirosina por minuto.
- 35 La FIGURA 10 es una gráfica que representa el perfil de ARN de melanoma en suero, Muestra 1. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final del inhibidor RNasa es 1.6 unidades/ $\mu\text{l}$  de regulador de suspensión de microvesícula.
- 40 La FIGURA 11] es una gráfica que representa el perfil de ARN de melanoma en suero, Muestra 2. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final del inhibidor RNasa es 1.6 unidades/ $\mu\text{l}$  de regulador de suspensión de microvesícula.
- La FIGURA 12 es una gráfica que representa el perfil de ARN de melanoma en suero, Muestra 3. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final del inhibidor RNasa es 1.6 unidades/ $\mu\text{l}$  de regulador de suspensión de microvesícula.
- 45 La FIGURA 13 es una gráfica que representa el perfil de ARN de melanoma en suero, Muestra 4. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final de la RNasa en inhibidor es 1.6 unidades/ $\mu\text{l}$  de regulador de suspensión de microvesícula.
- 50 La FIGURA 14 es una gráfica que representa el perfil de ARN de un melanoma en suero, Muestra 5. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final del inhibidor RNasa es 3.2 unidades/ $\mu\text{l}$  de regulador de suspensión de microvesícula.

## ES 2 547 715 T3

- La FIGURA 15 es una gráfica que representa el perfil de ARN de un melanoma en suero, Muestra 6. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final del inhibidor RNasa es 3.2 unidades/ $\mu$ l de regulador de suspensión de microvesícula.
- 5 La FIGURA 16 es una gráfica que representa el perfil de ARN de suero normal, Muestra 7. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final del inhibidor RNasa es 1.6 unidades/ $\mu$ l de regulador de suspensión de microvesícula.
- La FIGURA 17 es una gráfica que representa el perfil de ARN de a suero normal, Muestra 8. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final del inhibidor RNasa es 1.6 unidades/ $\mu$ l de regulador de suspensión de microvesícula.
- 10 La FIGURA 18 es una gráfica que representa el perfil de ARN de suero normal, Muestra 9. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final es del inhibidor RNasa 1.6 unidades/ $\mu$ l de regulador de suspensión de microvesícula.
- La FIGURA 19 es una gráfica que representa el perfil de ARN de suero normal, Muestra 10. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final del inhibidor RNasa es 1.6 unidades/ $\mu$ l de regulador de suspensión de microvesícula.
- 15 La FIGURA 20 es una gráfica que representa el perfil de ARN de suero normal, Muestra 11. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final del inhibidor RNasa es 3.2 unidades/ $\mu$ l de regulador de suspensión de microvesícula.
- La FIGURA 21 es una gráfica que representa el perfil de ARN de suero normal, Muestra 12. Se extrae ARN de 1 ml de suero con un método que utiliza un inhibidor de RNasa, Superase-In (Ambion, Inc). La concentración final del inhibidor RNasa es 3.2 unidades/ $\mu$ l de regulador de suspensión de microvesícula.
- 20 La FIGURA 22 es un diagrama de flujo que representa un nuevo método de extracción de ácido nucleico de una muestra biológica utilizando una operación potenciación de extracción.
- La FIGURA 23 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados con métodos con o sin tratamiento de DNasa. El ADN no ubicado dentro de las microvesículas se elimina mediante digestión de DNasa del sedimento de microvesículas aislado de muestras de orina antes de lisis y extracción de ácido nucleico. A - perfil sin digestión de DNasa utilizando Equipo RNeasy Micro. B - perfil con digestión de DNasa utilizando Equipo RNeasy Micro. C- perfil sin digestión de DNasa utilizando Equipo MirVana D - perfil con digestión de DNasa utilizando Equipo MirVana Observe los cambios en altura de pico de ARN pequeño y el área indicada por la flecha en D sugieren que hay algún traspaso de ADN en la muestra luego de extracción con base en fenol/cloroformo
- 25 30 La FIGURA 24 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados con métodos con o sin tratamiento de DNasa. El ADN no ubicado dentro de las microvesículas se elimina mediante digestión de DNasa del sedimento de microvesículas aislado de muestras de suero antes de lisis y extracción de ácido nucleico. A - perfil sin digestión de DNasa. B - perfil con digestión de DNasa. C - Un seudogel que muestra "cuerpo apoptótico" como escaleras que se pueden co-aislar con microvesículas derivadas de suero.
- 35 La FIGURA 25 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados con métodos con o sin tratamientos de RNasa. El ARN no ubicado dentro de las microvesículas se elimina mediante digestión de RNasa del sedimento de microvesículas aislado de muestras de orina antes de lisis y extracción de ácido nucleico. A - perfil sin digestión de RNasa. B - perfil con digestión de RNasa.
- 40 La FIGURA 26 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados de microvesículas de orina y tejido de riñón de rata. A - perfil de tejido de riñón de rata. B - perfil de microvesículas de orina.
- La FIGURA 27 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados de microvesículas de orina y tejido de riñón de rata utilizando métodos que pueden enriquecer extracción de ARN pequeño. Un perfil de tejido de riñón de rata. B- perfil de microvesículas de orina.
- 45 La FIGURA 28 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados de orina completa exclusiva de microvesículas, que no se capturan por la técnica de aislamiento, con o sin tratamientos de DNasa. A-ácidos nucleicos aislados de orina completa sin tratamiento de DNasa. B-ácidos nucleicos aislados de orina completa con tratamiento de DNasa.
- 50 La FIGURA 29 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados de microvesículas de orina. A-ácidos nucleicos aislados de microvesículas de orina sin tratamiento de DNasa. B- ácidos nucleicos aislados de microvesículas con tratamientos de DNasa.

## ES 2 547 715 T3

La FIGURA 30 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados de ácidos nucleicos extraídos de sedimentos formados durante el giro de 300 g. A- ácidos nucleicos aislados de giro de 300g de sedimentos sin tratamiento de DNasa. B- ácidos nucleicos aislados de 300g de giro de sedimentos con tratamiento de DNasa.

5 La FIGURA 31 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados de ácidos nucleicos extraídos de sedimentos formados durante el giro de 17,000g. A- perfil de ácido nucleico de giro de 17,000g de sedimento sin tratamiento de DNasa. B- perfil de ácido nucleico de giro de 17,000g de sedimento con tratamiento de DNasa.

10 La FIGURA 32 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados de microvesículas que se someten a digestión de RNasa y DNasa en el exterior antes de la lisis de microvesícula, con o sin digestión de RNasa intramicrovesicular. A- perfil de ácido nucleico sin digestión de RNasa intramicrovesicular. B- perfil de ácido nucleico con digestión de RNasa intramicrovesicular.

15 La FIGURA 33 es un par de gráficas que representan perfiles de ARN generados de microvesículas que se someten a digestión de RNasa y DNasa en el exterior antes de la lisis de microvesícula y digestión de RNasa intramicrovesicular, con o sin digestión de DNasa intramicrovesicular. A- perfil de ácido nucleico sin digestión de DNasa intramicrovesicular. B- perfil de ácido nucleico con digestión de DNasa intramicrovesicular. En la gráfica B, solo el pico después de 20s se reduce en comparación con el pico coincidente en la gráfica A. La reducción sugiere que una cantidad pequeña de material digestible de DNasa está presente dentro de los exosomas.

20 La FIGURA 34 A) se generan perfiles de 'seudo-gel' mediante BioAnalyzer de la identificación positiva de transcripciones amplificadas de mRNA amplificadas RiboAmp para beta-actina y GAPDH en microvesículas de orina mediante RT-PCR; B) es una ilustración de la nefrona y conducto colector destacando sus seis regiones funcionalmente distintas. 1. Glomérulo; 2. Túbulo próximo; 3. Extremidad descendente delgada; 4. Miembro ascendente medularmente grueso; 5. Túbulo contorneado distal; 6. Conductos colectores.

25 La FIGURA 35 representa perfiles de pseudogel generados por BioAnalyzer de la identificación de transcripciones de mRNA que codifica genes específicos de regiones 1 y 2 de la nefrona y conducto colector detectados por RT-PCR de RiboAmped mRNA de microvesículas de orina, específicamente: 1. Glomérulo: NPHS2 - podocina, LGALS1 - Galectina-1, HSPG2 - proteoglicano de sulfato de heparano 2. Túbulo próximo: CUBN - cubilina, LRP2 - megalina, AQP 1 - acuaporina 1, CA4 - anhidrasa carbónica4, CLCN5 - proteína de canal de cloruro 5.

30 La FIGURA 36 representa perfiles de pseudogel generados por BioAnalyzer de la identificación de transcripciones de mRNA que codifica genes específicos de regiones 3-6 de la nefrona y conducto colector detectados por RT-PCR de RiboAmped mRNA de microvesículas de orina, específicamente: 3. Extremidad descendente delgada: BDKRBI - receptor bradiquinina B1. 4. Extremidad ascendente medularmente gruesa: CALCR - receptor de calcitonina, SCNNID - subunidades de canal de sodio sensible a amilorida delta. 5. Túbulo contorneado distal: SLC12A3 - cotransportador de cloruro de sodio sensible a tiazida. 6. Conductos colectores: AQP2 - acuaporina 2, ATP6VIB1 - subunidad vATPasa B1, SLC12A1 - Cotransportadores de Na-K-Cl específicos a riñón.

35 La FIGURA 37 A) es un par de pseudogeles BioAnalyzer que representan la expresión de la subunidad de V-ATPasa B 1 y AQP2 mRNA mediante RT-PCR en V-ATPasa B 1 KO (B 1 -/-) y tipo natural (B1 +/+) ratón; B) es un par de diagramas que representan la expresión de la subunidad V-ATPasa B2 en microvesículas de orina y las células de riñón de V-ATPasa B 1 KO (B 1 -/-) y tipo natural (B1 +/+) de ratón mediante análisis de PCR en tiempo real. "NS" – no estadísticamente significativo.

40 La FIGURA 38 es un trío de gráficas que representa perfiles de ARN generados de microvesículas de orina. La microvesículas de orina no se lavan o tratan con cualquier mejorador de extracción antes de que las membranas de microvesículas se desintegren para extracción de ácido nucleico. Se utilizan tres muestras en este grupo de extracciones. Los perfiles se muestran en A, B y C, respectivamente.

45 La FIGURA 39 es un trío de gráficas que representa perfiles de ARN generados de microvesículas de orina. Las microvesículas de orina no se lavan pero se tratan con un inhibidor de RNasa, RNasa-In (Promega), antes de que las membranas de microvesículas se desintegren para extracción de ácido nucleico. Se utilizan tres muestras en este grupo de extracciones. Los perfiles se muestran en A, B y C, respectivamente.

50 La FIGURA 40 es un trío de gráficas que representa perfiles de ARN generados de microvesículas de orina. Las microvesículas de orina se lavan pero no se tratan con cualquier inhibidor de RNasa antes de que las membranas de microvesículas se desintegren para extracción de ácido nucleico. Se utilizan tres muestras en este grupo de extracciones. Los perfiles se muestran en A, B y C, respectivamente.

La FIGURA 41 es un trío de gráficas que representa perfiles de ARN generados de microvesículas de orina. Las microvesículas de orina se lavan y se tratan con inhibidor de RNasa antes que las membranas de microvesícula se desintegren para extracción de ácido nucleico. Se utilizan tres muestras en este grupo de extracciones. Los perfiles se muestran en A, B y C, respectivamente.

La FIGURA 42 es una lista de regiones de cromosoma en las que presenta más de 500 picos de transcripción en un análisis de secuenciación de profundidad del ARN extraído de microvesículas de orina ("picos"). Los números indican el punto de inicio y punto final de cada región de cromosoma. Por ejemplo, el "chr1.-1.91625366.91625741" se refiere a la región en el cromosoma humano 1 entre los nucleótidos nos. 9 1625366 y 9 1625741. Las SEQ ID NOS correspondientes también se indican.

La FIGURA 43 es una lista de cebadores utilizados para reacción PCR para amplificar las secuencias en 10 regiones de cromosoma como se indica. Por ejemplo, el "chr1.- 1.91 625366.9 1625741" se refiere a la región en el cromosoma humano 1 entre nucleótido nos. 9 1625366 y 9 1625741. El par de cebadores utilizado para ampliar esta región es "tccagtcacgttcctatt 1 L y ccaggtggggagmgact 1 R". Los cebadores corren desde 5' hasta 3' con el fin de que puedan ir de izquierda a derecha.

La FIGURA 44 es un par de pseudogeles BioAnalyzer que representan el resultado de amplificación PCR de 10 regiones de cromosoma ricas en picos. La numeración de las líneas en la parte superior de cada fotograma corresponde a la numeración de las regiones de cromosoma mostradas en la Figura 43. En A, una extracción de ácido nucleico de microvesículas de orina se utiliza como una plantilla para el PCR. En B, una extracción de ácido nucleico de tejido renal se utiliza como una plantilla para el PCR.

Las FIGURAS 45-73 son gráficas que representan los picos en 29 regiones de cromosoma. Las regiones se indican en la parte superior de cada gráfica. Por ejemplo, la gráfica en la Figura 46 se refiere a la región de "chr1.-1.91625366.91625741," que es la región en el cromosoma humano 1 entre nucleótido nos. 9 1625366 y 91 625741.

#### Descripción Detallada

Las microvesículas se desprenden por las células eucariotas, o brotan fuera de la membrana plasmática, al exterior de la célula. Estas vesículas de membrana son heterogéneas en tamaño con diámetros que van desde aproximadamente 10 nm hasta aproximadamente 5000 nm. Las pequeñas microvesículas (aproximadamente 10 a 1000 nm, y más a menudo aproximadamente 10 a 200 nm de diámetro) que se liberan mediante exocitosis de cuerpos multivesiculares intracelulares se denominan en la técnica como "exosomas". Las composiciones, métodos y usos descritos en el presente documento son igualmente aplicables a microvesículas de todos los tamaños; preferiblemente de 10 a 800 nm, y más preferiblemente de 10 a 200 nm.

En alguna bibliografía, el término "exosoma" también se refiere a complejos de proteínas que contienen exorribonucleasas que están implicadas en la degradación del ARNm y el procesamiento de pequeños ARNs nucleolares (snoARNs), pequeños ARN nucleares (snARN) y ARN ribosómicos (ARNr) (Liu et al., 2006; van Dijk et al., 2007). Estos complejos de proteínas no tienen membranas y no son "microvesículas" o "exosomas" tal como estos términos se utilizan aquí.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que los factores adversos pueden impedir una extracción eficaz de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica y se pueden utilizar agentes inesperados y novedosos y etapas para mitigar o eliminar los factores adversos, lo que mejora considerablemente la calidad de los ácidos nucleicos extraídos. Como tal, se describen en este documento nuevos métodos para la extracción de ácidos nucleicos de alta calidad de una muestra biológica. Las extracciones de alta calidad obtenidas por los métodos novedosos descritos aquí se caracterizan por un alto rendimiento y alta integridad, haciendo los ácidos nucleicos extraídos útiles para diversas aplicaciones en las que se prefieren las extracciones de ácido nucleico de alta calidad.

Los métodos novedosos escritos ampliamente incluyen, por ejemplo, las etapas de obtener una muestra biológica, mitigar o eliminar factores adversos que impiden una extracción efectiva de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, y extraer ácidos nucleicos de la muestra biológica seguida, opcionalmente, mediante análisis de ácido nucleico.

Las muestras biológicas aplicables incluyen, por ejemplo, una célula, grupo de células, fragmentos de células, productos celulares, que incluyen, por ejemplo, microvesículas, cultivos celulares, tejidos corporales de un sujeto, o fluidos corporales. Los fluidos corporales pueden ser fluidos aislados de cualquier parte del cuerpo del sujeto, preferiblemente una ubicación periférica, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, aspirados de pezón, fluidos de linfa, fluidos de los sistemas respiratorio, intestinal y genitourinario, líquido lagrimal, saliva, leche materna, líquido del sistema linfático, semen, líquido cefalorraquídeo, líquido del sistema intraórganos, líquido ascítico, líquido de quiste tumoral, fluidos amnióticos y sus combinaciones.

Una muestra biológica a veces puede venir de un sujeto. El término "sujeto" pretende incluir todos los animales que muestran o se espera que tengan microvesículas. El sujeto puede ser un mamífero, primate humano o no humano, perro, gato, caballo, vaca, otros animales de granja, o un roedor (por ejemplo, ratón, rata, cobaya, etc.). El término "sujeto" e "individuo" se utiliza indistintamente en el presente documento.

Una muestra biológica puede opcionalmente ser procesada para obtener un derivado de muestra biológica antes, después, o al mismo tiempo que, llevar a cabo la etapa de mitigar o eliminar los efectos adversos. El derivado de muestra biológica puede ser una célula, restos de células, una vesícula de membrana, o una microvesícula.

Una muestra biológica a veces se procesa previamente antes que se obtenga un derivado de muestra biológica tal como una microvesícula. En algunos casos, se prefiere la etapa de preprocesamiento. Por ejemplo, una muestra de orina se puede procesar previamente para obtener microvesículas de orina. El procesamiento previo se puede lograr mediante técnicas conocidas en el arte tales como centrifugación a baja velocidad y pre-filtración. Por ejemplo, las muestras de orina se pueden someter a una primera etapa de centrifugación de 300 g para deshacerse de las partículas grandes en las muestras. Las muestras de orina se pueden someter a una segunda etapa de centrifugación de 17,000 g para deshacerse de las partículas más pequeñas en las muestras. Después de la segunda etapa de centrifugación, las muestras de orina se pueden someter adicionalmente a una etapa de pre-filtración, por ejemplo, una etapa de filtración previa 0.8µm. Alternativamente, las muestras de orina se pueden procesar previamente por una etapa de filtración previa sin primero someterse a una o más de las etapas de centrifugación.

Las vesículas de membrana, por ejemplo, microvesículas, se pueden aislar de una muestra biológica. En algunos casos, tal aislamiento se puede llevar a cabo sin procesamiento previo de la muestra biológica. En otros casos, tal aislamiento se puede llevar a cabo después de que la muestra biológica se procesa previamente. La etapa de aislamiento puede ser ventajosa para la extracción de ácidos nucleicos de alta calidad de una muestra biológica. Por ejemplo, el aislamiento puede dar lugar a ventajas tales como: 1) la oportunidad de analizar selectivamente ácidos nucleicos específicos a enfermedad o tumor, los cuales se pueden obtener al aislar las microvesículas específicas a enfermedad o tumor aparte de las otras microvesículas dentro de la muestra de fluido; 2) el rendimiento significativamente mayor de especies de ácidos nucleicos con una mayor integridad, en comparación con la integridad de rendimiento obtenida mediante la extracción de ácidos nucleicos desde directamente la muestra de fluido; 3) la escalabilidad, por ejemplo, para detectar ácidos nucleicos expresados en niveles bajos, la sensibilidad se puede aumentar al sedimentar más microvesículas de un mayor volumen de suero; 4) ácidos nucleicos puros en los que las proteínas y lípidos, residuos de células muertas, y otros contaminantes potenciales e inhibidores de PCR se excluyen de los sedimentos de microvesículas antes de la etapa de extracción de ácido nucleico; y 5) más opciones en los métodos de extracción de ácidos nucleicos como sedimentos son microvesículas de volumen mucho más pequeño que el del suero de partida, por lo que es posible la extracción de ácidos nucleicos de estos sedimentos de microvesículas utilizando filtros de columna de pequeño volumen.

Los métodos de aislamiento de microvesículas de una muestra biológica son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método de centrifugación diferencial se describe en un documento por Raposo et al. (Raposo et al., 1996), un documento por Skog et. al. (Skog et al., 2008) y un documento por Nilsson et. al. (Nilsson et al., 2009). Los métodos de intercambio aniónico/ cromatografía de permeación en gel se describen en la Patente Estadounidense 6,899,863 y 6,812,023. Los métodos de gradientes de densidad de sacarosa o electroforesis de orgánulos se describen en la Patente Estadounidense No. 7,198,923. Un método activado magnéticamente de clasificación de células (MACS a) se describe en un documento de Taylor y Gercel- Taylor (Taylor y Gercel-Taylor, 2008). Un método de concentración por ultrafiltración de nanomembrana se describe en un documento de Cheruvanky et al. (Cheruvanky et al., 2007). Adicionalmente, las microvesículas pueden ser identificadas y aisladas de fluido corporal de un sujeto mediante una tecnología de microchip recientemente desarrollado que utiliza una plataforma de microfluidos única para separar eficiente y selectivamente las microvesículas derivadas de tumores (Chen et al.).

Las microvesículas aisladas de un fluido corporal pueden ser enriquecidas por aquellas que se originan de un tipo celular específico, por ejemplo, células del pulmón, páncreas, estómago, intestino, vejiga, riñón, ovario, testículo, piel, colorrectal, mama, próstata, cerebro, esófago, hígado, placenta, feto. Debido a que las microvesículas a menudo llevan moléculas de superficie, tales como antígenos de sus células del donante, las moléculas de superficie se pueden utilizar para identificar, aislar y/o enriquecer las microvesículas de un tipo de célula donante específica (Al-Nedawi et al., 2008; Taylor y Gercel-Taylor, 2008). De esta manera, las microvesículas que originan poblaciones de células distintas se pueden analizar por su contenido de ácido nucleico. Por ejemplo, las microvesículas de tumor (maligno y no maligno) llevan los antígenos de superficie asociados a tumores y se pueden detectar, aislar y/o enriquecer a través de estos antígenos específicos de superficie asociados a tumores. En un ejemplo, el antígeno de superficie es moléculas de adhesión a célula epitelial (EpCAM), que es específico para carcinomas de microvesículas de pulmón, colorrectal, de mama, de próstata, cabeza y cuello, y origen hepático, pero no de origen de células hematológicas (Balzar et al., 1999; Went et al., 2004). En otro ejemplo, el antígeno de superficie CD24, es una glicoproteína específica de microvesículas de orina (Keller et al., 2007). En otro ejemplo, se selecciona el antígeno de superficie de un grupo de moléculas tales como CD70, antígeno carcinoembrionario (CEA), EGFR, EGFRvIII y otras variantes, ligando Fas, TRAIL, receptor de transferrina p38.5, p97 y Hsp72. Adicionalmente, las microvesículas específicas del tumor se pueden caracterizar por la falta de marcadores de superficie, tales como CD80 y CD86.

El aislamiento de microvesículas de tipos celulares específicos se puede lograr, por ejemplo, al utilizar anticuerpos, aptámeros, análogos de aptámero o polímeros impresos molecularmente específicos para un antígeno de superficie deseada. El antígeno de superficie puede ser específico para un tipo de cáncer. El antígeno de superficie puede ser específico para un tipo de célula que no es necesariamente cancerosa. Un ejemplo de un método de separación de microvesículas basado en antígeno de superficie celular se proporciona en la Patente

Estadounidense No. 7,198,923. Como se describe en, por ejemplo, las Patentes Estadounidense Nos. 5,840,867 y 5,582,981, W0/2003/050290 y una publicación por Johnson et al. (Johnson et al., 2008), los aptámeros y sus análogos se unen específicamente a moléculas de superficie y se pueden utilizar como una herramienta de separación para la recuperación de microvesículas específicas a tipo de células. Los polímeros de huella molecular también reconocen específicamente moléculas de superficie como se describe en, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,525,154, 7,332,553 y 7,384,589 y una publicación de Bossi et al. (Bossi et al., 2007) y son una herramienta para recuperar y aislar microvesículas específicas al tipo de célula.

En los casos en los que el derivado biológico destinado es una vesícula de membrana tal como una microvesícula, se realiza una etapa de eliminación de ácidos nucleicos que no están dentro de la microvesícula periódicamente. Los métodos de eliminación de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, para eliminar dichos ácidos nucleicos de una muestra, se puede llevar a cabo una etapa de digestión enzimática. Dichas enzimas pueden ser un tipo de ribonucleasa que cataliza la digestión enzimática de ácidos ribonucleicos o un tipo de desoxirribonucleasa que cataliza la digestión enzimática de ácidos desoxirribonucleicos.

Los métodos de extracción de ácidos nucleicos novedosos pueden incluir una etapa de eliminación o mitigación de los factores adversos que impiden la extracción de ácido nucleico de alta calidad a partir de una muestra biológica. Dichos factores adversos son heterogéneos en que diferentes muestras biológicas pueden contener diversas especies de estos factores adversos. En algunas muestras biológicas, los factores tales como el ADN de extra-microvesícula excesiva pueden afectar la calidad de las extracciones de ácido nucleico a partir de dichas muestras y contaminan el ADN extraído de dentro de las microvesículas. En otras muestras, los factores tales como RNasa endógena excesiva pueden afectar la calidad de las extracciones de ácidos nucleicos a partir de dichas muestras. Muchos agentes y métodos se pueden utilizar para eliminar estos factores adversos. Estos métodos y agentes se denominan colectivamente como una "operación potenciación de extracción."

En algunos casos, la operación potenciación de extracción puede implicar la adición de agentes potenciadores extracción de ácido nucleico a la muestra biológica o derivado. Para eliminar los factores adversos como RNasa endógena, dichos agentes potenciadores de extracción como se definen aquí pueden incluir, pero no se limitan a, un inhibidor de RNasa disponible comercialmente, tales como Superase-In (Arnbion Inc.), RNaseIN (Promega Corp.), u otro agentes que funcionan de una manera similar; una proteasa; un agente reductor; un sustrato de señuelo tal como un ARN sintético, un receptor soluble que puede unirse a RNasa; un pequeño ARN de interferencia (siEWA); una molécula de ARN, tal como un anticuerpo anti-ARN, o una proteína chaperona de unión; una sustancia RNasa desnaturizante, tal como una solución de alta osmolaridad, un detergente, o una combinación de los mismos. Estos agentes potenciadores pueden ejercer sus funciones en diversas formas, por ejemplo, pero no limitadas a, a través de inhibición de actividad de RNasa (por ejemplo, inhibidores de RNasa), a través de una degradación ubicua de proteínas (por ejemplo, proteasas), o por medio de una proteína chaperona (por ejemplo, una proteína de unión al ARN) que se une y protege los ARN. En todos los casos, dichos agentes potenciadores de extracción eliminan o mitigan algunos o todos los factores adversos en la muestra biológica que de otro modo previenen o interfieren con la extracción de ácidos nucleicos de alta calidad la muestra biológica.

En otros casos, la operación potenciación de extracción puede implicar la realización de una o más etapas del proceso. Dichos procesos incluyen el lavado extenso o sustancialmente completo de los componentes que contienen ácidos nucleicos de la muestra, tales como microvesículas; separación por tamaños de RNasas de la muestra biológica; desnaturización de las proteínas en la muestra biológica mediante diversas técnicas que incluyen, pero no se limitan a, generar una condición de pH particular, una condición de temperatura, (por ejemplo, mantenimiento de una temperatura reducida o inferior), ciclos de congelado/descongelado, y combinaciones de los mismos.

Una sorprendente manifestación de la utilización de operaciones de mejora de extracción, como se describe en el presente documento, es la capacidad de detectar en una extracción de microvesículas de ácidos nucleicos, la existencia de cantidades significativas de ARN ribosómico (rARN). No se conocen estudios previos que hayan demostrado la detección de rARN 18S y 28S en extracciones de ácido nucleico de microvesículas. Por el contrario, los estudios previos sugirieron que poco o ningún rARN está presente en los extractos de ácido nucleico de microvesículas (Skog et al., 2008; Taylor y Gercel-Taylor, 2008; Valadi et al., 2007).

La realización de una operación de aumento de extracción mejorará la calidad del ARN extraído en términos de cifras de integridad del ARN (RIN). Diseñado por Agilent Technologies (<http://www.chem.agilent.com/en-us/products/i-on-achip/pages/gp14975.aspx>, acceso en julio 15,2010), el cifras de integridad del ARN (RIN) es el producto de una herramienta de software diseñada para estimar la integridad de las muestras de ARN total. El software asigna automáticamente unas cifras de integridad de una muestra total de ARN eucariota. Utilizando esta herramienta, la integridad de la muestra no se determina por la relación de las bandas ribosómicas 18s y 28s, sino por toda la traza electroforética de la muestra de ARN. Esto incluye la presencia o ausencia de productos de degradación. El RIN asignado es independiente de la concentración de la muestra, instrumento, y analista, y puede servir como un estándar para la integridad del ARN.

La realización de una operación potenciación de extracción mejorará la cantidad o rendimiento del ácido nucleico extraído. Por ejemplo, utilizando una operación potenciación de extracción, como se describe aquí, se puede

obtener un rendimiento de ácido nucleico de más de o igual a 50 pg/ml de 20 ml de una muestra biológica baja en proteínas, tales como orina. Alternativamente, se puede obtener un rendimiento de ácido nucleico de más de o igual a 50 pg/ml de 1 ml de una muestra biológica alta en proteínas, tal como suero o plasma.

5 Las extracciones de ácido nucleico novedosas de alta calidad obtenidas por los métodos descritos aquí pueden mostrar una combinación de detección de rARN 18S y 28S, preferiblemente en una relación de aproximadamente 1: 1 a aproximadamente 1: 2; y más preferiblemente, de aproximadamente 1: 2; unas cifras de integridad del ARN de más de o igual a 5 para una muestra biológica baja en proteínas, o mayor que o igual a 3 para una alta proteína de la muestra biológica; y un rendimiento de ácido nucleico de más de o igual a 50 pg/ml de 20 ml de una muestra biológica baja en proteínas o 1 ml de una muestra biológica alta en proteínas.

10 Las extracciones de ARN de alta calidad son muy deseables debido a que la degradación del ARN puede afectar seriamente la evaluación en dirección 3' del ARN extraído, como en la expresión génica y el análisis de mARN, así como el análisis de ARN no codificante tal como pequeños ARN y micro ARN. Los métodos novedosos descritos en este documento permiten extraer ácidos nucleicos de alta calidad de una muestra biológica tal como microvesículas de tal manera que se puede llevar a cabo un análisis preciso de expresión génica y el nivel de mutación dentro de los exosomas. Por ejemplo, cuando se utilizan mayores concentraciones de proteasa (5X, 10X) como un agente potenciador de la extracción, la cantidad e integridad del ARN aislado de microvesículas urinaria se aumenta significativamente.

15 También se proporcionan métodos de extracción de pequeños ARN de alta calidad de una muestra biológica tal como orina. El ARN pequeño, tal como los miARN son particularmente susceptibles a degradación y pérdida durante el proceso de extracción de ácidos nucleicos. En los métodos novedosos aquí descritos, se utiliza una alta concentración de proteasa para eliminar o mitigar los factores adversos que impiden la extracción de alta calidad de los ARN pequeños. Un método para extraer ácido nucleico, en particular ARN pequeños, pueden utilizar proteasa 25X y 50X como agente potenciador de extracción y es capaz de obtener un aumento significativo de cantidades de ARN pequeño. Tal como se utiliza aquí, las expresiones tales como 5X, 10X, 25X y 50X significan 5 veces, 10 veces, etc. El nivel de actividad de proteasa utiliza o recomienda actualmente los equipos de extracción de ácido nucleico disponibles comercialmente, tales como el Kit QIAamp MinElute Virus Spin.

20 Cuando se han eliminado o mitigado los factores adversos que afectan la extracción, las moléculas de ácido nucleico se pueden aislar de una muestra biológica utilizando cualquier número de procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Los expertos seleccionarán un procedimiento de aislamiento especial apropiado para la muestra biológica particular. Ejemplos de métodos para la extracción se proporcionan en la sección de Ejemplos aquí. En algunos casos, con algunas técnicas, también puede ser posible analizar el ácido nucleico sin extracción de la microvesícula.

25 Los ácidos nucleicos, incluyendo ADN y/o ARN, se pueden analizar directamente sin una etapa de amplificación. El análisis directo se puede realizar con diferentes métodos, que incluyen, pero no se limitan a, tecnología de NanoString. La tecnología de NanoString permite la identificación y cuantificación de moléculas objetivo individuales en una muestra biológica uniendo un código de color fluorescente indicador a cada molécula objetivo. Este enfoque es similar al concepto de medición de inventario mediante el escaneo de códigos de barras. Los reporteros se pueden hacer con cientos o incluso miles de códigos diferentes que permiten el análisis altamente multiplexado. La tecnología se describe en una publicación de Geiss et al. (Geiss et al., 2008).

30 Puede ser beneficioso o de otra manera deseable amplificar el ácido nucleico de la microvesícula antes de analizarla. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos se utilizan de forma habitual y generalmente son conocidos en la técnica, muchos ejemplos de los cuales se describen aquí. Si se desea, la amplificación se puede llevar a cabo de tal manera que es cuantitativa. La amplificación cuantitativa permitirá la determinación cuantitativa de las cantidades relativas de los diversos ácidos nucleicos, para generar un perfil como se describe adelante.

35 En una realización, el ácido nucleico extraído es ARN. El ARN preferentemente luego se hace transcripción inversa en el ADN complementario (cADN) antes de amplificación adicional. Dicha transcripción inversa se puede realizar solo o en combinación con una etapa de amplificación. Un ejemplo de un método de combinación de transcripción inversa y etapas de amplificación es la reacción de cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), que se pueden modificar adicionalmente para que sean cuantitativas, por ejemplo, RT-PCR cuantitativa tal como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,639,606.

40 Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen, sin limitación, reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Patente Estadounidense No. 5,219,727) y sus variantes tales como reacción en cadena de polimerasa in situ (Patente Estadounidense No. 5,538,871), reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (patente Estadounidense No. 5,219,727), reacción en cadena de polimerasa anidada (patente Estadounidense No. 5,556,773), replicación de secuencia auto-sostenida y sus variantes (Guatelli et al., 1990), sistema de amplificación transcripcional y sus variantes (Kwoh et al., 1989), replicasa Qb y sus variantes (Miele et al., 1983), PCR frío (Li et al., 2008), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido por la detección de moléculas amplificadas utilizando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en el arte. Especialmente útiles son aquellos

esquemas de detección diseñados para la detección de moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas están presentes en números muy bajos.

El análisis de ácidos nucleicos presentes en las microvesículas es cuantitativo y/o cualitativo. Para el análisis cuantitativo, las cantidades (niveles de expresión), ya sea relativa o absoluta, de los ácidos nucleicos específicos de interés dentro de las microvesículas se miden con métodos conocidos en la técnica (descrito luego). Para el análisis cualitativo, las especies de ácidos nucleicos específicos de interés dentro de las microvesículas, ya sea de tipo natural o variantes, se identifican con los métodos conocidos en la técnica.

También se describe una composición de materia novedosa, una extracción de ácidos nucleicos a partir de microvesículas en el que el rARN 18S y 28S es detectable en la extracción. Dichas extracciones de ácido nucleico se pueden lograr utilizando el método de extracción de ácido nucleico novedoso descrito en el presente documento. Una extracción de ácidos nucleicos de alta calidad de microvesículas en una muestra biológica es deseable en muchos casos. En algunos casos, una muestra de tejido no es fácilmente accesible. Por ejemplo, una muestra de tumor cerebral no puede generalmente obtenerse sin cirugía cerebral. En su lugar, una muestra de microvesículas a partir del suero del paciente con tumor cerebral es fácilmente accesible. Con el fin de analizar los ácidos nucleicos en las células tumorales del cerebro, es más fácil analizar los ácidos nucleicos en microvesículas de suero que son secretadas por las células tumorales del cerebro. Por lo tanto, en los casos en que se utilizan ácidos nucleicos en microvesículas secretadas por las células del tejido para sustituir los ácidos nucleicos de las células del tejido, es deseable obtener ácidos nucleicos de alta calidad que, contienen como los obtenidos de las células del tejido directamente controles de calidad detectable, tal como rARN 18s y 28S. En otros casos, son deseables los ARN pequeños de alta calidad. Las extracciones de ácido nucleico descritas aquí contienen dichos ARN pequeños de alta calidad junto con rARN 18s y 28S. Dichos ARN pequeños de alta calidad son importantes para la evaluación precisa de los ácidos nucleicos para diversos fines, por ejemplo, el nivel de expresión de un miARN particular.

También se describe un perfil nuevo, de alta calidad de los ácidos nucleicos de microvesículas en una muestra biológica. Dichos perfiles se generan mediante el análisis de extracciones de ácido nucleico que contienen rARN 18S y 28S. Dichos perfiles se pueden obtener con los métodos novedosos descritos en este documento. Los perfiles de ácidos nucleicos de alta calidad son muy deseables para muchos usos, tales como para uso como un biomarcador para una afección médica o selección de terapia. Es deseable que dichos perfiles sean consistentes entre muestras. Esta coherencia difícilmente se puede lograr sin extracciones de ácido nucleicos de alta calidad. Un perfil de los ácidos nucleicos se puede obtener mediante el análisis de ácidos nucleicos en microvesículas que son secretadas por las células de origen. Dichas microvesículas se pueden aislar de una muestra biológica de fácil acceso, por ejemplo, orina, suero o plasma. Dichos perfiles de ácidos nucleicos incluyen muchos ARN pequeños, ARN mensajero, ARN microARN, no codificantes o una combinación de los mismos. Dichos perfiles de ácidos nucleicos se pueden combinar con otros biomarcadores para lograr mayor precisión de determinados resultados.

El perfil de los ácidos nucleicos, por ejemplo puede ser una colección de aberraciones genéticas, que se utiliza aquí para referirse a cantidades de ácido nucleico, así como variantes de ácidos nucleicos dentro de las microvesículas. Específicamente, las aberraciones genéticas incluyen, sin limitación, la sobreexpresión de un gen (por ejemplo, oncogenes) o un panel de genes, bajo la expresión de un gen (por ejemplo, genes supresores de tumores tales como p53 o RB) o un panel de genes, producción alternativa de variantes de corte y empalme de un gen o un panel de genes, número de copias de genes variantes de (CNV) (ADN doble, por ejemplo ADN) (Hahn, 1993), modificaciones de ácidos nucleicos (por ejemplo, metilación, acetilación y fosforilaciones), polimorfismos de nucleótido único (SNPs), reordenamientos cromosómicos (por ejemplo, inversiones, supresiones y duplicaciones), y mutaciones (inserciones, supresiones, duplicaciones, sin sentido, sin sentido, sinónimas o cualquier otro cambio de nucleótido) de un gen o de un grupo de genes, que las mutaciones, en muchos casos, en última instancia, afectan la actividad y función de los productos génicos, que conducen a variantes de empalme alternativo de la transcripción y/o cambios de nivel de expresión génica.

La determinación de dichas aberraciones genéticas puede ser realizada por una variedad de técnicas conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, los niveles de expresión de ácidos nucleicos, variantes de empalme y corte alterativas, reordenamiento cromosómico y número de copias de genes se pueden determinar por análisis de micromatriz (Patentes Estadounidenses 6,913,879, 7,364,848,7,378,245, 6,893,837 y 6,004,755) y PCR cuantitativa. En particular, cambios en número de copias se pueden detectar con el ensayo de genotipado del genoma Illumina Infinium II o micromatriz Agilent Genoma Humano CGH (Steemers et al., 2006). Las modificaciones de ácido nucleico se pueden ensayar por o métodos descritos en, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 7,186,512 y publicación W0/2003/023065y pueden ser determinadas por Panel de cáncer OMA003 Illumina metilación del ADN. Se pueden detectar SNPs y mutaciones por hibridación con sondas específicas de alelo, la detección de mutaciones enzimática, escisión química de heterodúplex no coincidentes (Cotton et al., 1988), escisión de ribonucleasa de bases mal emparejadas (Myers et al., 1985), espectrometría de masas (patentes Estadounidenses 6,994,960,7,074,563, y 7,198,893), secuenciación de ácidos nucleicos, polimorfismo de conformación de cadena única (SSCP) (Orita et al, 1989), electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) (Fischer and Lerman, 1979a; Fischer y Lerman, 1979b ), electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE) (Fischer y Lerman, 1979a; Fischer y Lerman, 1979b), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (KAN y Dozy, 1978a; Kan y Dozy, 1978b), ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) , PCR específica de alelo (ASPCR) (Patente US No. 5,639,61 I), reacción en cadena de

ligación (LCR) y Estadounidense variantes (Abravaya et al., 1995; Landegren et al., 1988; Nakazawa et al, 1994), análisis de heterodúplex-citometría de flujo (W0/2006/113590) y combinaciones /modificaciones de los mismos. En particular, los niveles de expresión de genes pueden ser determinados por el análisis en serie de la expresión génica técnica (SAGE) (Velculescu et al., 1995). En general, los métodos para el análisis de aberraciones genéticas se presentan en numerosas publicaciones, no se limitan a los que se citan en el presente documento, y están disponibles para los profesionales cualificados. El método de análisis adecuado dependerá de las metas específicas del análisis, la historia de afección del paciente, y el cáncer específico (s), enfermedades u otras afecciones médicas que se pueden detectar, monitorizar o tratar.

Se debe entender que esta invención no se limita a las metodologías particulares, protocolos y reactivos, descritos en este documento, que pueden variar. La terminología utilizada aquí tiene el propósito de solo describir realizaciones particulares, y no se pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Ejemplos de la materia objeto descritos actualmente se establecen adelante. Otras características, objetos y ventajas de la materia objeto actualmente descrito serán evidentes a partir de la descripción detallada, figuras, ejemplos y reivindicaciones. Los métodos, dispositivos y materiales sustancialmente similares o equivalentes a los aquí descritos pueden ser utilizados en la práctica o ensayo de la materia actualmente descrita. Los métodos ejemplares, dispositivos, usos y materiales se describen ahora.

#### Microvesículas en orina

##### Ejemplo 1: células renales contienen cuerpos multivesiculares

Para examinar si las células renales arrojan microvesículas, se utiliza microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar si las células renales contienen cuerpos multivesiculares que pueden dar lugar a microvesículas. Riñón de rata se regula por perfusión intravascular con 2,0% glutaraldehído en regulador cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,4 (Electron Microscopy Sciences, PA), y los cortes de riñón se fijan más durante la noche a 4° C. Los cortes de muestra se enjuagan en regulador de cacodilato de sodio 0,1 M, después se fijan en 1.0% de tetróxido de osmio en regulador de cacodilato durante 1 h a temperatura ambiente, se enjuaga en regulador de nuevo, luego se enjuaga en agua destilada (dH<sub>2</sub>O) y se tiñen, en bloquean, en una solución acuosa de 2,0% de acetato de uranilo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se enjuagan en agua destilada y se deshidratan a través de una serie graduada de etanol al 100%. Las muestras se infiltran con resina Epon (Ted Pella, CA) por inmersión durante la noche en una solución 1: 1 de Epon: etanol. Al siguiente día las muestras se colocan en Epon fresco por varias horas y se incorpora en Epon durante la noche a 60° C. Se cortan secciones finas en un ultramicrotomo Reichert Ultracut E, se recogen en rejillas de Formvar recubiertas, se tiñen con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se examinan en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 10J 1 JEM a 80 kv. Las imágenes se recolectan a través de sistema de imagen digital AMT (Advanced Microscopy Techniques, MA). Como se muestra en la Figura 1, las imágenes del microscopio electrónico de transmisión (TEM) de MVBs se observan en las células de tejido renal de ratas. Los cuerpos multivesiculares (MVB) se pueden identificar en las diversas regiones de la nefrona y conductos colectores, incluyendo podocitos, túbulo proximal, extremidad descendente delgada, miembro ascendente grueso, recolectar célula principal del conducto colector biomarcador y recolectar células intercaladas del conducto. Esto demuestra que los exosomas de hecho se pueden liberar de varias regiones de la nefrona, así como ambas células intercaladas y principales del túbulo colector.

##### Ejemplo 2: Microvesículas que existen en la orina

Para examinar las microvesículas en sí mismas, examinamos microvesículas de orina humanas por TEM. La orina humana se obtiene bajo los lineamientos del IRB aprobados del Hospital General de Massachusetts. La orina luego se procesa por un método que consta de tres pasos: centrifugación de orina a 300 g durante 10 min a 4° C, centrifugación del sobrenadante a 17,000 g durante 20 min a 4° C, y filtración del sobrenadante a través de un filtro de 0,8 µm (unidad de filtro de membrana de nitrato de celulosa, Nalgene, NY). Alternativamente, la orina que se procesa mediante una filtración de una sola etapa directamente a través de un filtro de 0.8 µm sin ninguna etapa previa a la centrifugación. En cualquier caso, el filtrado luego se somete a ultracentrifugación en 118,00g durante 70 min a 4° C, se retira el sobrenadante y el sedimento que contiene microvesícula se lava en PBS y re-sedimenta a 1 18,000 g durante 70 min a 4° C.

En lugar de ultracentrifugación, también se utiliza la concentración de filtración para aislar microvesículas de las muestras preprocesadas. El concentrador de filtrado (100kDa MWCO) (Millipore, MA) se prepara de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El preprocesado filtrado se agrega al concentrador de filtración y se centrifuga a 4,000g durante 4 min a temperatura ambiente. Se incluye una etapa de lavado de PBS de 15 ml.

Los sedimentos de microvesículas se fijan, 1: 1 con 4% de paraformaldehído en dH<sub>2</sub>O. Diez (10) gotas µl se pipetea en redes de oro de malla 200 recubiertas con formvar y extraen después de un minuto. Las muestras se enjuagan 2 veces con gotas de dH<sub>2</sub>O. Se aplica ácido fosfotúngstico 2,0% (PTA) acuoso (10 µl) durante 10 s, se extrae y se lava una vez con dH<sub>2</sub>O. Las muestras se examinan en un microscopio electrónico de transmisión JEOL

## ES 2 547 715 T3

JEM 1011 a 80 kv. Las imágenes se recolectan a través de un sistema de imagen digital AMT (Advanced Microscopy Techniques, MA). Como se muestra en la Figura 2, el sedimento se enriquece con microvesículas. Las microvesículas algunas veces se agregan juntas o permanecen singulares en la imagen TEM.

Métodos mejorados para extracción de ácido nucleico de una muestra biológica

5 Ejemplo 3: La ultracentrifugación es reemplazable con concentrador de filtración con fines de aislamiento microvesicular

Mostramos aquí que los concentradores de filtración pueden producir microvesículas viables para la extracción de ARN similar al método de ultracentrifugación. Procesamos previamente 75 ml de orina mediante centrifugación a 300 g durante 10 minutos a 4° C y 17.000 g durante 20 minutos a 4° C, y luego se filtra a través de un filtro de 0,8 μm tal como se detalla en el Ejemplo 2. Luego, las microvesículas se aíslan a través de un concentrador de filtración 100 kDa MWCO (Millipore, MA) y a través de ultracentrifugación con la digestión de RNasa, respectivamente, y con y sin digestión con DNasa para eliminar la contaminación de ácido nucleico extramicrovesicular. Como se muestra en las figuras 3 y 4, el método de método de ultracentrifugación y la concentración por filtración producen concentraciones de ARN similares de 75 ml de muestras de orina con ultracentrifugación (Figura 4) a 410±28 pg/μl, y el concentrador de filtración (Figura 3) a 381±47 pg/μl (media ± DE). No hay diferencia estadísticamente significativa entre los dos rendimientos. Estos datos demuestran que el uso de concentradores de filtración es un método fiable para el aislamiento de microvesículas de orina para el análisis de ARN.

20 Ejemplo 4: Procesamiento previo de la muestra con sólo una etapa de filtración previa 0.8 μm es suficiente para el propósito del aislamiento de microvesícula

Adicionalmente, se encuentra que las etapas de centrifugación a baja velocidad a 300 g y 17,000 g podrían ser eliminadas porque el procesamiento previo de orina con sólo una etapa de filtración previa de 0,8 μm es tan eficaz como los métodos que incluye las etapas centrifugación a baja velocidad. Como se muestra en las figuras 5 y 6, el perfil de ácidos nucleicos utilizando un método de centrifugación a baja velocidad acoplado con filtración previa de 0,8 μm (A) es el mismo que el perfil utilizando un método de sólo filtración previa 0,8 μm (B).

25 Ejemplo 5: Extracción de ácidos nucleicos y microvesículas de orina con métodos que incluyen la eliminación o mitigación de los factores adversos

Utilizamos un método mejorado para la extracción de ácidos nucleicos de microvesículas. En este método, hemos eliminado los factores adversos para extracciones de ácidos nucleicos de alta calidad antes de romper las membranas microvesiculares. Como se muestra en la Figura 7, las muestras 100 de orina se procesan previamente al filtrar a través de una membrana 110 de filtro 0.8 μm. Las microvesículas en los filtrados luego se aíslan ya sea por ultracentrifugación o mediante concentración 120 de filtración, con detalles similares a los descritos en el Ejemplo 2. Las microvesículas aisladas se someten entonces a digestión de RNasa y/o DNasa para eliminar los ácidos nucleicos no contenidos dentro de las microvesículas 130. Específicamente, las microvesículas se resuspenden en 1 μl/mL se RNasa A (DNasa libre y proteasa) (Fermentas, MD) en PBS y se incuban durante 1 hora a 37° C. Las muestras se vuelven a sedimentar a 118,000g durante 70 min en PBS. Para la digestión de DNasa 1 el sedimento se resuspende en 500 μl de PBS y ADNasa 1 (libre de RNasa) (Qiagen, CA) diluido en regulador RDD (de acuerdo con instrucciones del fabricante) y se incuban a temperatura ambiente durante 10 min. Las muestras se vuelven a sedimentar a 118,000g durante 70 min en PBS. Para la digestión de RNasa A y DNasa 1 de microvesículas aisladas a través de concentradores de filtración, se utiliza la misma concentración de RNasa y DNasa y las incubaciones se llevan a cabo en los concentradores de filtración. Luego, se realiza una etapa 140 de mejora de extracción, por ejemplo, tres etapas de lavado/resuspensión con 15 ml de PBS solo, o junto con un tratamiento con proteasas. Después se aíslan las microvesículas, se digieren con las nucleasas y se tratan con la proteasa, los ácidos nucleicos 150. La extracción de ARN se realiza utilizando el equipo RNeasy Micro (Qiagen, CA) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utiliza 350 μl de regulador RLT (betamercaptoetanol con 10 μl por ml de RLT) para lisar exosomas y 16 μl de agua libre de nucleasa se utiliza para elución. El equipo RNeasy Micro Plus (Qiagen, CA) está diseñado para eliminar el ADN genómico (gDNA) y se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluye en 16 μl de agua libre de nucleasa. Para aislamiento de ARN pequeño utilizando el equipo RNeasy Micro o equipo RNeasy Micro Plus, el método de aislamiento de los genes miARN se sigue de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN aislado se analiza 160 en un chip de ARN Pico 6000 (Agilent, CA) utilizando un Agilent Bioanalyzer (Agilent, CA), que genera un perfil electroforético y que corresponde al 'seudogel' de la muestra.

Como se muestra en las figuras 8 y 9, la calidad (en términos de rendimiento e integridad) de extracción de ARN de microvesículas de orina aumenta a medida que más proteasa se utiliza para tratar microvesículas antes de romper la membrana de las microvesículas. En la Figura 8, los ácidos nucleicos de microvesículas en 20 ml de orina se extraen mediante el método anteriormente mejorado, excepto que la extracción de ARN se realiza utilizando el equipo de giro Qiagen MinElute virus Qiamp. La muestra de orina se concentra con la concentración de filtración y se eluye en 200 μl de PBS. Aquí, definimos la proteasa 1X como 0.027 AU; proteasa 5X como 0.135 UA; proteasa 10X como 0.27 UA; proteasa 25X como 0.675 AU; y 50X como 1.35 UA. Se observan picos de rARN

18S y 28S de mayor integridad cuando la concentración de proteasa se aumenta 5X de (A) a 10X (B). Del mismo modo, como se muestra en la Figura 9, a concentraciones más altas de la proteasa, 25X (A) y 50X (B), se observa rARN 18S y 28S de mayor integridad, además aumento en los niveles de miARN pequeño. Estos datos sugieren que la adición de proteasa puede aumentar el rendimiento y la integridad de rARN 18S y 28S, así como ARN pequeño y de microARN. Sospechamos que el efecto de la proteasa puede ser debido a su capacidad para digerir RNasas y otros factores inhibitorios.

La adición de una etapa de lavado de microvesículas varias veces también mejora dramáticamente la calidad de los ácidos nucleicos extraídos de microvesículas de orina. La etapa de lavado puede eliminar eficazmente los factores adversos que impiden la extracción de ácidos nucleicos de microvesículas de orina de alta calidad. Las muestras de orina de 20 ml cada una se utilizan para cuatro grupos de pruebas de extracción de ácidos nucleicos. Siguiendo el procedimiento anterior, excepto con algunas modificaciones. Para el grupo 1, las microvesículas aisladas se utilizan directamente para la extracción de ácidos nucleicos sin etapas intermedias. Para el grupo 2, las microvesículas se tratan con inhibidores de RNasa antes de extracción de ácido nucleico. Para el grupo 3, las microvesículas se lavan sin ningún tratamiento inhibitorio de RNasa antes de extracción de ácidos nucleicos. Para el grupo 4, las microvesículas se lavan y se tratan con inhibidores de RNasa. Como se muestra en la Figura 38, para el grupo 1 de pruebas, la calidad de los ácidos nucleicos extraídos es muy pobre con RIN de  $3.63 \pm 2.3$  y la concentración de ARN de  $101.3 \pm 27.6$  pg/ $\mu$ l. Para el grupo 2 pruebas (Figura 39), la calidad de los ácidos nucleicos extraídos es más o menos similar a aquella en el grupo 1 de pruebas con RIN de 1.83 y 2.2 y la concentración de ARN de  $101.6 \pm 88$  pg/ $\mu$ l. Para el grupo 3 pruebas (Figura 40), la calidad de los ácidos nucleicos extraídos se mejora dramáticamente con RIN de  $9.2 \pm 0.0$  y la concentración de ARN de  $347.7 \pm 297.7$  pg/ $\mu$ l. Para el grupo 4 de pruebas (Figura 41), la calidad de los ácidos nucleicos extraídos es similar a la del grupo 3 con RIN de  $7.43 \pm 0.2$  y la concentración de ARN de  $346.3 \pm 32.7$  pg/ $\mu$ l. Estos datos muestran que, sin etapas de lavado, la calidad de extracción de microvesículas son inconsistentes, con una variación relativamente más alta que aquellas extracciones donde las microvesículas se habían lavados antes de la extracción de ácidos nucleicos.

Ejemplo 6: Uso de inhibidores de RNasa para extracción de ácidos nucleicos a partir de microvesículas de suero

Con el método mejorado anteriormente, también se pueden obtener extracciones de ácidos nucleicos de alta calidad de microvesículas de suero. Aquí, se obtiene el suero de melanoma y sueros normales del paciente y utilizando cóctel inhibitorio de RNasa SUPERase-In™ (Ambion, Inc.) para el tratamiento de sedimento de microvesículas por resuspensión. En una tanda de pruebas, aislamos microvesículas de cuatro duplicados de muestras de suero 1 ml de melanoma y se tratan los sedimentos de microvesículas con 1.6 unidades SUPERase-In/ $\mu$ l a una concentración final. El método de aislamiento de microvesícula es ultracentrifugación y los sedimentos de microvesículas se tratan con DNasa durante 20 minutos a temperatura ambiente. Como se muestra en las Figuras 10-13, la calidad de la extracción de ARN de las cuatro muestras de suero de melanoma es baja e inconsistente, con rendimiento de ARN de 543pg/ $\mu$ l, 607 pg/ $\mu$ l, 1.084 pg/ $\mu$ l, 1,090 pg/ $\mu$ l, e integridad del ARN evaluado por la relación de 28s/28s que es 1.7, 1.8, 1.3 y 0.6, respectivamente. En otra tanda de pruebas, aislamos microvesículas de dos duplicados de muestras de suero 1 ml de melanoma y tratan los sedimentos de microvesículas con 3.2 unidades de Superase-In  $\mu$ /l a una concentración final. Como se muestra en las Figuras 14 y 15, la calidad de la extracción de ARN de las dos muestras de suero melanoma tratadas con 3.2 unidades de Superase-In/ $\mu$ l es generalmente mejor que la calidad de extracción de ARN de aquellos tratados con 1.6 unidades de SUPERase-In/ $\mu$ l. El rendimiento de ARN para las dos muestras de melanoma en suero es 3433 pg/ $\mu$ l y 781 pg/ $\mu$ l y la relación 28S/18S es de 1,4 y 1 S, respectivamente.

Adicionalmente, hemos probado cuatro duplicados de 1 ml de muestras de suero normales en 1.6 unidades SUPERase-In/ $\mu$ l y 2 duplicados de 1 ml de muestras de suero normales en 3.2 SUPERase-In/ $\mu$ l. Como se muestra en las Figuras 16-19, la calidad de extracción de ARN a 1.6 unidades de SUPERase-In/ $\mu$ l es bajo rendimiento de ARN siendo 995, 125 pg/ $\mu$ l 1027 pg/ $\mu$ l y 1206 pg/ $\mu$ l, y siendo la relación 28S/18S 1.3, 1.6, 1.6, 1.8, respectivamente. En contraste, como se muestra en las Figuras 20 y 21, la calidad de la extracción de ARN en 3.2 unidades de SUPERase-In/ $\mu$ l aumenta con el rendimiento de ARN de 579 y 952 pg/ $\mu$ l, y la relación 28S/18S siendo 1.6 y 2.3, respectivamente.

Ejemplo 7 Uso de agentes potenciadores de extracción para extracción de ácido nucleico de una muestra biológica

En los Ejemplos 3 y 4, los resultados de las pruebas sugieren que el tratamiento con potenciadores de extracción puede aumentar la calidad de la extracción de ARN a partir de microvesículas. Se espera que dichos potenciadores de extracción tengan efectos similares en otras muestras biológicas. Como se muestra en la Figura 22, un método novedoso de extracción de ácidos nucleicos requiere una etapa de practicar una operación potenciación en la extracción de la muestra biológica. Dicho método se puede ejemplificar en el siguiente experimento de extracción de ácidos nucleicos concebido. Un médico le receta una prueba de un biomarcador del tumor de un paciente. A la sangre 5 ml se extrae entonces del paciente. La muestra 200 de sangre veces se procesa previamente para obtener el suero sanguíneo. Luego se realiza una operación 210 de mejora, por ejemplo, una cantidad apropiada de potenciador de extracción se agrega al suero y la mezcla se incuba durante 30 minutos a 37° C. Los ácidos nucleicos del suero tratado luego, se extraen utilizando métodos de extracción regulares, tales como se detalla en el Ejemplo 5 220 y se analiza utilizando Agilent BioAnalyzer 230. Se espera que dicha extracción produzca ácidos nucleicos de alta calidad de la muestra biológica.

Ácidos nucleicos de Microvesículas de Orina como Biomarcadores

Ejemplo 8: microvesículas de orina se contaminan por libre, extra-microvesícula, ADN celular

Se separa una muestra de orina en dos muestras duplicadas de 25 ml y se aíslan microvesículas de las dos sub-muestras mediante centrifugación diferencial como se detalló anteriormente. En una submuestra, se tratan las microvesículas con DNasa y se extraen los ácidos nucleicos de las microvesículas tratadas como se detalló anteriormente. En otra submuestra, no tratamos las microvesículas con ADNasa y ácidos nucleicos extraídos de las microvesículas no tratadas. Como se muestra en la Figura 23, las microvesículas de orina aisladas contaminadas con ADN no celular, extra-microvesícula libre, el ADN no celular contaminado. Cuando se utiliza equipo RNeasy micro para la extracción de ácido nucleico (Figura 23 A y B), el resultado muestra que se observan más ácidos nucleicos en la muestra sin tratar (A) que la muestra tratada (B) desde el pico en (A) es generalmente más alta que el pico en (B).

En otra prueba, se realiza una prueba similar, excepto que se utilizan muestras de suero en vez de muestras de orina. Como se muestra en la Figura 24, el ADN libre, extra-microvesícula no celular también contamina las microvesículas de suero aisladas. Se observan más ácidos nucleicos en la muestra no tratada con DNasa (A) que la muestra tratada con DNasa (B) ya que el pico en (A) es generalmente más alto que el pico en (B). Del mismo modo, cuando se utiliza el equipo mirVana para la extracción de ácido nucleico, como se muestra en la Figura 23 (C) y (D), el resultado también demuestra que se observan más ácidos nucleicos en la muestra sin tratar (C) que la muestra tratada (D) ya que el pico en (C) es generalmente más alto que el pico en (D). Los ácidos nucleicos adicionales de la muestra no tratada son probables DNasa susceptibles "cuerpos apoptóticos" susceptibles porque la DNasa susceptible "escaleras como cuerpos apoptóticos fueron vistas como se muestra en el pseudogel en la Figura 24 C. En las muestras de orina y suero, la cantidad del ADN de extra-microvesícula, no celular libre varía entre sujetos, pero el tamaño de este ADN está en el intervalo de aproximadamente 25 a 1.500 pares de bases.

Ejemplo 9: Las microvesículas de orina en su mayoría no se contaminan con ARN libre, extramicrovesícula, no celular

Separamos una muestra de orina en dos muestras duplicadas de 25 ml y las microvesículas aisladas de las dos sub-muestras mediante centrifugación diferencial como se detalla anteriormente. En una submuestra, se tratan las microvesículas con RNasa y se extraen ácidos nucleicos de las microvesículas tratadas como se detalla anteriormente. En otra submuestra, no tratamos las microvesículas con RNasa y ácidos nucleicos extraídos de las microvesículas no tratadas. Como se muestra en la Figura 25, casi no hay ARN extra-microvesícula, no celular contaminado de microvesículas aisladas. La curva de la muestra no tratada con RNasa (A) en su mayoría se superpone con la curva de la muestra tratada con RNasa (B), lo que sugiere que no hay extra-microvesícula libre, el ARN no celular asociado con las microvesículas aisladas. Esto se puede deber a la presencia de ribonucleasas en orina.

Ejemplo 10: Los perfiles de ácidos nucleicos son similares en las microvesículas de orina y las células renales medidas por Agilent BioAnalyzer.

Se extraen los ácidos nucleicos de microvesículas de orina y tejidos renales (riñón) y se comparan sus perfiles. El método de extracción de microvesículas de orina de como se detalla en el Ejemplo 5. Las muestras de riñón de rata se procesan a través del equipo RNeasy Mini y el equipo RNeasy Plus. Para determinar la cantidad de ARN pequeño en la muestra de riñón de rata, también se procesan ambos equipos utilizando el método de aislamiento miARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como se muestra en la Figura 26, sus perfiles (A-renales, B-microvesícula) son muy similares incluyendo la presencia e integridad de los picos rARN 18s y 28S. Dichos picos de rARN 18s y 28s no se han visto en microvesículas derivadas de los medios derivados del suero o de cultivo celular como se reportó anteriormente.

Además de las similitudes en los picos de rARN, las microvesículas de orina también contienen perfiles pequeños de ARN similares obtenidos de células renales. Como se muestra en la Figura 27, ambas microvesículas de orina (B) y del tejido renal (A) contiene ARNs pequeños (alrededor de 25-200 pares de bases) y se comparten patrones similares.

Estos datos sugieren que utilizando el método de extracción de ácido nucleico novedoso descrito aquí, los perfiles en microvesículas de orina se pueden utilizar para examinar los perfiles en las células renales de las que se originan las microvesículas.

Ejemplo 11: perfiles de ARN en microvesículas de orina son diferentes de aquellos de la orina completa.

Descubrimos que los perfiles de ARN en microvesículas de orina son diferentes de aquellos de orina completa. Se utiliza 75 ml de muestras de orina duplicadas para las pruebas. Se aísla el ARN de microvesículas de orina al primero procesar previamente por primera la orina por 300 g durante 10 min a 4° C, la centrifugación del sobrenadante a 17,000 g durante 20 min a 4° C, y filtración del sobrenadante a través de un filtro de 0,8 µm

## ES 2 547 715 T3

(unidad de filtro de membrana de nitrato de celulosa, Nalgene, NY), seguido por las etapas como se detalla en el Ejemplo 5. El ARN de orina completa se aísla utilizando el equipo de aislamiento de ARN de orina ZR (Zymo Research, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para extraer el ADN de la muestra procesada Zymo, el ARN eluido se vuelve a suspender en 350 µl de regulador RLT y SE procesa a través del equipo RNeasy Micro Plus, que utiliza DNasa para eliminar el ADN asociado, y se eluye en 16 µl de agua libre de nucleasa.

Como se muestra en la Figura 28, una gran cantidad de ácido nucleico se puede aislar utilizando el equipo de aislamiento de ARN de orina ZR cuando no se utiliza DNasa (A). Sin embargo, el perfil parece amplio y carece de picos de rARN 18S y 28S. Adicionalmente, el perfil cambia significativamente (B) cuando se utiliza DNasa, lo que sugiere la mayor parte del extracto se ADN en la naturaleza. En contraste, como se muestra en la Figura 29, las microvesículas de perfil de ARN de la misma muestra de orina es en general muy diferente del perfil de toda la extracción de orina. En el perfil de microvesículas, hay picos de 18S y 28S. Adicionalmente, el ARN de microvesículas es más abundante de toda la orina. La digestión DNasa de las extracciones microvesículas FIOM no afecta el pico de rARN de manera significativa cuando se compara el perfil sin tratamiento con DNasa (A) para el perfil con tratamiento con DNasa (B). Los perfiles de ARN FIOM los sedimentos de 300g (Figura 30) y los sedimentos de 17,000 g (Figura 31) fueron similares a aquellas de toda la extracción de orina. En ambos de estos perfiles, los picos disminuyen sustancialmente después del tratamiento con DNasa cuando comparamos el perfil sin tratamiento con DNasa (A) con el perfil con tratamiento con DNasa (B). Estos datos sugieren que el ADN es la especie predominante en la extracción, y no los picos rARN 18s y 28S detectables. Por lo tanto, junto con los datos del Ejemplo 10, los perfiles de ADN de microvesículas de orina es más similar a los perfiles de células renales que a los perfiles de orina conjunto. Adicionalmente, la integridad de extracción de ARN de microvesículas es por lo menos 10 veces mejor que la orina completa.

Ejemplo 12: Las microvesículas de orina contienen tanto ARN como ADN.

Se determina si las microvesículas de orina contienen ARN, ADN, o ambos al tratar los primeros sedimentos tanto con RNasa y DNasa para eliminar contaminaciones libres, extra-microvesículas, no celulares seguidas de digestión de RNasa y/o DNasa de ácidos nucleicos dentro de microvesículas durante columna con base en aislamiento de ácidos nucleicos. La digestión de RNasa (B) casi completamente abole el perfil de ácido nucleico (Figura 32) en comparación con aquella sin digestión de RNasa (A). Estos datos sugieren que el ARN representa el ácido nucleico más abundante dentro de microvesículas. Como se muestra en la Figura 33, después de la digestión en columna de las muestras tratadas con RNasa con DNasa (B), el pico sólo se reduce 20s después de digestión adicional DNasa el interior en comparación con el pico de la digestión adicional antes de DNasa (A). Esta reducción demuestra que una pequeña cantidad de material de DNasa digestible estaba presente dentro de microvesículas, probablemente ADN.

Ejemplo 13: Las microvesículas de orina contienen transcritos de ARNm que codifican genes específicos de de varias regiones de la nefrona y el conducto colector.

Como se muestra en el Ejemplo 10, los perfiles de ácidos nucleicos son similares en microvesículas de orina y células renales medidas por Agilent BioAnalyzer. Aquí mostramos adicionalmente que las microvesículas contienen transcripciones de ARNm que codifican genes específicos a diversas regiones de la nefrona y conducto colector. La microvesículas de orina se aíslan de 200 ml de orina de cuatro sujetos humanos (23 a 32 años de edad) y se digieren con ARNasa y ADNasa antes de la lisis de exosoma y extracción de ARN a. detallado en el Ejemplo 5. El ARN extraído se somete a dos rondas de amplificación de mRNA utilizando RiboAmp (Molecular Devices, CA). Para la riboamplificación para la primera ronda de las muestras etapa de transcripción in vitro se incuban a 42° C durante 4 horas y para las segundas las muestras de etapa de transcripción se incuban a 42° C durante 6 horas. El ARN amplificado se desnaturaliza durante 5 minutos a 65° C y se somete a síntesis de primera hebra de cADN como se describe en el protocolo Qiagen Omniscript (Qiagen, CA). Ambos genes GAPDH y beta-actina se identifican en todas las muestras (Figura 34A). Examinamos 15 transcripciones características de las diversas regiones de nefrona y conducto colector (Figura 34B). Estas proteínas y receptores incluidos se implican en diversas enfermedades renales incluyendo podocina del glomérulo, cubilina del túbulo proximal y acuaporina 2 del conducto colector.

Para muestras humanas, los cebadores PCR utilizados son : ACTB UTR, directo 5'-GAAGTCCCTTGCCATCCTAA-3', inverso 5'-GCTATCACCTCCCCTGTGTG-3'; GAPDH EX, directo 5'-ACACCCACTCCTCCACCTTT-3' inverso 5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'; NPHS2 UTR, directo 5'-AACTTGGTTTCAGATGTCCCTTT-3', inverso 5'-CAATGATAGGTGCTTGTAGGAAG-3'; LGALS 1 EX, directo 5'-GGAAGTGTTCAGAGGTGTG-3', inverso 5'-TTGATGGCCTCCAGGTTG-3'; HSPG2 UTR, 5'-AAGGCAGGACTCAGACTGA-3', inverso 5'-ATGGCACTTGAGCTGGATCT-3'; CUBN EX, directo 5'-CAGCTCTCCATCCTCTGGAC-3', inverso 5'-CCGTGCATAATCAGCATGAA-3'; LRP2 EX, directo 5'-CAAATGGAATCTCTTCAAACG-3', inverso 5'-GTCGCAGCAACACTTTCCTT-3'; AQP 1 UTR, directo 5'-TTACGCAGGTATTTAGAAGCAGAG-3', inverso 5'-AGGGAATGGAGAAGAGAGTGTG-3'; CA4 UTR, directo 5'-ATGATGGCTCACTTCTGCAC-3', inverso 5'-TCATGCCTAAAGTCCCACCT-3'; CLCN5 EX, directo 5'-GTGCCTGGTTACACACAACG-3' re verse 5'-AGGATCTTGGTTCGCCATCT-3'; BDKRBI UTR, directo 5'-GTGGTTGCCTTCTGGTCT-3', inverso 5'-ATGAAGTCCCTCCAAAAGCA-3'; CALCR UTR, directo 5'-ATTTTGCCACTGCCTTTCAG-3', inverso 5'-ATTTTCTCTGGGTGCGCTAA-3'; SCNNID UTR, directo 5'-GCGGTGATGTACCCATGCT-3', inverso 5'-CTGAGGTGGCTAGGCTTGA-3'; SLC 12A3 EX, directo 5'-

AGAACAGAGTCAAGTCCCTTCG-3', inverso 5'- TATGGGCAAAGTGATGACGA-3'; AQP2 UTR, directo 5'- GCAGTTCCTGGCATCTCTTG-3', inverso 5'-GCCTTTGTCTTCCCTAACC-3'; ATP6V1B1EX, directo 5'- AGGCAGTAGTTGGGGAGGAG-3', inverso 5'- CGAGCGTTCTCGTAGGG-3'; SLC12A1EX, directo 5'- CAGATGCAGAECTGGAAGCA-3', inversa 5'-GGAAGGCTCAGGACAATGAG-3'. "UTR" se refiere a cebadores designados en el UTR y "EX" se refiere a cebadores designados a través de exones. El protocolo de PCR es 5 min a 94° C; 40 s a 94° C; 30 s a 55° C; 1 min a 65° C durante 30 ciclos; y 68° C durante 4 min. Para muestras de ratón los cebadores utilizados son: AQP2: directo 5'-GCCACCTCCTTGGGATCTATT-3' inverso 5'-TCATCAAACCTTGCCAGTGACAAC-3'; subunidad V-ATPasa B1: directo 5'-CTGGCACTGACCACGGCTGAG-3', inverso 5'-CCAGCCTGTGACTGAGCCCTG-3'. El protocolo de PCR es 5 min a 94° C; 40 S a 94° C, 30 s a 55° C, 1 min a 65° C durante 30 ciclos; y 68° C durante 4 min.

Como se muestra en la Figura 34, el Panel A, las transcripciones de mRNA amplificada RiboAmp de ARNm de beta-actina y GAPDH son fácilmente detectables en el pseudogel generado por BioAnalyzer en microvesículas de orina de los cuatro sujetos humanos. Con fines de aclaración, las seis regiones de nefrona y conducto colector se muestran en la Figura 34, Panel B. Como resultado del análisis de RT-PCR de ARNm de RiboAmped de exosomas urinarios, las siguientes transcripciones en las seis regiones también son fácilmente detectable: región 1 Glomérulo: NPHS2 - podocina, LGALS1 - Galectina-1, y HSPG2 - proteoglicano de sulfato de heparano (Figura 35); región 2 Túbulo próximo: CUBN - cubilina, LRP2 - megalina, AQP 1 - acuaporina 1, CA4 - anhidrasa carbónica4, y CLCN5 - proteína de canal de cloruro 5 (Figura 35); región 3 Extremidad descendente delgada: BDKRBI - bradiquinina B 1 receptor (Figura 36); región 4 Extremidad ascendente medularmente gruesa: CALCR - receptor de calcitonina, y SCNND1 - subunidades de canal de sodio sensible a amilorida delta (Figura 36); y; región 6 conductos colectores: AQP2 - acuaporina 2, ATP6V 1 B 1 - vATPasa B 1 subunidad, y SLC 12A 1 --riñón específica Na-K-Cl symporter (Figura 36).

Por lo tanto, las transcripciones de ARNm de todas las regiones renales examinadas se pueden identificar, lo que sugiere que las microvesículas que contienen ARNm se liberan de todas las regiones de la nefrona y conducto colector, y las microvesículas pueden ser una fuente no invasiva novedosa de biomarcadores de ácido nucleico para las enfermedades renales.

Ejemplo 14: Algunas transcripciones de mRNA dentro de microvesículas de orina son específicas a células renales

Si se utilizan ácidos nucleicos en microvesículas para examinar los genes invasivos no renales en las enfermedades, las transcripciones en microvesículas deben ser específicas a las células renales. Aquí, mostramos que las transcripciones de mRNA son específicas de células renales. Utilizamos ratones transgénicos en el que la subunidad V-ATPasa B 1 está ausente. La ausencia de subunidad V-ATPasa B 1 conduce a acidosis renal en los ratones ((Finberg KE, Wagner CA, Bailey MA, et al., The BI-subunit of the H(+) ATPase is required for maximal urinary acidification. Proc Natl Acad Sci USA 102:13616-13621, 2005).

Todos los experimentos con animales se llevan a cabo de acuerdo con las directrices de ética de animales aprobadas en el Hospital General de Massachusetts. Se ha descrito La subunidad V-ATPasa B1 de subunidades de animales transgénicos (Finberg KE, Wagner CA, Bailey MA, et al. The BI-subunit of the H(+) ATPase is required for maximal urinary acidification. Proc Natl Acad Sci USA 102:13616-13621, 2005). Para la recolección de orina, los animales fueron enjaulados en jaulas metabólicas en grupos de dos (n = 4 animales por grupo) durante un periodo de 72 horas (se puede obtener suficiente ARN al enjaular un animal por jaula, y se recoge la orina para el aislamiento de microvesículas y análisis como se ha descrito anteriormente para la orina humana. Para la extracción del riñón, los animales se anestesian utilizando pentobarbital sódico (Nembutal) (Abbott Laboratories, IL) (65 mg/kg de peso corporal i.p.), y los riñones retiran y se congelan en nitrógeno líquido inmediatamente. Utilizando un pistilo y mortero en un baño de nitrógeno líquido, el riñón congelado se muele, se resuspende en ARNlater (Qiagen, CA) y se almacenan en alícuotas a 1 ml –a 80° C. Para extracción de ARN, una parte de la alícuota se descongela en hielo y se lisan en 50 µl regulador RLT de 350 µl (con 10 µl de beta- mercaptoetanol por ml de RLT). Las muestras de riñón de ratón se procesan a través del equipo RNeasy Mini (Qiagen, CA) con la inclusión de la etapa de digestión de ADN.

Para análisis de PCR en tiempo real, el ARN extraído de microvesículas de orina de ratón se desnaturaliza durante 5 minutos a 65° C y se somete a síntesis de la primera hebra de cADN como se describe en el protocolo Qiagen Sensiscript (Qiagen, MD). Para cebadores de transcripción inversa Sensiscript oligo- dT se utilizan a una concentración final de 1µM (Applied Biosystems, CA). El cADN resultante se utiliza en el equipo de TaqMan PreAmp Master Mix de acuerdo con la guía de fabricación utilizando 14 ciclos de preamplificación (Applied Biosystems, CA). El producto de preamplificación se diluye 1: 20 con regulador 1X TE (Promega, WI) El cADN resultante se utiliza como molde para la PCR en tiempo real de acuerdo con la guía de preamplificación Taqman (Applied Biosystems, CA) se mide la concentración de ARN del riñón de ratón en un SmartSpec 3000 (Bio-Rad, CA) y todas las muestras se diluyen a 90 ng/µl. El ARN de riñón de ratón se desnaturaliza durante 5 minutos a 65° C y se somete a síntesis de la primera hebra de cADN como se describe en el protocolo Qiagen Omniscript (Qiagen, MD). En los cebadores de transcripción de Omniscript inverso oligo-dT se utilizan a una concentración final de 1µM (Applied Biosystems, CA) y 1 µl del cADN resultante se utiliza luego por pozo en tiempo real de reacción PCR subsiguiente. La reacción de PCR en tiempo real se realiza utilizando TaqMan Gene Expression Master Mix y Expression Assays (Número GAPD de ratón 4352339E y ensayo de ratón Atp6vlb2 identificación del Mm0043 1996\_MH) en un Sistema de PCR ABI 7300 en tiempo real (Applied Biosystems, CA).

Se extrae el ARN de tejidos de riñón, así como de microvesículas de orina de ratones transgénicos. Se examina la expresión de mRNA de la subunidad B1 V-ATPasa y acuaporina 2 (AQP2) mediante RT-PCR. Como se muestra en la Figura 37, el Panel A, no se detecta la transcripción de subunidad V-ATPasa B1 en muestras de microvesículas de orina y de riñón de ratones mutantes dobles y muestras de (B1-/-), que es consistente con el hecho de que el gen de la subunidad B1 V-ATPasa se inactiva en estos ratones. En contraste, subunidad transcripción la V-ATPasa B 1 está presente en las muestras de riñón y microvesículas de ratones de tipo natural (BU +/-). El mRNA AQP2 se detecta fácilmente en el riñón y la muestra de microvesícula de ratones con el ratón transgénico B1 o ratones de tipo natural, que se espera debido a la eliminación de la subunidad B1 V-ATPasa no afecta la expresión de AQP2. Adicionalmente, como se muestra en la Figura 37, Panel B, el nivel de expresión de la subunidad B2 V-ATPasa en microvesículas del transgén B1 no es estadísticamente diferente del nivel en microvesículas de los ratones de tipo natural. Esto también es cierto para el nivel de subunidad de expresión de B2 V-ATPasa en células de riñón de ratones transgénicos en comparación con el nivel en células de riñón de los ratones de tipo natural. Por lo tanto, las transcripciones presentes en células de riñón pueden ser detectados en microvesículas de orina segregadas por las células de riñón, y las transcripciones ausente en las células renales no se pueden detectar en las microvesículas de orina secretadas por la célula de riñón. De acuerdo con lo anterior, las transcripciones en microvesículas de orina son específicas de células renales y son biomarcadores no invasivos de transcripciones de células renales.

Ejemplo 15: Las microvesículas de orina contienen transcripciones de ARN no codificantes

Se aíslan microvesículas de orina y los ácidos nucleicos se extraen de acuerdo con el método anterior detallado en el Ejemplo 5. Se realiza una secuenciación profunda de ARN de microvesículas de orina y encontramos que existen áreas al azar en determinados cromosomas que muestran la transcripción extrema. Cuando se trazan el número transcripción frente a la posición en el cromosoma, estas transcripciones aparecen como "Picos". Estas transcripciones se expresan con mayor abundancia en marcadores endógenos conocidos como GAPDH o actina, y por lo general en regiones no codificantes del cromosoma. Los niveles de expresión relativamente altos de estas secuencias de pico sugieren que estas secuencias también pueden cumplir una función importante en la activación de cromosomas y la regulación celular.

Se identifican 29 regiones donde se presentan más de 500 picos. Las 29 regiones se muestran en la Figura 42 y corresponden a las SEQ ID NOS. 1-29. Los picos graficados en estas 29 regiones se muestran en las Figuras 45-73. El análisis de PCR de las secuencias de las transcripciones pico más altamente expresadas demuestran que están realmente presentes dentro de ambas microvesículas de orina humanas y células de riñón humano, lo que sugiere que estas secuencias no son un artefacto de secuenciación de profundidad. Los cebadores utilizados para ampliar las regiones abundantes de pico 10 se muestran en la Figura 43. La PCR se realiza de acuerdo con el siguiente programa: la desnaturalización inicial a 95°C durante 8 minutos; 30 ciclos de tres etapas de desnaturalización a 95° C durante 40 segundos, la hibridación a 55° C durante 30 segundos, y elongación a 65° C durante 1 minuto; elongación final a 68° C durante 5 minutos; y en espera a 4° C antes de su análisis BioAnalyzer de la reacción. Como se muestra en la Figura 44, la amplificación de cada una de estas 10 regiones da resultados positivos utilizando plantillas en ambas microvesículas humanos urinario (A) y células de riñón humano (B), lo que sugiere que estas transcripciones pico están realmente presentes dentro de microvesículas y células de riñón humano.

Estas transcripciones pico abundantes se pueden utilizar para evaluar la calidad de una extracción de ácido nucleico de una muestra biológica. Por ejemplo, la cantidad de cualquiera de las transcripciones de aguja se puede utilizar para evaluar la calidad de los ácidos nucleicos a partir de microvesículas de orina en lugar de marcadores comunes, tales como moléculas de polinucleótido GAPDH o ACTINA. La cantidad de ARN de GAPDH o ACTINA en microvesículas de orina es tan bajo que una etapa de extraamplificación, por ejemplo, un RiboAmp, se requiere para medir su cantidad. En contraste, la cantidad de cualquiera de las transcripciones de pico es tan alta que no es necesaria etapa de extra-amplificación. Por lo tanto, el uso de estas transcripciones pico puede hacer la evaluación de la calidad extracción de ácidos nucleicos más eficiente y más simple. Por lo tanto, se describe un nuevo método para evaluar la calidad de una extracción de ácido nucleico de una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de orina humana. El método se puede llevar a cabo mediante la extracción de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, medir la cantidad de cualquiera de las transcripciones pico, y comparar la cantidad con un estándar que se ha establecido para la muestra biológica particular. El establecimiento de dicho estándar puede ser, por ejemplo, una cantidad media de pico de dicha transcripción extraída de 10 muestras de orina humana normales realizadas por un profesional experimentado en biotecnología.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a determinadas realizaciones, numerosas modificaciones, alteraciones y cambios a las realizaciones descritas son posibles sin apartarse del ámbito y el alcance de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas. En consecuencia, se pretende que la presente invención no se limitará a las realizaciones descritas, sino que tiene el alcance total definido por el lenguaje de las siguientes reivindicaciones y equivalentes de las mismas.

REFERENCIAS:

## ES 2 547 715 T3

- Abravaya, K., J.J. Canino, S. Muldoon, and H.H. Lee. 1995. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR). *Nucleic Acids Res.* 23:675-82.
- Al-Nedawi, K., B. Meehan, J. Micallef, V. Lhotak, L. May, A. Guha, and J. Rak. 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 10:619-24.
- 5 Balzar, M., M.J. Winter, C.J. de Boer, and S.V. Litvinov. 1999. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *JMol Med.* 77:699-712.
- Bossi, A., F. Bonini, A.P. Tumer, and S.A. Piletsky. 2007. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of the art. *Biosens Bioelectron.* 22: 113 1-7.
- 10 Chen, C., J. Skog, C.H. Hsu, R.T. Lessard, L. Balaj, T. Wurdinger, B.S. Carter, X.O. Breakefield, M. Toner, and D. Irimia. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip.* 10505- 1 1.
- Cheruvanky, A., H. Zhou, T. Pisitkun, J.B. Kopp, M.A. Knepper, P.S. Yuen, and R.A. Star. 2007. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292:F1657-6 1.
- 15 Cocucci, E., G. Racchetti, and J. Meldolesi. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 19:43-5 1.
- Cotton, R.G., N.R. Rodrigues, and R.D. Campbell. 1988. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:4397-401.
- 20 Fischer, S.G., and L.S. Lerman. 1979a. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell.* 16 : 19 1-200.
- Fischer, S.G., and L.S. Lerman. 1979b. Two-dimensional electrophoretic separation of restriction enzyme fragments of DNA. *Methods Enzymol.* 68: 183-9 1.
- 25 Geiss, G.K., R.E. Bumgarner, B. Birditt, T. Dahl, N. Dowidar, D.L. Dunaway, H.P. Fell, S. Ferree, R.D. George, T. Grogan, J.J. James, M. Maysuria, J.D. Mitton, P. Oliveri, J.L. Osborn, T. Peng, A.L. Ratcliffe, P.J. Webster, E.H. Davidson, and L. Hood. 2008. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol.* 26:3 17-25.
- Guatelli, J.C., K.M. Whitfield, D.Y. Kwok, K.J. Bamnager, D.D. Richman, and T.R. Gingeras. 1990. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 1874-8.
- 30 Hahn, P.J. 1993. Molecular biology of double-minute chromosomes. *Bioessays.* 15:477-84.
- Johnson, S., D. Evans, S. Laurensen, D. Paul, A.G. Davies, P.K. Fenigno, and C. Walti. 2008. Surface-immobilized peptide aptamers as probe molecules for protein detection. *Anal Chem.* 80:978-83.
- Kan, Y.W., and A.M. Dozy. 1978a. Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia by D.N.A. analysis of amniotic-fluid cells. *Lancet.* 2:910-2.
- 35 Kan, Y.W., and A.M. Dozy. 1978b. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75:5631-5.
- Keller, S., C. Rupp, A. Stoeck, S. Runz, M. Fogel, S. Lugert, H.D. Hager, M.S. Abdel-Baw, P. Gutwein, and P. Altevogt. 2007. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int.* 72: 1095-1 02.
- 40 Kwok, D.Y., G.R. Davis, K.M. Whitfield, H.L. Chappelle, L.J. DiMichele, and T.R. Gingeras. 1989. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 1 173-7.
- Landegren, U., R. Kaiser, J. Sanders, and L. Hood. 1988. A ligase-mediated gene detection technique. *Science.* 241 : 1077-80.
- 45 Li, J., L. Wang, H. Mamon, M.H. Kulke, R. Berbeco, and G.M. Makrigiorgos. 2008. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med.* 14 579-84.

## ES 2 547 715 T3

- Liu, Q., J.C. Greimann, and C.D. Lima. 2006. Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell*. 127: 1223-37.
- Miele, E.A., D.R. Mills, and F.R. Kramer. 1983. Autocatalytic replication of a recombinant RNA. *J Mol Biol*. 17 1 :28 1-95.
- 5 Myers, R.M., Z. Larin, and T. Maniatis. 1985. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science*. 230: 1242-6.
- Nakazawa, H., D. English, P.L. Randell, K. Nakazawa, N. Martel, B.K. Arrnstrong, and H. Yamasaki. 1994. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91 :360-4.
- 10 Nilsson, J., J. Skog, A. Nordstrand, V. Baranov, L. Mincheva-Nilsson, X.O. Breakefield, and A. Widmark. 2009. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer*. 100: 1603-7.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:2766-70.
- 15 Raposo, G., H.W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C.V. Harding, C.J. Melief, and H.J. Geuze. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *JExp Med*. 183:1161-72.
- Skog, J., T. Wurdinger, S. van Rijn, D.H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W.T. Cuny, Jr., B.S. Carter, A.M. Krichevsky, and X.O. Breakefield. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 10: 1470-6.
- 20 Steemers, F.J., W. Chang, G. Lee, D.L. Barker, R. Shen, and K.L. Gunderson. 2006. Wholegenome genotyping with the single-base extension assay. *Nat Methods*. 3 :3 1-3.
- Stoorvogel, W., M.J. Kleijmeer, H.J. Geuze, and G. Raposo. 2002. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffc*. 3 :32 1-30.
- 25 Taylor, D.D., and C. GerceI-Taylor. 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1 10: 13-2 1.
- Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and fimction. *Nat Rev Immunol*. 2569-79.
- Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J.J. Lee, and J.O. Lotvall. 2007. Exosomemediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 9:654-9.
- 30 van Dijk, E.L., G. Schilders, and G.J. Pruijn. 2007. Human cell growth requires a functional cytoplasmic exosome, which is involved in various mRNA decay pathways. *RNA*. 13:1027-35.
- Velculescu, V.E., L. Zhang, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science*. 270:484-7.
- 35 Went, P.T., A. Lugli, S. Meier, M. Bundi, M. Mirlacher, G. Sauter, and S. Dirnhofer. 2004. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*. 35:122-8.

# ES 2 547 715 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

<120> Un método para analizar ácidos nucleicos de microvesículas

<130> 26504-008

5 <150> US 61/226,106

<151> 2009-07-16

<150> US 61/226,025

<151> 2009-07-16

<160> 29

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 376

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

15 <400> 1

```
tcatttcctgg ggacagtgcc aggtggggag tttgactggg gctgtacacc tgtcaaacgg      60
taacgcaggt gtcctaaggc gagctcaggg aggacagaaa cctcccgtgg agcagaaggg      120
caaaagctcg cttgatcttg attttcagta cgaatacaga ccgtgaaagc ggggcctcac      180
gatccttctg accttttggg ttttaagcag gaggtgtcag aaaagttacc acagggataa      240
ctggcttgtg gcggccaagc gttcatagcg acgtcgtttt ttgatccttc gatgtcggct      300
cttcctatca ttgtgaagca gaattcacca agcgttggat tgttcaccca ctaatagggg      360
acgtgagctg gaggtt
```

<210> 2

<211> 378

20 <212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 2

ES 2 547 715 T3

gaacctccag ctcacgttcc ctattagtgg gtgaacaatc caacgcttgg tgaattctgc 60  
 ttcacaatga taggaagagc cgacatcgaa ggatcaaaaa gcgacgtcgc tatgaacgct 120  
 tggccgccac aagccagtta tcctgtgggt aacttttctg acacctctg cttaaaaccc 180  
 aaaaggtcag aaggatcgtg aggccccgct ttcacggctc gtattcgtac tgaaaatcaa 240  
 gatcaagcga gcttttgccc ttctgtcca cgggaggttt ctgtcctccc tgagctcgcc 300  
 ttaggacacc tgcgttaccg tttgacaggt gtacagcccc agtcaaactc cccacctggc 360  
 actgtccccg gaaatgat 378

<210> 3

<211> 226

<212> ADN

5 <213> HOMO SAPIENS

<400> 3

gatccgccac cgggttgaat cctccggggc gactgcgcg acctgacceca tttacctctt 60  
 aacggtttca cgccctcttg tactctctct tcaaagtct tttcaacttt cccttacggt 120  
 acttgttgac tatcggctctc gtgccgggat ttagccttaa atggagttta ccacctgctt 180  
 tgggctgcat tccaagcaa cccgactcct ggaagacctg ggccaa 226

<210> 4

<211> 223

10 <212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 4

ttggcccggg tcttccagga gtcgggttgc ttgggaatgc agcccaaagc ggggtggtaaa 60  
 ctccatttaa ggctaaatac cggcacgaga ccgatagtca acaagtaccg taagggaaag 120  
 ttgaaaagaa ctttgaagag agagtacaag agggcgtgaa accgtaaga ggtaaatggg 180  
 tcaggctcgc gcagtcgcc cggaggattc aacctgggtg egg 223

<210> 5

15 <211> 107

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 5

gtggggaacc tggcgctaaa ccattcgtag acgacttgct tctgggtcgg ggtttcgtac 60  
 gtagcagagc agtccctcgt ctgcgatcta ttgaaagtca gatctcc 107

ES 2 547 715 T3

<210> 6

<211> 160

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

5 <400> 6

**cgcagacccg ctcggggggtc gcgtaactag ttagcatgcc agagtctcgt tcggtatcgg 60**  
**aattaaccag acaaatcgct ccaccaacta agaacggcca tgcaccacca cccacggaat 120**  
**cgagaaagag ctatcaatct gtcaatcctg tccgtaaadc 160**

<210> 7

<211> 105

<212> ADN

10 <213> HOMO SAPIENS

<400> 7

**agatctgact ttcaatagat cgcagcgagg gagctgctct gctacgtacg aaacccccgac 60**  
**ccagaagcaa gtcgtctacg aatggtttag cgccagggtc cccac 105**

<210> 8

15 <211> 159

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 8

**gatttacgga caggattgac agattgatag ctotttctcg attccgtggg tgggtggtgca 60**  
**tggccgttct tagttggtgg agcgatttgt ctggttaatt ccgataacga acgagactct 120**  
**ggcatgctaa ctagttacgc gacccccgag cgggtctgc 159**

20 <210> 9

<211> 271

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 9

ES 2 547 715 T3

aacactcagc taagagcatc gagggggcgc caagaggcaa ggggcgggga cgggcagtgg 60  
 ctgcctcat ggcggactgc cgcgccgctc ccaagatcca actaggagct ttttaactgc 120  
 agcaacttta atatacgcta ttggagctgg aattaccgcg gctgctggca ctaaacttgc 180  
 cctccaatgg atcttcgta aaggatttaa agtggactca ttccaattac aggacctcga 240  
 aagagtctg tattgttatg tttcatcact a 271

<210> 10

<211> 143

<212> ADN

5 <213> HOMO SAPIENS

<400> 10

gtccctctta atcatggcct cagttccata aaccaacaaa atagaaccgc ggtcctattc 60  
 cattattcct agctgcggta tccaggcggc ttggacctgc tttgaacct ctaatttttt 120  
 caaagtaaac gctttgggcc gcg 143

<210> 11

<211> 212

10 <212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 11

ccacgtaggg taggcacacg ctgagccagt cagtgtagcg cgcgtgcagt cccggacatc 60  
 taagggcatc acagatctgt tattgctcaa ttcgggtgg ctgaaggcca cttgtccctc 120  
 taagaagttg ggggacgccg accgctcggg ggtcacgtaa ctagttagca tgccagagtc 180  
 tcgttggtta ttggaattaa ccagacaaat ca 212

<210> 12

15 <211> 588

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 12

tagtgatgaa acataacaat acaggactct ttcgaggtcc tgtaattgga atgagtccac 60  
 tttaaatcct ttaacgaaga tccattggag ggcaagttha gtgccagcag ccgcggtaat 120  
 tccagctcca atagcgtata ttaaagttgc tgcagttaaa aagctcctag ttggatcttg 180

ES 2 547 715 T3

**ggagcgggcg ggcagtccgc catgaggcga gccactgccc gtccccgccc cttgcctett 240**  
**ggcggccccct cgatgctctt agctgagtgt tccgcgggccc aaagcgttta ctttgaaaaa 300**  
**attagagtgt tcaaagcagg tccaagccgc ctggataccg cagctaggaa taatggaata 360**  
**ggaccgcggt tctattttgt tggtttatgg aactgaggcc atgattaaga gggacagctg 420**  
**ggggcatttg tattgcaccg ctagaggtga aattcttggga cgggcgcagt ttggaccaga 480**  
**gtgaaagcat ttgccaagaa tgttttcatt aatcaagaat gaaagtcgga ggttcgaaga 540**  
**cgatcagata ccgtggtagt tctgaccata aacgatgccg actggcaa 588**

<210> 13

<211> 137

<212> ADN

5 <213> HOMO SAPIENS

<400> 13

**gatttgtctg gttaattcca ataaccaacg agactctggc atgctaacta gttacgtgac 60**  
**ccccgagcgg tcggcgtccc ccaacttctt agagggacaa gtggcettca gccacccgaa 120**  
**attgagcaat aacagat 137**

<210> 14

<211> 266

10 <212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 14

**agaatccccg cccccgggtg gggcgcggga aatgtggcgt acggaagacc cactccccgg 60**  
**cgccgctcgt gtggggccca agtccttctg atcgaggccc gcgacctcag atcagacgtg 120**  
**gcgacccgct gaatttaagc atatttgtca gcggaggaaa agaaactaac caggattccc 180**  
**tcagtaatgg cgagtgaaca ggggaagagcc cagcgcgcaa tccccgccc gcggtggggc 240**  
**gcgggaaatg tggcgtacgg aaaaat 266**

<210> 15

15 <211> 167

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 15

ES 2 547 715 T3

**atthttccgt acgccacatt tcccgcgccc caccgcgggg cggggattcg gcgctgggct 60**  
**cttccctggt cactcgccat tactgagggg atcctgggta gtttcttttc ctccgctgac 120**  
**aaatatgctt aaattcagcg ggtcgccaag tctgatctga ggtecgcg 167**

<210> 16

<211> 171

<212> ADN

5 <213> HOMO SAPIENS

<400> 16

**tgactgctgg cgatggccgg gtatgggctt gatgctccag tgccatccat tttcagggct 60**  
**agttgattcg gcaggtagt tgttacacac tccttagtgg attctgactt ccatggccac 120**  
**cgtcctgctg tctatatcaa ccaacacctt ttctggggtc tgatgagcga g 171**

<210> 17

10 <211> 164

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 17

**ctcgctcatc agaccccaga aaaggtggtg gttgatatag acagcaggac ggtggccatg 60**  
**gaagtcagaa tccactaagg agtgtgtaac aactcacctg ccgaatcaac tagccctgaa 120**  
**aatggatggc actggagcat caggcccata cccggccatc gcca 164**

15 ~21018~

<211> 121

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 18

**cttgggaataa tggaatagga ccacagttct atthttggtg ttttcggaac tgaggccatg 60**  
**attaagaggg acggccgggg gcattcatat tgcaccgcta gaggtgaaat tcttggactg 120**  
**g 121**

20

<210> 19

<211> 97

ES 2 547 715 T3

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 19

**gtgcagatct tggtagtagt agcaaatttt caaatgagaa ctttgaaggc cgaagtggag 60**

**aagggttcca tgtgaacagc agttgaacat ggggtccc 97**

5 <210> 20

<211> 245

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 20

**atcgccagtt ggcacggtt atggtcggaa ttacaacggt atctgatcgt cttcgaacct 60**

**ccgactttcg ttcttgatta atgaaaacat tcttggcaaa tgctttcgct ctggtctaaa 120**

**ctgccagtc aagaatttca cctctagcgg tgcaatatga atgcccccg cegtcctct 180**

**taatcatggc ctcagttccg aaaaccaaca aatagaact gtggtcctat tccattattc 240**

**caagc 245**

10

<210> 21

<211> 95

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

15 <400> 21

**gggacccatg ttcaactgct gttcacatgg aacccttctc cacttcggcc ttcaaagttc 60**

**tcatttgaaa atttgetact accaccaaga tctgc 95**

<210> 22

<211> 216

<212> ADN

20 <213> HOMO SAPIENS

<400> 22

ES 2 547 715 T3

**tttgcgtgcg gccgggcgct tggcgccaga agcgagagcc cctcagggct cgcccccccg 60**  
**cctcaccggg tcagtgaaaa aacgatcaga gtagtggtat ttcaccggcg gcccgcaggg 120**  
**ccggcagacc ccgccttga ccctctcgcg ggacaccggg gggcgccggg ggctctccac 180**  
**ttattctaca cctctcacgt ctcttcaccg tgccag 216**

<210> 23

<211> 229

<212> ADN

5 <213> HOMO SAPIENS

<400> 23

**gcttgactct agtctggcac ggtgaagaga cgtgagaggt gtagaataag tgggaggccc 60**  
**ccggcgcccc ccggtgtccc cgcgaggggt ccagggcggg gtctgccggc cctgcggggc 120**  
**gccggtgaaa taccactact ctgatcgttt tttcactgac ccggtgaggc gggggggcga 180**  
**gccctgaggg gctctcgctt ctggcgccaa gcgcccggcc gcacgcaa 229**

<210> 24

<211> 592

10 <212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 24

**tctacctacc tacctggttg atcctgccag tagcatatgc ttgtctcaaa gattaagcca 60**  
**tgcatgtcta agtacgcacg gccggtacag tgaaactgcg aatggetcat taaatcagtt 120**  
**atggttcctt tggtcgctcg ctctctcct acttgataa ctgtggtaat tctagagcta 180**  
**atacatgccg acgggcgctg acccccttcg cgggggggat gcgtgcattt atcagatcaa 240**  
**aaccaaccgg gtcagcccct ctccggcccc ggccgggggg cgggcgccgg cggctttggt 300**  
**gactctagat aacctcgggc tgatcgcacg cccccctgg cggcgacgac ccattcgaac 360**  
**gtctgccta tcaactttcg atggtagtcg ccgtgcctac catggtgacc acgggtgacg 420**  
**gggaatcagg gttcgattcc ggagagggag cctgagaaac ggctaccaca tccaaggaag 480**  
**gcagcaggcg cgcaaattac ccactcccga cccggggagg tagtgacgaa aaataacaat 540**  
**acaggactct ttcgaggccc tgtaattgga atgagtcac tttaaatcta at 592**

<210> 25

15 <211> 670

<212> ADN

ES 2 547 715 T3

<213> HOMO SAPIENS

<400> 25

```

atttaaagtg gactcattcc aattacaggg cctcgaaga gtcctgtatt gttatTTTTc      60
gtcactacct ccccgggtcg ggagtgggta atttgcgcg cTgctgcctt ccttggatgt      120
ggtagccggt tctcaggctc cctctccgga atcgaacctt gattccccgt caccctgggt      180
caccatggta ggcacggcga ctaccatcga aagttgatag ggcagacgtt cgaatgggtc      240
gtcgccgcca cggggggcgt gcgatcagcc cgaggttatc tagagtcacc aaagccgccc      300
gcgcccgcc cccggccggg gccggagagg ggctgaccgg gttggTTTTg atctgataaa      360
tgcacgcac cccccgcga agggggtcag cgcccgtcgg catgtattag ctctagaatt      420
accacagtta tccaagtagg agaggagcga gcgaccaaag gaaccataac tgatttaatg      480
agccattcgc agtttcactg taccggcctg gcgtacttag acatgcatgg cttaatcttt      540
gagacaagca tatgctactg gcaggatcaa ccaggtaggt aggtagagcg cggcgaggcc      600
ccgacgcggc cggacggccg gccggggggc ctcgcgagga cgggcccggc gccccgcaag      660
cgaggaggac      670

```

<210> 26

5 <211> 210

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 26

```

gtgttgagat ttacaccctc tccccggat tttcaagggc cagcgagagc tcaccggatg      60
ccgccagaac cgcgacgctt tccaaggcac gggcccctct ctcggggcga acccattcca      120
ggcgccctg cccttcacaa agaaaagaga actctccccg gggctcccgc cggtttctcc      180
gggatcggtc acgttaccgc actggaagaa      210

```

10 <210> 27

<211> 207

<212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

<400> 27

15

ES 2 547 715 T3

ttcttccagt gcggtaacgt gaccgatccc ggagaagccg gcgggagccc cggggagagt 60  
tctcttttct ttgtgaaggg cagggcgccc tggaatgggt tcgccccgag agaggggccc 120  
gtgccttgga aagcgtcgcg gttctggcgg catccggtga gctctcgctg gcccttgaaa 180  
atccggggga gaggggtgaa atctcaa 207

<210> 28

<211> 94

<212> ADN

5 <213> HOMO SAPIENS

<400>28

ccgaaggtag tgagttatct caattgattg ttcacagtca gttacagatc gaactccttg 60  
ttctactctt tcccccttc tcaactactgc actt 94

<210> 29

<211> 99

10 <212> ADN

<213> HOMO SAPIENS

(400> 29

gtcaagtgca gtagtgagaa ggggggaaag agtagaacia ggagttcgat ctgtaactga 60  
ctgtgaacia tcaattgaga taactcacta ccttcggac 99

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para obtener y analizar ARN a partir de una muestra de orina, que comprende las etapas de:
  - (a) obtener una muestra de orina y procesar previamente la muestra de orina mediante filtración a través de un filtro de 0.8  $\mu\text{m}$ ;
  - 5 (b) obtener una fracción de microvesícula de la muestra de orina procesada previamente mediante ultracentrifugación o concentración por filtración;
  - (c) lavar la fracción de microvesícula;
  - (d) extraer el ARN de la fracción de microvesícula;
  - 10 (e) medir la calidad del ARN de la fracción de microvesícula al determinar la cantidad de rARN 18S y 28s en la extracción con el propósito de evaluar la calidad de la extracción de ARN, donde la detección de 18S-28S rARN en la extracción de ARN indica que la extracción de ARN tiene alto rendimiento y/o alta integridad; y
  - (f) analizar uno o más ARN a partir de la extracción de ARN de la etapa e) que se ha evaluado como alto rendimiento y/o alta integridad.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde la fracción de microvesícula se obtiene mediante concentración por filtración.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la concentración por filtración comprende pasar la muestra de orina a través de un filtro que tiene un tamaño poro de menos de o igual a 0.8  $\mu\text{m}$ .
- 20 4. El método de cualquier reivindicación previa, en donde la muestra de orina o fracción de microvesícula se trata con una ribonucleasa, desoxirribonucleasa, o una combinación de los mismos, antes de la realización del lavado en la etapa c).
5. El método de cualquier reivindicación previa, en donde la etapa c) comprende la adición de un inhibidor RNasa, antes de extraer el ARN.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en donde inhibidor RNasa tiene una concentración de mayor que la concentración [1X]; alternativamente, mayor que o igual a la concentración [5X]; alternativamente, mayor que o igual a la concentración [10X]; alternativamente, mayor que o igual a la concentración [25X]; y alternativamente, mayor que o igual a la concentración [50X].
7. El método de la reivindicación 5 o reivindicación 6, en donde inhibidor RNasa es una proteasa.
8. El método de cualquier reivindicación previa, que comprende adicionalmente determinar una relación cuantitativa de rARN 18S con rARN 28S en la extracción.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en donde la relación cuantitativa de rARN 18S con rARN 28S está dentro del rango de aproximadamente 1: 1 a aproximadamente 1:2.
10. El método de la reivindicación 8 o reivindicación 9, en donde la relación cuantitativa de rARN 18S con rARN 28S es aproximadamente 1:2.
11. El método de la reivindicación 4 comprende:
  - 35 tratar la fracción de microvesícula con ADNsa para eliminar todo o sustancialmente todo de cualquier ADN ubicado fuera de o sobre la superficie de las microvesículas en la fracción; extraer ARN de la muestra; y analizar el ARN extraído.

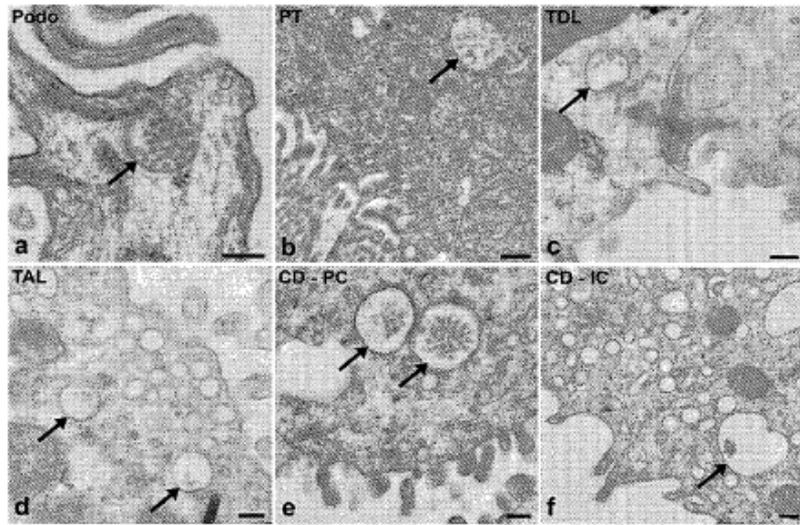


FIGURA 1

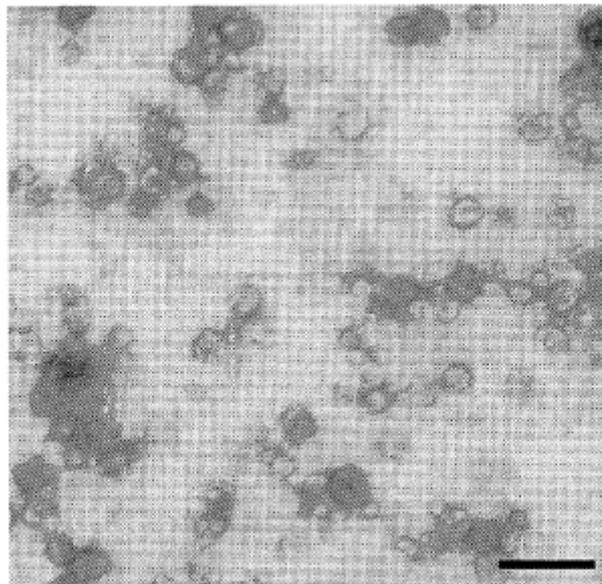


FIGURA 2

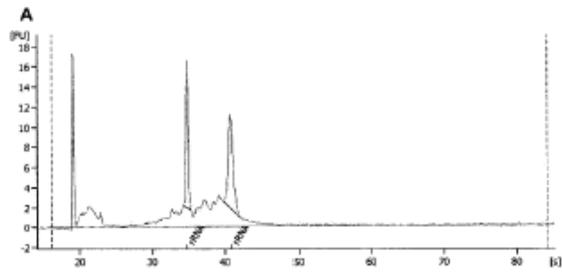


FIGURA 3

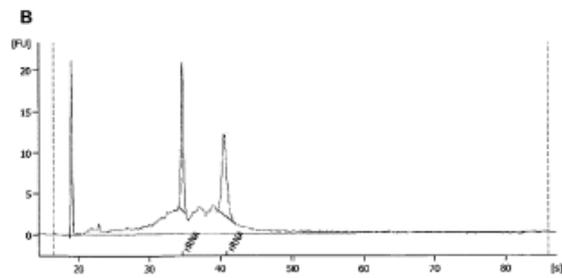


FIGURA 4

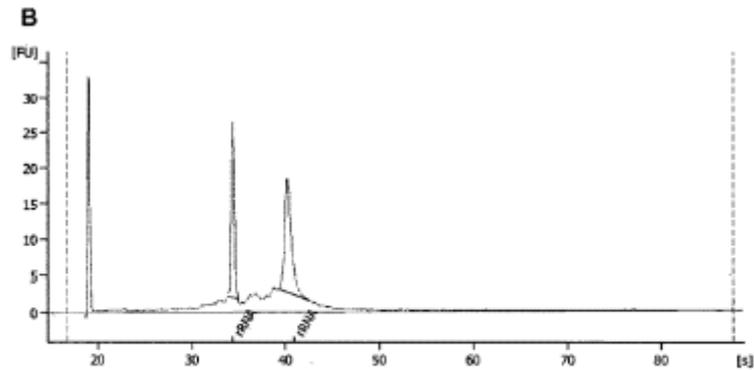
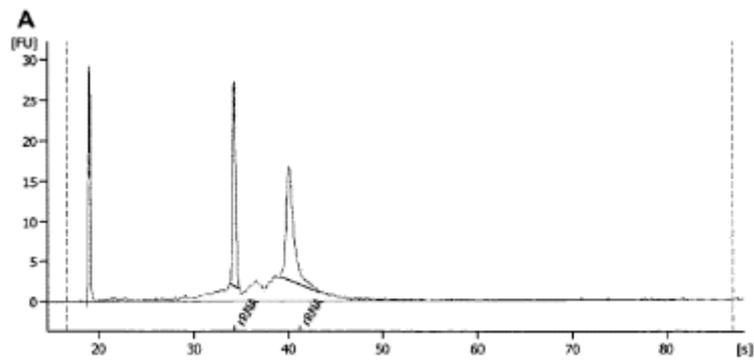


FIGURA 5

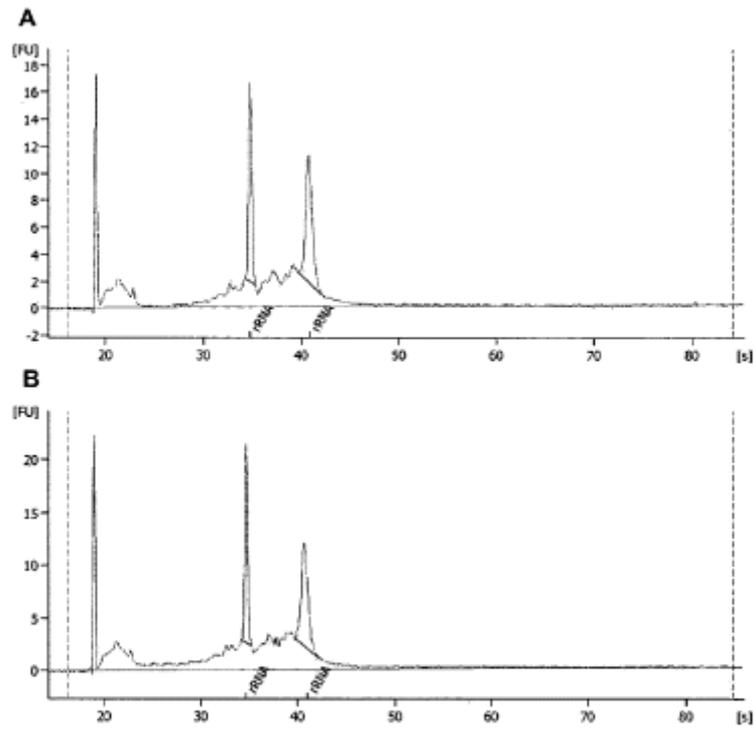


FIGURA 6

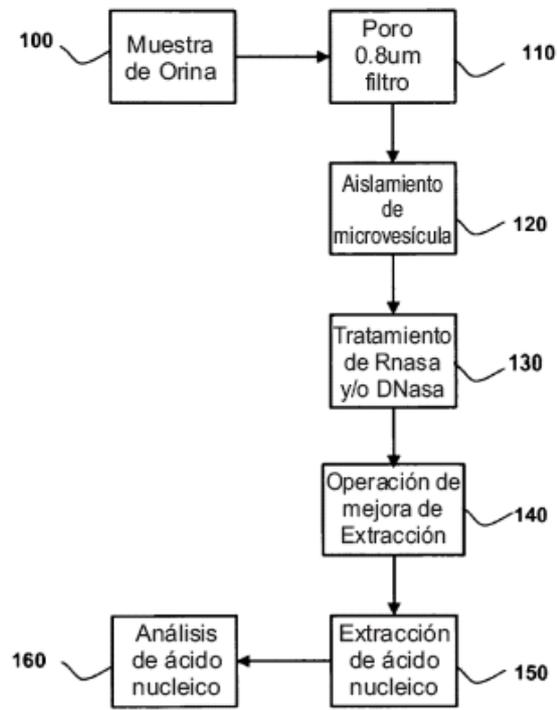


FIGURA 7

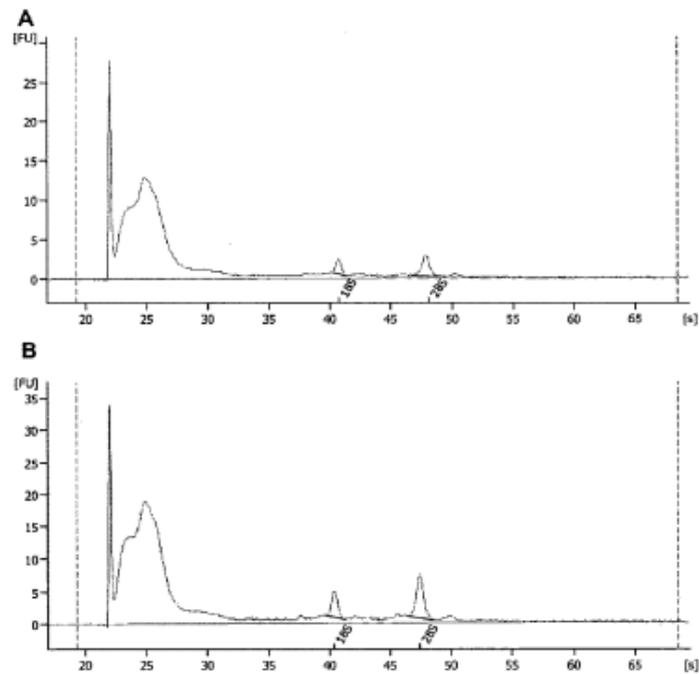


FIGURA 8

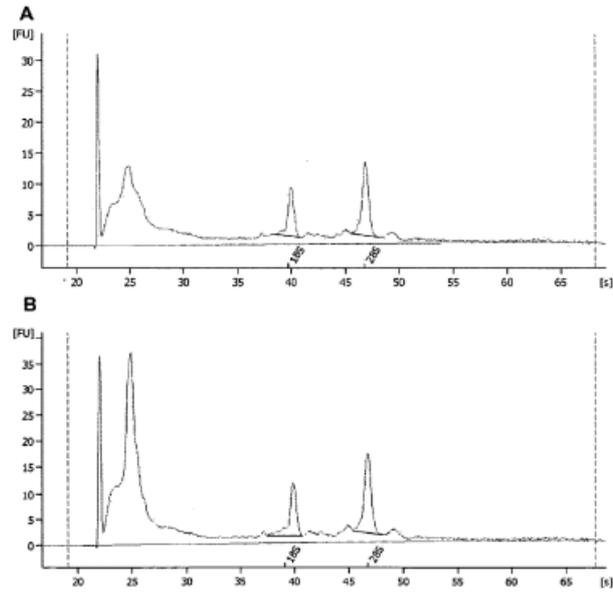


FIGURA 9

Muestra 1

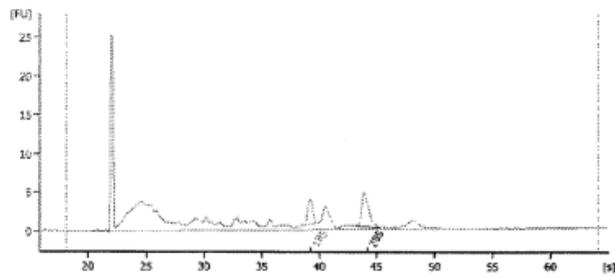


FIGURA 10

Muestra 2

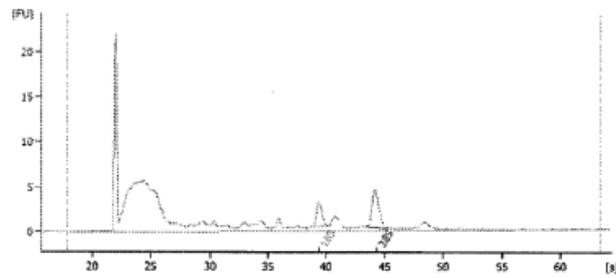


FIGURA 11

Muestra 3

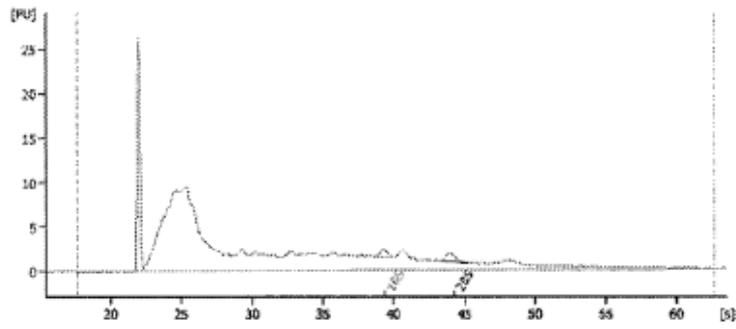


FIGURA 12

Muestra 4

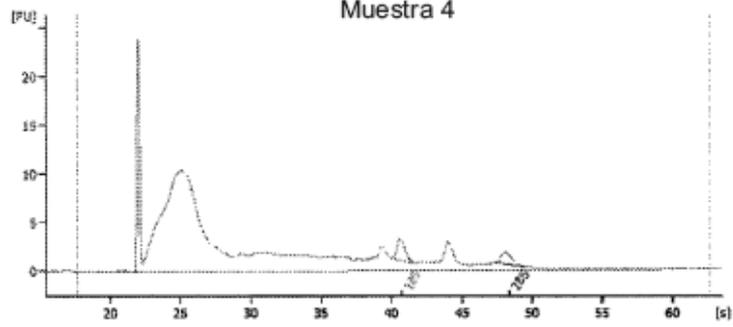


FIGURA 13

Muestra 5

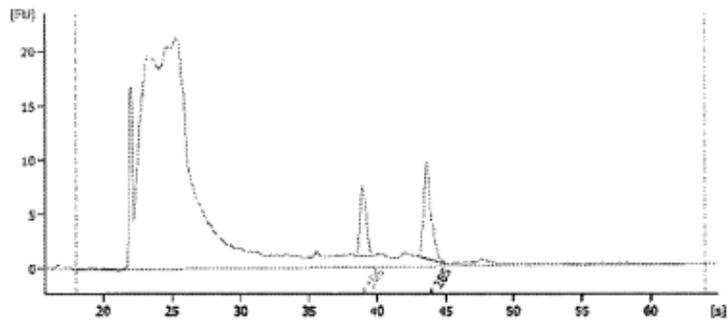


FIGURA 14

Muestra 6

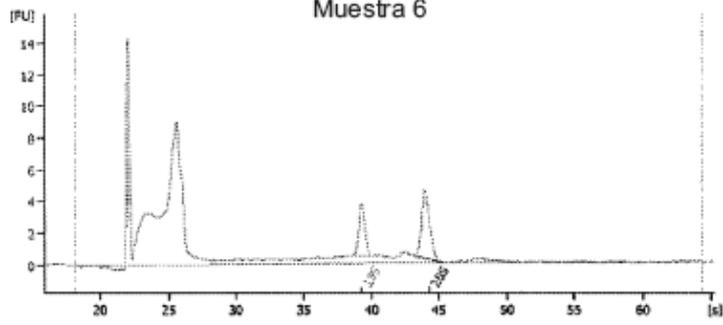


FIGURA 15

Muestra 7

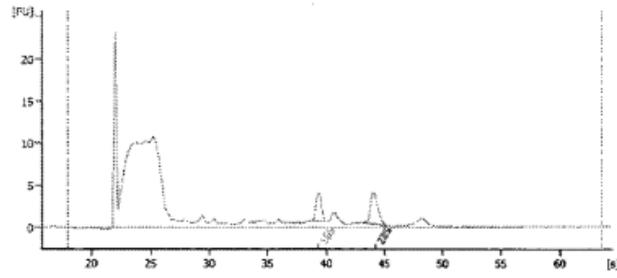


FIGURA 16

Muestra 8

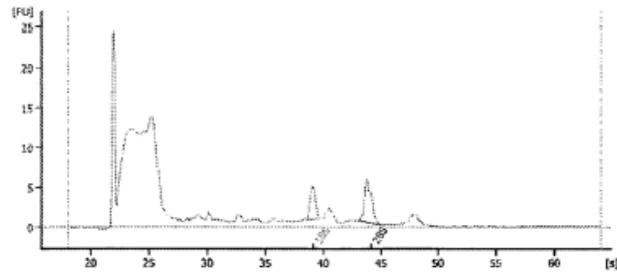


FIGURA 17

Muestra 9

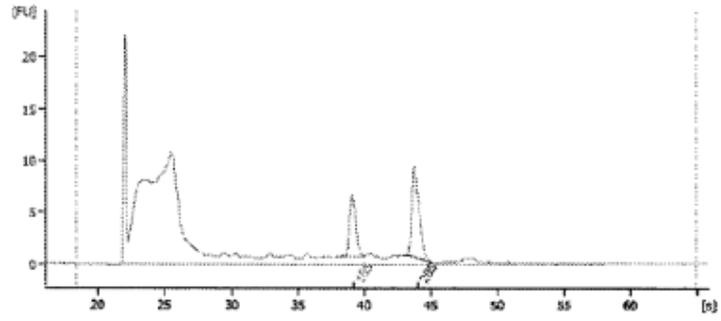


FIGURA 18

Muestra 10

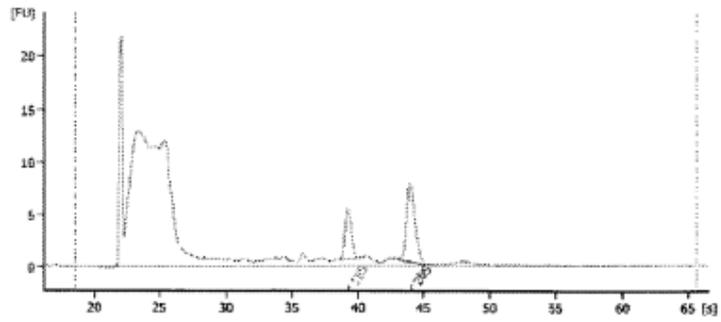


FIGURA 19

Muestra 11

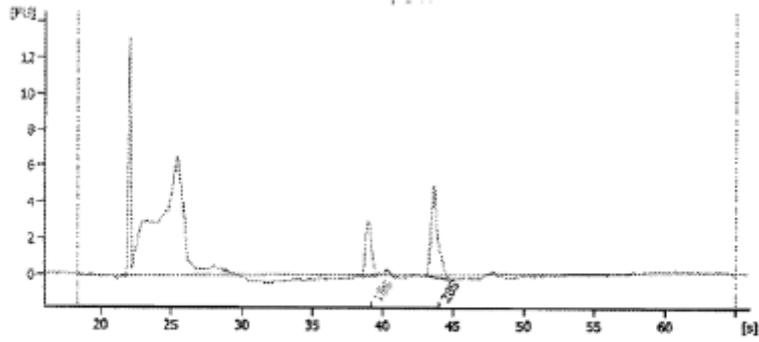


FIGURA 20

Muestra 12

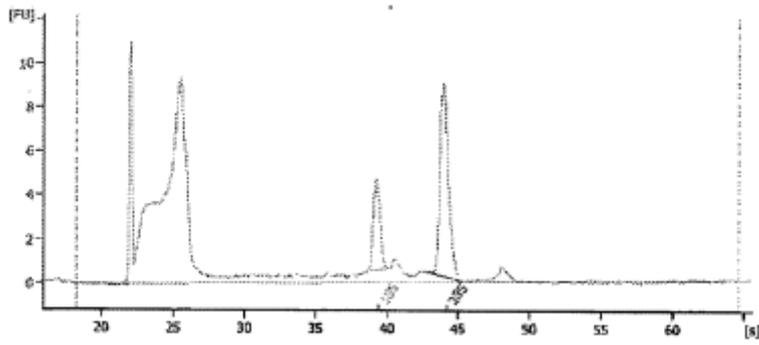


FIGURA 21

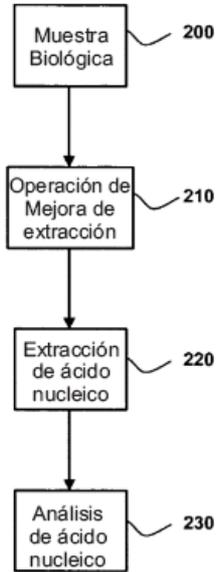


FIGURA 22

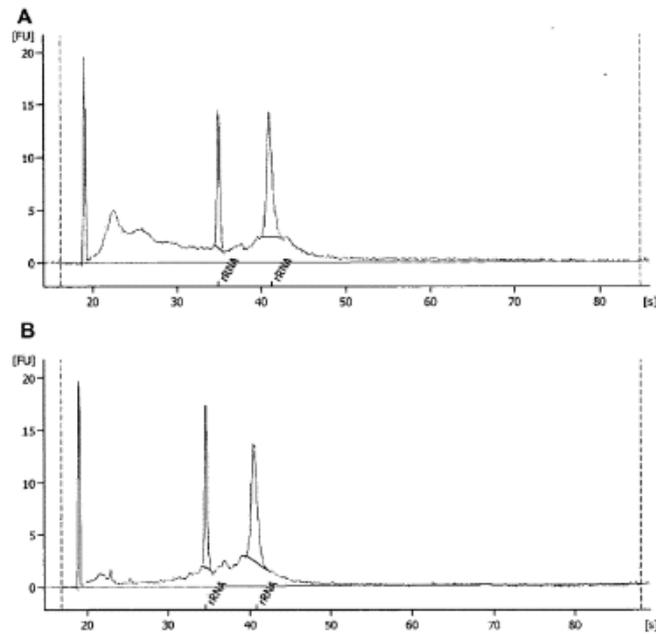


FIGURA 23 A y B

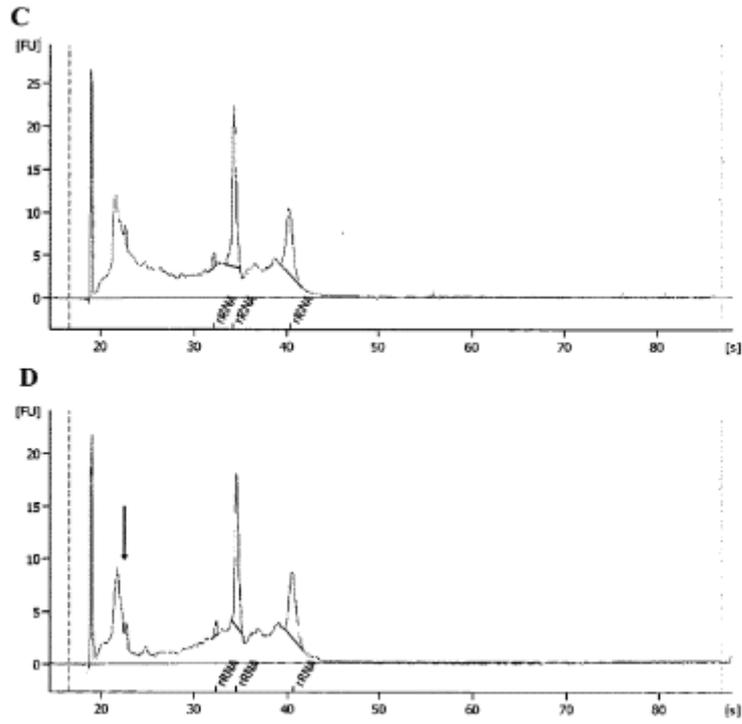


FIGURA 23 C y D

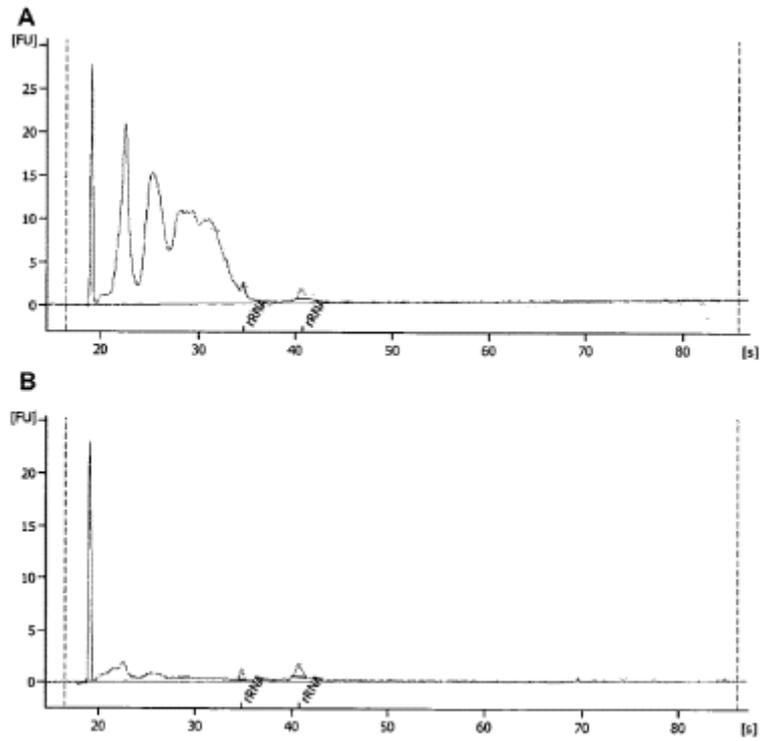


FIGURA 24 A y B

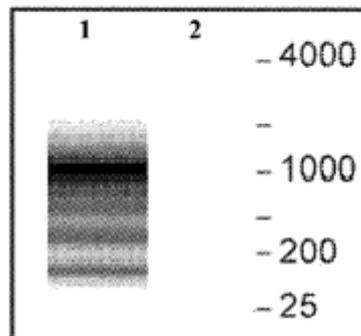


FIGURA 24 C

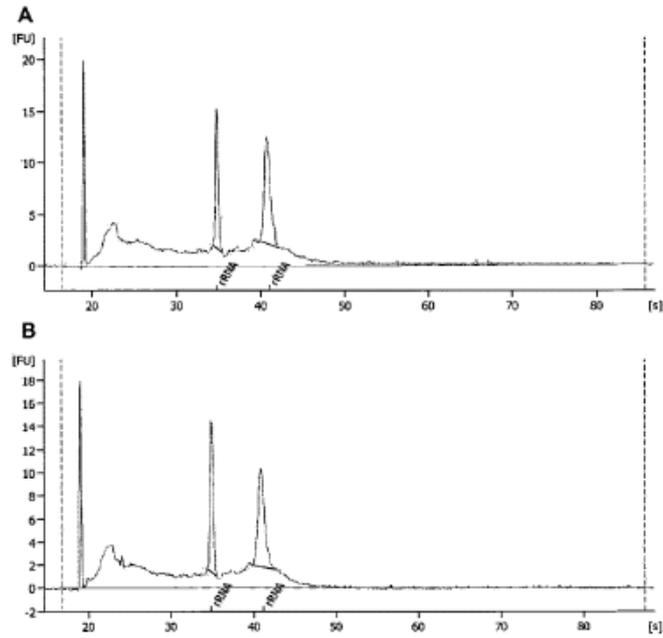


FIGURA 25

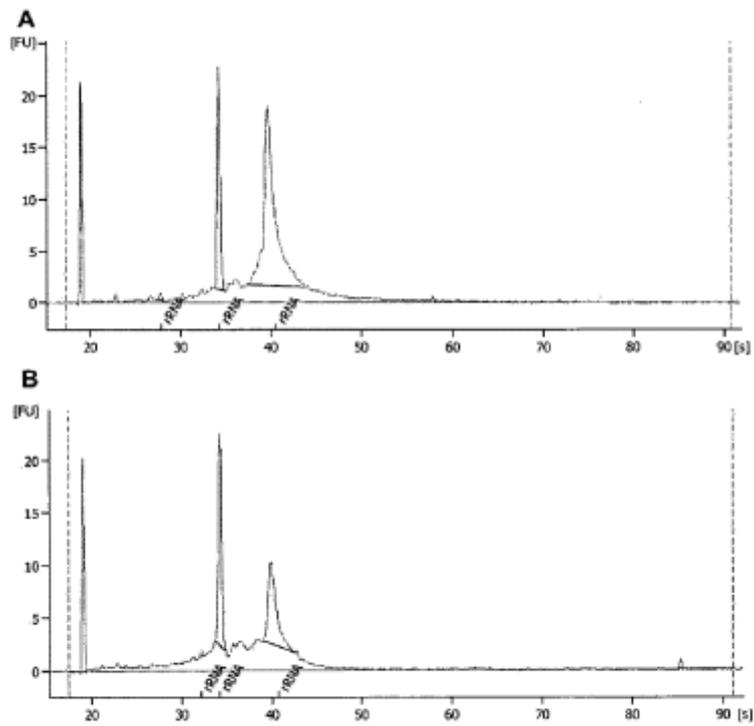


FIGURA 26

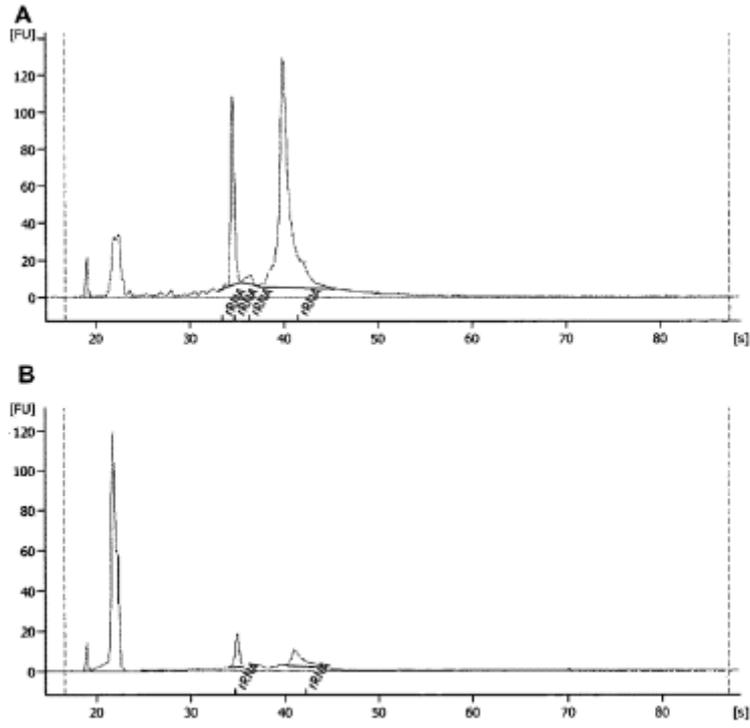


FIGURA 27

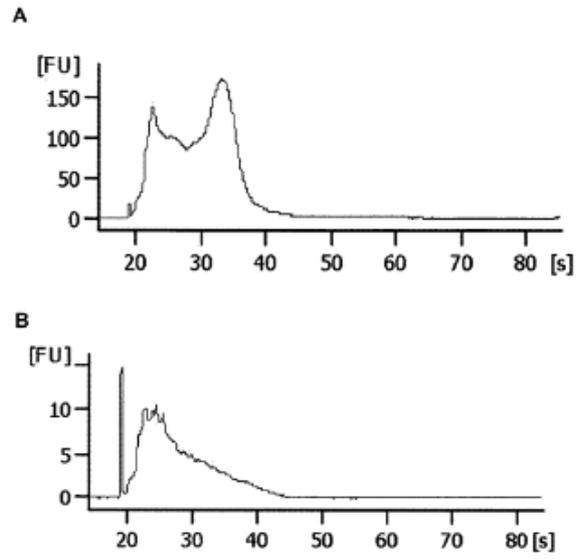


FIGURA 28

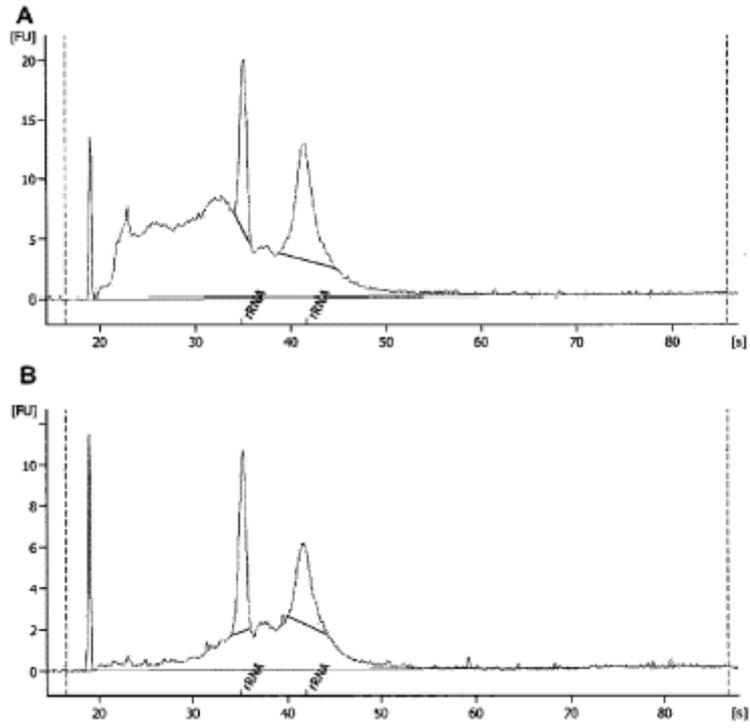


FIGURA 29

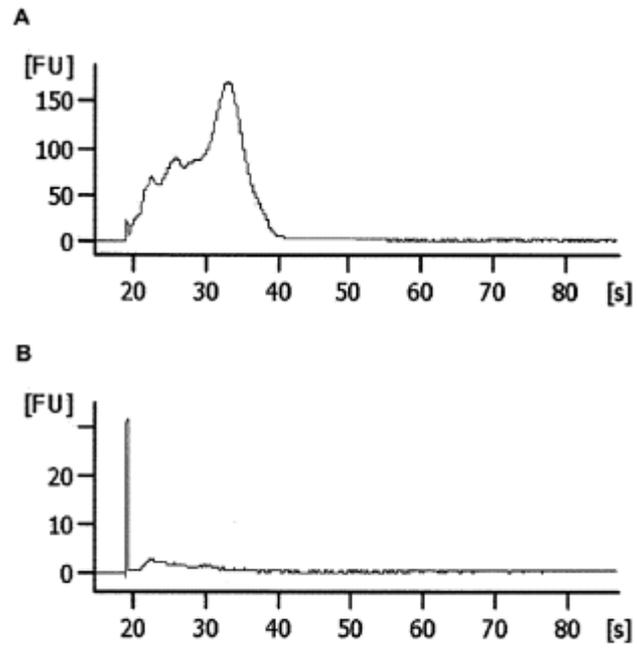


FIGURA 30

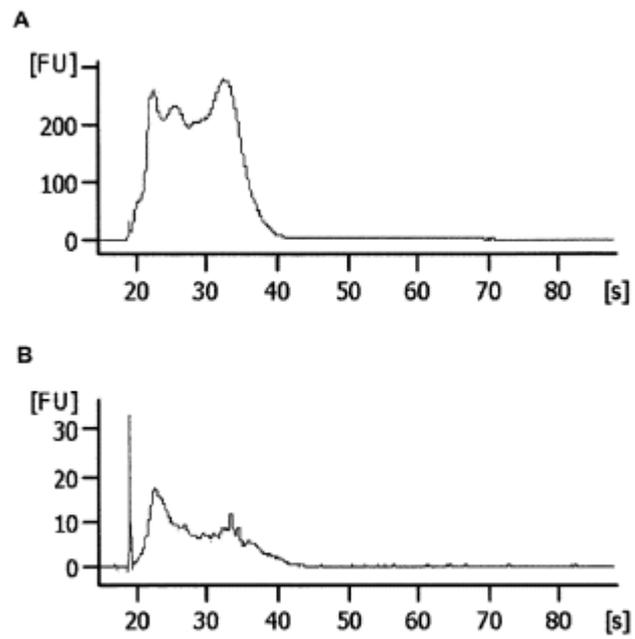


FIGURA 31

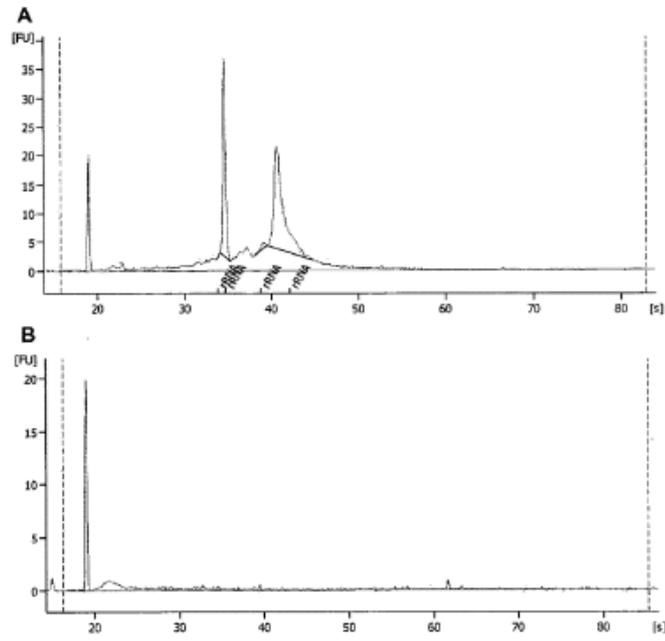


FIGURA 32

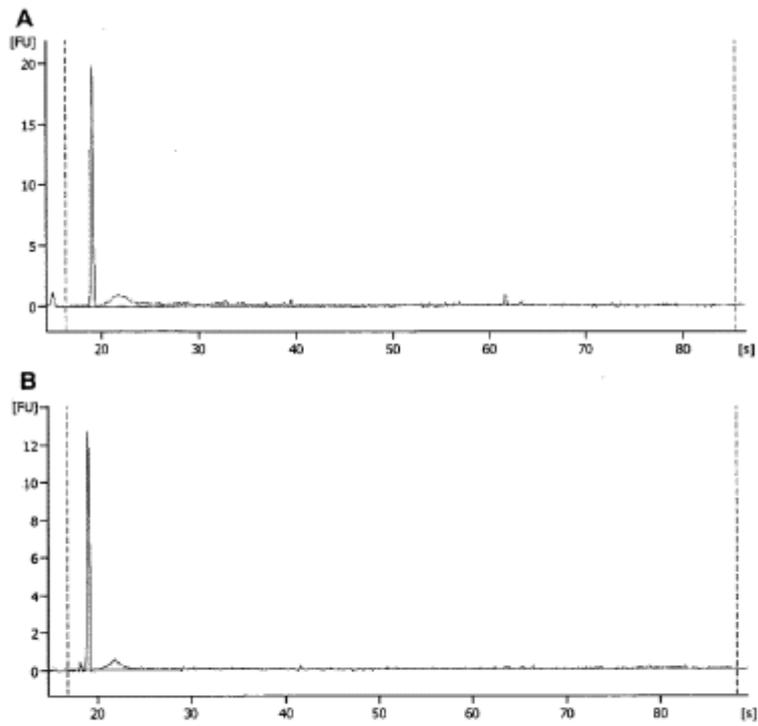


FIGURA 33

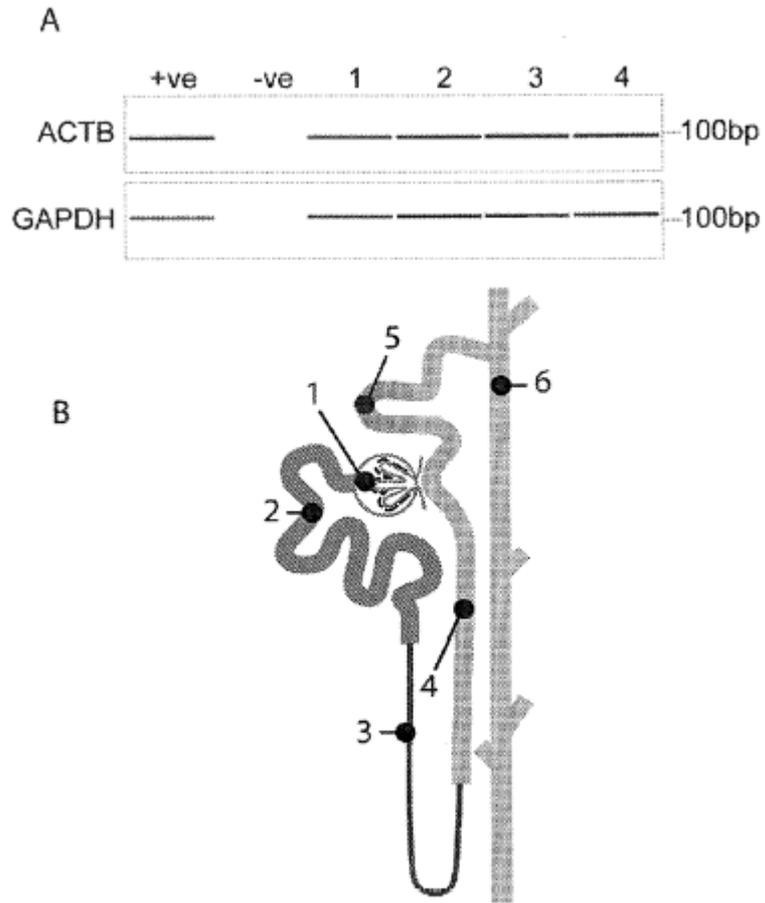


FIGURA 34

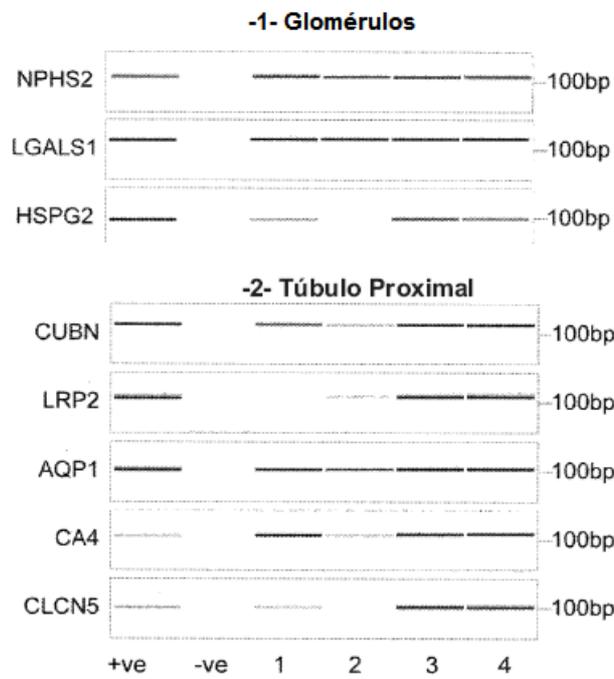


FIGURA 35



FIGURA 36

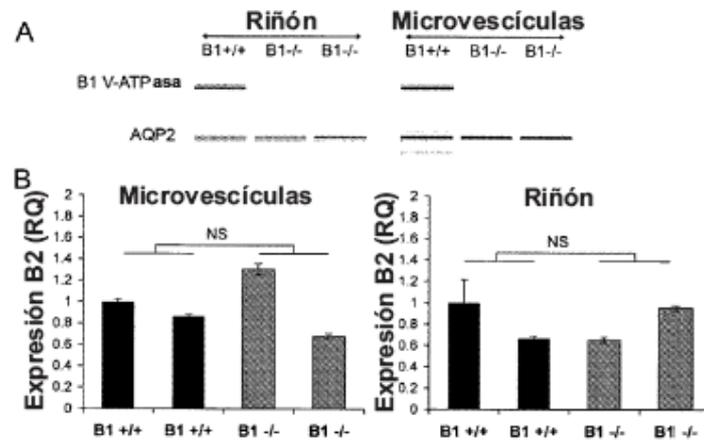


FIGURA 37

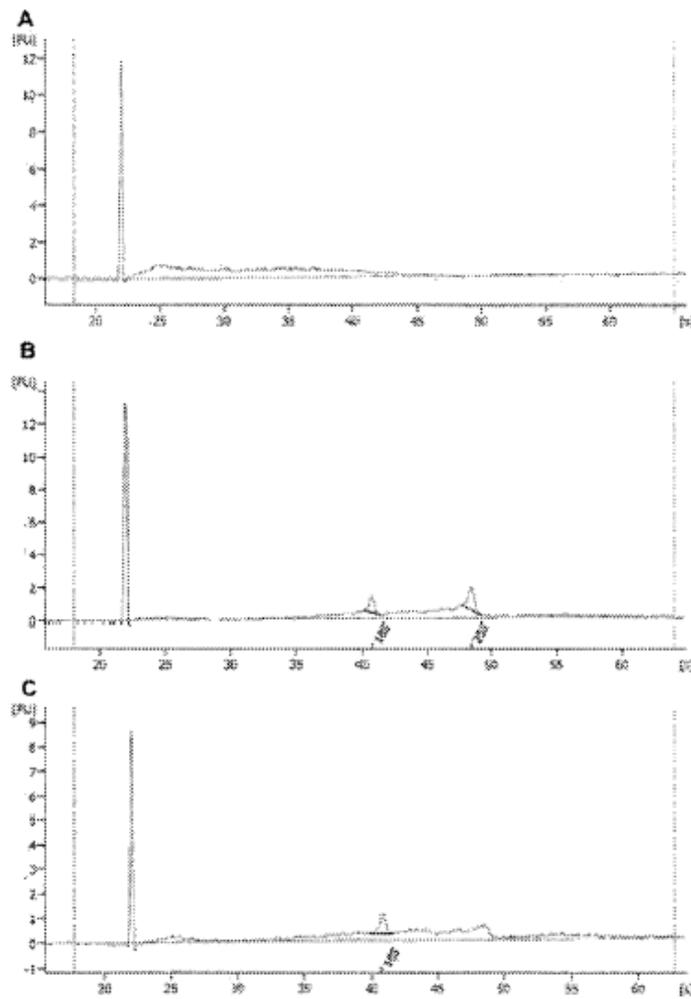


FIGURA 38

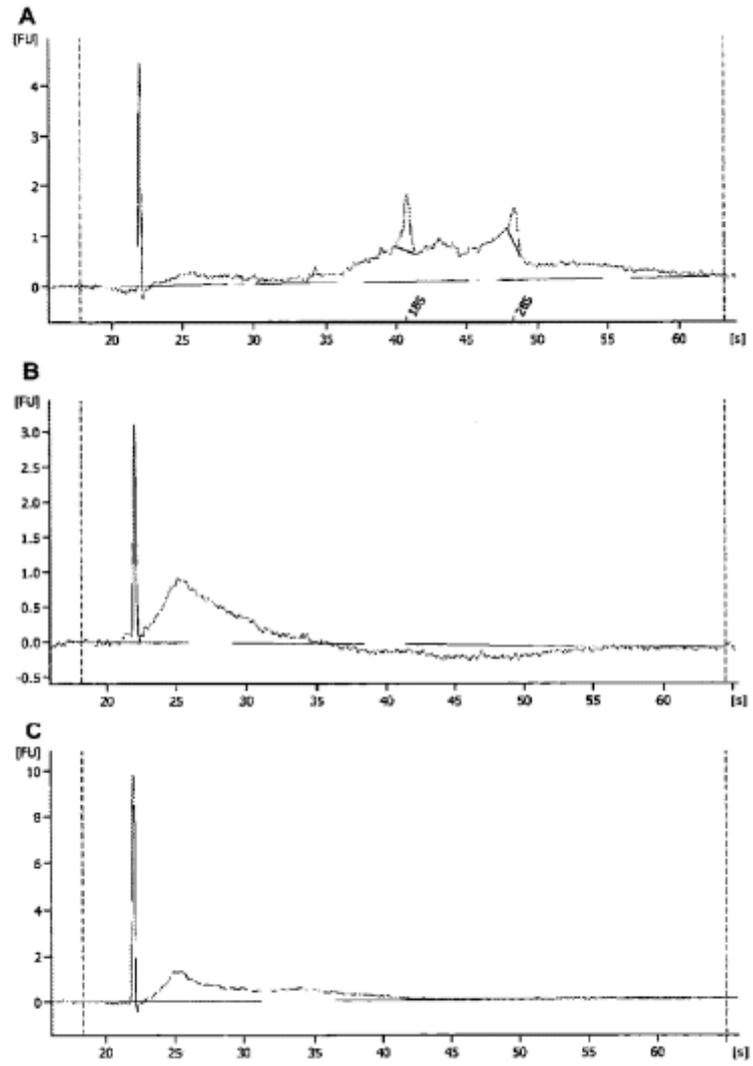


FIGURA 39

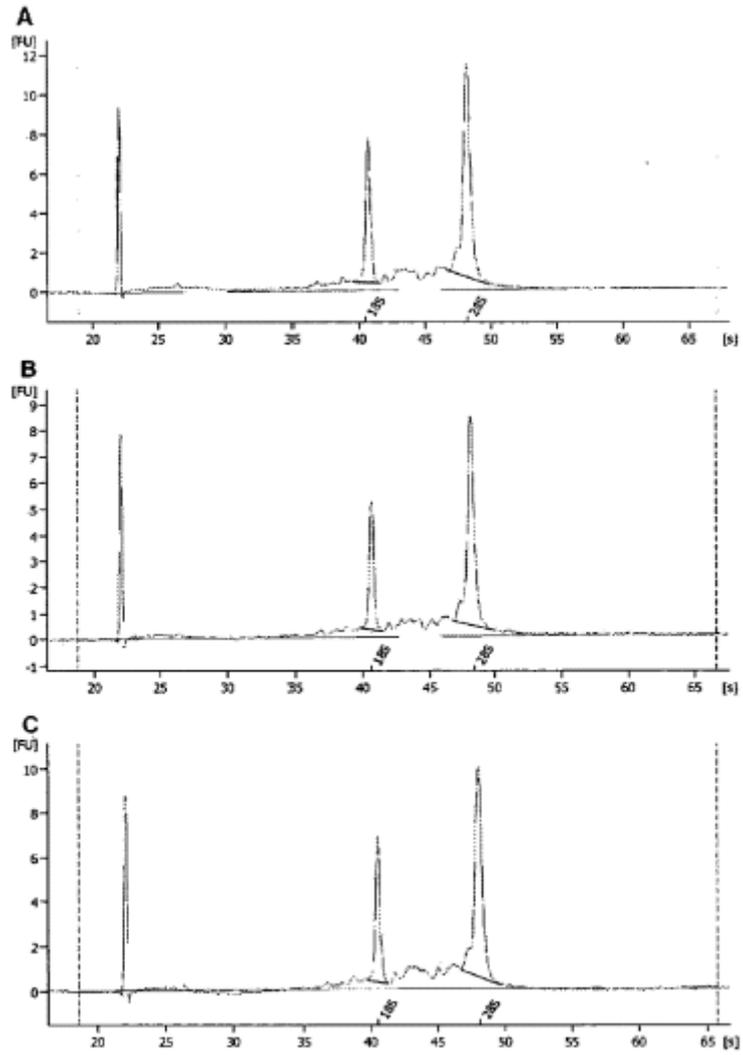


FIGURA 40

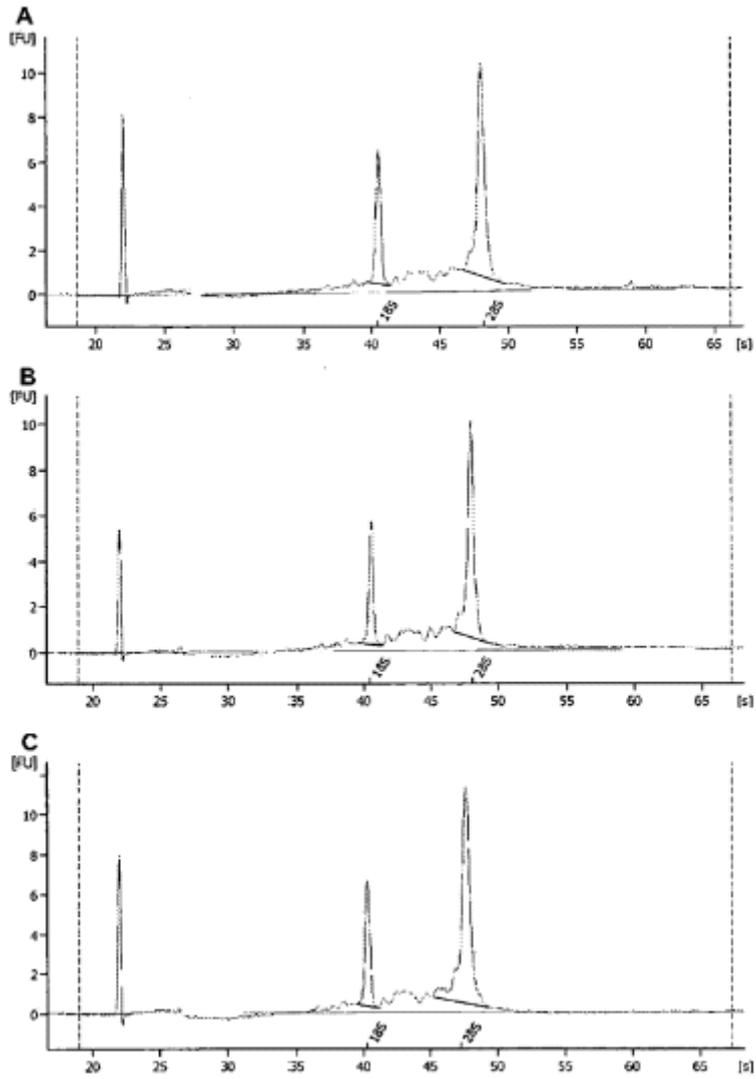


FIGURA 41

<b>Región de Cromosoma</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
chr1.-1.91625366.91625741	1
chr1.1.91625365.91625742	2
chr11.-1.84872657.84872882	3
chr11.1.84872657.84872879	4
chr12.-1.126216420.126216526	5
chr12.-1.20595620.20595779	6
chr12.1.126216422.126216526	7
chr12.1.20595620.20595778	8
chr16.-1.33870510.33870780	9
chr16.-1.33870782.33870924	10
chr16.-1.33871356.33871567	11
chr16.1.33870510.33871097	12
chr16.1.33871357.33871493	13
chr17.-1.30502222.30502487	14
chr17.1.30502222.30502388	15
chr19.-1.40758344.40758514	16
chr19.1.40758344.40758507	17
chr2.-1.132729275.132729395	18
chr2.-1.132755094.132755190	19
chr2.1.132729152.132729396	20
chr2.1.132755094.132755188	21
chr23.-1.108184279.108184494	22
chr23.1.108184266.108184494	23
chr42.-1.1677545.1678136	24
chr42.1.1677550.1678219	25
chr5.-1.71182494.71182703	26
chr5.1.71182494.71182700	27
chr7.-1.148315173.148315266	28
chr7.1.148315170.148315268	29

FIGURA 42

<b>1</b>	chr1.-1.91625366.91625741	iccagctcacgttccctatt 1L; ccaggtggggagttgact 1R
<b>2</b>	chr11.-1.84872657.84872882	gctaaataccggcaccgagac 2L; ggtttcacgccctctgtac 2R
<b>3</b>	chr12.-1.126216420.126216526	ggcgclaaaccaticgtaga 3L; ggagatctgactttcaatagatcg
<b>4</b>	chr12.-1.20595620.20595779	cggacaggattgacagattg 4L; tctctctgttatcggaatt 4R
<b>5</b>	chr16.-1.33870510.33871097	ttggagggcaagtttagtgc 5L; cagtcggcatcgttataggt 5R
<b>6</b>	chr16.-1.33871357.33871493	tccaataaccaacgagactctg 6L; gaaggccactgtccccta 6R
<b>7</b>	chr17.-1.30502222.30502388	ttttccgtacgccacattt 7L; ttccctcagtaatggcgagt 7R
<b>8</b>	chr19.-1.40758344.40758514	tcatcagaccccagaaaagg 8L; gattcggcaggtagtgtt 8R
<b>9</b>	chr2.-1.132729275.132729395	tctagcgggtgcaataigaatg 9L; cttggaiaaatggaalaggaccac
<b>10</b>	chr2.-1.132755094.132755190	ggacccatgttcaactgctg 10L; cagatcttggtgtagtagcaaa 10R

**FIGURA 43**

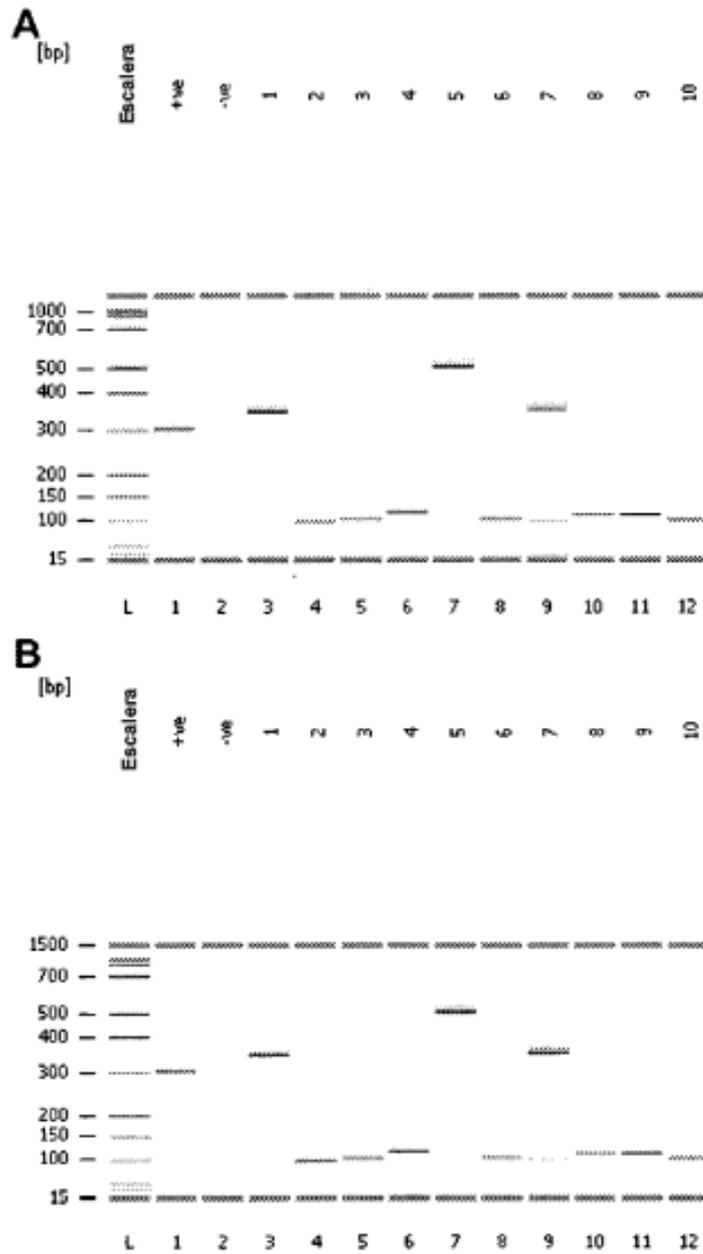


FIGURA 44

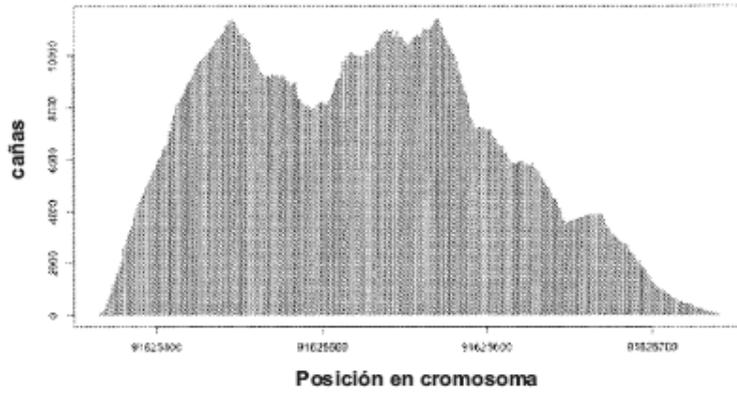


FIGURA 45

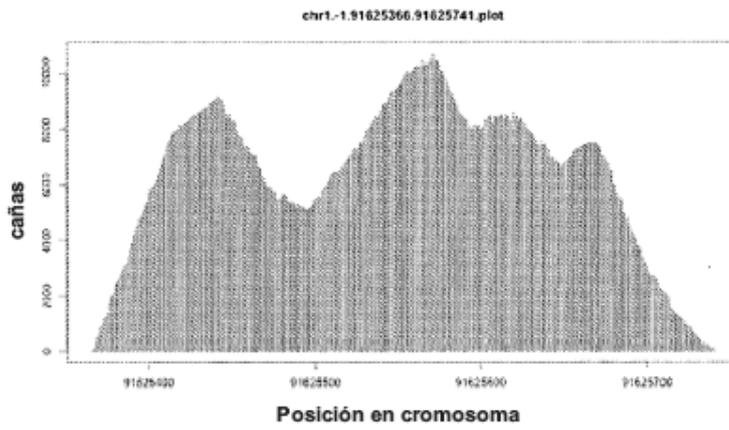


FIGURA 46

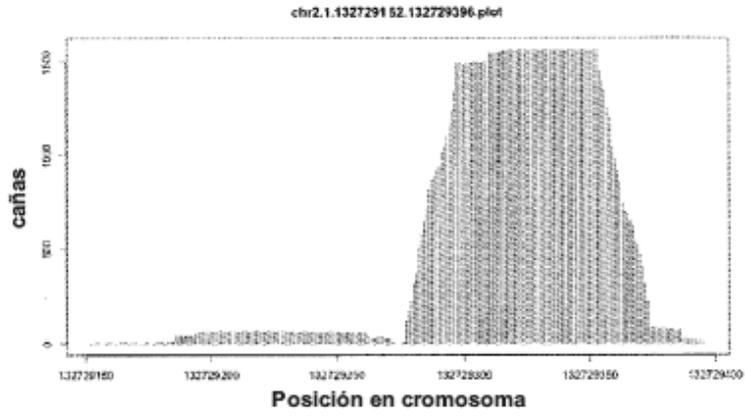


FIGURA 47

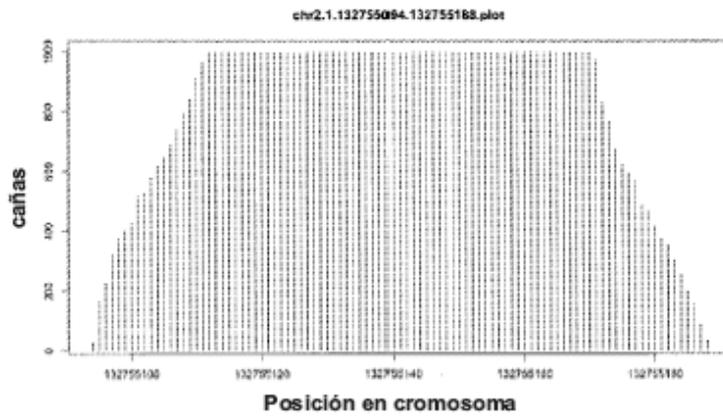


FIGURA 48

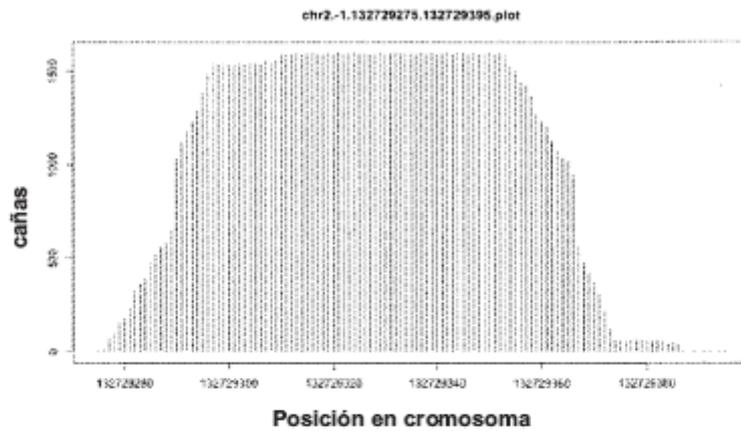


FIGURA 49

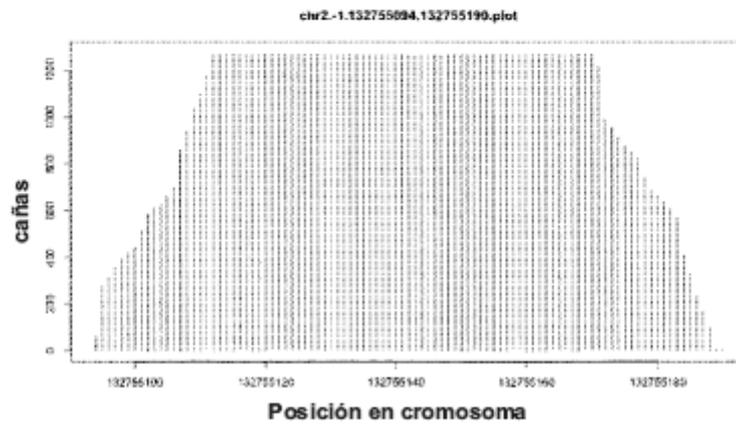


FIGURA 50

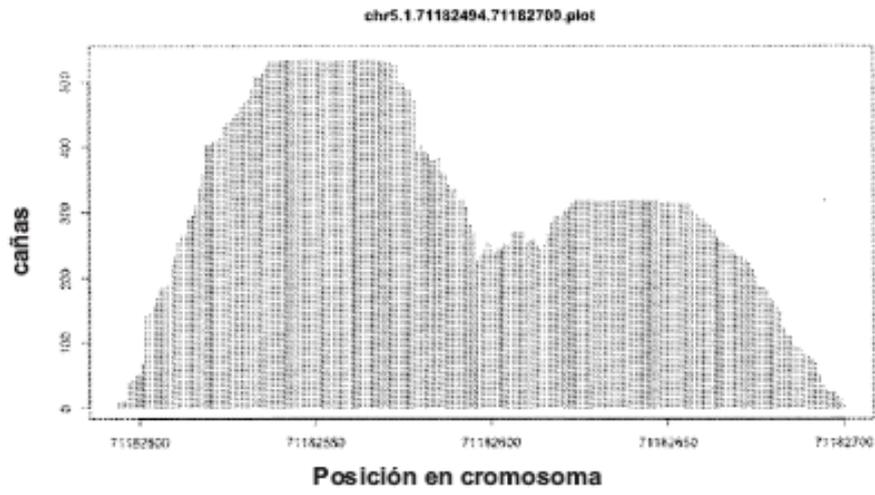


FIGURA 51

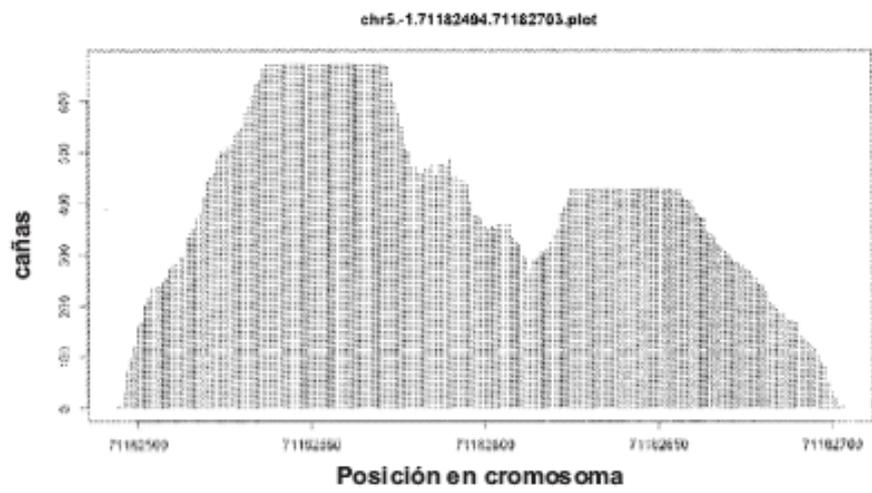


FIGURA 52

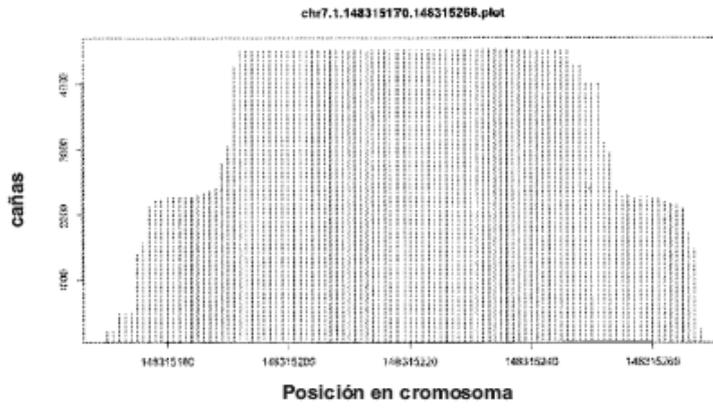


FIGURA 53

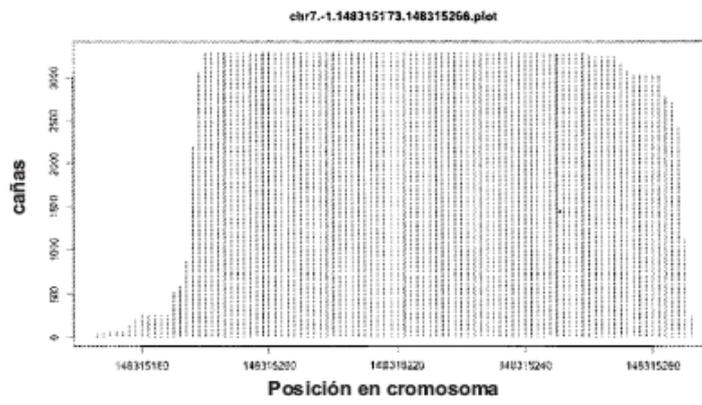


FIGURA 54

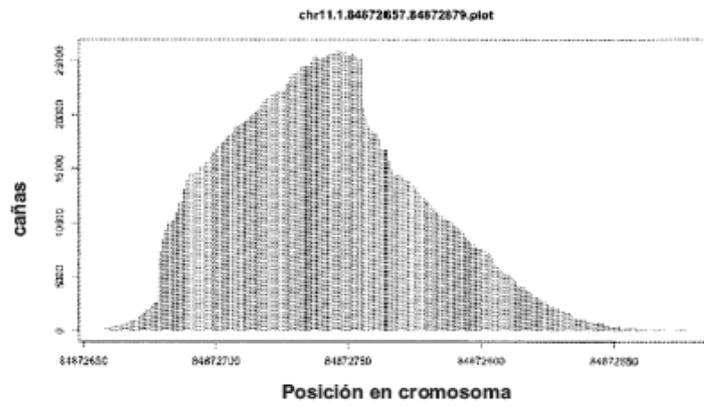


FIGURA 55

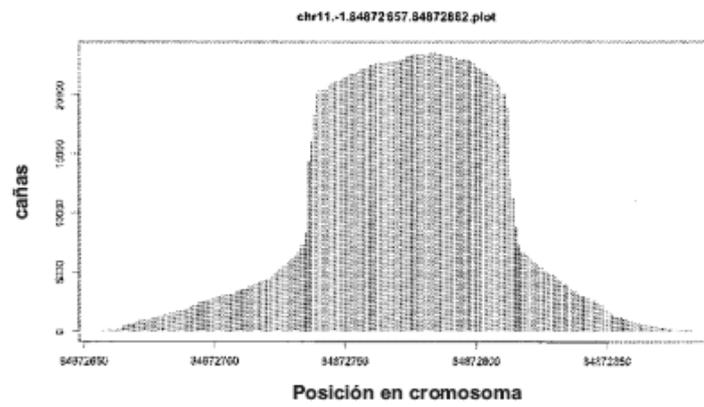
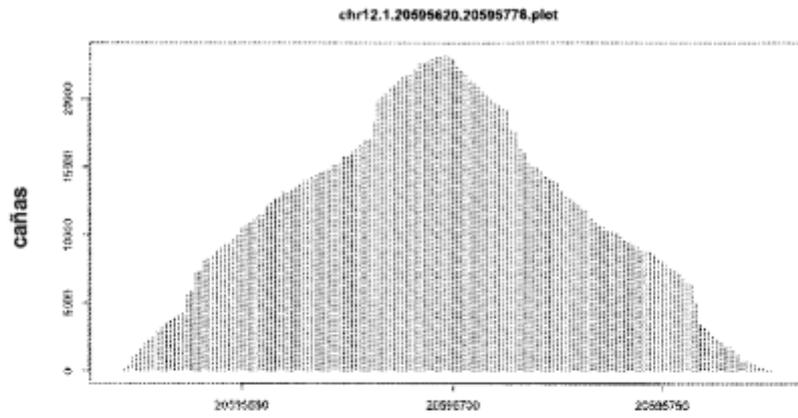
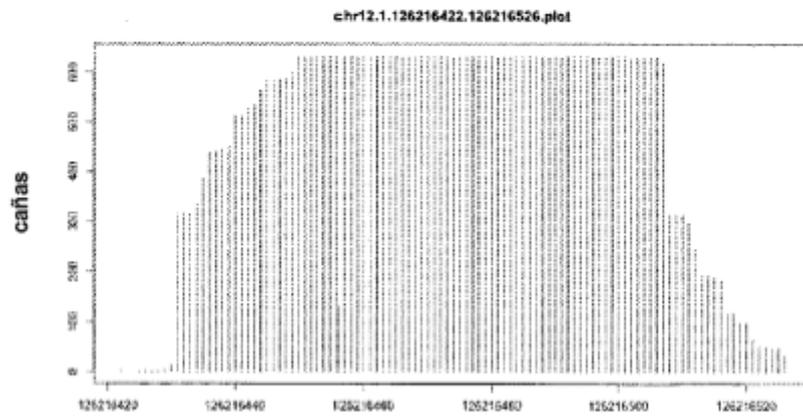


FIGURA 56



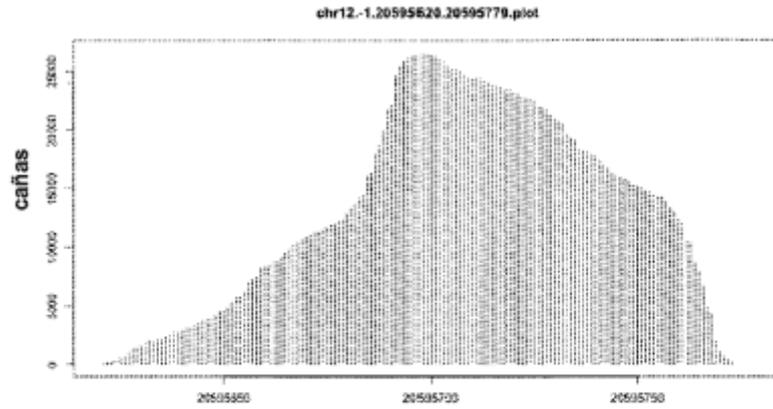
Posición en cromosoma

FIGURA 57



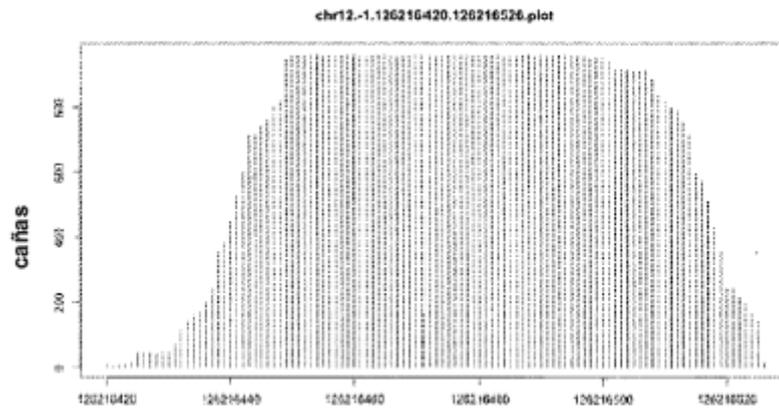
Posición en cromosoma

FIGURA 58



Posición en cromosoma

FIGURA 59



Posición en cromosoma

FIGURA 60

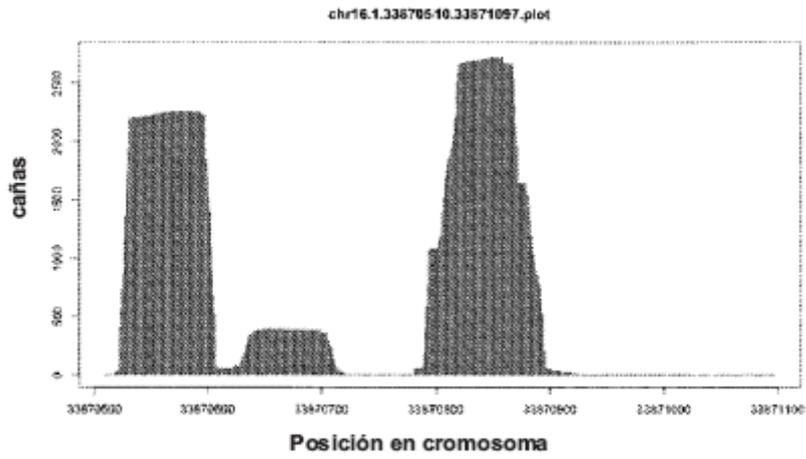


FIGURA 61

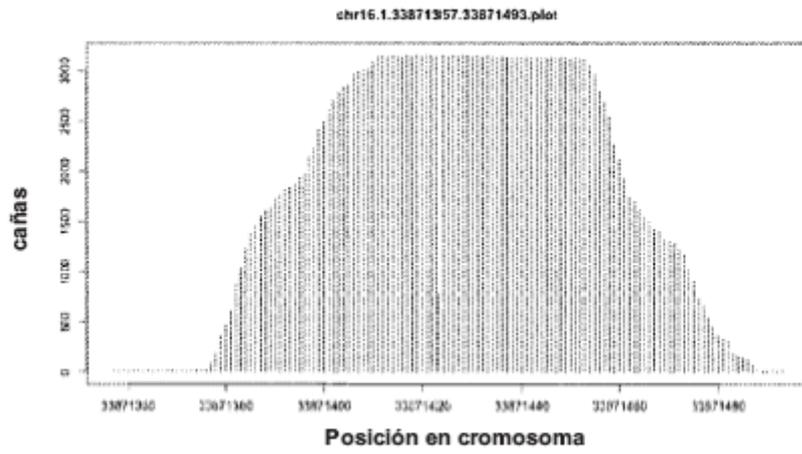


FIGURA 62

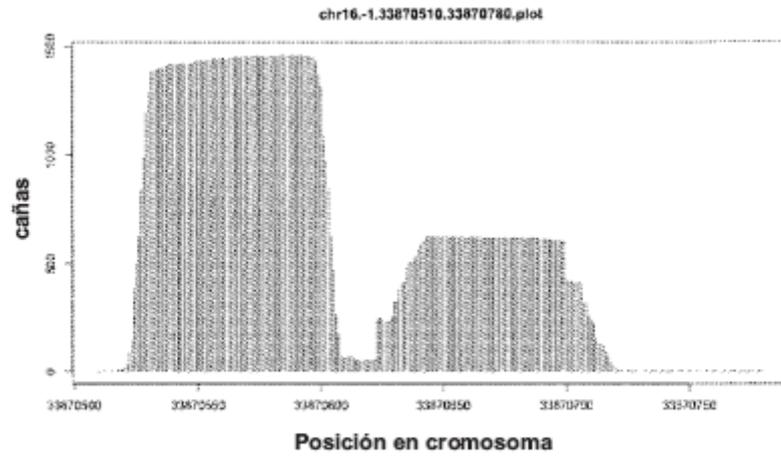


FIGURA 63

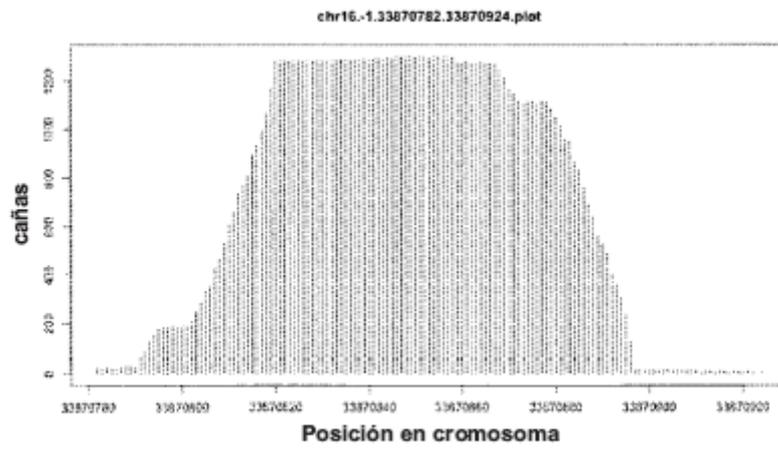


FIGURA 64

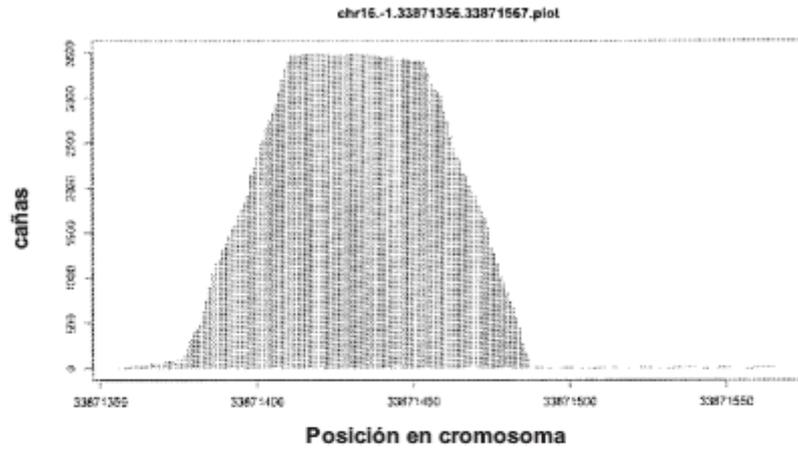


FIGURA 65

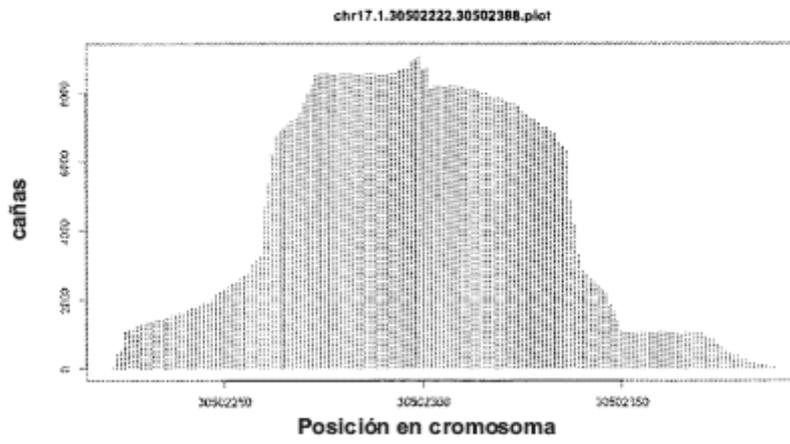


FIGURA 66

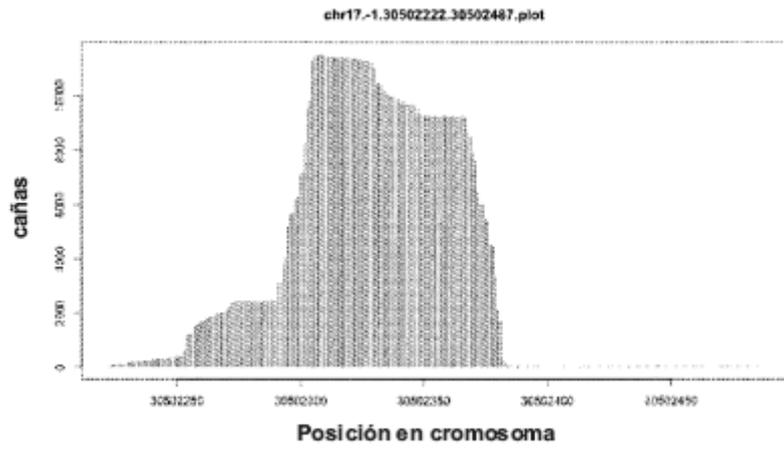


FIGURA 67

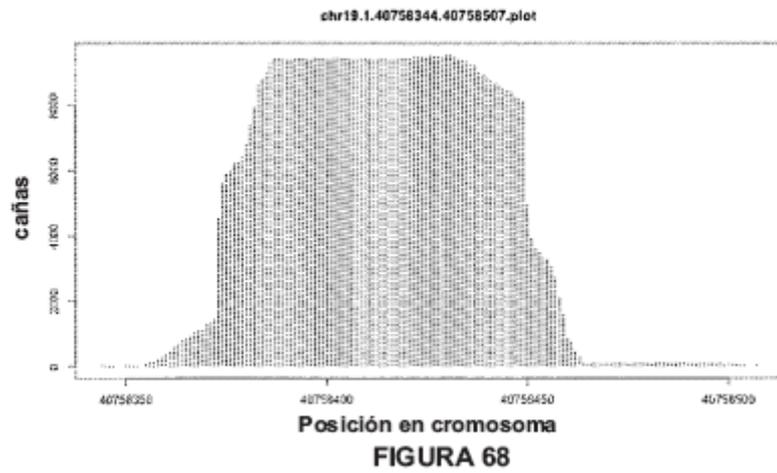
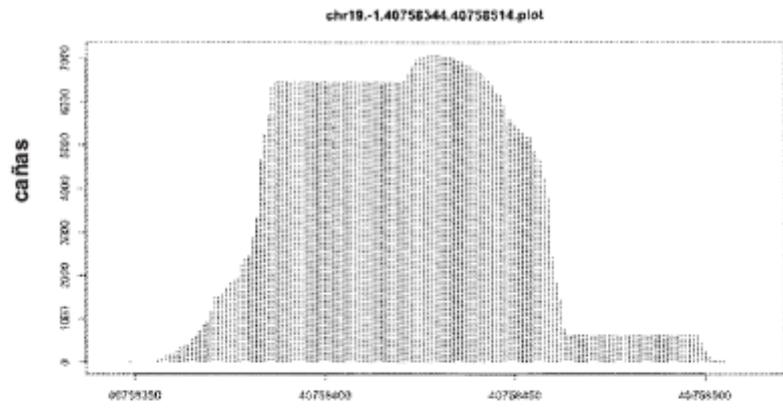
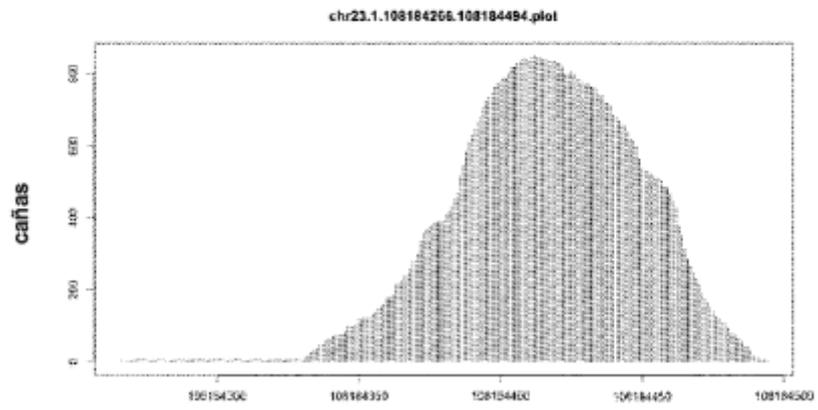


FIGURA 68



Posición en cromosoma

FIGURA 69



Posición en cromosoma

FIGURA 70

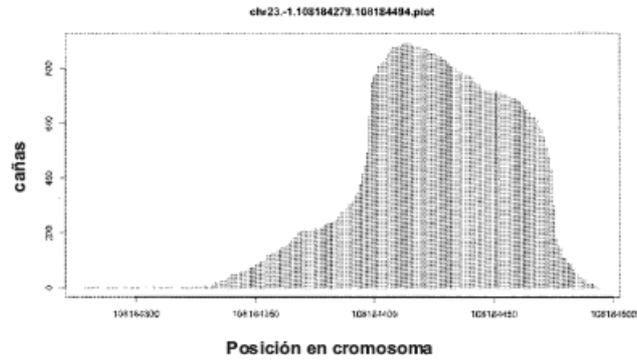


FIGURA 71

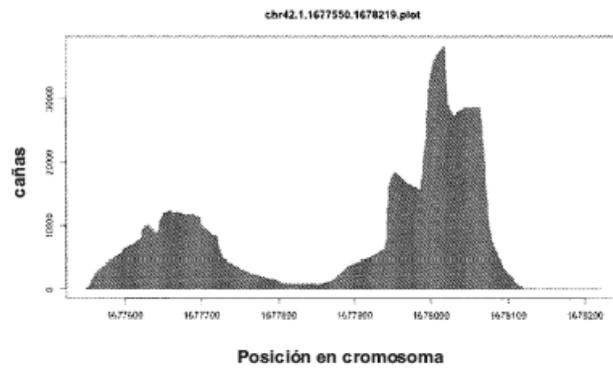


FIGURA 72

