

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 404**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2015 PCT/EP2015/062594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185730**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2015 E 15726199 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3152576**

54 Título: **Uso de TM9SF4 como biomarcador para exosomas asociados a tumores**

30 Prioridad:

06.06.2014 EP 14171464

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

15.02.2019

73 Titular/es:

**EXOSOMICS SIENA S.P.A. (100.0%)
Via Fiorentina 1
53100 Siena, IT**

72 Inventor/es:

**LOZUPONE, FRANCESCO;
CHIESI, ANTONIO;
GUAZZI, PAOLO;
ZAROVNI, NATASA;
FERRUZZI, PIETRO y
ZOCCO, DAVIDE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 700 404 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de TM9SF4 como biomarcador para exosomas asociados a tumores.

- 5 La presente invención se refiere a biomarcadores de microvesículas extracelulares para la determinación del estado de transformación tumoral o la presencia de un tumor en un sujeto, y a los usos de tales biomarcadores y a métodos de diagnóstico usando tales biomarcadores.

10 **Antecedentes de la invención**

Al contrario que los tumores malignos (o cancerosos), los tumores benignos son normalmente masas de células que carecen de la capacidad para invadir el tejido circundante o para metastatizar. Además, los tumores benignos tienen generalmente una velocidad de crecimiento más lenta que los tumores malignos y las células tumorales están habitualmente más diferenciadas.

15 Aunque la mayor parte de los tumores benignos no son potencialmente mortales, muchos tipos de tumores benignos tienen el potencial para volverse cancerosos (malignos) a través de un proceso conocido como transformación tumoral.

20 El cáncer no metastásico (primario o recurrente) es un cáncer que no se ha diseminado a partir del sitio primario (lugar donde se inició) a otros lugares en el cuerpo.

El cáncer metastásico es un cáncer que se ha diseminado desde la parte del cuerpo donde inició (el sitio primario) a otras partes del cuerpo.

25 El desarrollo de neurofibromas benignos a menudo puede estar vinculado una mutación del gen supresor de tumores NF1 en células del linaje de células de Schwann¹⁻³. Estas neoplasias pueden experimentar frecuentemente una transformación adicional a tumores malignos de la vaina nerviosa periférica (MPNST)¹⁻³. Actualmente está poco claro qué tipos celulares son particularmente susceptibles a la formación de MPNST, cuáles son los cambios moleculares que provocan el desarrollo de MPNST a partir de los neurofibromas o qué otros factores en el entorno tumoral podrían contribuir a la neoplasia. Además, se observan gliomas, particularmente astrocitomas pilocíticos del nervio óptico, y leucemias, con frecuencia aumentada en la población con NF1³.

35 Los MPNST tienen un pronóstico muy malo dado que no responden a la quimioterapia o radioterapia convencional, y tienen una elevada propensión a metastatizar⁴⁻⁷. Los pacientes con NF1 y sus familias son muy conscientes de estos hechos, lo cual es el porqué de que el desarrollo de un MPNST sea la complicación más temida por los pacientes que padecen esta enfermedad⁸. Sin embargo, la detección temprana a menudo se ve dificultada por el hecho de que los MPNST se desarrollan frecuentemente dentro de grandes neurofibromas preexistentes, lo que hace que el nuevo crecimiento o progresión sea difícil de detectar y distinguir, incluso con MRI. Este retraso en el diagnóstico probablemente es la causa del mal desenlace de MPNST en NF1 con respecto a sus homólogos esporádicos. Esto constituye el mayor impulso para la identificación de alteraciones moleculares que puedan detectarse de manera no invasiva y sean indicativas del inicio y la progresión de MPNST en pacientes con NF1, que serían útiles en el examen y diagnóstico temprano, así como en la monitorización de la enfermedad o el desenlace terapéutico en la práctica preclínica y clínica.

45 Se acepta generalmente que existen múltiples subtipos de neurofibromas que difieren en su ubicación y patrón de crecimiento, su asociación con NF1 y su potencial para la transformación maligna. Muchos investigadores en ciencia clínica y básica clasifican ampliamente los neurofibromas como variantes o bien dérmicas o bien plexiformes¹. Los neurofibromas plexiformes son variantes de neurofibromas que se producen casi exclusivamente en pacientes con NF1 y se cree que son congénitos; se distinguen de los neurofibromas intraneurales localizados por su patrón de crecimiento plexiforme característico. Los neurofibromas plexiformes tienen el riesgo más alto de transformación maligna a MPNST¹.

55 De manera similar a la transformación de los neurofibromas a MPNST, otros tumores benignos tienen el riesgo de transformarse en sus homólogos malignos. Este es el caso, por ejemplo, de la hiperplasia prostática benigna (BPH) a cáncer de próstata, pólipos de colon a cáncer colorrectal, nevos benignos a melanoma, estados de mama no cancerosos a cáncer de mama, nódulos pulmonares a cáncer pulmonar, astrocitoma en estadio temprano a glioblastoma y tumores ováricos benignos a cáncer ovárico. La mayor parte de estos cánceres también pueden metastatizarse.

60 Las vesículas extracelulares (EV) son una clase de orgánulos unidos a membranas secretados por diversos tipos celulares⁹. Las EV incluyen, sin limitación, (i) exosomas: vesículas membranosas de 30-100 nm de diámetro de origen endocítico, (ii) ectosomas (también denominados microvesículas de desprendimiento, SMV): vesículas membranosas grandes (50-1000 nm de diámetro) que se desprenden directamente desde la membrana plasmática (PM) y (iii) cuerpos apoptóticos (50-5000 nm de diámetro): liberados por células moribundas.

Los exosomas son nanovesículas extracelulares lipídicas naturales producidas y liberadas prácticamente por todos los tipos celulares de manera finamente regulada y funcionalmente relevante de modo que la composición de proteínas y ARNm refleja el tipo y estado de una célula original¹⁰⁻¹⁴. Estas vesículas tienen estabilidad y capacidad intrínseca para cruzar las barreras biológicas, de modo que los exosomas originados a partir de diferentes tejidos pueden encontrarse en fluidos biológicos fácilmente accesibles tales como la sangre¹⁵⁻¹⁷. Dados sus papeles y características biológicas, los exosomas se consideran centinelas tempranos de alteraciones en la homeostasis y metabolismo celular y tisular, y son una fuente atractiva para la identificación de biomarcadores novedosos relevantes para enfermedades, así como la presentación de marcadores tisulares conocidos en un paradigma de biopsia líquida. Esto es una premisa y promesa importante del uso de ensayos dirigidos a exosomas en el diagnóstico de enfermedades complejas, tales como cáncer. El desafío principal yace en la asociación de marcadores asociados a exosomas, tanto proteínas como ARN, a un tejido particular, en una condición particular, y la optimización de disoluciones y ensayos fiables, asequibles y no invasivos dirigidos a exosomas que puedan implementarse de manera realista en la investigación y práctica clínica¹⁸⁻²¹.

Actualmente existe la necesidad de biomarcadores de vesículas extracelulares que puedan determinar la presencia de un tumor (ya sea benigno, maligno o metastásico) o el estado de transformación de un tumor (de benigno a maligno y de no metastásico a metastásico)

La proteína TM9SF4 (SEQ ID NO: 1) es una proteína transmembrana recientemente descrita que pertenece a la superfamilia transmembrana 9 (*Transmembrane-9 Superfamily*, TM9SF), una familia bien definida de proteínas caracterizadas por un dominio N-terminal hidrófilo grande seguido por nueve dominios transmembrana²². Se sabe que esta proteína se sobreexpresa en melanoma y en leucemia mieloide aguda y síndromes mielodisplásicos, esto último debido a una amplificación de tres a diez veces de un fragmento del cromosoma 20 (20q11.21) que lleva el gen *TM9SF4* completo^{23,24}. TM9SF4 está implicado en la fagocitosis de bacterias y en el fenotipo canibal de células de melanoma metastásico, un fenómeno relacionado a menudo con un mal pronóstico^{25,26}. Se han detectado frecuentemente células cancerosas caníbales en cáncer gástrico y de colon²⁷⁻³⁰.

Se ha mostrado recientemente que TM9SF4 se une a V-ATPasa, una bomba de protones reguladora del pH sobreexpresada en varios tumores. Esta interacción estabiliza de manera aberrante la bomba de protones en su estado activo con las consecuentes alteraciones en el gradiente de pH, lo que a su vez está asociado con resistencia a fármacos e invasividad de células de cáncer de colon³¹.

La proteína CD9 (SEQ ID NO: 2) es un miembro de la superfamilia transmembrana 4, también conocida como la familia de tetraspanina. Las tetraspaninas son glicoproteínas de superficie celular con cuatro dominios transmembrana que forman complejos multiméricos con otras proteínas de superficie celular. La proteína codificada funciona en muchos procesos celulares incluyendo diferenciación, adhesión y transducción de señales, y la expresión de este gen desempeña un papel crítico en la supresión de la motilidad y metástasis de células cancerosas. Se encuentra en la superficie de exosomas y se considera la proteína de mantenimiento de exosomas para el análisis cuantitativo de nanovesículas derivadas de plasma.

Los miARN miARN21 (SEQ ID NO: 3) son una clase de ARN no codificantes pequeños cuyos productos maduros tienen ~22 nucleótidos de largo. Regulan negativamente la expresión génica induciendo inhibición de la traducción o degradación de transcritos³². Se ha encontrado que miR-21 está regulado por incremento en muchos estados patológicos incluyendo cáncer y enfermedades cardiovasculares³³. La identificación de varias dianas de miARN que son realmente oncogenes o supresores de tumores clásicos ha conducido a la idea ampliamente aceptada de que los miARN desempeñan papeles fundamentales en el inicio, la progresión y la metastasización del cáncer^{34,35}. miR-21 se indicó por primera vez como supresor apoptótico en diversas líneas celulares³⁶.

RNU6 (SEQ ID NO: 4) es una molécula de ARN no codificante (ARNnc) que funciona en la modificación de otros ARN nucleares pequeños (ARNnp). La obtención precisa del perfil de microARN (miRNA) es una etapa esencial para la comprensión de la significación funcional de estos ARN pequeños en procesos tanto fisiológicos como patológicos. Se sabe bien que la normalización es una de las etapas más críticas en qRT-PCR y genes comúnmente usados para este fin, tales como U6 y 5S³⁷, ya se ha descrito que se expresan de manera diferencial en cáncer, lo que hace que estos genes no sean adecuados como controles internos.

Descripción de la invención

En un primer aspecto de esta invención, se proporciona un método para la determinación *in vitro* de la presencia de un tumor en un sujeto, comprendiendo tal método:

- a) proporcionar una muestra biológica obtenida a partir de ese sujeto,
- b) aislar vesículas extracelulares a partir de dicha muestra, en el que esta etapa de aislamiento de vesículas extracelulares comprende el aislamiento de vesículas extracelulares positivas para TM9SF4,
- c) determinar, a partir de las vesículas extracelulares aisladas en la etapa b), el nivel o la presencia de un

biomarcador adecuado, y

d) comparar el nivel o la presencia del biomarcador determinado en la etapa c) con uno o más valores de referencia,

5 caracterizado porque las vesículas extracelulares positivas para TM9SF4 se aíslan a través de la unión a un anticuerpo anti-TM9SF4.

En otra realización, al menos una porción de las vesículas extracelulares son exosomas.

10 En una realización, el tumor es cáncer de colon.

En otra realización, el tumor es cáncer gástrico.

15 En otra realización, el tumor es cáncer de mama.

En otra realización, el tumor es cáncer pulmonar.

En otra realización, el tumor es melanoma.

20 En otra realización, el tumor es cáncer pancreático.

En otra realización, el tumor es cáncer ovárico.

25 En otra realización, el tumor es cáncer prostático.

En otra realización, el tumor es un tumor del sistema nervioso central.

En una realización particular, el tumor del sistema nervioso central es glioblastoma.

30 En otra realización, el tumor es MPNST.

En una realización, el biomarcador de la etapa c) es la proteína CD9.

35 En otra realización, el biomarcador de la etapa c) es miR-21.

En otra realización, el biomarcador de la etapa c) es RNU6.

40 Cualquier combinación de las realizaciones anteriores de este primer aspecto de la invención representa realizaciones adicionales de la invención.

En un segundo aspecto para esta invención, se proporciona un método para la determinación *in vitro* del estado de transformación tumoral en un sujeto, comprendiendo tal método:

45 a) proporcionar una muestra biológica obtenida a partir de ese sujeto,

b) aislar vesículas extracelulares a partir de dicha muestra, en el que esta etapa de aislamiento de vesículas extracelulares comprende el aislamiento de vesículas extracelulares positivas para TM9SF4,

50 c) determinar, a partir de las vesículas extracelulares aisladas en la etapa b), el nivel o la presencia de un biomarcador adecuado, y

d) comparar el nivel o la presencia del biomarcador determinado en la etapa c) con uno o más valores de referencia,

55 caracterizado porque las vesículas extracelulares positivas para TM9SF4 se aíslan a través de la unión a un anticuerpo anti-TM9SF4.

En una realización, la muestra biológica de la etapa a) se obtiene a partir de un paciente afectado por un tumor benigno.

60 En otra realización, al menos una porción de las vesículas extracelulares son exosomas.

En una realización, el estado de transformación tumoral es la transformación a un MPNST.

En otra realización, el estado de transformación tumoral es la transformación a un cáncer colorrectal.

65

En una realización, el biomarcador de la etapa c) es la proteína CD9.

- En otra realización, el biomarcador de la etapa c) es miR-21.
- 5 En otra realización, el biomarcador de la etapa c) es RNU6.
- Cualquier combinación de las realizaciones anteriores de este segundo aspecto de la invención representa realizaciones adicionales de la invención.
- 10 Un tercer aspecto de esta invención se refiere al uso de vesículas extracelulares positivas para TM9SF4 en una prueba para determinar la presencia de un tumor o el estado de transformación tumoral en un sujeto caracterizado porque la presencia del tumor o el estado de transformación tumoral se determina mediante un método según el primer o segundo aspecto de esta invención.
- 15 En una realización, al menos una parte de las vesículas extracelulares son exosomas.
- En una realización, el tumor es cáncer de colon.
- En otra realización, el tumor es cáncer gástrico.
- 20 En otra realización, el tumor es cáncer de mama.
- En otra realización, el tumor es cáncer pulmonar.
- En otra realización, el tumor es melanoma.
- 25 En otra realización, el tumor es cáncer pancreático.
- En otra realización, el tumor es cáncer ovárico.
- 30 En otra realización, el tumor es cáncer prostático.
- En otra realización, el tumor es un tumor de sistema nervioso central.
- En una realización particular, el tumor de sistema nervioso central es glioblastoma.
- 35 En otra realización, el tumor es MPNST.
- En una realización, el estado de transformación tumoral es la transformación a un MPNST.
- 40 En otra realización, el estado de transformación tumoral es la transformación a un cáncer colorrectal.
- Cualquier combinación de las realizaciones anteriores de este tercer aspecto de la invención representa realizaciones adicionales de la invención.
- 45 En un cuarto aspecto de esta invención, se proporciona el uso de un kit para determinar la presencia de un tumor o un estado de transformación tumoral en un sujeto, comprendiendo tal kit un anticuerpo anti-TM9SF4 y un reactivo seleccionado de la lista que consiste en un anticuerpo anti-CD9, un cebador de miR-21 o un cebador de RNU6.
- 50 En una realización, el tumor es cáncer de colon.
- En otra realización, el tumor es cáncer gástrico.
- En otra realización, el tumor es cáncer de mama.
- 55 En otra realización, el tumor es cáncer pulmonar.
- En otra realización, el tumor es melanoma.
- En otra realización, el tumor es cáncer pancreático.
- 60 En otra realización, el tumor es cáncer ovárico.
- En otra realización, el tumor es cáncer prostático.
- 65 En otra realización, el tumor es un tumor de sistema nervioso central.

En una realización particular, el tumor de sistema nervioso central es glioblastoma.

En otra realización, el tumor es MPNST.

5 En una realización, el estado de transformación tumoral es la transformación a un MPNST.

En otra realización, el estado de transformación tumoral es la transformación a un cáncer colorrectal.

10 En otra realización, el kit comprende además instrucciones para parámetros operativos adecuados en forma de una etiqueta o prospecto separado.

Cualquier combinación de las realizaciones anteriores de este cuarto aspecto de la invención representa realizaciones adicionales de la invención.

15 En todos los aspectos y realizaciones de la presente invención, una “muestra biológica” es por ejemplo una muestra tumoral, un líquido corporal, una muestra de plasma, una muestra de orina o una muestra de saliva.

20 En todos los aspectos y realizaciones de la presente invención, un “sujeto” es o bien un ser humano o bien un mamífero.

Debido a la naturaleza micelar de las vesículas extracelulares tales como los exosomas, algunas biomoléculas presentes en estas vesículas pueden detectarse sin lisar las vesículas porque residen en la membrana, mientras que algunas otras sólo pueden detectarse después de la lisis de las vesículas porque están ubicadas dentro de la vesícula.

25

Biomarcador	Tipo	Detectado a partir de
CD9	Proteína	Membrana de vesícula extracelular
miR-21	miARN	Vesícula extracelular completa
RNU6	ARNnp	Vesícula extracelular completa

Ejemplos

30 A continuación, a modo de ejemplo solamente, hay una descripción detallada de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

35 La figura 1 compara los niveles de los biomarcadores TM9SF4 y CD9 medidos por FACS en una línea celular de MPNST (S462, primera columna), una línea de neurofibroma plexiforme (54836T_003, segunda columna) y una línea celular de neurofibroma dérmico (1201A078, tercera columna). La mediana de los valores demuestra que los biomarcadores, cuando se detectan a partir de la membrana del exosoma, pueden diferenciar entre estados benignos (neurofibroma plexiforme, neurofibroma dérmico) y malignos (MPNST).

40 La figura 2 muestra los resultados de una prueba de Elisa de tipo sándwich en donde 40, 20, 10 y 5 µg de exosomas purificados por un protocolo de ultracentrifugación, a partir de medios acondicionados que se originan de una línea celular de glioblastoma (U87) o tres líneas celulares de MPNST (S462, T265 y 88-14) o de una línea celular de riñón embrionario humano (HEK293), se capturan con un anticuerpo anti-TM9SF4 y se detectan con un anticuerpo anti-CD9, lo que muestra que estos biomarcadores se expresan en la membrana exosómica, y que este ensayo de Elisa de tipo sándwich particular puede usarse para detectar neurofibroma maligno (MPNST) u otros exosomas derivados de tumores sólidos (por ejemplo, glioblastoma) y no exosomas purificados de HEK293. La razón con respecto al fondo notificada en el eje de las ordenadas corresponde a los valores de absorbancia de cada muestra divididos entre la absorbancia promedio de fondo (PBS solo, 0 µg = razón con respecto al fondo 1).

45 50 Figura 3A. La evaluación por IHC de TM9SF4 en sujetos con cáncer colorrectal (CRC) y cáncer gástrico (GC) en comparación con tejido circundante sano y lesiones preneoplásicas (pólipos hiperplásicos y adenoma tubulovelloso, y displasia gástrica, respectivamente) reveló una tinción altamente específica del tejido tumoral en estadios tanto temprano como avanzado, con poca o ninguna expresión en tejido sano o displásico. En total, el 90% de los cánceres examinados expresaron fuertemente TM9SF4, y el nivel de expresión (puntuación de IHC) se correlacionaba significativamente con el estadio de enfermedad. Figura 3B. Tinción por IHC de células positivas para TM9SF4/mm² en cánceres de mama, pulmón y melanoma en comparación con los tejidos circundantes sanos. La figura reveló un número significativo superior de células positivas para TM9SF4/mm² en todos los tejidos cancerosos analizados.

55 60 La figura 4 muestra los resultados de una prueba de ELISA de tipo sándwich donde 100 µl de muestras de plasma preaclaramadas (véanse materiales y métodos) obtenidas a partir de pacientes en estadio tumoral temprano (clasificación de TNM T1-2N0M0) o avanzado (clasificación de TNM T3-4NxMx) se han sometido a inmunocaptura mediante placas de 96 pocillos recubiertas con anticuerpo frente a TM9SF4. La detección por anticuerpo frente a

5 CD9 reveló valores altamente específicos de razón con respecto al fondo de las muestras de plasma tumoral en estadios tanto temprano como avanzado, con muy baja expresión en muestras de plasma de donantes sanos. Los números en el gráfico de barras correspondían al número de observaciones para cada grupo de estudio. Se calculó la razón con respecto al fondo dividiendo los valores de absorbancia de muestras entre el valor del fondo (sólo PBS en el pocillo de razón con respecto al fondo = 1).

10 La figura 5 muestra los resultados de una prueba de ELISA de tipo sándwich donde 100 µl de muestras de plasma preacla­radas (véanse materiales y métodos) obtenidas a partir de pacientes con tumores se han sometido a inmunocaptura mediante placas de 96 pocillos recubiertas con anticuerpo frente a TM9SF4. La detección por anticuerpo frente a CD9 reveló valores altamente específicos de razón con respecto al fondo de las muestras de plasma tumoral con muy baja expresión en muestras de plasma de donantes sanos. En el eje horizontal se notifica el grupo tumoral y el número de observaciones (N). Se calculó la razón con respecto al fondo dividiendo los valores de adsorbancia de muestras entre el valor del fondo (sólo PBS en el pocillo de razón con respecto al fondo = 1).

15 La figura 6 representa una curva de característica operativa del receptor (ROC) calculada por el programa GraphPad Prism usando los datos de cáncer colorrectal (CRC) notificados en la figura 5. El grupo de donantes sanos se usó para calcular la especificidad y el umbral óptimo del ensayo de tipo sándwich de ELISA para TM9SF4/CD9 en las muestras de plasma. La figura muestra cómo, al asumir un umbral >6,925, la prueba tiene una sensibilidad >92% y una especificidad >95%.

20 La figura 7 representa una curva ROC calculada por el programa GraphPad Prism usando los datos de cáncer gástrico notificados en la figura 5. El grupo de donantes sanos se usó para calcular la especificidad y el umbral óptimo del ensayo de tipo sándwich de ELISA para TM9SF4/CD9 en las muestras de plasma. La figura muestra cómo, al asumir un umbral >7,025, la prueba tiene una sensibilidad >83,9% y una especificidad >95%.

25 La figura 8 representa una curva ROC calculada por el programa GraphPad Prism usando los datos de cáncer de mama notificados en la figura 5. El grupo de donantes sanos se usó para calcular la especificidad y el umbral óptimo del ensayo de tipo sándwich de ELISA para TM9SF4/CD9 en las muestras de plasma. La figura muestra cómo, al asumir un umbral >7,004, la prueba tiene una sensibilidad >88,2% y una especificidad >95%.

30 La figura 9 representa una curva ROC calculada por el programa GraphPad Prism usando los datos de cáncer de próstata notificados en la figura 5. El grupo de donantes sanos se usó para calcular la especificidad y el umbral óptimo del ensayo de tipo sándwich de ELISA para TM9SF4/CD9 en las muestras de plasma. La figura muestra cómo, al asumir un umbral >7,005, la prueba tiene una sensibilidad >75,8% y una especificidad >95%.

35 La figura 10 muestra los resultados de una prueba de ELISA de tipo sándwich donde 100 µl de muestras de SUERO preacla­radas (véanse materiales y métodos) obtenidas a partir de pacientes con tumores, se han sometido a inmunocaptura mediante placas de 96 pocillos recubiertas con anticuerpo frente a TM9SF4. La detección por anticuerpo frente a CD9 reveló valores superiores significativos de razón con respecto al fondo de las muestras de suero tumoral, en comparación con muestras de suero de donantes sanos. Estos resultados sugieren que la prueba ELISA TM9SF4/CD9 es adecuada también para muestra de plasma de cáncer de páncreas.

45 La figura 11-A muestra los resultados de una prueba de ELISA de tipo sándwich donde 100 µl de muestras de plasma preacla­radas (véanse materiales y métodos) obtenidas a partir de siete cánceres colorrectales (CRC n.º 1 a n.º 7) y el grupo de control (donantes sanos, HD), se han sometido a inmunocaptura mediante placas de 96 pocillos recubiertas con anticuerpo frente a TM9SF4. La figura 11-B muestra la expresión relativa de miR-21 derivado de vesículas extracelulares (EV) (normalizado a miR-451) a partir de 100 µl del MISMO conjunto de muestras. Las vesículas positivas a TM9SF4 se capturaron usando perlas recubiertas con anticuerpo anti-TM9SF4 y el ARN se extrajo y analizó por RT-qPCR tal como se describe en la sección de materiales y métodos. El umbral de diagnóstico (línea horizontal) para el ensayo de ELISA se ajustó tal como se describió anteriormente (véanse materiales y métodos), y para el ensayo de miR-21 se ajustó a un valor 2 veces mayor que el valor medio del grupo de control. Sorprendentemente, 6 de 7 muestras de CRC mostraron resultados de diagnóstico coincidentes, lo que sugiere una correlación entre estos dos ensayos basados en inmunocaptura con TM9SF4.

55 La figura 12 muestra la expresión relativa de miR-21 derivado de EV (normalizado a miR-451 o a miR-574) a partir de 100 µl de plasma de pacientes de cáncer (cáncer colorrectal (CRC) N = 7; cáncer gástrico N = 6; cáncer de mama N = 6; enfermedad de próstata N = 5; melanoma N = 5; ovario N = 6; cáncer pulmonar N = 6) y grupo de control (donantes sanos N = 11). Las EV positivas para TM9SF4 se capturaron usando perlas recubiertas con anticuerpo anti-TM9SF4 y el ARN se extrajo y analizó por RT-qPCR tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Los datos sugieren que el miR-21 derivado de EV se sobreexpresa en el plasma de pacientes de cáncer y que tanto miR-451 como miR-574 son miAR de referencia adecuados para determinar la expresión relativa de miRNA derivados de tumores a partir de las EV.

65 La figura 13 muestra la expresión relativa del RNU6 derivado de EV y miR-21 derivado de EV (normalizados a miR-223) a partir de 1 ml de sobrenadante celular concentrado (10X) de líneas celulares dérmicas, plexiformes y de

MPNST. Las EV positivas para TM9SF4 se capturaron usando perlas recubiertas con anticuerpo anti-TM9SF4 y el ARN se extrajo y analizó por RT-qPCR tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Los datos sugieren que el RNU6 y miR-21 derivados de EV se sobreexpresan en el sobrenadante de líneas celulares cancerosas humanas (MPNST) pero no en el sobrenadante de líneas celulares derivadas de tumores benignos (plexiformes) o líneas celulares normales (dérmicas).

La figura 14-A muestra la expresión relativa de miR-21 derivado de EV (normalizado a miR-451) a partir de 100 µl de plasma de un paciente con cáncer de próstata y un donante sano. Las EV se capturaron usando perlas recubiertas con anticuerpo anti-CD9 o perlas recubiertas con anticuerpo anti-TM9SF4. Se extrajo el ARN y se analizó por RT-qPCR tal como se describe en la sección de materiales y métodos. La figura 14-B muestra la expresión relativa de miR-21 derivado de EV (normalizado a miR-451) a partir de 100 µl de suero de un paciente con cáncer colorrectal (CRC) y un donante sano. Las EV se capturaron usando perlas recubiertas con anticuerpos anti-CD9 y anti-CD63, o perlas recubiertas con anticuerpo anti-TM9SF4, y el ARN se extrajo y analizó por RT-qPCR tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Los datos de las figuras 14-A y B sugieren que la inmunocaptura de EV derivadas de tumores con perlas recubiertas con anticuerpo anti-TM9SF4 enriquece miR-21 (un miARN asociado a cáncer bien conocido) TANTO EN plasma COMO en suero. A la inversa, la captura de EV con anticuerpos que seleccionan como diana marcadores genéricos de EV (CD9 o CD63) no enriquece miR-21.

La figura 15 muestra la expresión relativa de miR-21 derivado de EV (normalizado a miR-451) a partir de 100 µl de plasma de un paciente con cáncer de próstata y un donante sano. Las EV se capturaron usando perlas recubiertas con anticuerpo anti-TM9SF4 o perlas recubiertas con anticuerpos IgG de isotipo coincidente (ISO) para evaluar la unión inespecífica. Se extrajo el ARN y se analizó por RT-qPCR tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Los datos muestran el enriquecimiento específico de las EV positivas para TM9SF4 usando perlas recubiertas con Ac anti-TM9SF4 mientras que se observó una baja unión inespecífica en el plasma del paciente con cáncer.

La figura 16 muestra los resultados de una prueba de ELISA de tipo sándwich donde 100 µl de muestras de plasma preaclaras (véanse materiales y métodos) obtenidas a partir de pacientes con tumores y donantes sanos, se han sometido a inmunocaptura mediante placas de 96 pozos recubiertas con anticuerpo frente a CD9. La detección por anticuerpo frente a TM9SF4 reveló que la inversión del anticuerpo de captura y detección, utilizado en la figura 5, no es útil para distinguir muestras de plasma de origen tumoral de muestras de plasma de donantes sanos. La razón con respecto al fondo se calculó dividiendo los valores de adsorbancia de muestras entre el valor del fondo (sólo PBS en el pozo de razón con respecto al fondo = 1).

MÉTODOS

A continuación se encuentra una descripción de los métodos usados en los ejemplos para el aislamiento y análisis de los exosomas. El experto en la técnica reconocerá que existen métodos equivalentes alternativos.

Aislamiento de exosomas por protocolo de ultracentrifugación.

El medio acondicionado para la preparación y análisis de exosomas debe recogerse a partir de células de interés confluentes al 80-90%.

El sobrenadante del cultivo celular se recoge en condiciones estériles y se le añaden inhibidores de proteasas diluidos 1:1.000, se preaclara por filtración (0,2 µm) y se somete ultracentrifugación (aprox. 50 ml/tubo) a 110.000 g durante 1,5 horas a +4°C. Entonces se retira el sobrenadante y se descarta. El sedimento se resuspende en 100 µl de PBS helado antes de su dilución en 50 ml de PBS 1x helado, y se somete a ultracentrifugación a 110.000 g durante 1,5 horas a +4°C. El sedimento resultante se resuspende en 100 µl de PBS y se agita con vórtex durante 30 segundos antes de recoger con pipeta para experimentación.

Protocolo convencional para la detección de marcadores proteicos por análisis de FACS

La concentración exosómica se cuantifica usando el método de Bradford para la cuantificación de proteínas. Los exosomas aislados a partir de sobrenadantes de líneas celulares se incuban a 4°C durante la noche con perlas de látex con aldehído/sulfato (4% p/v, 4 µm) en una razón de 1:20. Después de una etapa de lavado en PBS, los exosomas adsorbidos sobre la superficie de las perlas se incuban en PBS + BSA al 0,5% con el anticuerpo primario relevante (para una concentración final de 5 µg/ml) y se mantienen 1 h a 4°C. Después de una etapa de lavado con PBS + BSA al 0,5%, las muestras se incuban durante 45' a 4°C con el anticuerpo secundario correspondiente (AlexaFluor 488 de ratón, conejo o cabra diluido 1:1000). Después de una etapa de lavado final en PBS, las muestras se resuspenden en 300 µl de PBS y se analizan en FACSCalibur (BD). Se usan anticuerpos de isotipo coincidente o anticuerpos secundarios solos como control negativo. Se lee la mediana de la intensidad de fluorescencia de cada muestra usando el canal FL1 y se normaliza para su control negativo.

Recogida de muestras:

Los criterios de inclusión comprendieron sólo un caso de cáncer recién diagnosticado, ninguno de los pacientes había recibido previamente tratamiento de radio o quimioterapia ni se sometieron a cirugía antes de la recogida de sangre. Todos los pacientes otorgaron su consentimiento firmado antes de incluirse en el estudio. El estudio lo realizó el Riga East University Hospital y lo aprobó un comité ético local, y era conforme con la Declaración de Helsinki. La sangre, habiéndose recogido en tubos de EDTA de 10 ml, se invirtió suavemente y se centrifugó a 1500 g 10' a TA en 30 minutos desde el momento de la recogida de sangre.

El centro de transfusiones del North Estonia Hospital proporcionó plasma de donantes sanos certificados.

Examen inmunohistoquímico del tejido

Se sometieron a inmunotinción secciones de tejidos para visualizar células que eran positivas para TM9SF4. Se logró la recuperación de antígenos mediante la incubación de los portaobjetos en tampón Tris/EDTA a pH = 9,0 en horno de microondas científico durante 30 min. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con H₂O₂ al 3,0% durante 10 min. La unión inespecífica de anticuerpos primarios se bloqueó con suero de caballo normal antes de la incubación con anticuerpos. Los portaobjetos se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo frente a TM9SF4 (dilución 1:400). Los portaobjetos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora a una dilución 1:100. La unión de los anticuerpos se detectó usando el reactivo EnVision (1 hora a temperatura ambiente). El color de la reacción de inmunoperoxidasa se reveló incubando los portaobjetos con diaminobencidina durante 7 min. Un control negativo que omitió el anticuerpo primario se incluyó para cada experimento.

Obtención de imágenes y cuantificación de células.

Para cada muestra se dio una puntuación según la intensidad de la tinción nucleica o citoplásmica (sin tinción = 0, tinción débil = 1, tinción moderada = 2, tinción fuerte = 3) y el grado de células teñidas (0% = puntuación 0; - 10% = 1; 11-50% = 2; 51> = puntuación 3. Negativo significa área de tinción del 0%. Focalmente positivo significa área de tinción del 1-80%, difusamente positivo significa área de tinción del 81-100%. Para cáncer de mama, pulmón y melanoma se ha contado el número de células positivas para cáncer/mm².

Análisis de datos

Los resultados para datos morfológicos se expresaron como las medias \pm DE. Los datos morfológicos e inmunohistoquímicos se analizaron por ANOVA bidireccional seguido por prueba a posteriori de Bonferroni para comparación entre grupos. La correlación con datos clínicos e histopatológicos se evaluó mediante la prueba de Spearman. En todas las pruebas, un valor de p de <0,05 se consideró estadísticamente significativo. Se usó el software SPSS versión 21 para el análisis estadístico.

Protocolo convencional para la detección de marcadores proteicos mediante ensayo de ELISA de tipo sándwich:

Ensayo de ELISA para exosomas purificados por medios acondicionados ultracentrifugados: Se cargan 40, 20, 10 y 5 μ g/100 μ l de PBS de exosomas aislados y 100 μ l de PBS como control negativo (0 μ g) en una placa de 96 pocillos prerrecubierta con anticuerpo frente a TM9SF4 (2 μ g/ml) (placa transparente). Brevemente, se recubren previamente placas de 96 pocillos con el anticuerpo de captura relevante, se lavan tres veces con PBS + TWEEN al 0,05% (tampón de lavado), se añaden los exosomas aislados y se incuban durante la noche a 37°C. Después de tres lavados con tampón de lavado, se incuban las placas con anticuerpo de detección frente a CD9, se incuban durante 2 h a 37°C, se lavan tres veces con tampón de lavado, se incuban durante una hora a 37°C con el anticuerpo secundario correspondiente y se lavan tres veces con tampón de lavado. Se añaden 100 μ l de TMB (tetrametilbencidina) a cada pocillo y, después de 5 minutos, se detiene la reacción por la adición de 100 μ l de disolución de detención (ácido sulfúrico 1 N).

La absorbancia O/D se lee con un instrumento M1000 Tecan a 450 nm.

Ensayo de ELISA para líquidos biológicos (plasma y suero):

Las muestras de plasma y suero se almacenan a -80°C, se descongelan a temperatura ambiente y se preaclaran después de la adición de un cóctel de inhibidores de proteasas 1:500 centrifugando a 1200 g 20' 4°C, transfiriendo el sobrenadante a otro vial y centrifugando de nuevo a 10000 g 30' 4°C. El sobrenadante obtenido se denomina preaclorado y se usa para el siguiente análisis.

Brevemente, se incuban 100 μ l de plasma o suero preaclorado durante la noche a 4°C en placas de 96 pocillos prerrecubiertas con anticuerpo frente a TM9SF4 (2 μ g/ml). Después de tres lavados con tampón de lavado, se incuban las placas con anticuerpo de detección frente a CD9, se incuban durante 2 h a 4°C, se lavan tres veces con tampón de lavado, se incuban durante una hora a 4°C con el anticuerpo secundario correspondiente y se lavan tres veces con tampón de lavado. Se añade una cantidad de 100 μ l de TMB (tetrametilbencidina) a cada pocillo y,

después de 5 minutos, se detiene la reacción mediante la adición de 100 µl de disolución de detención (ácido sulfúrico 1 N).

5 La absorbancia O/D se lee con un instrumento M1000 Tecan a 450 nm.

Preparación de perlas recubiertas con TM9SF4

10 Las perlas recubiertas con un anticuerpo frente a TM9SF4 pueden obtenerse usando el método conocido por el experto en la técnica, o modificaciones del mismo.

Extracción de ARN y miARN a partir de exosomas inmunocapturados.

Aislamiento de exosomas por inmunocaptura a través de perlas prerrecubiertas con TM9SF4: medios de cultivo o líquidos biológicos (plasma y suero)

15 Se añade una cantidad de 10 ml de sobrenadante a partir del cultivo celular a inhibidores de proteasas diluidos a 1:1000 y concentrados 10X usando unidades de filtración centrífuga (Millipore). Se incuba entonces una cantidad de 1 ml de medio 10X durante la noche a 4°C con inmunoperlas prerrecubiertas con anticuerpo frente a TM9SF4.

20 Las EV inmunocapturadas se lavan tres veces con PBS + Tween al 0,01%, y se tratan con 0,7 ml de QIAZOL.

Se diluyen 100 µl de plasma o suero preclarado con 900 µl de PBS 1X y se incuba durante la noche a 4°C en un rotador con 10 µl de perlas prerrecubiertas con TM9SF4. Las perlas se lavan tres veces con PBS + Tween al 0,01%, y se tratan con 0,7 ml de QIAZOL.

25 Se extrae el ARN total usando el kit de extracción de ARN total (Hansabiomed) y se cuantifica el ARN eluido en el instrumento Nanodrop.

Amplificación de miARN y snoARN, y análisis de RT-qPCR

30 Los miRNA se sometieron a transcripción inversa usando un kit de RT miScript II (Qiagen) y se amplificaron 0,3 ng de ADNc mediante qRT-PCR en el sistema de detección por PCR en tiempo real CFX96™ (BIORAD) con el kit de PCR miScript SYBR Green (Qiagen), usando ensayos con cebadores miScript (Qiagen) que seleccionan como diana miR-21 (número de catálogo: MS00009079), RNU6, (número de catálogo: MS00033740) y los miARN de referencia miR-451 (número de catálogo: MS00004242), miR-574 (número de catálogo: MS00032025) y miR-223 (número de catálogo: MS00003871).

Bibliografía

40 11. Carroll SL, Ratner N. How does the Schwann cell lineage form tumors in NF1? *Glia*. 2008; 56(14):1590-605. Pub. elec. 23-09-2008. doi: 10.1002/glia.20776. PubMed PMID: 18803326; PubMed Central PMCID: PMC2652636.

45 2. Evans DG, Baser ME, McGaughan J, Sharif S, Howard E, Moran A. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet*. 2002; 39(5):311-4. Pub. elec. 16-05-2002. PubMed PMID: 12011145; PubMed Central PMCID: PMC1735122.

3. Korf BR. Malignancy in neurofibromatosis type 1. *Oncologist* 2000; 5(6):477-85.

50 4. Lewis JJ, Brennan MF. Soft tissue sarcomas. *Curr Probl Surg*. 1996; 33(10):817-72. Pub. elec. 01-10-1996. PubMed PMID: 8885853.

5. Woodruff JMK, H.P.; Louis, D.N.; Scheithauer, B.W. Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST). En: Kleihues PC, W.K., editor. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*. Primera ed. Lyon: IARC Press; 2000. p. 172-4.

55 6. Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgras DG, Reiman HM, Ilstrup DM. Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer*. 1986; 57(10):2006-21. Pub. elec. 15-05-1986. PubMed PMID: 3082508.

60 7. Ferner RE, Gutmann DH. International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer Res*. 2002; 62(5): 1573-7. Pub. elec. 16-03-2002. PubMed PMID: 11894862.

8. McQueen M, MacCollin M, Gusella J, Plotkin SR. Patient and physician attitudes regarding clinical trials in neurofibromatosis 1. *J Neurosci Nurs*. 2008; 40(6):341-5. Pub. elec. 28-01-2009. PubMed PMID: 19170300.

65 9. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73: 1907-1920.

10. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett.* 15 de noviembre de 2006; 107(2):102-8. Pub. elec. 17 de octubre de 2006.
- 5 11. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; 21(4):575-81.
12. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics.* Octubre de 2008 Oct; 8(19):4083-99. doi: 10.1002/pmic.200800109.
- 10 13. Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics.* 2010; 9(2):197-208.
- 15 14. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(6):654-9.
- 20 15. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol.* Julio de 2005; 17(7):879-87.
16. Mitchell PJ, Welton J, Staffurth J, Court J, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? 12;7:4. doi: 10.1186/1479-5876-7-4.
- 25 17. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Estevés M, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008; 10(12):1470-6.
- 30 18. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabro L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E, Brambilla D, Venturi G, Lozupone F, Santinami M, Huber V, Maio M, Rivoltini L, Fais S. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One.* 2009; 4(4):e5219.
19. Duijvesz D, Luider T, Bangma CH, Jenster G. Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer. *Eur Urol.* Mayo de 2011.
- 35 20. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* Julio de 2012; 1820(7):940-8.
- 40 21. Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, Ciccia F, De Leo G, Alessandro R. Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int J Mol Sci.* 6 de marzo de 2013; 14(3):5338-66.
22. Chluba-de Tapia J, de Tapia M, Jäggin V, Eberle AN. Cloning of a human multispinning membrane protein cDNA: evidence for a new protein family. *Gene.* 15 de septiembre de 1997; 197(1-2):195-204.
- 45 23. Lozupone F, Perdicchio M, Brambilla D, Borghi M, Meschini S, Barca S, Marino ML, Logozzi M, Federici C, Iessi E, de Milito A, Fais S. The human homologue of Dictyostelium discoideum phg1A is expressed by human metastatic melanoma cells. *EMBO Rep.* Diciembre de 2009; 10(12):1348-54. doi: 10.1038/embor.2009.236. Pub. elec. 6 de noviembre de 2009.
- 50 24. Mackinnon RN, Selan C, Wall M, Baker E, Nandurkar H, Campbell LJ. The paradox of 20q11.21 amplification in a subset of cases of myeloid malignancy with chromosome 20 deletion. *Genes Chromosomes Cancer.* Noviembre de 2010; 49(11):998-1013. doi: 10.1002/gcc.20806.
- 55 25. Fais S. Proton pump inhibitor-induced tumour cell death by inhibition of a detoxification mechanism. *J Intern Med.* Mayo de 2010; 267(5):515-25. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02225.x.
- 60 26. Perrin J, Mortier M, Jacomin AC, Viargues P, Thevenon D, Fauvarque MO. The nonaspanins TM9SF2 and TM9SF4 regulate the plasma membrane localization and signalling activity of the peptidoglycan recognition protein PGRP-LC in Drosophila. *J Innate Immun.* 2015; 7(1):37-46. doi: 10.1159/000365112. Pub. elec. 13 de agosto de 2014.
27. Caruso RA, Fedele F, Finocchiaro G, Arena G, Venuti A. Neutrophil-tumor cell phagocytosis (cannibalism) in human tumors: an update and literature review. *Exp Oncol.* 2012 34:306-11.
- 65 28. Caruso RA, Muda AO, Bersiga A, Rigoli L, Inferrera C. Morphological evidence of neutrophil-tumor cell phagocytosis (cannibalism) in human gastric adenocarcinomas. *Ultrastruct Pathol.* 2002 26:315-21.

29. McBurney McBurney MI, Van Soest PJ, Jeraci JL. Colonic carcinogenesis: the microbial feast or famine mechanism. *Nutr Cancer*. 1987; 10(1-2):23-8.
- 5 30. Bansal C, Tiwari V, Singh U, Srivastava A, Misra J. Cell Cannibalism: A cytological study in effusion samples. *J Cytol*. 2011 28:57-60.
- 10 31. Lozupone F, Borghi M, Marzoli F, Azzarito T, Matarrese P, Iessi E, Venturi G, Meschini S, Canitano A, Bona R, Cara A, Fais S. TM9SF4 is a novel V-ATPase-interacting protein that modulates tumor pH alterations associated with drug resistance and invasiveness of colon cancer cells. *Oncogene*. 9 de febrero de 2015. doi: 10.1038/onc.2014.437. [Pub. elec. antes de la impresión]
- 15 32. Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2003; 13:807-818.
- 20 33. Jazbutyte V, Thum T. MicroRNA-21: From cancer to cardiovascular disease. *Curr Drug Targets*. 2010; 11:926-935.
34. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:259-269. [PubMed]
35. Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumor-igenesis: A primer. *Am J Pathol*. 2007; 171:728-738. [PMC free article] [PubMed]
- 25 36. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005; 65:6029-6033.
- 30 37. Lim QE, Zhou L, Ho YK, Too HP. snoU6 and 5S RNAs are not reliable miRNA reference genes in neuronal differentiation. *Neuroscience* 2011; 199:32-43.

Lista de secuencias

- <110> HANSABIOMED OU
- 35 <120> BIOMARCADORES EXOSÓMICOS
- <130> PC1375EC
- <160> 4
- 40 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 642
- 45 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 700 404 T3

Met Ala Thr Ala Met Asp Trp Leu Pro Trp Ser Leu Leu Leu Phe Ser
 1 5 10 15

Leu Met Cys Glu Thr Ser Ala Phe Tyr Val Pro Gly Val Ala Pro Ile
 20 25 30

Asn Phe His Gln Asn Asp Pro Val Glu Ile Lys Ala Val Lys Leu Thr
 35 40 45

Ser Ser Arg Thr Gln Leu Pro Tyr Glu Tyr Tyr Ser Leu Pro Phe Cys
 50 55 60

Gln Pro Ser Lys Ile Thr Tyr Lys Ala Glu Asn Leu Gly Glu Val Leu
 65 70 75 80

Arg Gly Asp Arg Ile Val Asn Thr Pro Phe Gln Val Leu Met Asn Ser
 85 90 95

Glu Lys Lys Cys Glu Val Leu Cys Ser Gln Ser Asn Lys Pro Val Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Glu Gln Ser Arg Leu Val Ala Glu Arg Ile Thr Glu Asp
 115 120 125

Tyr Tyr Val His Leu Ile Ala Asp Asn Leu Pro Val Ala Thr Arg Leu
 130 135 140

Glu Leu Tyr Ser Asn Arg Asp Ser Asp Asp Lys Lys Lys Glu Lys Asp
 145 150 155 160

Val Gln Phe Glu His Gly Tyr Arg Leu Gly Phe Thr Asp Val Asn Lys
 165 170 175

ES 2 700 404 T3

Ile Tyr Leu His Asn His Leu Ser Phe Ile Leu Tyr Tyr His Arg Glu
 180 185 190

Asp Met Glu Glu Asp Gln Glu His Thr Tyr Arg Val Val Arg Phe Glu
 195 200 205

Val Ile Pro Gln Ser Ile Arg Leu Glu Asp Leu Lys Ala Asp Glu Lys
 210 215 220

Ser Ser Cys Thr Leu Pro Glu Gly Thr Asn Ser Ser Pro Gln Glu Ile
 225 230 235 240

Asp Pro Thr Lys Glu Asn Gln Leu Tyr Phe Thr Tyr Ser Val His Trp
 245 250 255

Glu Glu Ser Asp Ile Lys Trp Ala Ser Arg Trp Asp Thr Tyr Leu Thr
 260 265 270

Met Ser Asp Val Gln Ile His Trp Phe Ser Ile Ile Asn Ser Val Val
 275 280 285

Val Val Phe Phe Leu Ser Gly Ile Leu Ser Met Ile Ile Ile Arg Thr
 290 295 300

Leu Arg Lys Asp Ile Ala Asn Tyr Asn Lys Glu Asp Asp Ile Glu Asp
 305 310 315 320

Thr Met Glu Glu Ser Gly Trp Lys Leu Val His Gly Asp Val Phe Arg
 325 330 335

Pro Pro Gln Tyr Pro Met Ile Leu Ser Ser Leu Leu Gly Ser Gly Ile
 340 345 350

Gln Leu Phe Cys Met Ile Leu Ile Val Ile Phe Val Ala Met Leu Gly
 355 360 365

Met Leu Ser Pro Ser Ser Arg Gly Ala Leu Met Thr Thr Ala Cys Phe
 370 375 380

Leu Phe Met Phe Met Gly Val Phe Gly Gly Phe Ser Ala Gly Arg Leu
 385 390 395 400

Tyr Arg Thr Leu Lys Gly His Arg Trp Lys Lys Gly Ala Phe Cys Thr
 405 410 415

Ala Thr Leu Tyr Pro Gly Val Val Phe Gly Ile Cys Phe Val Leu Asn
 420 425 430

ES 2 700 404 T3

Cys Phe Ile Trp Gly Lys His Ser Ser Gly Ala Val Pro Phe Pro Thr
 435 440 445

Met Val Ala Leu Leu Cys Met Trp Phe Gly Ile Ser Leu Pro Leu Val
 450 455 460

Tyr Leu Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Arg Lys Gln Pro Tyr Asp Asn Pro
 465 470 475 480

Val Arg Thr Asn Gln Ile Pro Arg Gln Ile Pro Glu Gln Arg Trp Tyr
 485 490 495

Met Asn Arg Phe Val Gly Ile Leu Met Ala Gly Ile Leu Pro Phe Gly
 500 505 510

Ala Met Phe Ile Glu Leu Phe Phe Ile Phe Ser Ala Ile Trp Glu Asn
 515 520 525

Gln Phe Tyr Tyr Leu Phe Gly Phe Leu Phe Leu Val Phe Ile Ile Leu
 530 535 540

Val Val Ser Cys Ser Gln Ile Ser Ile Val Met Val Tyr Phe Gln Leu
 545 550 555 560

Cys Ala Glu Asp Tyr Arg Trp Trp Trp Arg Asn Phe Leu Val Ser Gly
 565 570 575

Gly Ser Ala Phe Tyr Val Leu Val Tyr Ala Ile Phe Tyr Phe Val Asn
 580 585 590

Lys Leu Asp Ile Val Glu Phe Ile Pro Ser Leu Leu Tyr Phe Gly Tyr
 595 600 605

Thr Ala Leu Met Val Leu Ser Phe Trp Leu Leu Thr Gly Thr Ile Gly
 610 615 620

Phe Tyr Ala Ala Tyr Met Phe Val Arg Lys Ile Tyr Ala Ala Val Lys
 625 630 635 640

Ile Asp

<210> 2

<211> 228

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 700 404 T3

Met Pro Val Lys Gly Gly Thr Lys Cys Ile Lys Tyr Leu Leu Phe Gly
 1 5 10 15

Phe Asn Phe Ile Phe Trp Leu Ala Gly Ile Ala Val Leu Ala Ile Gly
 20 25 30

Leu Trp Leu Arg Phe Asp Ser Gln Thr Lys Ser Ile Phe Glu Gln Glu
 35 40 45

Thr Asn Asn Asn Asn Ser Ser Phe Tyr Thr Gly Val Tyr Ile Leu Ile
 50 55 60

Gly Ala Gly Ala Leu Met Met Leu Val Gly Phe Leu Gly Cys Cys Gly
 65 70 75 80

Ala Val Gln Glu Ser Gln Cys Met Leu Gly Leu Phe Phe Gly Phe Leu
 85 90 95

Leu Val Ile Phe Ala Ile Glu Ile Ala Ala Ala Ile Trp Gly Tyr Ser
 100 105 110

His Lys Asp Glu Val Ile Lys Glu Val Gln Glu Phe Tyr Lys Asp Thr
 115 120 125

Tyr Asn Lys Leu Lys Thr Lys Asp Glu Pro Gln Arg Glu Thr Leu Lys
 130 135 140

Ala Ile His Tyr Ala Leu Asn Cys Cys Gly Leu Ala Gly Gly Val Glu
 145 150 155 160

Gln Phe Ile Ser Asp Ile Cys Pro Lys Lys Asp Val Leu Glu Thr Phe
 165 170 175

Thr Val Lys Ser Cys Pro Asp Ala Ile Lys Glu Val Phe Asp Asn Lys
 180 185 190

Phe His Ile Ile Gly Ala Val Gly Ile Gly Ile Ala Val Val Met Ile
 195 200 205

Phe Gly Met Ile Phe Ser Met Ile Leu Cys Cys Ala Ile Arg Arg Asn
 210 215 220

Arg Glu Met Val
 225

<210> 3
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3
 uagcuuauca gacugauguu ga 22

10

<210> 4
 <211> 107
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 700 404 T3

<400> 4

gtgctcgctt cggcagcaca tataactaaa ttggaacgat acagagaaga ttagcatggc 60

ccctgcgcaa ggatgacacg caaattcgtg aagcgttcca tattttt 107

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar *in vitro* la presencia de un tumor en un sujeto, comprendiendo tal método:
 - 5 a) proporcionar una muestra biológica obtenida a partir de ese sujeto,
 - b) aislar vesículas extracelulares a partir de la muestra, en el que esta etapa de aislamiento de vesículas extracelulares comprende el aislamiento de vesículas extracelulares positivas a TM9SF4,
 - 10 c) determinar, a partir de las vesículas extracelulares aisladas en la etapa b), el nivel o la presencia de un biomarcador adecuado, y
 - d) comparar el nivel o la presencia del biomarcador determinado en la etapa c) con uno o más valores de referencia,
 - 15 caracterizado porque las vesículas extracelulares positivas para TM9SF4 se aíslan a través de la unión a un anticuerpo anti-TM9SF4.
2. Método según las la reivindicación 1, en el que al menos una porción de las vesículas extracelulares son exosomas.
3. Método según las reivindicaciones 1-2, en el que el tumor se selecciona de la lista que consiste en cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer pulmonar, melanoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer prostático, tumor del sistema nervioso central, glioblastoma o MPNST.
4. Método según las reivindicaciones 1-3, en el que el biomarcador de la etapa c) se selecciona de la lista que consiste en la proteína CD9, miR-21 o RNU6.
5. Método para determinar *in vitro* el estado de transformación tumoral en un sujeto, comprendiendo tal método:
 - 30 a) proporcionar una muestra biológica obtenida a partir de ese sujeto,
 - b) aislar vesículas extracelulares a partir de dicha muestra, en el que esta etapa de aislamiento de vesículas extracelulares comprende el aislamiento de vesículas extracelulares positivas para TM9SF4,
 - 35 c) determinar, a partir de las vesículas extracelulares aisladas en la etapa b), el nivel o la presencia de un biomarcador adecuado, y
 - d) comparar el nivel o la presencia del biomarcador determinado en la etapa c) con uno o más valores de referencia,
 - 40 caracterizado porque las vesículas extracelulares positivas para TM9SF4 se aíslan a través de la unión a un anticuerpo anti-TM9SF4.
 - 45
6. Método según la reivindicación 5, en el que la muestra biológica de la etapa a) se obtiene a partir de un sujeto afectado por un tumor benigno.
7. Método según las reivindicaciones 5-6, en el que al menos una porción de las vesículas extracelulares son exosomas.
8. Método según las reivindicaciones 5-6, en el que el estado de transformación tumoral es la transformación a un MPNST o a un cáncer colorrectal.
9. Método según las reivindicaciones 5-8, en el que el biomarcador adecuado se selecciona de la lista que consiste en la proteína CD9, miR-21 o RNU6.
10. Uso de vesículas extracelulares positivas para TM9SF4 en una prueba para determinar la presencia de un tumor o el estado de transformación tumoral en un sujeto, caracterizado porque la presencia del tumor o el estado de transformación tumoral se determina mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que las vesículas extracelulares son exosomas.
12. Uso según las reivindicaciones 10-11, en el que el tumor se selecciona de la lista que consiste en cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer pulmonar, melanoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico,

cáncer de próstata, tumor del sistema nervioso central, glioblastoma o MPNST.

- 5
13. Uso según las reivindicaciones 10-11, en el que el estado de transformación tumoral es la transformación a MPNST o a cáncer colorrectal.
- 10
14. Uso de un kit para determinar en un método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 ó 9 la presencia de un tumor o un estado de transformación tumoral en un sujeto, comprendiendo tal kit un anticuerpo anti-TM9SF4 y un reactivo seleccionado de la lista que consiste en un anticuerpo anti-CD9, un cebador de miR-21 o un cebador de RNU6.
15. Uso según la reivindicación 14, en el que el tumor se selecciona de la lista que consiste en cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer pulmonar, melanoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer prostático, tumor del sistema nervioso central, glioblastoma o MPNST.
- 15
16. Uso según la reivindicación 14, en el que el estado de transformación tumoral es la transformación a un MPNST o a un cáncer colorrectal.
- 20
17. Uso según las reivindicaciones 14-16, que comprende además instrucciones para parámetros operativos adecuados, en forma de una etiqueta o prospecto separado.

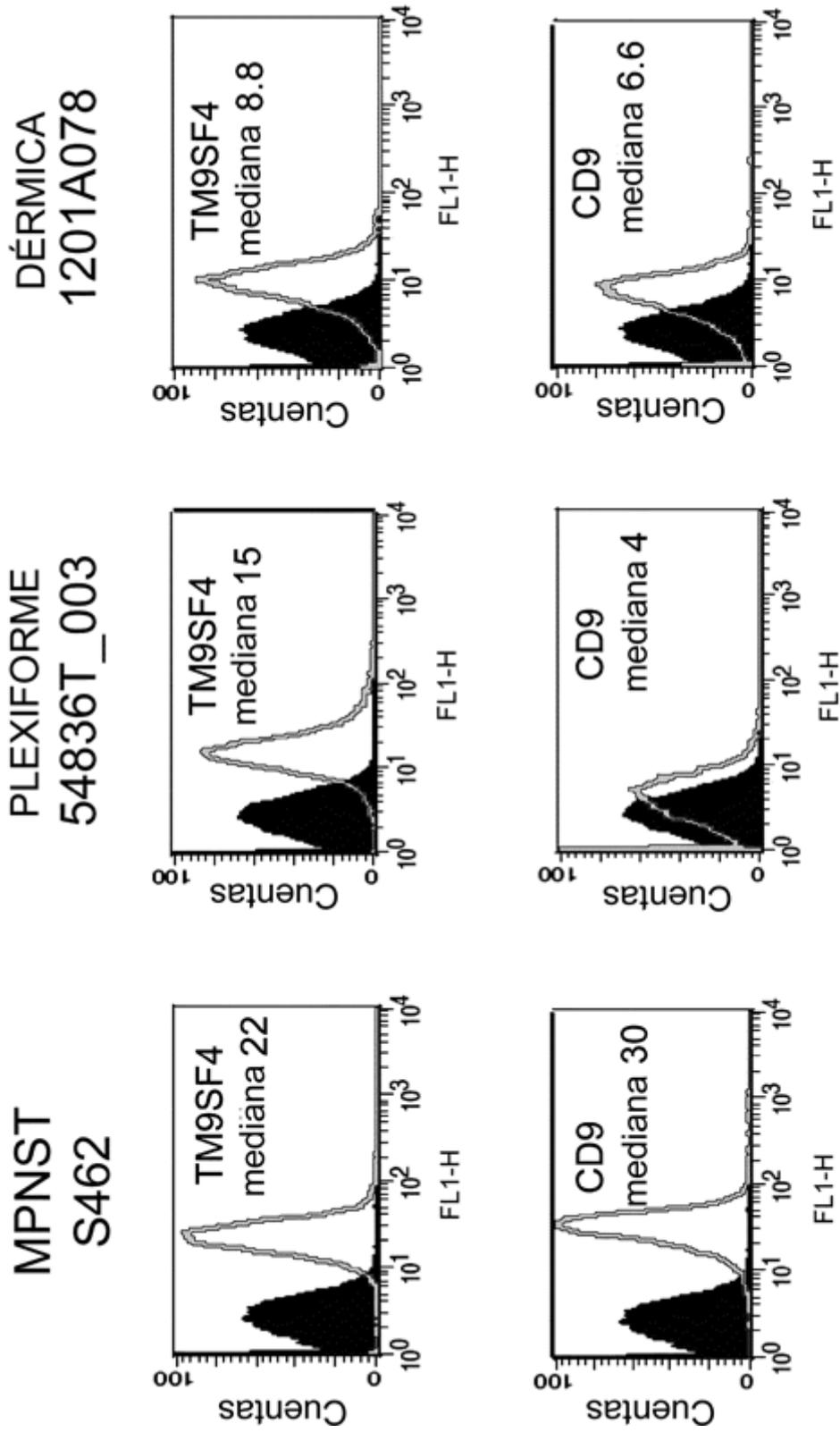


FIG. 1

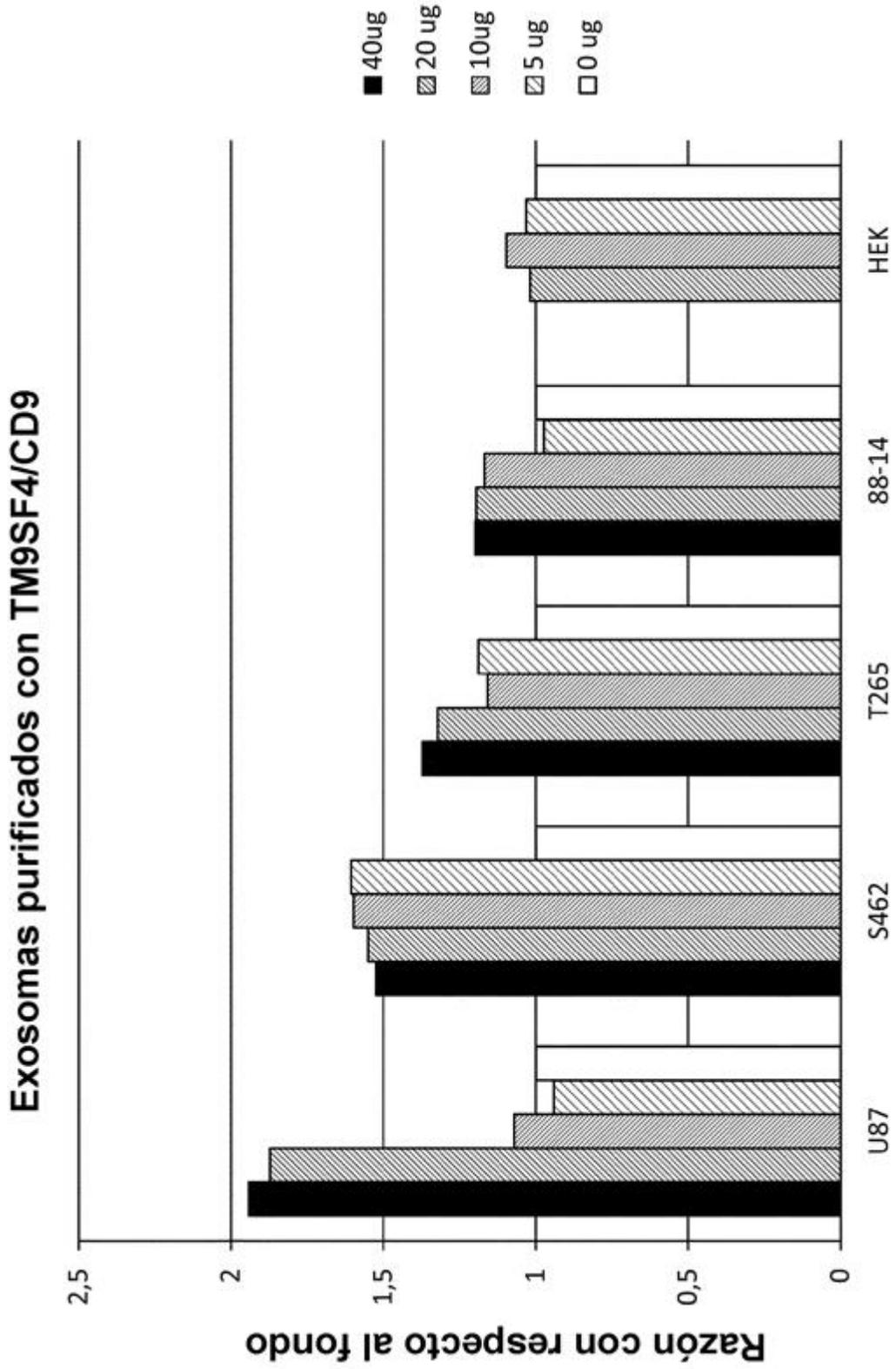


FIG. 2

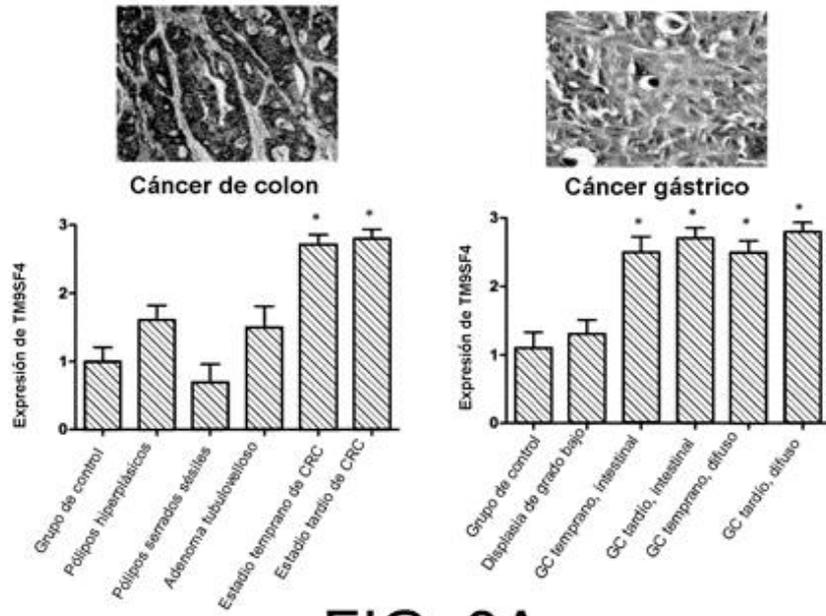


FIG. 3A

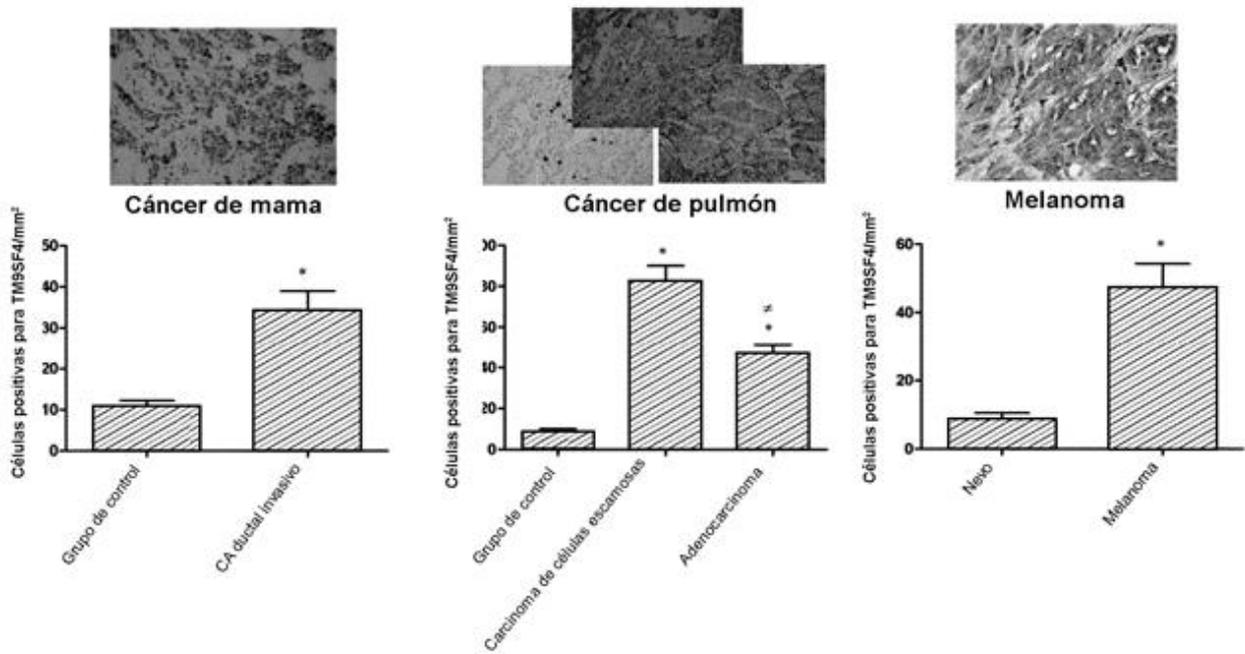


FIG. 3B

ENSAYO DE ELISA temprano frente a avanzado: TM9SF4-CD9

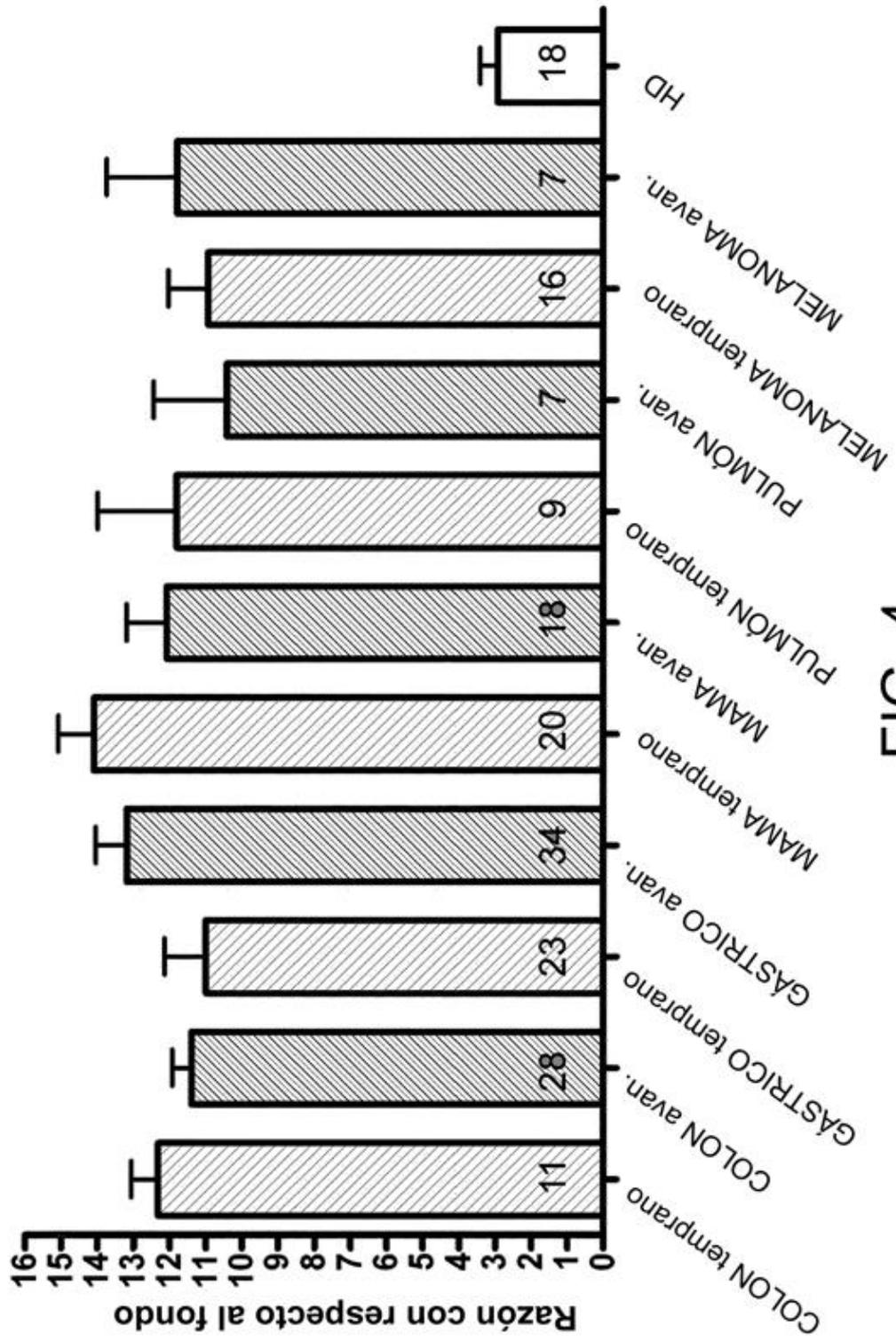


FIG. 4

ENSAYO DE ELISA: TM9SF4-CD9

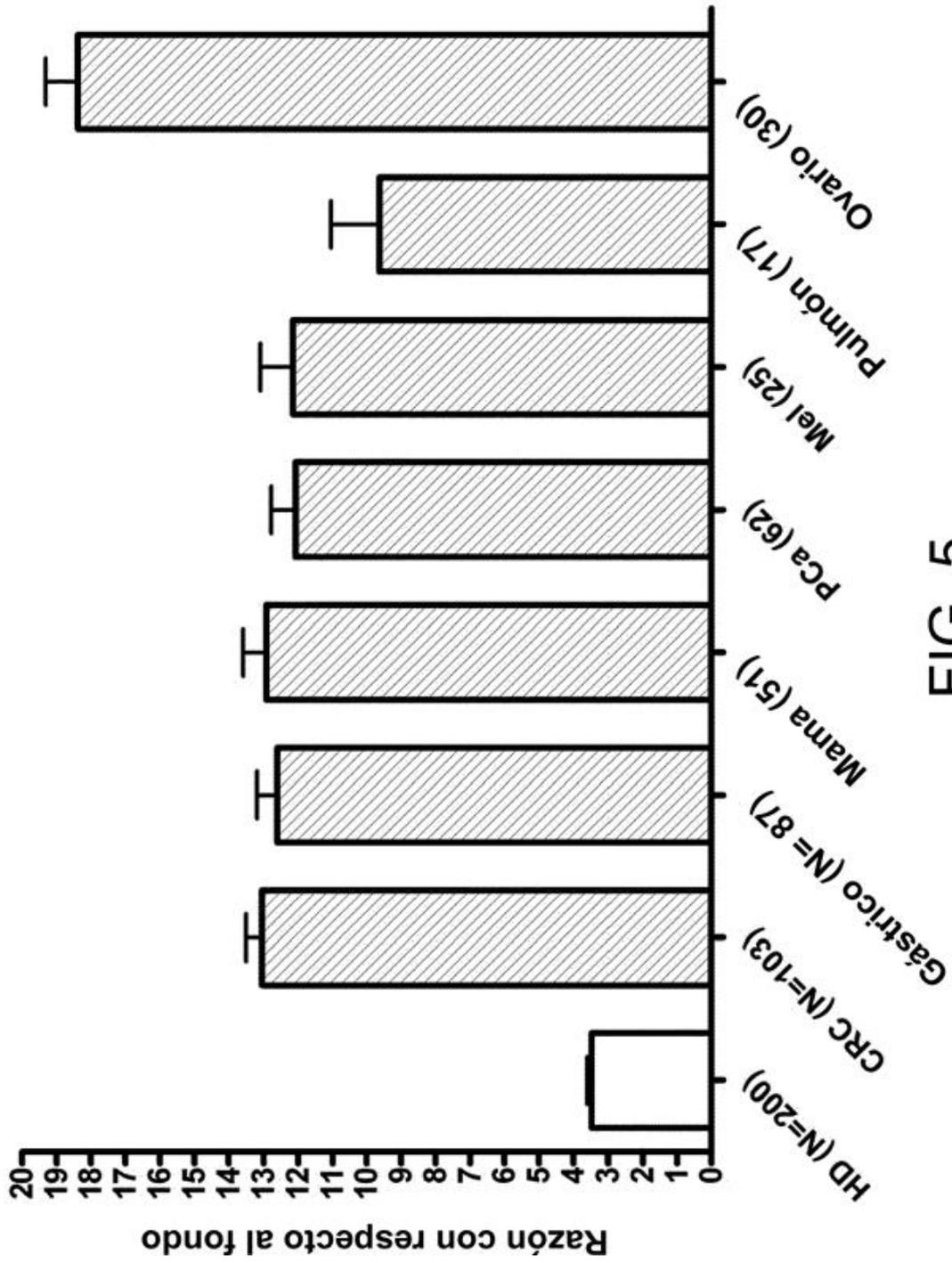
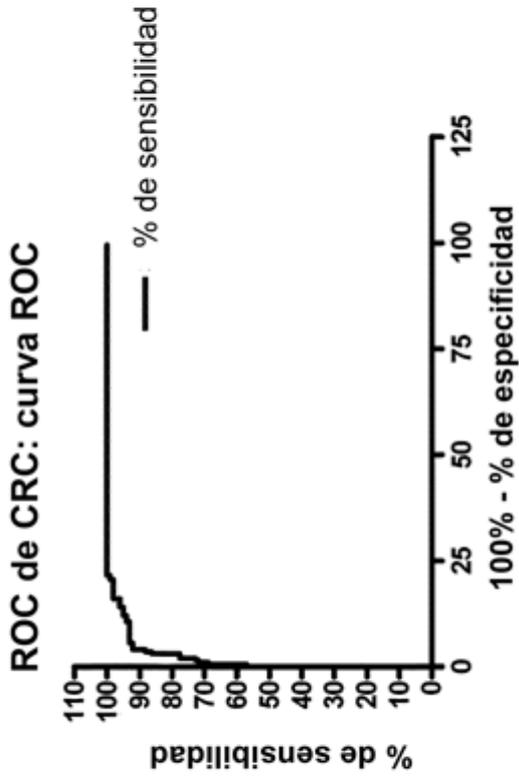


FIG. 5

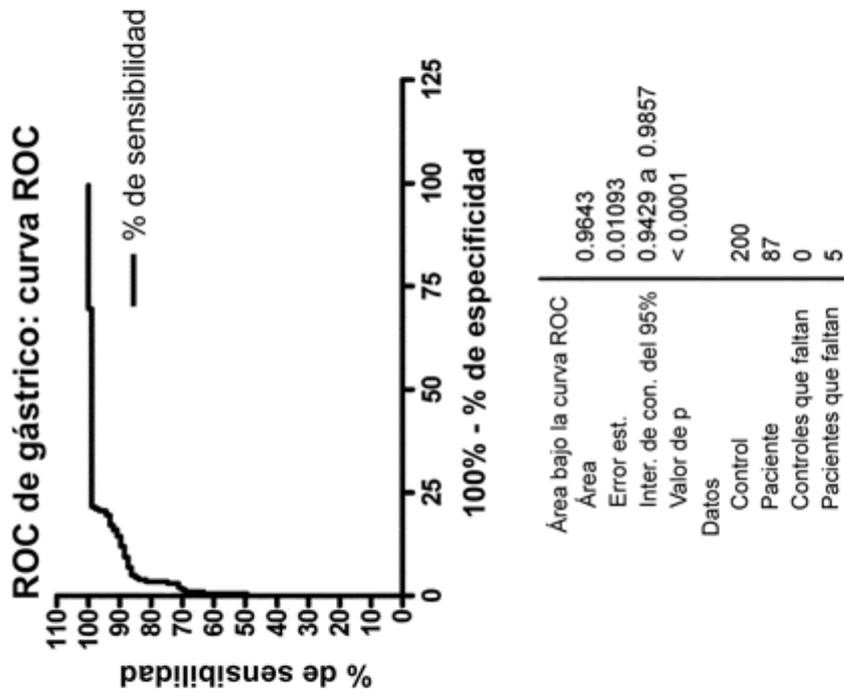


Área bajo la curva ROC
 Área 0.9819
 Error est. 0.005638
 Inter. de con. del 95% 0.9708 a 0.9929
 Valor de p < 0.0001

Datos
 Control 200
 Paciente 103
 Controles que faltan 0
 Pacientes que faltan 0

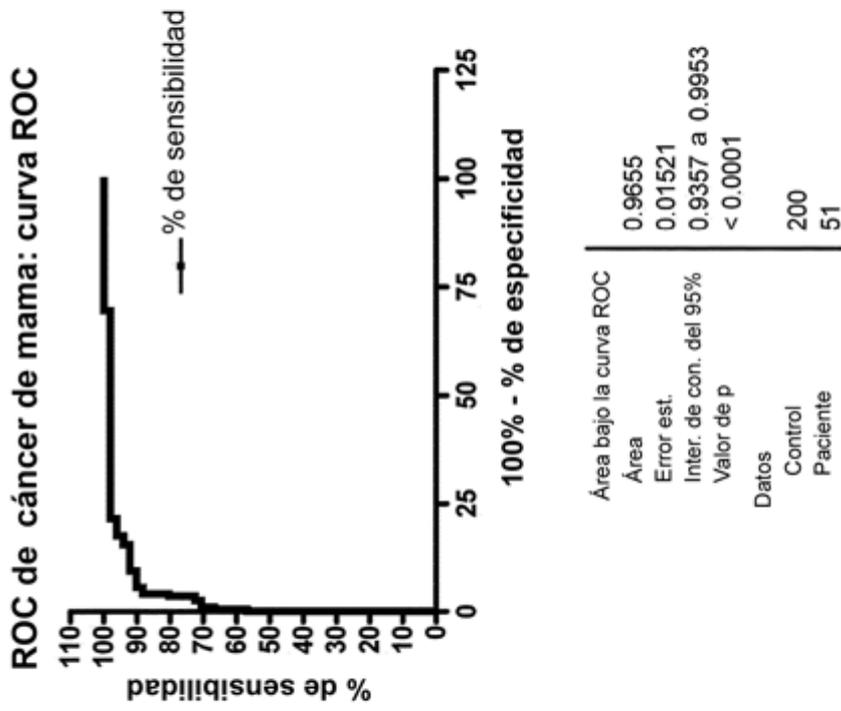
Corte	% de sensibilidad	IC del 95%	% de especificidad	IC del 95%	Razón de probabilidades
> 6.925	92.23	85.27% al 96.59%	96	92.27% al 98.26%	23.06

FIG. 6



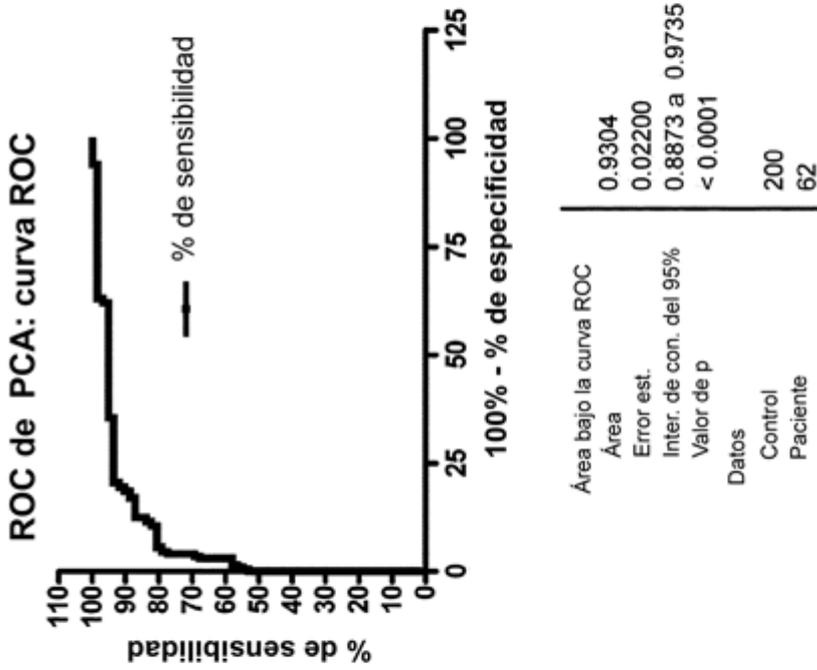
Corte	% de sensibilidad	IC del 95%	% de especificidad	IC del 95%	Razón de probabilidades
> 7.026	83.91	74.48% al 90.91%	96	92.27% al 98.26%	20.98

FIG. 7



Corte	% de sensibilidad	IC del 95%	% de especificidad	IC del 95%	Razón de probabilidades
> 7.004	88.24	76.13% al 95.56%	96	92.27% al 98.26%	22.06

FIG. 8



Corte	% de sensibilidad	IC del 95%	% de especificidad	IC del 95%	Razón de probabilidades
> 7.005	75.81	63.26% al 85.78%	96	92.27% al 98.26%	18.95

FIG. 9

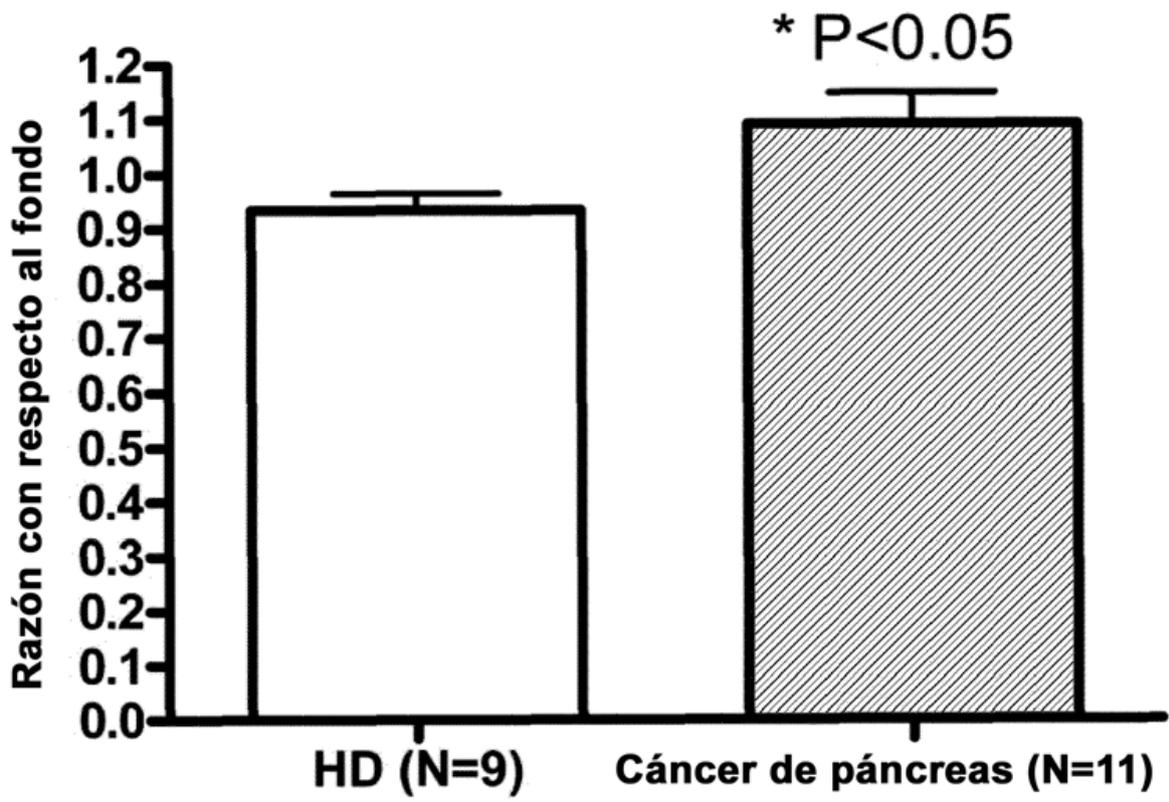


FIG. 10

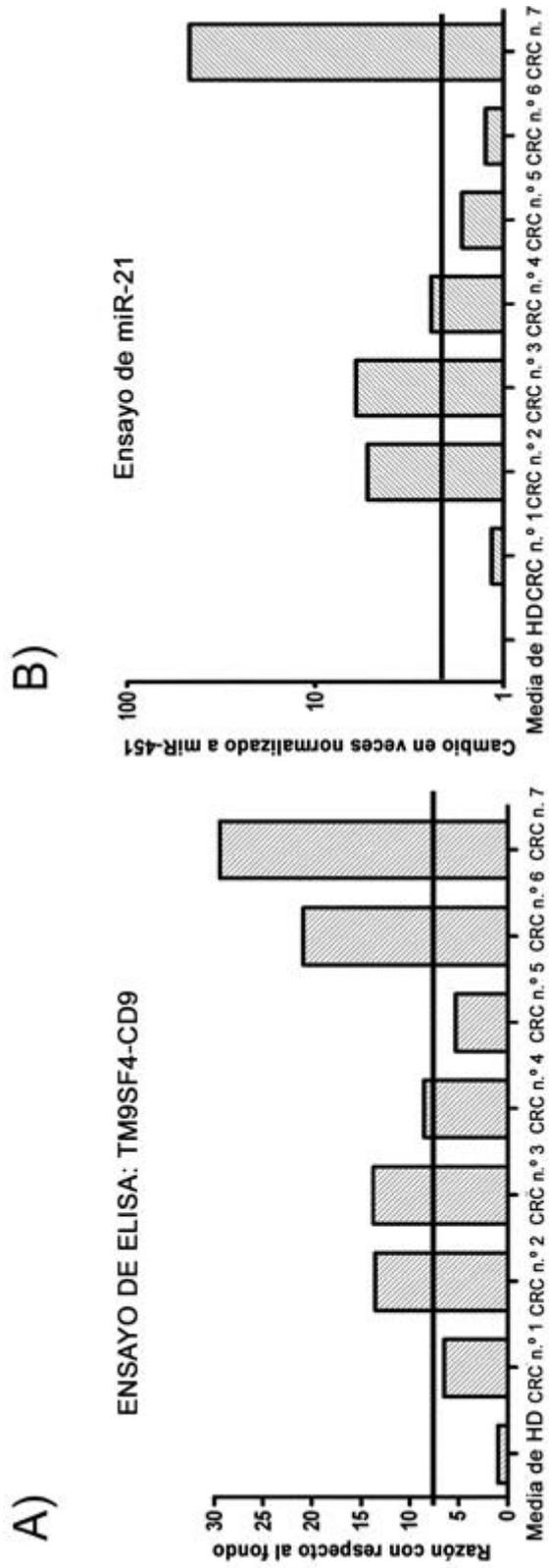


FIG. 11

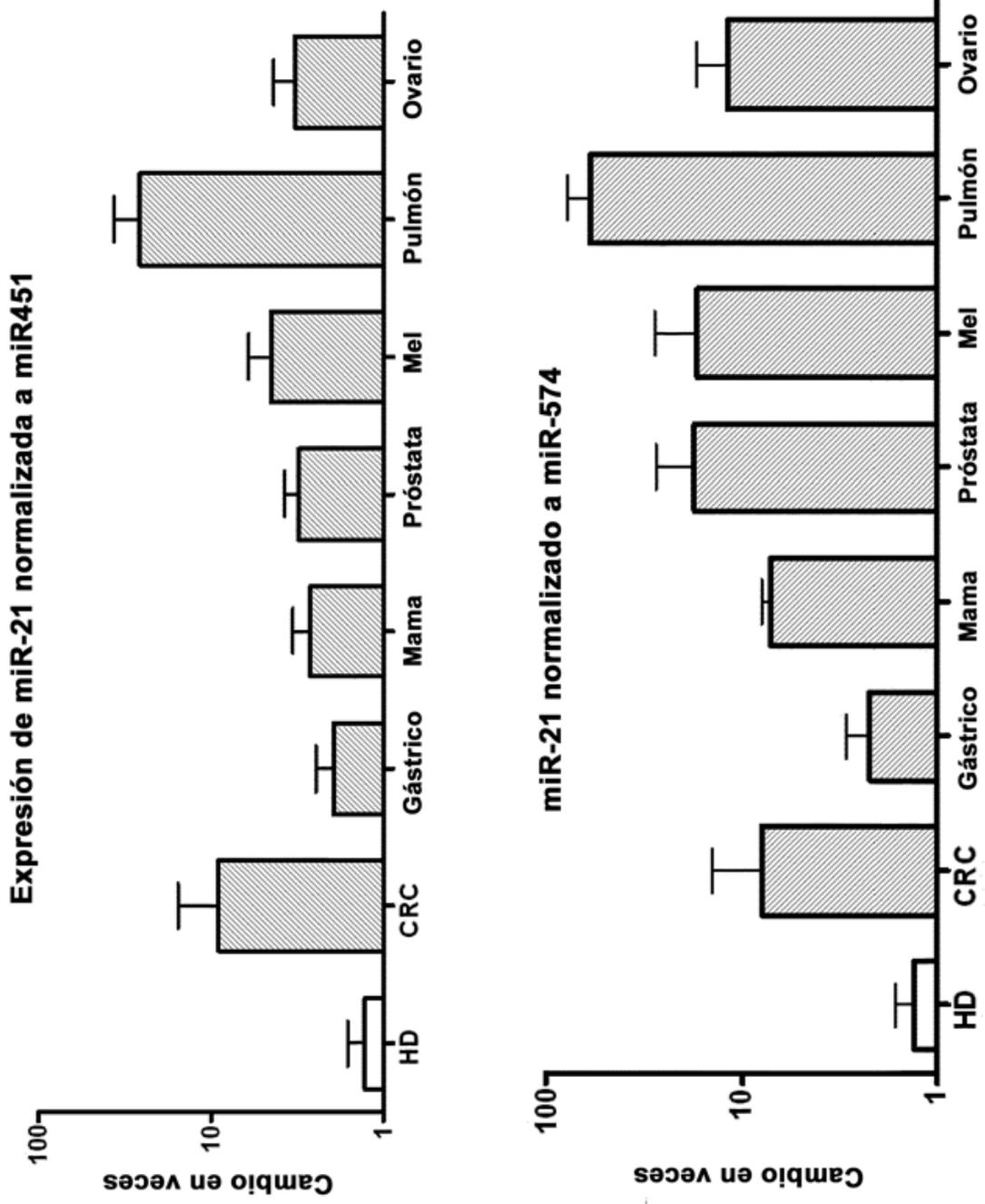


FIG. 12

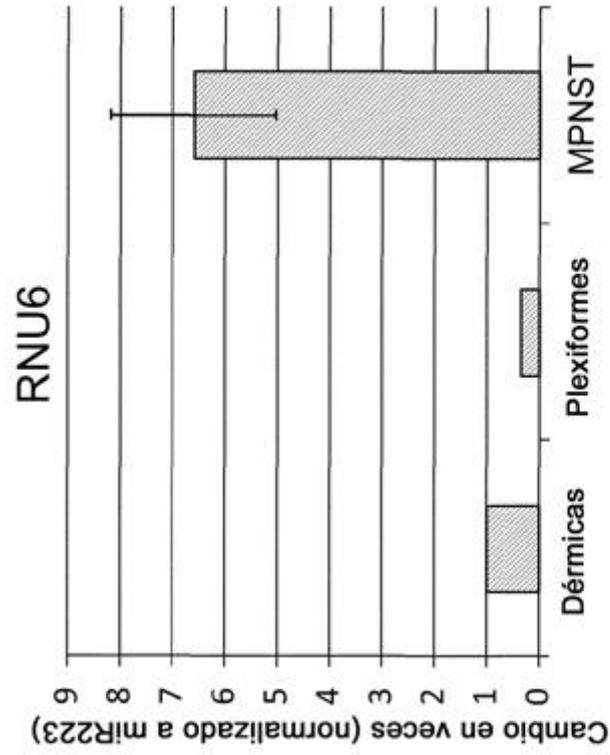
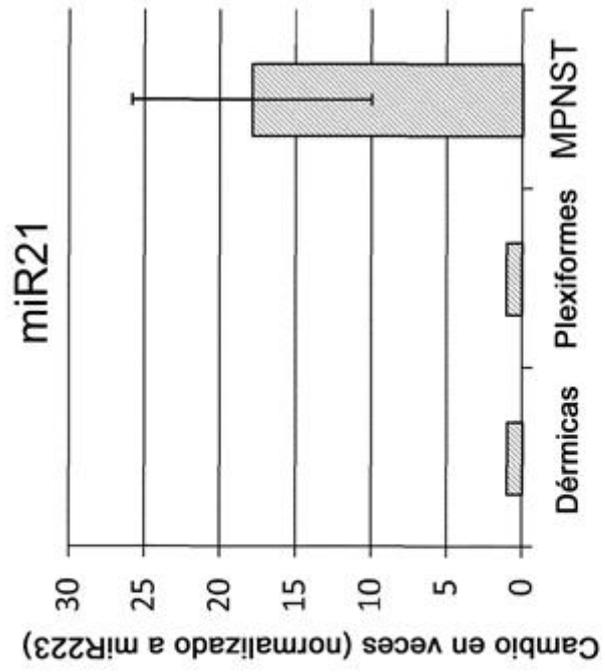


FIG. 13

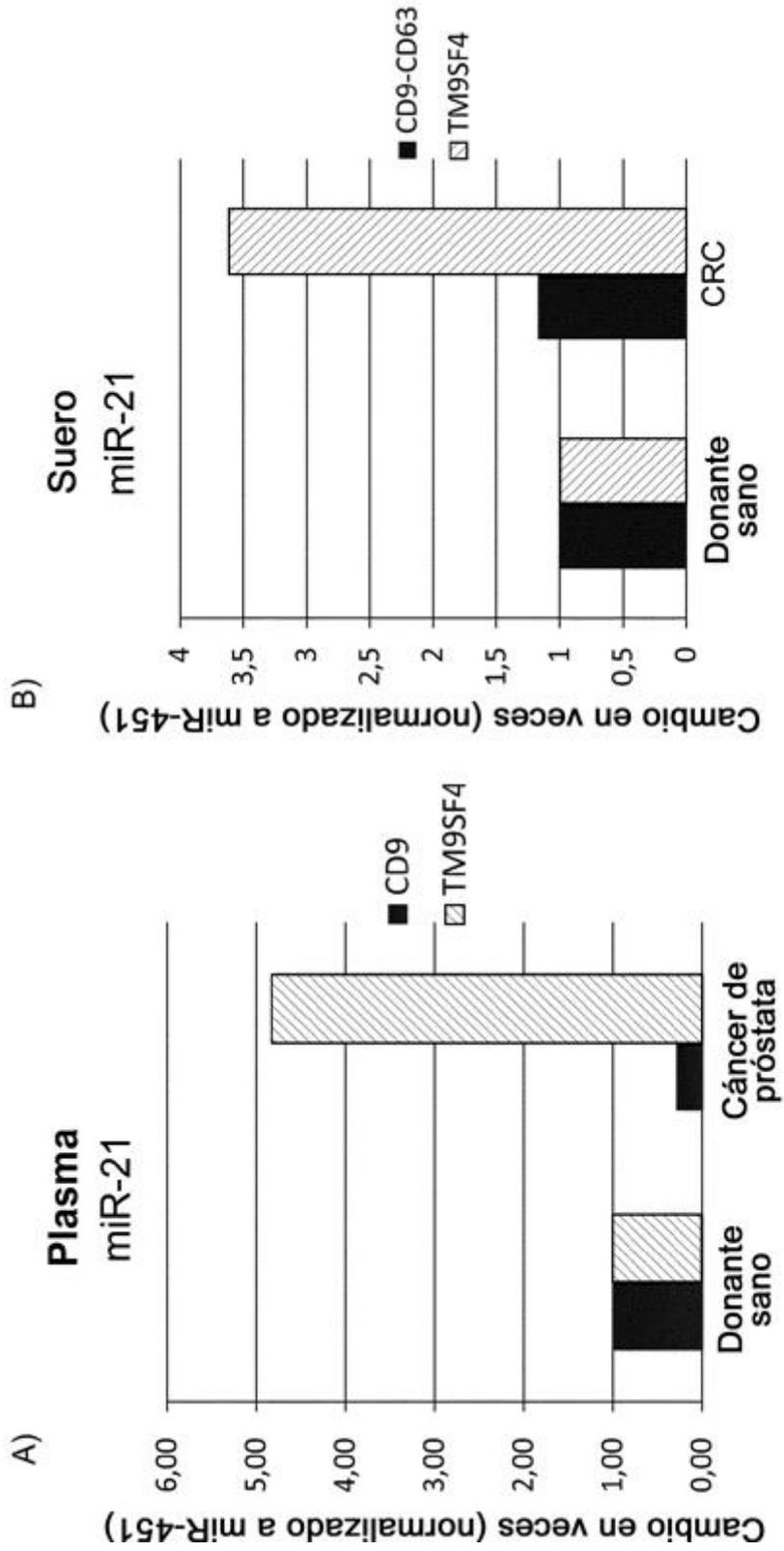


FIG. 14

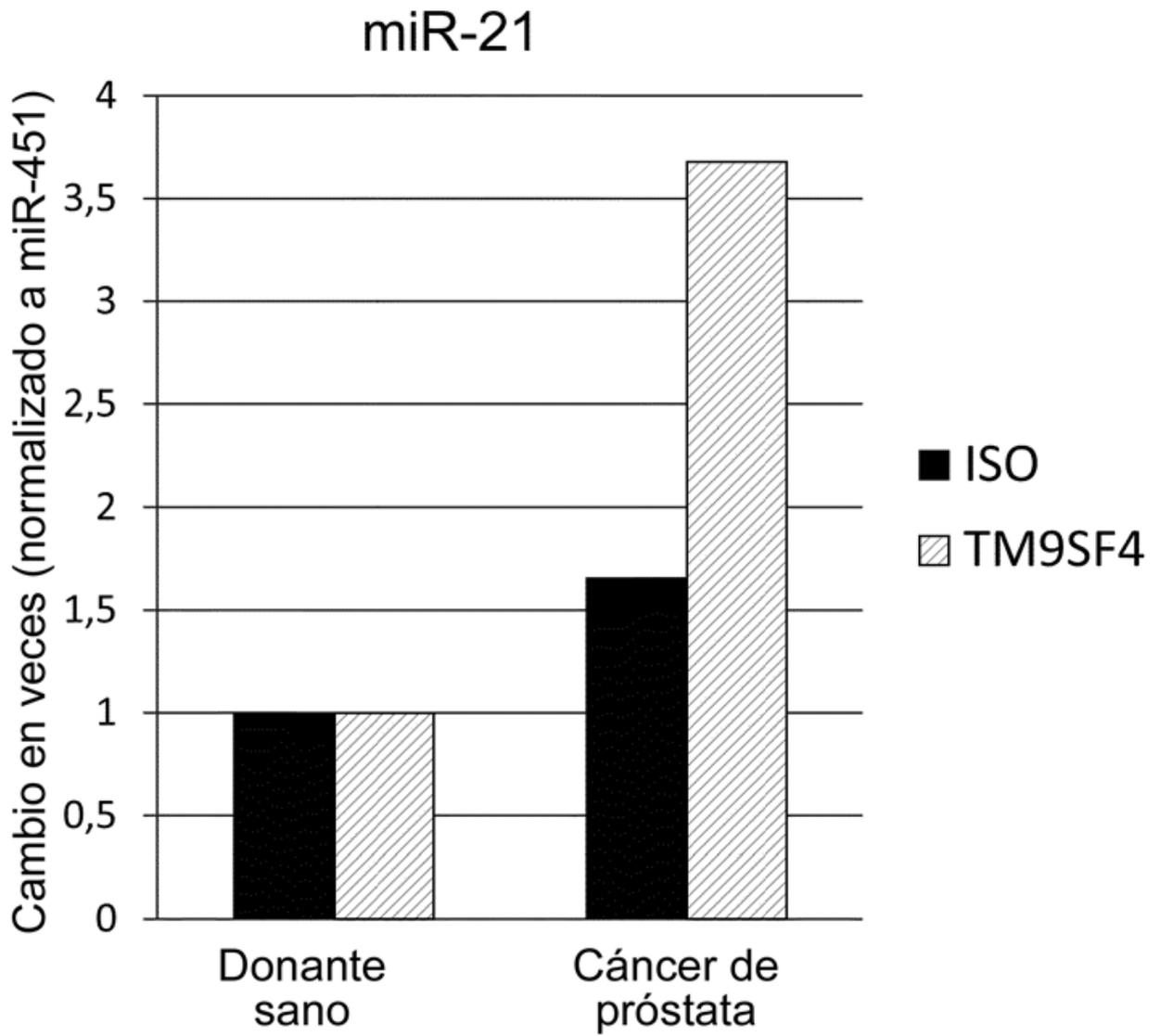


FIG. 15

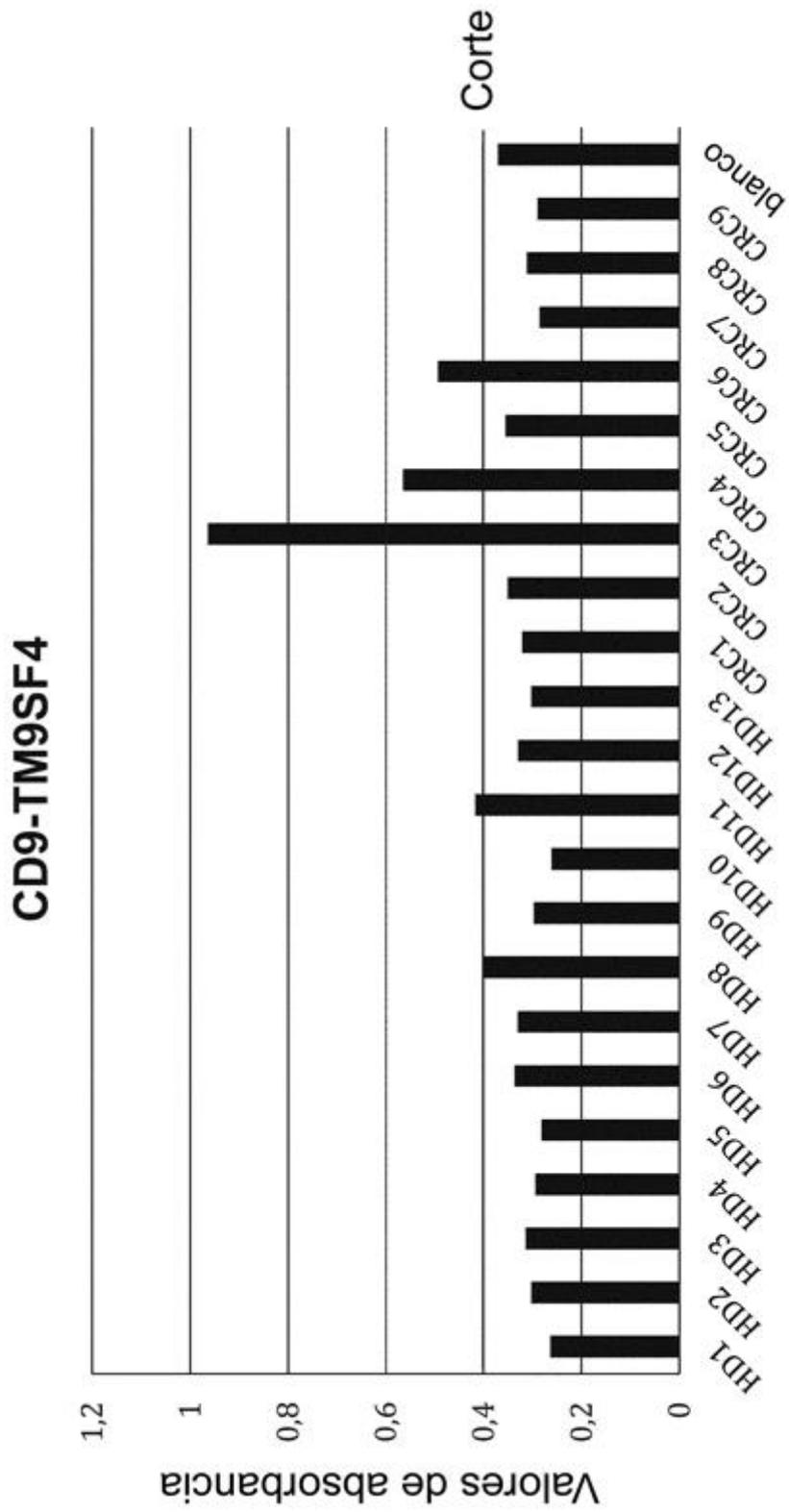


FIG. 16