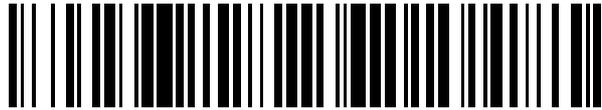


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 589**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2012 PCT/US2012/037443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12155014**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2012 E 12782575 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2707381**

54 Título: **Extracción de ácido nucleico de materiales biológicos heterogéneos**

30 Prioridad:

**11.05.2011 US 201161485112 P**

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

**25.02.2020**

73 Titular/es:

**EXOSOME DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)  
266 Second Avenue, Suite 200  
Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**COMPER, WAYNE;  
RUSSO, LEILEATA, M. y  
SKOG, JOHAN, KARL OLOV**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 744 589 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

Extracción de ácido nucleico de materiales biológicos heterogéneos

## 5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere al campo general del análisis de ácido nucleico, particularmente a la obtención y análisis de ácidos nucleicos de alta calidad a partir de una muestra de materiales biológicos heterogéneos.

## 10 Antecedentes

El conocimiento creciente de los cambios genéticos y epigenéticos que ocurren en las células cancerosas proporciona una oportunidad para detectar, caracterizar y controlar tumores analizando secuencias y perfiles de ácido nucleico relacionados con tumores. Los biomarcadores relacionados con el cáncer incluyen, por ejemplo, mutaciones específicas en secuencias de genes (Cortez y Calin, 2009; Diehl et al., 2008; Network, 2008; Parsons et al., 2008), regulación hacia arriba y hacia abajo de la expresión de ARNm y ARNmi (Cortez y Calin, 2009; Itadani et al., 2008; Novakova et al., 2009), variaciones de empalme de ARNm, cambios en los patrones de metilación del ADN (Cadieux et al., 2006; Kristensen y Hansen, 2009), amplificación y eliminación de regiones genómicas (Cowell y Lo, 2009), y expresión aberrante de secuencias repetidas de ADN (Ting et al., 2011). Diversos ensayos de diagnóstico molecular como el análisis mutacional, el estado de metilación del ADN genómico y el análisis de la expresión génica pueden detectar estos biomarcadores y proporcionar información valiosa para médicos, médicos e investigadores. Hasta ahora, estas pruebas utilizan células cancerosas derivadas de tejido tumoral extirpado quirúrgicamente o de tejido obtenido mediante biopsia.

Sin embargo, la capacidad de realizar estas pruebas usando un fluido corporal es a menudo más deseable que usar una muestra de tejido del paciente. Un enfoque menos invasivo que utiliza una muestra de fluido corporal tiene amplias implicaciones en términos de bienestar del paciente, la capacidad de realizar una monitorización longitudinal de la enfermedad y la capacidad de obtener perfiles de expresión incluso cuando las células de los tejidos no son fácilmente accesibles, por ejemplo, en pacientes con cáncer de ovario o cerebro.

La presente divulgación está dirigida a métodos y sistemas para extraer ácido nucleico de alta calidad de una muestra biológica, preferiblemente una muestra fluida, y las extracciones de ácido nucleico resultantes. Los métodos objeto, sistemas y extracciones en cuestión se pueden utilizar en apoyo del diagnóstico del paciente, pronósticos, teranósticos, monitorización, medicina predictiva, medicina personalizada, medicina integrada, farmacodiagnóstico y diagnóstico/asociación de prescripción (diagnóstico complementario). El documento WO2011/009104A1 (RUSSO ET AL), 20 de enero de 2011, analiza el análisis de ácido nucleico en humanos u otros animales objeto, en particular la obtención y análisis de ácidos nucleicos de alta calidad a partir de una muestra biológica y, en particular, de microvesículas.

CHEN C. ET AL, "Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles", LAB ON A CHIP, vol. 10, No. 4, 21 de febrero de 2010, páginas 505-511, discute un método de inmunoafinidad microfluídica para aislar microvesículas, y la extracción de ARN de estas microvesículas que proporciona una fuente de información sobre el estado genético de los tumores para servir como biomarcadores para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer.

## 45 Resumen

En términos generales, la presente divulgación se refiere a métodos para extraer ácido nucleico de una muestra biológica utilizando principios de mejora de extracción y exclusión de afinidad para reducir la heterogeneidad en una muestra que contiene una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico. Son posibles una serie de variaciones, cada una de las cuales se describe a continuación.

Como se describe aquí, los materiales que contienen ácido nucleico se refieren a células, microvesículas, complejos de ARN-proteína y otras partículas que contienen ácido nucleico que se encuentran naturalmente en muestras biológicas. Los ejemplos de células que contienen ácidos nucleicos de especial interés incluyen, entre otras, células tumorales circulantes y otras células que han sufrido o están experimentando una transformación relacionada con la enfermedad, u otras células que contienen evidencia genómica del estado físico o la salud de un organismo. Los ejemplos de microvesículas incluyen, entre otros, exosomas, vesículas de membrana, microvesículas desprendibles, micropartículas, nanovesículas, cuerpos apoptóticos, nanopartículas y vesículas de membrana, y se denominarán colectivamente en toda esta especificación como "microvesículas" a menos que se indique expresamente lo contrario. Los materiales que contienen ácido nucleico pueden originarse, por ejemplo, de una célula, órgano o tejido particular del cuerpo, o fluido corporal. Por ejemplo, los materiales que contienen ácido nucleico pueden detectarse o aislarse de la orina. Alternativamente, un material que contiene ácido nucleico puede originarse, por ejemplo, de un tumor, crecimiento hiperplásico, nódulo, neoplasia, quiste o masa. Los materiales que contienen ácido nucleico transportan moléculas de superficie, como antígenos, biomarcadores, receptores, que pueden usarse para identificar, detectar, aislar, enriquecer u ordenar materiales que contienen ácido nucleico de un tipo de célula, tejido u órgano donante específico del cuerpo o fluido corporal. Las especies individuales de materiales que contienen

ácido nucleico pueden purificarse conjuntamente durante los métodos de extracción, como se describe aquí. Por ejemplo, las células tumorales circulantes pueden purificarse conjuntamente con microvesículas.

Una "colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico", como se usa en el presente documento, es una mezcla de cualquiera de las especies anteriores de materiales que contienen ácido nucleico, por ejemplo, células, cualquier especie de microvesícula, complejos de ARN-proteína y cualquier otra especie de partículas que contienen ácido nucleico, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico de la presente invención incluye células o microvesículas, o ambas. En un aspecto, una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico de la presente invención es células tumorales circulantes y microvesículas. En algunas realizaciones, la mezcla comprenderá una o más células además de cualquiera o todas las otras especies de materiales que contienen ácido nucleico.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 1.

En el presente documento se divulga un método para extraer ácido nucleico de una muestra biológica, que comprende los pasos de: obtener una muestra biológica; realizar un paso de preprocesamiento de muestra en la muestra biológica para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico; realizar una operación de mejora de extracción; y extraer ácido nucleico de los materiales resultantes. No hay un orden específico para el desempeño del paso de preprocesamiento de muestra y la operación de mejora de extracción, y de hecho, los dos pueden realizarse simultáneamente. Preferiblemente, este método dará como resultado una extracción de ácido nucleico que cumpla con uno o más de los estándares de calidad descritos a continuación en términos de la relación cuantitativa de 18S ARNr a 28S ARNr, o rendimiento de ácido nucleico. La colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico incluye, pero no se limita a, una mezcla de materiales que contienen ácido nucleico, que incluyen, pero no se limitan a, células o microvesículas, o ambas.

También se divulga un método para extraer ácido nucleico de una muestra biológica, que comprende los pasos de: obtener una muestra biológica; realizar un paso de preprocesamiento de muestra en la muestra biológica para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico; realizar una operación de exclusión por afinidad en la colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico; y extraer ácido nucleico de los materiales resultantes. Preferiblemente, este método dará como resultado una extracción de ácido nucleico que cumpla con uno o más de los estándares de calidad descritos a continuación en términos de la relación cuantitativa de 18S ARNr a 28S ARNr, o rendimiento de ácido nucleico. La colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico incluye, pero no se limita a, una mezcla de materiales que contienen ácido nucleico, que incluyen, pero no se limitan a, células o microvesículas o ambas.

También se divulga un método para extraer ácido nucleico de una muestra biológica, que comprende los pasos de: obtener una muestra biológica; realizar un paso de preprocesamiento de muestra en la muestra biológica para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico; realizar una operación de mejora de extracción; realizar una operación de exclusión por afinidad en los materiales resultantes; y extracción de ácido nucleico de los materiales restantes. No hay un orden específico para el desempeño del paso de preprocesamiento de muestra y la operación de mejora de extracción, y de hecho, los dos pueden realizarse simultáneamente. La operación de exclusión por afinidad se realiza en cualquier momento después del paso de preprocesamiento. Preferiblemente, este método dará como resultado una extracción de ácido nucleico que cumpla con uno o más de los estándares de calidad descritos a continuación en términos de la relación cuantitativa de 18S ARNr a 28S ARNr, o rendimiento de ácido nucleico. La colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico incluye, pero no se limita a, una mezcla de materiales que contienen ácido nucleico, que incluyen, pero no se limitan a, células o microvesículas, o ambas.

Se divulga una extracción de ácido nucleico de una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico obtenidos de una muestra biológica eucariota, en la que el ARNr 18S y el ARNr 28S son detectables en la extracción. Preferiblemente, la relación cuantitativa de 18S ARNr a 28S ARNr detectable en las extracciones de ácido nucleico está dentro del rango de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:2; y es preferiblemente aproximadamente 1:2. Las extracciones de ácido nucleico de esta naturaleza se pueden obtener usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

Se divulga una extracción de ácido nucleico de una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico obtenidos de una muestra de fluido corporal con una concentración de proteína de menos de 10 mg/ml, tal como orina, donde la extracción de ácido nucleico tiene un rendimiento de ácido nucleico de 50 pg/ml a partir de 20 ml de muestra biológica. Las extracciones de ácido nucleico de esta naturaleza se pueden obtener usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

Se divulga una extracción de ácido nucleico de una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico obtenidos de una muestra de fluido corporal con una concentración de proteína de más de 10 mg/ml, tal como suero o plasma, en donde la extracción de ácido nucleico tiene un rendimiento de ácido nucleico mayor o igual a 50 pg/ml a partir de 1 ml de muestra biológica. La colección heterogénea de materiales que contienen ácido

nucleico incluye, pero no se limita a, una mezcla de materiales que contienen ácido nucleico, que incluyen, pero no se limitan a, células o microvesículas. Las extracciones de ácido nucleico de esta naturaleza se obtienen utilizando cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

5 En otro aspecto más de la divulgación, los perfiles de ácido nucleico se obtienen analizando las extracciones de ácido nucleico resultantes de cualquiera de los métodos anteriores.

Se divulga un kit para extraer ácidos nucleicos de muestras biológicas o una colección heterogénea que contiene ácido nucleico. Variaciones y ejemplos de los cuales se describen a continuación. La colección heterogénea de  
10 materiales que contienen ácido nucleico incluye, pero no se limita a, una mezcla de materiales que contienen ácido nucleico, que incluyen, pero no se limitan a, células o microvesículas, o ambas.

Las realizaciones anteriores incluyen un paso de preprocesamiento de muestra que incluye técnicas para separar materiales que contienen ácido nucleico de una muestra biológica. Por ejemplo, se pueden usar métodos de  
15 centrifugación, concentración de filtración y/o intercambio aniónico y/o cromatografía de permeación en gel.

Las realizaciones anteriores incluyen un paso de operación de mejora de extracción para eliminar o mitigar factores adversos que evitan la extracción de ácido nucleico de alta calidad de una muestra biológica. Los agentes potenciadores de la extracción incluyen: inhibidor de RNasa, proteasa, agente reductor, sustrato señuelo (por  
20 ejemplo, ARN sintético), receptor soluble, ARN interferente pequeño, molécula de unión a ARN (por ejemplo, Anticuerpo anti-ARN, proteína chaperona, proteína inhibidora de RNasa) o RNasa sustancia desnaturizante (por ejemplo, detergente en solución de alta osmolaridad) o cualquier combinación de los agentes anteriores.

Las realizaciones anteriores incluyen una operación de exclusión por afinidad, como se describe a continuación, para reducir la heterogeneidad de la fracción de materiales que contienen ácido nucleico obtenida de la etapa de preprocesamiento. Por ejemplo, la operación de exclusión por afinidad puede eliminar materiales que contienen ácido nucleico que no son de interés. El agotamiento puede ser completo o parcial. Por ejemplo, en algunos casos, un agotamiento del 50% de los materiales indeseables sería suficiente para lograr una extracción de ácido nucleico de alta calidad.  
25

Todas las realizaciones anteriores pueden incluir una operación de enriquecimiento de afinidad, como se describe a continuación, en la que los métodos de selección de afinidad se usan para enriquecer materiales que contienen ácido nucleico de cierto tipo o que se originan a partir de una célula, tejido u órgano particular del cuerpo. Por ejemplo, los materiales que contienen ácido nucleico de células donantes específicas pueden ser detectados, seleccionados o enriquecidos por las moléculas de superficie específicas que se sabe que están presentes.  
30

Se divulgan usos para cualquiera de los métodos de extracción de ácido nucleico divulgados aquí en cualquiera de una variedad de métodos y técnicas conocidos para analizar ácidos nucleicos en apoyo del diagnóstico del paciente, pronósticos, teranósticos, monitorización, medicina predictiva, medicina personalizada, medicina integrada, farmacodiagnóstico y asociación de diagnóstico/prescripción (diagnóstico complementario). Por ejemplo, el ácido nucleico obtenido de la práctica del método de extracción se analiza para detectar la presencia o ausencia de una aberración genética asociada con una enfermedad o afección médica.  
35

En cualquiera de los aspectos de la presente invención, un ácido nucleico es, por ejemplo, ADN o ARN. El ARN puede ser, por ejemplo, ARN codificante, por ejemplo, ARN mensajero que puede codificar proteínas, o ARN no codificante (ARNnc), por ejemplo, ARN ribosómico, ARN de transferencia, microARN y otras transcripciones no codificantes que pueden originarse a partir de ADN genómico. Las transcripciones de ARN no codificantes pueden incluir, pero no se limitan a, transcripciones que se transcriben de repeticiones de satélite y transposones, que pueden ser transposones de ADN o retrotransposones. El ADN puede ser, por ejemplo, ADN de cadena sencilla, por ejemplo, ADNc que se transcribe inversamente a partir de ARN o se genera a partir de la replicación de ADN; ADN de cadena doble; ADN genómico; ADN no codificante (ADNnc), por ejemplo, repeticiones de satélite, transposones o retrotransposones; o cualquier fragmento o combinación de los mismos.  
40

En cualquiera de los aspectos de la presente invención, la muestra biológica puede ser cualquier muestra de un organismo, por ejemplo, un mamífero y, en particular, un ser humano. Preferiblemente, la muestra biológica es un fluido corporal tal como orina, sangre, suero o plasma, y también puede incluir esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, aspirados de pezón, líquido linfático, líquido de las vías respiratorias, intestinales y genitourinarias, líquido lagrimal, saliva, leche materna, líquido del sistema linfático, semen, líquido cefalorraquídeo, líquido del sistema intraorgánico, líquido ascítico, líquido de quistes tumorales, líquido amniótico y combinaciones de los mismos.  
45

En cualquiera de los aspectos de la presente invención, la muestra biológica se obtiene de un sujeto. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero no se limitan a, todos los animales que se muestra o se espera que tengan materiales que contienen ácido nucleico. En realizaciones particulares, el sujeto es un mamífero, un primate humano o no humano, un perro, un gato, un caballo, una vaca, otros animales de granja o un roedor (por ejemplo, ratón, rata, conejillo de indias, etc.).  
50

Las realizaciones preferidas de la invención en cualquiera de sus diversos aspectos son como se describe a continuación o como se define en las reivindicaciones subordinadas.

## 5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo que representa un método de extracción de ácido nucleico de una muestra biológica.

10 La figura 2 es un diagrama de flujo que representa un segundo método de extracción de ácido nucleico de una muestra biológica.

La figura 3 es un diagrama de flujo que representa un tercer método de extracción de ácido nucleico de una muestra biológica.

## 15 Descripción detallada

Materiales que contienen ácido nucleico y colecciones heterogéneas de los mismos

20 Los materiales biológicos que contienen ácido nucleico se usan a menudo como materiales de partida para la extracción y análisis de ácido nucleico. Las células son un ejemplo de un material biológico que contiene ácido nucleico. Los ejemplos de células que contienen ácidos nucleicos de especial interés incluyen, entre otras, células tumorales circulantes y otras células que han sufrido o están experimentando una transformación relacionada con la enfermedad, u otras células que contienen evidencia genómica del estado físico o la salud de un organismo.

25 Además, los ácidos nucleicos se pueden encontrar en materiales más pequeños que varían en tamaño desde aproximadamente 10 nm de diámetro hasta aproximadamente 10000 nm de diámetro. Por ejemplo, los “exosomas” tienen diámetros de aproximadamente 30 a 200 nm, con desprendimiento de microvesículas y cuerpos apoptóticos a menudo descritos como más grandes (Orozco y Lewis, 2010). Los exosomas, las microvesículas desprendibles, las micropartículas, las nanovesículas, los cuerpos apoptóticos, las nanopartículas y las vesículas de membrana se

30 aíslan conjuntamente mediante diversas técnicas y, por lo tanto, se denominarán colectivamente en toda esta especificación como “microvesículas” a menos que se indique expresamente lo contrario. Otros materiales que contienen ácido nucleico, como los complejos de ARN-proteína, pueden aislarse conjuntamente con células y microvesículas utilizando los diversos métodos y técnicas descritos en este documento. De acuerdo con lo anterior, el término genérico “materiales que contienen ácido nucleico” se usará en el presente documento para referirse a

35 células, microvesículas, complejos de ARN-proteína y otras partículas que contienen ácido nucleico que se encuentran naturalmente en muestras biológicas.

Una “colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico”, como se usa en el presente documento, es una mezcla de cualquiera de las especies anteriores de materiales que contienen ácido nucleico, por ejemplo,

40 células, cualquier especie de microvesícula, complejos de ARN-proteína y cualquier otra especie de partículas que contienen ácido nucleico. Preferiblemente, la mezcla comprenderá una o más células además de cualquiera o todas las otras especies de materiales que contienen ácido nucleico.

Los materiales que contienen ácido nucleico pueden originarse a partir de células, tejidos u órganos particulares del

45 cuerpo o fluidos corporales. En particular, los materiales que contienen ácido nucleico pueden aislarse de orina, plasma o suero. En algunas realizaciones, los materiales que contienen ácido nucleico pueden originarse a partir de un tumor, crecimiento hiperplásico, nódulo, neoplasia, quiste o masa. Los materiales que contienen ácido nucleico a menudo transportan moléculas de superficie como antígenos, biomarcadores o receptores de sus células donantes. Estas moléculas de superficie pueden usarse para detectar, identificar, aislar, clasificar y/o enriquecer materiales que

50 contienen ácido nucleico de un tipo específico de célula donante (Al-Nedawi et al., 2008; Taylor y Gercel-Taylor, 2008). De esta manera, los materiales que contienen ácido nucleico que se originan de distintas poblaciones celulares pueden analizarse para determinar su contenido de ácido nucleico. Por ejemplo, los materiales que contienen ácido nucleico tumoral (maligno y no maligno) portan antígeno de superficie asociado a tumor y pueden detectarse, aislarse o enriquecerse mediante estos antígenos de superficie específicos de tumor asociados.

## 55 Métodos de extracción de ácido nucleico

En un primer ejemplo, se divulga un método para extraer ácido nucleico de una muestra biológica, que comprende los pasos de: obtener una muestra biológica; realizar un paso de preprocesamiento de muestra en la muestra

60 biológica para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico (preferiblemente dicha colección heterogénea comprende células además de otros materiales que contienen ácido nucleico); realizar una operación de mejora de extracción; y extraer ácido nucleico de los materiales resultantes. No hay un orden específico para el desempeño del paso de preprocesamiento de muestra y la operación de mejora de extracción, y, de hecho, los dos pueden realizarse simultáneamente. Preferiblemente, este

65 método dará como resultado una extracción de ácido nucleico que cumpla con uno o más de los estándares de

calidad descritos a continuación en términos de la relación cuantitativa de 18S ARNr a 28S ARNr, o rendimiento de ácido nucleico.

5 Una variación de este primer ejemplo se muestra en la figura 1, en el que el método comprende los pasos de obtener una muestra (100) biológica, preprocesar la muestra para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales (110) que contienen ácido nucleico, realizar una operación de mejora de extracción en la fracción (120 ), y extracción de ácido nucleico de la fracción (130).

10 En variaciones de este primer ejemplo, la operación de mejora de extracción se realiza antes del preprocesamiento de la muestra, o las operaciones de mejora de preprocesamiento y extracción se realizan simultáneamente.

15 En variaciones adicionales, puede haber un paso adicional de eliminar ácidos nucleicos que no se encuentran dentro de las células o microvesículas que pueden ser parte de la colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico. Los métodos para eliminar ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar un paso de digestión enzimática en cualquier punto del proceso, por ejemplo, antes del preprocesamiento de la muestra, antes de la realización de la operación de extracción de mejora, o antes de la extracción de ácido nucleico. Dichas enzimas pueden ser un tipo de ribonucleasa que cataliza la digestión enzimática de los ácidos ribonucleicos o un tipo de desoxirribonucleasa que cataliza la digestión enzimática de los ácidos desoxirribonucleicos.

20 La muestra biológica puede ser cualquier muestra de un organismo, por ejemplo, un mamífero y, en particular, un ser humano. Preferiblemente, la muestra biológica es un fluido corporal tal como orina, sangre, suero o plasma, y también puede incluir esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, aspirados de pezón, líquido linfático, líquido de las vías respiratorias, intestinales y genitourinarias, líquido lagrimal , saliva, leche materna, líquido del sistema linfático, semen, líquido cefalorraquídeo, líquido del sistema intraorgánico, líquido ascítico, líquido de quistes tumorales, líquido amniótico y combinaciones de los mismos.

25 Una muestra biológica a veces puede provenir de un sujeto. El término "sujeto" pretende incluir todos los animales que se muestra o se espera que tengan materiales que contienen ácido nucleico. En realizaciones particulares, el sujeto es un mamífero, un primate humano o no humano, un perro, un gato, un caballo, una vaca, otros animales de granja o un roedor (por ejemplo, ratón, rata, conejillo de indias, etc.). Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento y tienen el mismo significado.

35 La etapa de preprocesamiento de la muestra proporciona ciertas ventajas que no están presentes en los métodos de extracción de ácido nucleico de la técnica anterior que no emplean un paso de preprocesamiento para obtener de la muestra una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico. Por ejemplo, los métodos de la presente descripción, que emplean como todos ellos, un paso de preprocesamiento, (1) tienden a producir rendimientos significativamente más altos de ácido nucleico extraído con mayor integridad; (2) proporcionan ventajas asociadas con la escalabilidad, por ejemplo, cuando se usa en apoyo de un ensayo para detectar ácidos nucleicos expresados en un sujeto a niveles bajos, la sensibilidad del ensayo se puede aumentar aislando, en la etapa de preprocesamiento, más materiales que contienen ácido nucleico de un volumen mayor de fluido de muestra; (3) los ácidos nucleicos más puros en esa proteína y lípidos, restos de células muertas y otros contaminantes potenciales e inhibidores de PCR pueden excluirse de los materiales que contienen ácido nucleico aislados en la etapa de preprocesamiento; y (4) más opciones en herramientas y técnicas de extracción de ácido nucleico, ya que la fracción que comprende materiales que contienen ácido nucleico que resulta de la etapa de preprocesamiento es típicamente de un volumen mucho menor que el volumen de muestra inicial, lo que hace posible extraer ácidos nucleicos de la fracción utilizando herramientas y técnicas de pequeño volumen, como filtros de columna de pequeño volumen.

40 La etapa de preprocesamiento de la muestra puede ser cualquiera de varias técnicas conocidas para separar materiales que contienen ácido nucleico de una muestra biológica. Por ejemplo, un método de aislamiento de células tumorales circulantes se describe en un artículo de Stott et al. (Stott et al., 2010), un método de centrifugación diferencial se describe en un artículo de Raposo et al. (Raposo et al., 1996), un artículo de Skog et al. (Skog et al., 2008) y un artículo de Nilsson et al. (Nilsson et al., 2009). Los métodos de intercambio aniónico y/o cromatografía de permeación en gel se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6,899,863 y 6,812,023. Los métodos de gradientes de densidad de sacarosa o electroforesis de orgánulos se describen en la Patente de Estados Unidos No. 7.198.923. Taylor y Gercel-Taylor (Taylor y Gercel-Taylor, 2008) describen un método de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS). Los métodos de concentración de filtración se describen en un artículo de Cheruvanky et al. (Cheruvanky et al., 2007) y en la publicación PCT No. WO2011/009104 (Russo et al.). Además, las microvesículas pueden identificarse y aislarse del fluido corporal de un sujeto mediante una tecnología de microchips recientemente desarrollada que utiliza una plataforma microfluídica única para separar de manera eficiente y selectiva las microvesículas derivadas de tumores (Chen et al., 2010).

65 El propósito del paso de mejora de extracción es eliminar o mitigar factores adversos que evitan la extracción de ácido nucleico de alta calidad de una muestra biológica. En algunas muestras biológicas, factores como el ADN circulante excesivo pueden afectar la calidad de la extracción de ácido nucleico de dichas muestras y contaminar el

ADN extraído de los materiales que contienen ácido nucleico. En otras muestras, factores tales como niveles excesivos de RNasa endógena pueden afectar la calidad de la extracción de ácido nucleico de dichas muestras. Se pueden usar muchos agentes y métodos para eliminar estos factores adversos. Estos métodos y agentes se denominan colectivamente en el presente documento como una "operación de mejora de extracción".

En algunos casos, la operación de mejora de extracción puede implicar la adición de agentes de mejora de extracción de ácido nucleico a la muestra biológica o diversos derivados de la muestra en cualquier etapa dada del proceso. Con el fin de eliminar factores adversos como la RNasa endógena, los agentes potenciadores de la extracción pueden incluir, entre otros, un inhibidor de la RNasa disponible en el mercado, como Superase-In (Ambion Inc.), RNaseIN (Promega Corp.) u otros agentes que funcionan de manera similar; una proteasa; un agente reductor; un sustrato señuelo tal como un ARN sintético; un receptor soluble que puede unirse a RNasa; un ARN de interferencia pequeña (ARNip); una molécula de unión a ARN, tal como un anticuerpo anti-ARN, o una proteína chaperona; una sustancia desnaturizante de RNasa, tal como una solución de alta osmolaridad, un detergente o una combinación de los mismos. Estos agentes potenciadores pueden ejercer sus funciones de varias maneras, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, mediante la inhibición de la actividad de RNasa (por ejemplo, inhibidores de RNasa), a través de una degradación ubicua de proteínas (por ejemplo, proteasas), o mediante una proteína chaperona (por ejemplo, una proteína de unión a ARN) que se une y protege al ARN. En todos los casos, dichos agentes de mejora de extracción eliminan o mitigan algunos o todos los factores adversos en la muestra biológica que de otro modo evitarían o interferirían con la extracción de alta calidad de ácidos nucleicos de la muestra.

En otros casos, la operación de mejora de extracción puede implicar el desempeño de uno o más pasos de proceso. Tales procesos incluyen un lavado extenso o sustancialmente completo de componentes que contienen ácido nucleico de la fracción o muestra; separación por tamaño de RNasas de la muestra biológica; desnaturización de proteínas en la muestra biológica mediante diversas técnicas que incluyen, entre otras, generar una condición de pH particular, una condición de temperatura (por ejemplo, el mantenimiento de una temperatura decreciente o más baja), ciclos de congelación/descongelación y combinaciones de los mismos.

Por lo tanto, la operación de mejora de extracción comprende: (a) la adición de uno o más agentes de mejora a la muestra biológica; o (b) el desempeño de uno o más pasos de mejora antes de la extracción de ácido nucleico; o (c) una combinación de agentes de mejora y etapas de mejora. Los agentes potenciadores pueden incluir: (i) inhibidor de RNasa; (ii) proteasa; (iii) agente reductor; (iv) sustrato señuelo, tal como ARN sintético; (v) receptor soluble; (vi) ARN interferente pequeño; (vii) molécula de unión a ARN, tal como anticuerpo anti-ARN, proteína chaperona o una proteína inhibidora de RNasa; y (ix) sustancia desnaturizante de RNasa, tal como una solución o detergente de alta osmolaridad. Los pasos de mejora de extracción pueden incluir: (x) lavado; (xi) RNasa de separación de tamaño de la muestra; (xii) efectuar la desnaturización de RNasa a través de un cambio físico, tal como disminuyendo la temperatura o ejecutando un ciclo de congelación/descongelación.

En variaciones en las que la operación de mejora de la extracción implica la adición de un inhibidor de RNasa, el inhibidor de RNasa se puede agregar a la muestra biológica o a la fracción que comprende una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico antes de extraer el ácido nucleico. Preferiblemente, el inhibidor de RNasa tiene una concentración de más de 0.027 UA (1X) para una muestra igual o superior a 1  $\mu$ l; alternativamente, mayor o igual a 0.135 AU (5X) para una muestra igual o mayor a 1  $\mu$ l; alternativamente, mayor o igual a 0.27 AU (10X) para una muestra igual o mayor a 1  $\mu$ l; alternativamente, mayor o igual a 0.675 AU (25X) para una muestra igual o mayor a 1  $\mu$ l; y, alternativamente, mayor o igual a 1.35 AU (50X) para una muestra igual o mayor a la que la concentración de proteasa 1x se refiere a una condición enzimática en la que se usa 0.027 AU o más proteasa para tratar microvesículas aisladas de 1  $\mu$ l o más fluido corporal; la concentración de proteasa 5X se refiere a una condición enzimática en la que se usan 0.135 UA o más proteasa para tratar microvesículas aisladas de 1  $\mu$ l o más fluido corporal; la concentración de proteasa 10X se refiere a una afección enzimática en la que se usan 0.27 UA o más de proteasa para tratar microvesículas aisladas de 1  $\mu$ l o más fluido corporal; la concentración de proteasa 25X se refiere a una afección enzimática en la que se usan 0.675 UA o más proteasa para tratar microvesículas aisladas de 1  $\mu$ l o más fluido corporal; la concentración de proteasa 50X se refiere a una condición enzimática en la que se usa 1.35 UA o más proteasa para tratar microvesículas aisladas de o más fluido corporal. Preferiblemente, el inhibidor de RNasa es una proteasa.

La etapa de extracción de ácido nucleico puede realizarse usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Las personas expertas seleccionarán un procedimiento de extracción particular según sea apropiado para la muestra biológica particular. Se proporcionan ejemplos de procedimientos de extracción en las publicaciones de patentes WO/2009/100029 y WO/2011/009104. En algunos casos, con algunas técnicas, también puede ser posible analizar el ácido nucleico sin extraerlo primero de los materiales que contienen ácido nucleico.

En un segundo ejemplo, se divulga un método para extraer ácido nucleico de una muestra biológica, que comprende los pasos de: obtener una muestra biológica; realizar un paso de preprocesamiento de muestra en la muestra biológica para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico; realizar una operación de exclusión por afinidad en la colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico; y extraer ácido nucleico de los materiales resultantes. La muestra biológica, el paso de

preprocesamiento y el paso de extracción de ácido nucleico son todos los descritos anteriormente en relación con el primer ejemplo. Preferiblemente, este método dará como resultado una extracción de ácido nucleico que cumpla con uno o más de los estándares de calidad descritos a continuación en términos de la relación cuantitativa de 18S ARNr a 28S ARNr, o rendimiento de ácido nucleico.

Una variación de este segundo ejemplo se muestra en la figura 2, en el que el método comprende los pasos de obtener una muestra (200) biológica, preprocesar la muestra para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico (210), realizar una operación (220) de exclusión por afinidad, y extracción de ácidos nucleicos de la fracción (230) de afinidad reducida.

La operación de exclusión por afinidad es un medio novedoso para reducir la heterogeneidad de la fracción de materiales que contienen ácido nucleico obtenidos de la etapa de preprocesamiento. En lugar de utilizar técnicas de selección por afinidad para enriquecer materiales de interés que contienen ácido nucleico, en la operación de exclusión por afinidad, se utilizan técnicas de afinidad para eliminar materiales que contienen ácido nucleico que no son de interés (por ejemplo, Materiales que contienen ácido nucleico procedentes de una célula tipo que no es de interés en un ensayo de biomarcadores que se realizará en el ácido nucleico extraído). Por ejemplo, usando los métodos y técnicas descritos en este documento, las células epiteliales, eritrocitos, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, basófilos, trombocitos, fibroblastos y células mesenquimales pueden eliminarse de la muestra antes de la ejecución de la etapa de extracción de ácido nucleico. El agotamiento puede ser completo o parcial. Por ejemplo, en algunos casos, un agotamiento del 50% de los materiales indeseables sería suficiente para lograr una extracción de ácido nucleico de alta calidad.

Debido a que los materiales que contienen ácido nucleico a menudo transportan moléculas de superficie, como los antígenos, de sus células donantes, se pueden usar moléculas de superficie para identificar y agotar los materiales que contienen ácido nucleico que se originan de un tipo específico de célula donante. En un ejemplo, la molécula de superficie utilizada en la operación de exclusión por afinidad es una molécula específica para el tipo de célula, por ejemplo, pero sin limitarse a, cualquiera de los marcadores de tipo de células enumerados en la Tabla 1. Alternativamente, dependiendo del diseño del ensayo, la molécula de superficie usado en la operación de exclusión por afinidad puede ser una molécula de superficie listada en la Tabla 2 si los materiales que contienen ácido nucleico que se originan a partir de un tipo específico de célula tumoral deben excluirse en el ensayo.

Tabla 1: Ejemplos de marcadores específicos de tipo celular.

Marcadores y tipos celulares	Referencias
I. Para selección positiva:	
A. Marcadores de células epiteliales:	
CD51	(Siegel et al., 2009)
Citoqueratina 8	(Punnoose et al., 2010)
Citoqueratina 18	(Punnoose et al., 2010)
Citoqueratina 19	(Punnoose et al., 2010)
E-cadherina (CD324, Cadherina-1)	(Punnoose et al., 2010)
EpCAM (ESA; molécula de adhesión de células epiteliales; CD326)	(Shmelkov et al., 2008)
Mucin 1 (EMA, antígeno de membrana epitelial; CA15-3; CD227)	(Matthews et al., 1988)
ZO-1	(Siegel et al., 2009)
II. Para selección negativa de muestras de orina	
A. Marcadores de eritrocitos (RBC):	
AE1 (Banda 3	(Ding et al., 2004)

II. Para selección negativa de muestras de orina	
A. Marcadores de eritrocitos (RBC):	
BGP1	(Lewis et al., 1988)
CD47	(Oldenborg et al., 2000)
Globina	(Min-Oo et al., 2004)
Glicoforina A (GPA)	(Shan et al., 1998; Telen and Chasis, 1990)
Polipéptidos Rh y glicoproteína Rh	(Agre et al., 1990; Avent et al., 1996)
TER119	(Jiang et al., 2005; Kobayashi et al., 2004)
Receptor de transferrina (CD71)	(Min-Oo et al., 2004; Tao et al., 2000)
Marcadores de B. Leucocitos (WBC):	
Integrinas de Beta2 Leucocitos (CD11/CD18)	(Flaherty et al., 1997)
CD45RA/ CD45RB/ CD45RO	(Bembridge et al., 1993; Lai et al., 1991; Masuoka et al., 1992)
CD166 (ALCAM, molécula de adhesión de células leucocitarias activadas)	(Lunter et al., 2005)
HLA (antígeno de leucocitos humanos)	(Guerini et al., 2006)
LAM-1 (molécula-1 de adhesión leucocitaria)	(Kansas et al., 1991)
L-selectina	(Tu et al., 2002; Venturi et al., 2003)
Marcadores y tipos de células	Referencias
LSP1 (proteína-1 específica de leucocitos)	(Hannigan et al., 2001; Marafioti et al., 2004)
Ly-9	(de la Fuente et al., 2001)
M6 (antígeno de activación de leucocitos)	(Kasinrerck et al., 1992)
III Para selección negativa de muestras de sangre	
A. Igual que II A y II B	
B. Marcadores de Neutrófilos:	
31D8	(Gallin et al., 1986; Spiekermann et al., 1996)
CD11b-también un marcador de monocitos	(De Clerck et al., 1995)
CD15	
CD18	(De Clerck et al., 1995)
CD45	
CD64	(Matsui et al., 2006)
Gelatinasa	(Borregaard et al., 1995)

Mac-1	
C. Marcadores de linfocitos:	
Células T: CD3, CD5, receptor de células T (TCR)	(Berrington et al., 2005)
Células B: MHC clase II, CD19, CD21	(Berrington et al., 2005)
Células NK: CD16, CD56, NKp46, NKp44	(Berrington et al., 2005)
D. Marcadores de Monocitos/Marcadores de macrofase:	
125I-WVH-1	(Fayle et al., 1985)
CD1 1b – también un marcador de neutrófilos	Fink et al., 2003)
CD14	(Jonas et al., 1990; Ruppert et al., 1991)
FcRI y FcRII	(Clement et al., 1985)
HLA-DR	
Ki-M1p	(Rudolph et al., 1997)
p-selectina	
Marcadores de E. Basófilo:	
2D7	(Agis et al., 2006b; Kepley et al., 1995)
Basogranulina (BB1)	(Agis et al., 2006a)
Bsp-1	(Valent et al., 1990)
CCR-3 (receptor de eotaxina)	(Ducrest et al., 2005)
CD203-c (E-NPP3)	(Sainte-Laudy and Belon, 2006)
CDw-17 (lactosilceramida)	(Yokohama et al., 2002)
CD88	(Yokohama et al., 2002)
F. Marcador de trombocitos (plaquetas):	
CD36	(Thibert et al., 1995)
G. marcador de células dendríticas:	
CD83	
CD11c	
CD1a	
Marcadores y tipos de Células	Referencias
H. Células endoteliales	
CD31	
IV Otros tipos de marcadores	

A. Marcador de Fibroblastos:	
Proteína 1 específica fibroblastos (FSP1)	(Nishitani et al., 2005; Strutz et al., 1995)
MAb AS02	
Thy. 1	
B. Marcador mesenquimal:	
CD29	(Siegel et al., 2009)
N-cadherina	(Li et al., 2011)
Vimentina	(Punnoose et al., 2010)
C. Marcador de células de Glioblastoma:	
Proteína EGFRvIII	(Al-Nedawi et al., 2008)
PDGFR	
IL13Ra2	
C. Marcador de células de Glioblastoma:	
CD133	
Sulfato de proteoglicano condroitina	
3'-isoLM1	
3'6'-isoLD1	
GPNMB	
MRP3	
podoplanina	
D. Marcador de partículas HERV	
HERV env	

En variaciones de este segundo ejemplo, el método puede comprender adicionalmente una operación de mejora de extracción, como se describió anteriormente en relación con el primer ejemplo. La operación de mejora de extracción se puede realizar en cualquier momento del proceso antes de la etapa final de extracción de ácido nucleico.

5 En variaciones adicionales, puede haber un paso adicional de eliminación de ácidos nucleicos que no están ubicados dentro de las células o microvesículas que pueden ser parte de la colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico. Los métodos para eliminar ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar un paso de digestión enzimática en cualquier punto del proceso. Dichas enzimas pueden ser un tipo de ribonucleasa que cataliza la digestión enzimática de los ácidos ribonucleicos o un tipo de desoxirribonucleasa que cataliza la digestión enzimática de los ácidos desoxirribonucleicos.

15 En un tercer ejemplo, se divulga un método para extraer ácido nucleico de una muestra biológica, que comprende los pasos de: obtener una muestra biológica; realizar un paso de preprocesamiento de muestra en la muestra biológica para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico; realizar una operación de mejora de extracción; realizar una operación de exclusión por afinidad; y extraer ácido nucleico de los materiales resultantes. La muestra biológica, el paso de preprocesamiento, la operación de mejora de extracción, la operación de exclusión de afinidad y el paso de extracción de ácido nucleico son todos los descritos anteriormente en relación con el primer y segundo ejemplos.

20

En este ejemplo, la etapa de preprocesamiento de la muestra debe ocurrir antes de la operación de exclusión de afinidad, pero la operación de mejora de extracción puede ocurrir en cualquier momento antes de la etapa de extracción de ácido nucleico.

5 Preferentemente, este ejemplo también dará como resultado una extracción de ácido nucleico que cumple con uno o más de los estándares de calidad descritos a continuación en términos de la relación cuantitativa de 18S ARNr a 28S ARNr, o rendimiento de ácido nucleico.

10 Una variación del método descrito en este ejemplo se muestra en la figura 3, en donde el método comprende los pasos de obtener una muestra (300) biológica, preprocesar la muestra para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales (310) que contienen ácido nucleico, realizar una operación (320) de exclusión por afinidad, realizar una operación (330) de mejora de extracción y extracción de ácidos nucleicos.

15 Como con el primer y segundo ejemplos, este tercer ejemplo puede comprender además un paso adicional de eliminación de ácidos nucleicos que no se encuentran dentro de las células o microvesículas que pueden ser parte de la colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico. Los métodos para eliminar ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar un paso de digestión enzimática en cualquier punto del proceso, por ejemplo, antes del preprocesamiento de la muestra, antes de realizar la operación de extracción de mejora, o antes de la extracción de ácido nucleico. Dichas enzimas pueden ser un tipo de ribonucleasa que cataliza la digestión enzimática de los ácidos ribonucleicos o un tipo de desoxirribonucleasa que cataliza la digestión enzimática de los ácidos desoxirribonucleicos.

#### Enriquecimiento de afinidad

25 Todos los ejemplos y variaciones anteriores de los métodos de extracción de ácido nucleico descritos anteriormente pueden comprender además una operación de enriquecimiento de afinidad, en la que los métodos de selección de afinidad se usan para enriquecer materiales que contienen ácido nucleico de cierto tipo o que se originan a partir de una célula particular, tejido u órgano del cuerpo, por ejemplo, pulmón, páncreas, estómago, intestino, vejiga, riñón, ovario, testículo, piel, colorrectal, mama, próstata, cerebro, esófago, hígado, placenta o células fetales.

30 Debido a que los materiales que contienen ácido nucleico a menudo transportan moléculas de superficie tales como antígenos de sus células donantes, las moléculas de superficie pueden usarse para identificar, aislar y/o enriquecer materiales que contienen ácido nucleico de un tipo específico de célula donante (Al-Nedawi et al., 2008; Taylor y Gercel-Taylor, 2008). De esta manera, los materiales que contienen ácido nucleico que se originan de distintas poblaciones celulares pueden analizarse para determinar su contenido de ácido nucleico. Por ejemplo, materiales que contienen ácido nucleico de tumor (maligno y no maligno) pueden llevar antígenos de superficie asociados a tumor y pueden detectarse, aislarse o enriquecerse mediante estos antígenos de superficie específicos de tumores asociados.

40 En un ejemplo, el antígeno de superficie es la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), que es específica de los materiales que contienen ácido nucleico de carcinomas de pulmón, colorrectal, mama, próstata, cabeza y cuello, y de origen hepático, pero no de origen celular hematológico (Balzar et al., 1999; Went et al., 2004).

45 En otro ejemplo, el antígeno de superficie es CD24, que es una glucoproteína específica de los materiales que contienen ácido nucleico en la orina (Keller et al., 2007).

50 En otro ejemplo más, el antígeno de superficie se selecciona 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. Además, los materiales que contienen ácido nucleico específico de tumor pueden caracterizarse por la falta de marcadores de superficie, tales como CD80 y CD86.

55 En otros ejemplos, los antígenos de superficie son cualquiera de los marcadores tumorales, enumerados en la Tabla 2. Los antígenos de superficie en la Tabla 2 pueden usarse para realizar una operación de enriquecimiento de afinidad para que los materiales que contienen ácido nucleico de un tipo de célula tumoral específica se enriquecen. Alternativamente, dependiendo del diseño del ensayo, el antígeno de superficie en la operación de enriquecimiento de afinidad puede ser cualquiera de los marcadores de superficie enumerados en la Tabla 1 anterior.

Tabla 2 Ejemplos de biomarcadores tumorales

Biomarcador	Nombre(s)	Combinación	Tipo de cáncer	Referencias
ABCB1	MDR1; P-glicoproteína 1; Miembro de la subfamilia B del casete de unión a ATP 1		Leucemia mieloide aguda (AML), Páncreas Ovario	(Young, 2007) (Fong and Kakar, 2010)

ABCB5	Miembro de la subfamilia B del casete de unión a ATP 5		Melanoma	(Schatton et al., 2008)
ABCG2	CDw338; BCRP; Miembro de la subfamilia G del casete de unión a ATP 2		Ovario Mama	(Kim et al., 2002) (Fong and Kakar, 2010)
AFP	Alfa-fetoproteína		Hepatocelular	(Baig et al., 2009)
ALDH1	Aldehído deshidrogenasa 1	ALDH1+/CD44+/CD24-/lin-	Mama	(Ginestier et al., 2007)
ALDH1	Aldehído deshidrogenasa 1		Pulmón Hematopoyético	(Matsui et al., 2004) (Jiang et al., 2009)
APOE	Apolipoproteína E, apo E		Ovario	(Chen et al., 2005)
BIRC5	Survivina; inhibidor baculovírico de la apoptosis que contiene repeticiones 5		Pulmón	(Falleni et al., 2003)
CD15	leuMI; 3-fucosil-N-acetilactosamina		Mama, colorrectal, leucemia, pulmón	(Ball, 1995)
CD20	Antígeno 20 de B-linfocito		Linfoma de células B, leucemia	(Coiffier, 2007)
CD24	HSA; antígeno estable al calor CD24	CD24+/CD44+/EpCAM+	Páncreas	(Li et al., 2007)
CD24	HSA; antígeno estable al calor CD24		Colon, vesícula biliar, ovario, páncreas, estómago	(Lim and Oh, 2005; Sagiv et al., 2006)
CD34	Molécula CD34; Antígeno CD34 de célula progenitora hematopoyética	CD34+/CD10-CD34+/CD38-	Leucemia AML	(Cox et al., 2004) (Kojima and Kitamura, 1999)
CD44	Molécula CD44 (grupo sanguíneo indio)	CD44+/CD24-/bajo CD44+/CD24-/bajo/lin-  CD44+/CD24-  CD44+/CD24-  CD44+/CD24- CD44+/CD24low/EpCAM+ CD44+/EpCA M+	Mama Mama  Gliomas  AML  Próstata Mama Colon	(Al-Hajj et al., 2003) (Al-Hajj et al., 2003)  (Galli et al., 2004; Hemmati et al., 2003; Ignatova et al., 2002; Lee et al., 2006; Singh et al., 2003; Singh et al., 2004; Uchida et al., 2000; Yuan et al., 2004) (Bonnet and Dick, 1997; Ishikawa et al., 2007; Lapidot et al., 1994) (Hurt et al., 2008) (Fillmore and Kuperwasser, 2008) (Boman and Huang, 2008)

		CD44+/MYD8 8+ CD44+/CD117 +/CD133+	Ovario Vejiga Vejiga	(Alvero et al., 2009) (Fong and Kakar, 2010) (Chan et al., 2009) (Yang and Chang, 2008)
CD44	Molécula CD44 (grupo sanguíneo indio)		AML de Cabeza y Cuello	(Jin et al., 2006) (Prince et al., 2007)
CD47	MER6; IAP; proteína asociada a la integrina de transmembrana de tipo inmunoglobulina		Vejiga	(Chan et al., 2009)
CD90	Thy-1, antígeno de diferenciación de timocitos 1	CD90+/CD44+	Hígado	(Yang et al., 2008)
CD96	CD96; Táctil; Activación de células T aumenta la expresión tardía		Leucemia	(Hosen et al., 2007)
CD133	PROM1, prominina-1	CD133+/ABCG2+ CD133+/CD44 +	Melanoma Colon	(Monzani et al., 2007) (Dallas et al., 2009)
CD133	PROM1, prominina-1		Cerebro  Colon  Hepatocelular Pulmón Ovario Páncreas  Próstata Skin	(Bao et al., 2006a; Hemmati et al., 2003; Liu et al., 2006; Singh et al., 2003; Singh et al., 2004; Taylor et al., 2005; Zeppernick et al., 2008) (O'Brien et al., 2007; RicciVitiani et al., 2007; Todaro et al., 2007) (Smith et al., 2008) (Eramo et al., 2008) (Fernandina et al., 2008) (Hermann et al., 2007; Li et al., 2007) (Collins et al., 2005) (Monzani et al., 2007)
CD142	Factor tisular; factor tisular de plaquetas; factor III; trombocinasa		Mama, colorrectal, pulmón, páncreas	(Zwicker et al., 2009)
CD147	EMMPRIN; inductor de metaloproteínasa de matriz extracelular; basigina		Próstata	(Zhong et al., 2011)
CD326	CD326; Flotillina		Mama, colon, GI, ovario  Próstata	(Naundorf et al., 2002)  (Oberneder et al., 2006)
CEA	Antígeno carcinoembrionario		Colon	(Thomas et al., 2009)
CLDN3	Claudina 3		Ovario	(Hough et al., 2001; Rangel et al., 2003)

CLDN4	Claudina 4		Ovario	(Hough et al., 2001; Rangel et al., 2003)
CLDN7	Claudina 7		Ovario	(Hough et al., 2001)
CTSB	Catepsina B		Glioma	(Strojanik et al., 2007)
CXCL1	GRO-alfa; Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1		Vejiga	(Kawanishi et al., 2008)
CXCR4	Receptor de Quimiocina tipo 4		Colon Gliomas  Melanoma Próstata	(Ottaiano et al., 2005) (Dirks, 2001; Liu et al., 2006; Salmaggi et al., 2006)  (Alsayed et al., 2007) (Sun et al., 2005)
EpCAM	ESA; Molécula de adhesión a célula epitelial; CD326	EpCAM+/CD45-	Mama, colorrectal, próstata	(Allard et al., 2004)
EpCAM	ESA; Molécula de adhesión a célula epitelial; CD326		Colon, próstata	(Ammons et al., 2003; Goel et al., 2007; Oberneder et al., 2006)
EGFR1	erbB-1; HER1; Receptor del factor de crecimiento epidermoide 1		Anal Mama Glioblastoma  Pulmón	(Walker et al., 2009) (Neve et al., 2006) (Heimberger et al., 2005)  (Jackman et al., 2009; Punnoose et al., 2010)
EGFRvIII	EGFR Mutante		GBM	(Pelloski et al., 2007)
FOLH1	Folato hidrolasa 1; PSM; PSMA, antígeno de membrana específico de próstata		Próstata	(Chang et al., 1999; Ross et al., 2003)
FOLR1	Alfa receptor folato		Ovario	(Kalli et al., 2008)
	Gangliosida GD1a		Ovario	(Prinetti et al., 2010)
GFAP	Proteína ácida fibrilar Glial		Glioblastoma	(Hill et al., 2003)
GYPA	Glicoforina A; CD235a		Leucemia	(Andersson et al., 1979)
HER2	erbB-2; neu; Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2		Mama Útero	(Korkaya et al., 2008) (Santin et al., 2008)
HLA-G	antígeno-G de leucocito humano		Ovario	(Sheu and Shih le, 2007)
HPN	Hepsina; TMPRSS1		Próstata	(Dhanasekaran et al., 2001)
KLK2	Kallikreina 2		Próstata	(Magklara et al., 1999; Partin et al., 1999; Rittenhouse et al., 1998)
KLK3	PSA; Kallikreina 3; antígeno específico de próstata		Próstata	(Rittenhouse et al., 1998)
KLK5	Kallikreina 5		Ovario	(Yousef et al., 2003a; Yousef et al., 2003b)

KLK6	Kallikreina 6		Ovario	(Yousef et al., 2003b)
KLK7	Kallikreina 7		Ovario	(Yousef et al., 2003b)
KLK8	Kallikreina 8		Ovario	(Hoffman et al., 2002; Yousef et al., 2003b)
KLK10	Kallikreina 10		Ovario	(Luo et al., 2001; Yousef et al., 2003b)
KLK11	Kallikreina 11		Ovario	(Yousef et al., 2003b)
KLK14	Kallikreina 14		Mama Ovario	(Borgono et al., 2003) (Borgono et al., 2003; Yousef et al., 2003b)
	Sulfatos de Keratano		Carcinoma papilar de tiroides	(Magro et al., 2003)
L1CAM	CD171; molécula de adhesión celular L1		Gliomas	(Bao et al., 2008)
LMP1	proteína de membrana latente EBV 1		Linfoblastoma	(Flanagan et al., 2003)
MET	c-Met; HGFR; receptor de factor de crecimiento de hepatocitos		Mama	(Neve et al., 2006)
MSLN	Mesotelina		Mesotelioma Ovario Páncreas	(Chang and Pastan, 1996) (Chang and Pastan, 1996; Lu et al., 2004) (Agarwal et al., 2008)
MUC 1	Mucina 1; CD227		Mama Colon	(McGuckin et al., 1995; Taylor-Papadimitriou et al., 1999) (Niv, 2008)
MUC4	Mucina 4		Ovario	(Shih Ie and Davidson, 2009)
MUC16	Mucina 16; antígeno de cáncer de ovario CA 125		Ovario	(Yin et al., 2002; Yin and Lloyd, 2001)
OPN	BSP-1; BNSP; Osteopontina; sialoproteína I ósea		Ovario	(Rosen et al., 2005; Visintin et al., 2008)
PCA-3	DD3; antígeno 3 de cáncer de próstata		Próstata	(Laxman et al., 2008)
PNCAM	Ácido polisialílico o polisialilado NCAM (una modificación postraduccional de NCAM, molécula de adhesión de células neuronales)		Prolactinoma Neuroendocrino carcinoma pulmonar microcítico	(Gurlek et al., 2007) (Figarella-Branger et al., 1990; Jin et al., 1991) (Komminoth et al., 1991)
PTK7	Proteína tirosino cinasa 7		Leucemia linfoblástica aguda de células T	(Shangguan et al., 2008)
TMPRSS2: ERG	Transmembrana proteasa, serina 2 : gen relacionado con Ets		Próstata	(Hessels et al., 2007; Laxman et al., 2008)

VEGF	Factor de crecimiento endotelial		Gliomas	(Bao et al., 2006b)
------	----------------------------------	--	---------	---------------------

5 Un experto en la materia apreciará que los marcadores de superficie descritos en las Tablas 1 y 2 pueden usarse indistintamente para una operación de exclusión de afinidad o una operación de enriquecimiento de afinidad dependiendo de los objetivos de un ensayo dado y método de extracción de ácido nucleico practicado de acuerdo con a las enseñanzas de esta divulgación. Por ejemplo, por un lado, los marcadores de superficie para fibroblastos pueden usarse para excluir materiales que contienen ácido nucleico derivados de fibroblastos cuando se realiza un procedimiento para evaluar biomarcadores de glioblastoma. Por otro lado, los marcadores de superficie para fibroblastos pueden usarse para enriquecer materiales que contienen ácido nucleico derivados de fibroblastos cuando se realiza un procedimiento para evaluar el fibroblastoma.

10 Se puede lograr un procedimiento de afinidad para el agotamiento o enriquecimiento de materiales que contienen ácido nucleico de un tipo de célula específico, por ejemplo, usando anticuerpos, aptámeros, análogos de aptámeros o polímeros impresos molecularmente específicos para un antígeno de superficie deseado (en adelante agente de "afinidad"). En una realización, el antígeno de superficie es específico para un tipo de cáncer. En otra realización, el antígeno de superficie es específico para un tipo celular que no es necesariamente canceroso.

15 Un ejemplo de un método de separación de material que contiene ácido nucleico basado en el antígeno de la superficie celular proporcionado en la Patente de los Estados Unidos Núm. 7,198,923. Allí se usó el anticuerpo CD81 para enriquecer los exosomas que contienen antígeno CD81 para preparar ARN de VHC a partir de una muestra de sangre.

20 Se describe otro ejemplo, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 5.840.867 y 5.582.981, WO/2003/050290 y una publicación de Johnson et al. (Johnson et al., 2008). Allí, los aptámeros y sus análogos que se unen específicamente a las moléculas de superficie se usaron como una herramienta de separación para enriquecer los materiales que contienen ácido nucleico específico del tipo de célula. Además, los polímeros impresos molecularmente también pueden reconocer específicamente moléculas de superficie tal como se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 6.525,154, 7,332,553 y 7,384,589 y una publicación de Bossi et al. (Bossi et al., 2007) y también puede ser una herramienta para recuperar y aislar materiales que contienen ácido nucleico de tipo celular específico.

25 Estándares de calidad para extracciones de ácido nucleico

30 Las extracciones de ácido nucleico obtenidas por los nuevos métodos descritos en el presente documento se caracterizan por un alto rendimiento y una alta integridad, lo que hace que los ácidos nucleicos extraídos sean útiles para diversas aplicaciones en las que se requieren o prefieren extracciones de ácido nucleico de alta calidad.

35 Como se mencionó anteriormente, el rendimiento de cualquiera de los diversos métodos de extracción de ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción preferiblemente da como resultado una extracción de ácido nucleico que cumple con uno o más de los estándares de calidad descritos a continuación en términos de la relación cuantitativa de 18S ARNr a 28S ARNr, o rendimiento de ácido nucleico.

40 Preferentemente, los métodos de extracción de ácido nucleico de esta descripción darán como resultado una extracción de ácido nucleico en la que se pueden detectar cantidades significativas de ARN ribosómico (ARNr), específicamente ARNr 18S y 28S, preferiblemente en una relación de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:2; y más preferiblemente, en una proporción de aproximadamente 1:2.

45 Además, los métodos de extracción de ácido nucleico de la presente descripción preferiblemente darán como resultado rendimientos mejorados de ácido nucleico extraído. Por ejemplo, usando los métodos descritos en este documento, se puede obtener un rendimiento de ácido nucleico mayor o igual a 50 pg/ml a partir de una muestra biológica baja en proteínas de 20 ml como la orina. Alternativamente, se puede obtener un rendimiento de ácido nucleico mayor o igual a 50 pg/ml a partir de 1 ml de una muestra biológica alta en proteínas, como el masa de tejido o el plasma.

50 Por lo tanto, las nuevas extracciones de ácido nucleico obtenidas por los métodos descritos en el presente documento cumplen preferiblemente uno o más de los siguientes estándares de calidad: (1) la detección de ARNr 18S y 28S, preferiblemente en una relación de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:2; y más preferiblemente, aproximadamente 1:2; y/o (2) un rendimiento de ácido nucleico mayor o igual a 50 pg/ml de una muestra biológica baja en proteínas de 20 ml o una muestra biológica alta en proteínas de 1 ml.

55 Uso de los métodos de extracción de ácido nucleico, y las extracciones de ácido nucleico resultantes, en análisis de ácido nucleico para investigación y aplicaciones clínicas.

60 Los métodos de extracción de ácido nucleico de la presente divulgación se pueden usar para producir extracciones de ácido nucleico novedosas y mejoradas para diversas aplicaciones, que incluyen pero no se limitan a análisis de

ácido nucleico para investigación (por ejemplo, investigación en apoyo del descubrimiento de nuevos biomarcadores o asociaciones de biomarcadores) o análisis clínicos de ácido nucleico en ayuda del diagnóstico del paciente, pronósticos, teranósticos, monitorización, medicina predictiva, medicina personalizada, medicina integrada, farmacodiagnóstico y diagnóstico/asociación de prescripción (diagnóstico complementario).

En un ejemplo, los ácidos nucleicos extraídos, que incluyen ADN y/o ARN, se analizan directamente sin un paso de amplificación. El análisis directo se puede realizar con diferentes métodos que incluyen, entre otros, la tecnología de nanocadenas. La tecnología de nanocadenas permite la identificación y cuantificación de moléculas objetivo individuales en una muestra biológica al unir un indicador fluorescente codificado por color a cada molécula objetivo. Este enfoque es similar al concepto de medición de inventario escaneando códigos de barras. Los reporteros se pueden hacer con cientos o incluso miles de códigos diferentes que permiten un análisis altamente multiplexado. La tecnología se describe en una publicación de Geiss et al. (Geiss et al., 2008).

En otro ejemplo, puede ser beneficioso o deseable amplificar el ácido nucleico antes de analizarlo. Los métodos de amplificación de ácido nucleico se usan comúnmente y generalmente se conocen en la técnica, muchos ejemplos de los cuales se describen aquí. Si se desea, la amplificación se puede realizar de manera que sea cuantitativa. La amplificación cuantitativa permitirá la determinación cuantitativa de cantidades relativas de los diversos ácidos nucleicos, para generar un perfil como se describe a continuación.

En una realización, el ácido nucleico extraído es ARN. El ARN se transcribe preferiblemente de manera inversa en ADN complementario (ADNc) antes de una amplificación adicional. Dicha transcripción inversa puede realizarse sola o en combinación con un paso de amplificación. Un ejemplo de un método que combina los pasos de transcripción inversa y amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), que puede modificarse adicionalmente para que sea cuantitativa, por ejemplo, RT-PCR cuantitativa como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5,639,606.

Los métodos de amplificación de ácido nucleico incluyen, sin limitación, reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Patente de EE. UU. No. 5,219,727) y sus variantes tales como reacción en cadena de polimerasa in situ (Patente de EE. UU. No. 5,538,871), reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (Patente de EE. UU. 5,219,727), reacción en cadena de la polimerasa anidada (Patente de los Estados Unidos No. 5,556,773), replicación de secuencia autosostenida y sus variantes (Guatelli et al., 1990), sistema de amplificación transcripcional y sus variantes (Kwoh et al., 1989), Qb Replicase y sus variantes (Miele et al., 1983), PCR en frío (Li et al., 2008) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Las técnicas Especialmente útiles son aquellos esquemas de detección diseñados para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en cantidades muy bajas.

El análisis de los ácidos nucleicos presentes en los materiales que contienen ácido nucleico puede ser cuantitativo y/o cualitativo. Para el análisis cuantitativo, las cantidades (niveles de expresión), ya sean relativos o absolutos, de ácidos nucleicos específicos de interés dentro de los materiales que contienen ácido nucleico se miden con métodos conocidos en la técnica (descritos a continuación). Para el análisis cualitativo, las especies de ácidos nucleicos específicos de interés dentro de los materiales que contienen ácido nucleico, ya sean de tipo salvaje o variantes, se identifican con métodos conocidos en la técnica.

Perfiles de ácido nucleico.

Esta divulgación incluye además un perfil novedoso de ácidos nucleicos de alta calidad de una muestra biológica. Dichos perfiles se generan realizando cualquiera de las diversas realizaciones y variaciones de los métodos de extracción de ácido nucleico divulgados aquí, y analizando el ácido nucleico resultante.

Un perfil, como se usa el término en el presente documento, se refiere a una colección de características, que puede determinarse a través del análisis cuantitativo o cualitativo de uno o más componentes o materiales biológicos (tales como ácido nucleico) contenidos en una muestra (tales como una extracción de ácido nucleico obtenida por cualquiera de los métodos divulgados aquí). Un perfil de referencia es un perfil obtenido de un sujeto independiente o del mismo sujeto en un punto de tiempo diferente.

Los ácidos nucleicos del perfil pueden ser ARN. El ARN puede codificar ARN, por ejemplo, ARN mensajero que puede codificar proteínas. El ARN también puede ser ARN no codificante (ARNnc), por ejemplo, ARN ribosómico, ARN de transferencia, microARN y otras transcripciones no codificantes que pueden originarse a partir de ADN genómico. Estas transcripciones de ARN no codificantes pueden incluir transcripciones que se transcriben a partir de repeticiones de satélite y transposones, que pueden ser transposones de ADN o retrotransposones.

Los ácidos nucleicos también pueden ser ADN. El ADN puede ser ADN de cadena sencilla, por ejemplo, ADNc, que se transcribe inversamente a partir del ARN. El ADN también puede ser ADN de cadena sencilla que se genera durante la replicación del ADN. El ADN genómico se replica en el núcleo mientras la célula se divide. Parte del ADN

replicado puede salir de su plantilla, exportarse fuera del núcleo y empacarse en microvesículas. También es posible que el ADN sea ADN de cadena doble. Además, el ADN puede ser ADN no codificante (ADNnc).

Los perfiles de ácido nucleico de alta calidad son altamente deseables para muchos usos, tales como la investigación (por ejemplo, investigación en apoyo del descubrimiento de nuevos biomarcadores o asociaciones de biomarcadores) o usos clínicos tales como diagnósticos, pronósticos, teranósticos, monitorización, medicina predictiva, medicina personalizada, medicina integrada, farmacodiagnóstico y asociación de diagnóstico/prescripción (diagnóstico complementario). Es deseable que tales perfiles sean consistentes entre las muestras. Dicha consistencia no puede lograrse sin extracciones de ácido nucleico de alta calidad.

En un ejemplo, el perfil de ácido nucleico incluye una o más aberraciones genéticas, que se usa en el presente documento para referirse a cantidades de ácido nucleico, así como a variantes de ácido nucleico. Preferiblemente, el ácido nucleico es endógeno al sujeto. Las aberraciones genéticas incluyen, sin limitación, sobreexpresión de uno o más elementos genómicos, subexpresión de uno o más elementos genómicos, producción alternativa de variantes de empalme de uno o más elementos genómicos, variantes de número de copias (CNV) de uno o más elementos genómicos (por ejemplo, minutos dobles de ADN) (Hahn, 1993), modificaciones de ácidos nucleicos (por ejemplo, metilación, acetilación y fosforilaciones), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), reordenamientos cromosómicos (por ejemplo, inversiones, eliminaciones y duplicaciones) y mutaciones (inserciones, eliminaciones, duplicaciones, sentido erróneo, sin sentido, sinónimos o cualquier otro cambio de nucleótidos) de uno o más elementos genómicos, cuyas mutaciones, en muchos casos, afectan en última instancia la actividad y la función del genoma, conducen a variantes de empalme transcripcional alternativas y/o cambios en el nivel de expresión génica.

Los ácidos nucleicos en los materiales que contienen ácido nucleico pueden ser cualquier tipo de ácido nucleico, incluidos, entre otros, los ejemplos proporcionados aquí. En la categoría de ARN, los ácidos nucleicos pueden codificar ARN, por ejemplo, ARN mensajero que puede codificar proteínas; ARN no codificante (ARNnc), por ejemplo, ARN ribosómico, ARN de transferencia, microARN y otras transcripciones no codificantes que pueden originarse a partir de ADN genómico. Las transcripciones de ARN no codificantes pueden incluir transcripciones que se transcriben desde repeticiones de satélite y transposones, que pueden ser transposones de ADN o retrotransposones. En la categoría de ADN, los ácidos nucleicos pueden incluir ADN de cadena sencilla (ADNcs), por ejemplo, ADNc, que se transcribe inversamente a partir de ARN y ADNcs que se genera durante la replicación de ADN; ADN de cadena doble (ADNcd); ADN que codifica proteínas (ADN codificante); y ADN que no codifica proteínas, es decir, ADN no codificante (ADNnc).

La determinación de tales aberraciones genéticas se puede realizar mediante una variedad de técnicas conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, los niveles de expresión de ácidos nucleicos, variantes de empalme alternativas, reordenamiento cromosómico y números de copias de genes se pueden determinar mediante análisis de micromatriz (patentes de EE. UU. Nos. 6,913,879, 7,364,848, 7,378,245, 6,893,837 y 6,004,755) y PCR cuantitativa. Particularmente, los cambios en el número de copias pueden detectarse con el ensayo de genotipado de genoma completo Illumina Infinium II o el Microarray Agilent Human Genome CGH (Steeimers et al., 2006). Las modificaciones de ácido nucleico se pueden analizar mediante métodos descritos en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 7,186,512 y la publicación de patente WO/2003/023065. En particular, los perfiles de metilación se pueden determinar, por ejemplo, mediante el Illumina DNA Methylation OMA003 Cancer Panel. Los SNP y las mutaciones pueden detectarse mediante hibridación con sondas específicas de alelos, detección de mutaciones enzimáticas, escisión química de heterodúplex no coincidente (Cotton et al., 1988), escisión de ribonucleasa de bases no coincidentes (Myers et al., 1985), espectrometría de masas (Patentes de EE. UU. Nos. 6,994,960, 7,074,563 y 7,198,893), secuenciación de ácidos nucleicos, polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) (Orita et al., 1989), electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) (Fischer y Lerman, 1979a; Fischer y Lerman, 1979b), electroforesis en gel con 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 ligadura de oligonucleótidos (OLA), PCR alelo-específica (ASPCR) (Patente de Estados Unidos No. 5.639.611), reacción en cadena de ligadura (LCR) y sus variantes (Abravaya et al., 1995; Landegren et al., 1988; Nakazawa et al., 1994), flow- análisis de heterodúplex citométrico (WO/2006/113590) y combinaciones o modificaciones de los mismos. En particular, los niveles de expresión génica pueden determinarse mediante el análisis en serie de la técnica de expresión génica (SAGE) (Velculescu et al., 1995). En general, los métodos para analizar las aberraciones genéticas se informan en numerosas publicaciones, no limitadas a las citadas aquí, y están disponibles para profesionales expertos. El método de análisis apropiado dependerá de los objetivos específicos del análisis, la condición/historial del paciente y las cancelaciones específicas), enfermedades u otras condiciones médicas que se detectarán, controlarán o tratarán.

Kits para obtener ácidos nucleicos

La presente descripción también se dirige a un kit para obtener ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas. El kit puede comprender un agente de afinidad; un agente de mejora de extracción; y un tampón de lisis. En algunos ejemplos, el agente de afinidad es capaz de unirse a uno o más marcadores enumerados en la Tabla 1 o la Tabla 2.

5 En algunos casos, el kit puede comprender además instrucciones para usar el kit. Las instrucciones para usar el kit pueden incluirse en el paquete con los otros componentes del kit o en una ubicación diferente a la que pueda acceder un usuario del kit (por ejemplo, en un sitio web o página web accesible para el comprador del kit). El contenido de las instrucciones puede incluir, entre otras, instrucciones sobre cómo usar el agente de afinidad, cómo realizar una operación de exclusión de afinidad, cómo reconstituir reactivos, cómo mejorar el ácido nucleico, cómo usar el tampón de lisis y cómo llevar a cabo todo el procedimiento para obtener ácidos nucleicos mediante el uso del kit.

10 En algunos ejemplos del kit, el agente potenciador de extracción puede ser un inhibidor de RNasa; proteasa; agente reductor; sustrato señuelo; receptor soluble; ARN de interferencia corta; Molécula de unión a ARN; Sustancia desnaturalizante RNase; o cualquier combinación de cualquiera de los anteriores.

15 En algunos ejemplos, el agente de afinidad es adecuado para realizar una operación de exclusión, y las instrucciones incluidas en o con el kit comprenden instrucciones para usar el agente de afinidad en una operación de exclusión de afinidad. Los kits de esta naturaleza pueden comprender además un segundo agente de afinidad e instrucciones para usar el segundo agente de afinidad en una operación de enriquecimiento de afinidad.

20 En ejemplos adicionales, el kit puede comprender además DNasa, RNasa, o ambas, e instrucciones para su uso. Estos reactivos pueden usarse para eliminar ADN o ARN que no tienen interés en el ensayo previsto, por ejemplo, ADN o ARN que se adhiere al exterior de los materiales que contienen ácido nucleico en la extracción. La cantidad de DNasa o RNasa puede depender de la fuente de la muestra biológica. En algunas muestras, la cantidad de ADN o ARN sin interés es relativamente alta y, por lo tanto, será necesario agregar más DNasa o RNasa en el proceso de extracción.

25 Las metodologías, protocolos y reactivos particulares, divulgados aquí, pueden variar. La terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente.

30 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a ciertas realizaciones, son posibles numerosas modificaciones, alteraciones y cambios en las realizaciones descritas.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1: Extracción de ácido nucleico con operación de mejora de extracción

35 Una variación del método divulgado se muestra en la Figura 1, donde el método comprende los pasos de obtener una muestra (100) biológica, preprocesar la muestra para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales (110) que contienen ácido nucleico, realizando una operación de mejora de extracción en la fracción (120), y extrayendo ácido nucleico de la fracción (130).

##### Ejemplo 2: Extracción de ácido nucleico con operación de exclusión de afinidad

45 Una variación del método divulgado se muestra en la figura 2, donde el método comprende los pasos de obtener una muestra (200) biológica, preprocesar la muestra para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico (210), realizar una operación (220) de exclusión por afinidad, y extracción de ácidos nucleicos de la fracción (230) de afinidad reducida.

##### Ejemplo 3: Extracción de ácido nucleico con operación de mejora de extracción y operación de exclusión de afinidad

50 Una variación del método divulgado se muestra en la figura 3, donde el método comprende los pasos de obtener una muestra (300) biológica, preprocesar la muestra para obtener una fracción que comprende una colección heterogénea de materiales (310) que contienen ácido nucleico, realizar una operación (320) de exclusión por afinidad, realizar una operación (330) de mejora de extracción y extracción de ácidos nucleicos.

##### Ejemplo 4: Extracción y análisis de ácido nucleico de una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico

60 Las colecciones heterogéneas de materiales que contienen ácido nucleico pueden aislarse de una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cáncer. Se recoge una muestra de orina del sujeto. En la etapa de preprocesamiento, una fracción que contiene materiales que contienen ácido nucleico se enriquece por centrifugación o filtración de la orina. La fracción resultante contiene una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico, que incluye una mezcla de microvesículas y células además de otros materiales que contienen ácido nucleico. Esta fracción se incubaba con agentes de mejora de la extracción, como los inhibidores de la RNasa, para prevenir o mitigar aquellos factores que pueden prevenir la extracción de ácido nucleico de alta calidad. Luego, la fracción se somete a una operación de enriquecimiento de afinidad para enriquecer las posibles células tumorales circulantes y microvesículas de particular interés. Se utiliza un antígeno de superficie transportado tanto por las células tumorales circulantes como por las microvesículas para seleccionar y purificar estos materiales que

contienen ácido nucleico particulares de la mezcla restante. Los ácidos nucleicos de las células tumorales purificadas circulantes y las microvesículas se extraen y analizan para detectar la presencia, ausencia o niveles de aberraciones genéticas asociadas con la presencia o ausencia de cáncer maligno; o etapa o grado del tumor a partir del cual las células y las microvesículas pueden haberse originado.

- 5 Referencias:
- Abravaya, K., J.J. Carrino, 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.
- 10 Agarwal, B., O.J. Ludwig, B.T. Collins, and C. Cortese. 2008. Immunostaining as an adjunct to cytology for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 6:1425-31.
- 15 Agis, H., M.T. Krauth, A. Bohm, I. Mosberger, L. Mullauer, I. Simonitsch-Klupp, A.F. Walls, H.P. Horny, and P. Valent. 2006a. Identification of basogranulin (BB1) as a novel immunohistochemical marker of basophils in normal bone marrow and patients with myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 125:273-81.
- 20 Agis, H., M.T. Krauth, I. Mosberger, L. Mullauer, I. Simonitsch-Klupp, L.B. Schwartz, D. Printz, A. Bohm, G. Fritsch, H.P. Horny, and P. Valent. 2006b. Enumeration and immunohistochemical characterisation of bone marrow basophils in myeloproliferative disorders using the basophil specific monoclonal antibody 2D7. *J Clin Pathol.* 59:396-402.
- Agre, P., B.L. Smith, and S. Hartel-Schenk. 1990. Biochemistry of the erythrocyte Rh polypeptides: a review. *Yale J Biol Med.* 63:461-7.
- 25 Al-Hajj, M., M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, and M.F. Clarke. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3983-8.
- 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.
- 30 Allard, W.J., J. Matera, M.C. Miller, M. Repollet, M.C. Connelly, C. Rao, A.G. Tibbe, J.W. Uhr, and L.W. Terstappen. 2004. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res.* 10:6897-904.
- 35 Alsayed, Y., H. Ngo, J. Runnels, X. Leleu, U.K. Singha, C.M. Pitsillides, J.A. Spencer, T. Kimlinger, J.M. Ghobrial, X. Jia, G. Lu, M Timm, A. Kumar, D. Cote, I. Veilleux, K.E. Hcdin, G.D. Roodman, T.E. Witzig, A.L. Kung, T. Hidcshima, K.C. Anderson, C.P. Lin, and I.M. Ghobrial. 2007. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood.* 109:2708-17.
- 40 Alvero, A.B., R. Chen, H.H. Fu, M. Montagna, P.E. Schwartz, T. Rutherford, D.A. Silasi, K.D. Steffensen, M. Waldstrom, I. Visintin, and G. Mor. 2009. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle.* 8:158-66.
- 45 Ammons, W.S., R.J. Bauer, A.H. Horwitz, Z.J. Chen, E. Bautista, H.H. Ruan, M. Abramova, K.R. Scott, and R.L. Dedrick. 2003. In vitro and in vivo pharmacology and pharmacokinetics of a human engineered monoclonal antibody to epithelial cell adhesion molecule. *Neoplasia.* 5:146-54.
- Andersson, L.C., C.G. Gahmberg, L. Teerenhovi, and P. Vuopio. 1979. Glycophorin A as a cell surface marker of early erythroid differentiation in acute leukemia. *MU Cancer.* 24:717-20.
- 50 Avent, N.D., W. Liu, K.M. Warner, W.J. Mawby, J.W. Jones, K. Ridgwell, and M.J. Tanner. 1996. Immunochemical analysis of the human erythrocyte Rh polypeptides. *J Biol Chem.* 271:14233-9.
- Baig, J.A., J.M. Alam, S.R. Mahmood, M. Baig, R. Shaheen, I. Sultana, and A. Waheed. 2009. Hepatocellular carcinoma (HCC) and diagnostic significance of A-fetoprotein (AFP). *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 21:72-5.
- 55 Ball, E.D. 1995. Introduction: workshop summary of the CD15 monoclonal antibody panel from the Fifth International Workshop on Leukocyte Antigens. *Eur J Morphol.* 33:95 -100.
- Balzar, M., M.J. Winter, C.J. de Boer, and S.V. Litvinov. 1999. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med.* 77:699-712.
- Bao, S., Q. Wu, Z. Li, S. Sathornsumetee, H. Wang, R.E. McLendon, A.B. Hjelmeland, and J.N. Rich. 2008. Targeting cancer stem cells through L1 CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res.* 68:6043-8.
- 65 Bao, S., Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, and J.N. Rich. 2006a. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.*

444:756-60.

- 5 Bao, S., Q. Wu, S. Sathornsumetee, Y. Hao, Z. Li, A.B. Hjelmeland, Q. Shi, R.E. McLendon, D.D. Bigner, and J.N. Rich. 2006b. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 66:7843-8.
- 10 Bembridge, G.P., K.R. Parsons, P. Sopp, N.D. MacHugh, and C.J. Howard. 1993. Comparison of monoclonal antibodies with potential specificity for restricted isoforms of the leukocyte common antigen (CD45R). *Vet Immunol Immunopathol.* 39:129-36.
- 15 Berrington, J.E., D. Barge, A.C. Fenton, A.J. Cant, and G.P. Spickett. 2005. Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clin Exp Immunol.* 140:289-92.
- 20 Boman, B.M., and E. Huang. 2008. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol.* 26:2828-38.
- Bonnet, D., and J.E. Dick. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3:730-7.
- 25 Borgono, C.A., L. Grass, A. Soosaipillai, G.M. Yousef, C.D. Petraki, D.H. Howarth, S. Fracchioli, D. Katsaros, and E.P. Diamandis. 2003. Human kallikrein 14: a new potential biomarker for ovarian and breast cancer. *Cancer Res.* 63:9032-41.
- Borregaard, N., M. Sehested, B.S. Nielsen, H. Sengelov, and L. Kjeldsen. 1995. Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood.* 85:812-7.
- 30 Bossi, A., F. Bonini, A.P. Turner, and S.A. Piletsky. 2007. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of the art. *Biosens Bioelectron.* 22:1131-7.
- Chan, K.S., I. Espinosa, M. Chao, D. Wong, L. Ailles, M. Diehn, H. Gill, J. Presti, Jr., H.Y. Chang, M. van de Rijn, L. Shortliffe, and I.L. Weissman. 2009. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:14016-21.
- 35 Chang, K., and I. Pastan. 1996. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci US A.* 93:136-40.
- 40 Chang, S.S., V.E. Reuter, W.D. Heston, N.H. Bander, L.S. Grauer, and P.B. Gaudin. 1999. Five different antiprostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res.* 59:3192-8.
- 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. 2010. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip.* 10:505-11.
- 45 Chen, Y.C., G. Pohl, T.L. Wang, P.J. Morin, B. Risberg, G.B. Kristensen, A. Yu, B. Davidson, and M. Shih le. 2005. Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer. *Cancer Res.* 65:331-7.
- 50 Cheruvanky, A., H. Zhou, T. Pisitkun, J.B. Kopp, MA. 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:F1657-61.
- Clement, L.T., A.B. Tilden, and N.E. Dunlap. 1985. Analysis of the monocyte Fc receptors and antibody-mediated cellular interactions required for the induction of T cell proliferation by anti-T3 antibodies. *J Immunol.* 135:165-71.
- 55 Coiffier, B. 2007. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene.* 26:3603-13. Collins, A.T., P.A. Berry, C. Hyde, M.J. Stower, and N.J. Maitland. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65:10946-51.
- 60 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.
- Cowell, J.K., and K.C. Lo. 2009. Application of oligonucleotides arrays for coincident comparative genomic hybridization, ploidy status and loss of heterozygosity studies in human cancers. *Methods Mol Biol.* 556:47-65.
- 65

- Cox, C.V., R.S. Evely, A. Oakhill, D.H. Pamphilon, N.J. Goulden, and A. Blair. 2004. Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood*. 104:2919-25.
- 5 Dallas, N.A., L. Xia, F. Fan, M.J. Gray, P. Gaur, G. van Buren, 2nd, S. Samuel, M.P. Kim, S.J. Lim, and L.M. Ellis. 2009. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulinlike growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res*. 69:1951-7.
- 10 De Clerck, L.S., C.M. De Gendt, C.H. Bridts, N. Van Osselaer, and W.J. Stevens. 1995. Expression of neutrophil activation markers and neutrophil adhesion to chondrocytes in rheumatoid arthritis patients: relationship with disease activity. *Res Immunol*. 146:81-7.
- 15 de la Fuente, M.A., V. Tovar, N. Villamor, N. Zapater, P. Pizcueta, E. Campo, J. Bosch, and P. Engel. 2001. Molecular characterization and expression of a novel human leukocyte cell-surface marker homologous to mouse Ly-9. *Blood*. 97:3513-20.
- 20 Dhanasekaran, S.M, T.R. Barrette, D. Ghosh, R. Shah, S. Varambally, K. Kurachi, K.J. Pienta, M.A. Rubin, and A.M. Chinnaiyan. 2001. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 412:822-6.
- 25 Ding, Y., W. Jiang, Y. Su, H. Zhou, and Z. Zhang. 2004. Expression and purification of recombinant cytoplasmic domain of human erythrocyte band 3 with hex ahistidine tag or chitin-binding tag in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 34:167-75.
- 30 Dirks, P.B. 2001. Glioma migration: clues from the biology of neural progenitor cells and embryonic CNS cell migration. *J Neurooncol*. 53:203-12.
- 35 Ducrest, S., F. Meier, C. Tschopp, R. Pavlovic, and C.A. Dahinden. 2005. Flowcytometric analysis of basophil counts in human blood and inaccuracy of hematology analyzers. *Allergy*. 60:1446-50.
- 40 Eramo, A., F. Lotti, G. Sette, E. Pilozzi, M. Biffoni, A. Di Virgilio, C. Conticello, L. Ruco, C. Peschle, and R. De Maria. 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 15:504-14.
- 45 Falleni, M., C. Pellegrini, A. Marchetti, B. Oprandi, F. Buttitta, F. Barassi, L. Santambrogio, G. Coggi, and S. Bosari. 2003. Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer. *J Pathol*. 200:620-6.
- 50 Fayle, D.R., P.S. Sim, D.K. Irvine, and W.F. Doe. 1985. Isolation of plasma membrane from human blood monocytes. Subcellular fractionation and marker distribution. *Eur J Biochem*. 147:409-19.
- 55 Ferrandina, G., G. Bonanno, L. Pierelli, A. Perillo, A. Procoli, A. Mariotti, M. Corallo, E. Martinelli, S. Rutella, A. Paglia, G. Zannoni, S. Mancuso, and G. Scambia. 2008. Expression of CD 133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 18:506-14.
- 60 Figarella-Brangcr, D.F., P.L. Durbcc, and G.N. Rougon. 1990. Differential spectrum of expression of neural cell adhesion molecule isoforms and L1 adhesion molecules on human neuroectodermal tumors. *Cancer Res*. 50:6364-70.
- 65 Fillmore, C.M., and C. Kuperwasser. 2008. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 10:R25.
- Fink, R., M. Al-Obaidi, S. Grewal, M. Winter, and J. Pepper. 2003. Monocyte activation markers during cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 18:83-6.
- Fischer, S.G., and L.S. Lerman. 1979a. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*. 16:191-200.
- 55 Fischer, S.G., and L.S. Lerman. 1979b. Two-dimensional electrophoretic separation of restriction enzyme fragments of DNA. *Methods Enzytnol*. 68:183-91.
- 60 Flaherty, S.F., D.T. Golenbock, F.H. Milham, and R.R. Ingalls. 1997. CD11/CD18 leukocyte integrins: new signaling receptors for bacterial endotoxin. *J Surg Res*. 73:85-9.
- 65 Flanagan, J., J. Middeldorp, and T. Sculley. 2003. Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *J Gen Virol*. 84:1871-9.
- Fong, M.Y., and S.S. Kakar. 2010. The role of cancer stem cells and the side population in epithelial ovarian cancer. *Histol Histopathol*. 25:113-20.

- Galli, R., E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, S. De Vitis, R. Fiocco, C. Foroni, F. Dimeco, and A. Vescovi. 2004. Isolation and characterization of tumorigenic, stemlike neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 64:7011-21.
- 5 Gallin, J.I., R.J. Jacobson, B.E. Seligmann, J.A. Metcalf, J.H. McKay, R.A. Sacher, and H.L. Malech. 1986. A neutrophil membrane marker reveals two groups of chronic myelogenous leukemia and its absence may be a marker of disease progression. *Blood.* 68:343-6.
- 10 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.* 26:317-25.
- 15 Ginestier, C., M.H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, M. Brown, J. Jacquemier, P. Viens, C.C. Kleer, S. Liu, A. Schott, D. Hayes, D. Birnbaum, M.S. Wicha, and G. Dontu. 2007. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 1:555-67.
- 20 Goel, S., R.J. Bauer, K. Desai, A. Bulgaru, T. Iqbal, B.K. Strachan, G. Kim, A. Kaubisch, G.F. Vanhove, G. Goldberg, and S. Mani. 2007. Pharmacokinetic and safety study of subcutaneously administered weekly ING-1, a human engineered monoclonal antibody targeting human EpCAM, in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol.* 18:1704-7.
- 25 Guatelli, J.C., K.M. Whitfield, D.Y. Kwok, K.J. Barringer, 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 Guerini, F.R., C. Agliardi, M. Zanzottera, S. Delbue, E. Pagani, C. Tinelli, R. Boldorini, P.G. Car, C. Veggiani, and P. Ferrante. 2006. Human leukocyte antigen distribution analysis in North Italian brain Glioma patients: an association with HLA-DRB1\*14. *J Neurooncol.* 77:213-7.
- 35 Gurlek, A., N. Karavitaki, O. Ansorge, and J.A. Wass. 2007. What are the markers of aggressiveness in prolactinomas? Changes in cell biology, extracellular matrix components, angiogenesis and genetics. *Eur J Endocrinol.* 156:143-53.
- Hahn, P.J. 1993. Molecular biology of double-minute chromosomes. *Bioessays.* 15:477-84.
- Hannigan, M., L. Zhan, Y. Ai, and C.K. Huang. 2001. Leukocyte-specific gene 1 protein (LSP1) is involved in chemokine KC-activated cytoskeletal reorganization in murine neutrophils in vitro. *J Leukoc Biol.* 69:497-504.
- 40 Heimberger, A.B., D. Suki, D. Yang, W. Shi, and K. Aldape. 2005. The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med.* 3:38.
- 45 Hemmati, H.D., I. Nakano, J.A. Lazareff, M. Masterman-Smith, D.H. Geschwind, M. Bronner-Fraser, and H.T. Kornblum. 2003. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:15178-83.
- Hermann, P.C., S.L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J.W. Ellwart, M. Guba, C.J. Bruns, and C. Heeschen. 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 1:313-23.
- 50 Hessels, D., F.P. Smit, G.W. Verhaegh, J.A. Witjes, E.B. Cornel, and J.A. Schalken. 2007. Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 13:5103-8.
- 55 Hill, C., S.B. Hunter, and D.J. Brat. 2003. Genetic markers in glioblastoma: prognostic significance and future therapeutic implications. *Adv Anat Pathol.* 10:212-7.
- 60 Hoffman, B.R., D. Katsaros, A. Scorilas, P. Diamandis, S. Fracchioli, I.A. Rigault de la Longrais, T. Colgan, M. Puopolo, G. Giardina, M. Massobrio, and E.P. Diamandis. 2002. Immunofluorometric quantitation and histochemical localisation of kallikrein 6 protein in ovarian cancer tissue: a new independent unfavourable prognostic biomarker. *Br J Cancer.* 87:763-71.
- Hosen, N., C.Y. Park, N. Tatsumi, Y. Oji, H. Sugiyama, M. Gramatzki, A.M. Krensky, and I.L. Weissman. 2007. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:11008-13.
- 65 Hough, C.D., K.R. Cho, A.B. Zonderman, D.R. Schwartz, and P.J. Morin. 2001. Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. *Cancer Res.* 61:3869-76.

- Hurt, E.M., B.T. Kawasaki, G.J. Klarmann, S.B. Thomas, and W.L. Farrar. 2008. CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer*. 98:756-65.
- 5 Ignatova, T.N., V.G. Kukekov, E.D. Laywell, O.N. Suslov, F.D. Vrionis, and D.A. Steindler. 2002. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 39:193-206.
- Ishikawa, F., S. Yoshida, Y. Saito, A. Hijikata, H. Kitamura, S. Tanaka, R. Nakamura, T. Tanaka, H. Tomiyama, N. Saito, M. Fukata, T. Miyamoto, B. Lyons, K. Ohshima, N. Uchida, S. Taniguchi, O. Ohara, K. Akashi, M. Harada, and L.D. Shultz. 2007. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bonemarrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. 25:1315-21.
- 10
- Jackman, D.M., V.A. Miller, L.A. Cioffredi, B.Y. Yeap, P.A. Janne, G.J. Riely, M.G. Ruiz, G. Giaccone, L.V. Sequist, and B.E. Johnson. 2009. Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials. *Clin Cancer Res*. 15:5267-73.
- 15
- Jiang, F., Q. Qiu, A. Khanna, N.W. Todd, J. Deepak, L. Xing, H. Wang, Z. Liu, Y. Su, S.A. Stass, and R.L. Katz. 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 7:330-8.
- 20
- Jiang, J., B. Kong, B. Shen, L. Li, X. Yang, H. Hou, Q. Shi, D. Ma, and X. Ma. 2005. High dose chemotherapy and transplantation of hematopoietic progenitors from murine D3 embryonic stem cells. *J Chemother*. 17:302-8.
- Jin, L., J.J. Hemperly, and R.V. Lloyd. 1991. Expression of neural cell adhesion molecule in normal and neoplastic human neuroendocrine tissues. *Am JPathol*. 138:961-9.
- 25
- Jin, L., K.J. Hope, Q. Zhai, F. Smadja-Joffe, and J.E. Dick. 2006. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 12:1167-74.
- 30
- Johnson, S., D. Evans, S. Laurensen, D. Paul, A.G. Davies, P.K. Ferrigno, and C. Walti. 2008. Surface-immobilized peptide aptamers as probe molecules for protein detection. *Anal Chem*. 80:978-83.
- Jonas, L., C. Schutt, P. Neels, H. Walzel, and E. Siegl. 1990. Electron microscopic study of receptor mediated endocytosis of a monoclonal antibody (RoMo-1) against the surface marker CD 14 of human monocytes. *Acta Histochem Suppl*. 39:339-44.
- 35
- Kalli, K.R., A.L. Oberg, G.L. Keeney, T.J. Christianson, P.S. Low, K.L. Knutson, and L.C. Hartmann. 2008. Folate receptor alpha as a tumor target in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 108:619-26.
- 40
- 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.
- 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.
- 45
- Kansas, G.S., O. Spertini, L.M. Stoolman, and T.F. Tedder. 1991. Molecular mapping of functional domains of the leukocyte receptor for endothelium, LAM-1. *J Cell Biol*. 114:351-8.
- Kasinrerk, W., E. Fiebiger, I. Stefanova, T. Baumruker, W. Knapp, and H. Stockinger. 1992. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the 1g superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol*. 149:847-54.
- 50
- Kawanishi, H., Y. Matsui, M. Ito, J. Watanabe, T. Takahashi, K. Nishizawa, H. Nishiyama, T. Kamoto, Y. Mikami, Y. Tanaka, G. Jung, H. Akiyama, H. Nobumasa, P. Guilford, A. Reeve, Y. Okuno, G. Tsujimoto, E. Nakamura, and O. Ogawa. 2008. Secreted CXCL1 is a potential mediator and marker of the tumor invasion of bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 14:2579-87.
- 55
- Keller, S., C. Rupp, A. Stoeck, S. Runz, M. Fogel, S. Lugert, H.D. Hager, M.S. Abdel-Bakky, P. Gutwein, and P. Altevogt. 2007. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int*. 72:1095-102.
- 60
- Kepley, C.L., S.S. Craig, and L.B. Schwartz. 1995. Identification and partial characterization of a unique marker for human basophils. *J Immunol*. 154:6548-55.
- 65
- Kim, M., H. Turnquist, J. Jackson, M. Sgagias, Y. Yan, M. Gong, M. Dean, J.G. Sharp, and K. Cowan. 2002. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin. Cancer Res*. 8:22-8.

- Kobayashi, D., S. Aizawa, T. Maeda, I. Tsuboi, H. Yabuuchi, J. Nezu, A. Tsuji, and I. Tamai. 2004. Expression of organic cation transporter OCTN 1 in hematopoietic cells during erythroid differentiation. *Exp Hematol.* 32:1156-62.
- 5 Kojima, T., and T. Kitamura. 1999. A signal sequence trap based on a constitutively active cytokine receptor. *Nat Biotechnol.* 17:487-90.
- Komminoth, P., J. Roth, P.M. Lackie, D. Bitter-Suermann, and P.U. Heitz. 1991. Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule distinguishes small cell lung carcinoma from carcinoids. *Am JPathol.* 139:297-304.
- 10 Korkaya, H., A. Paulson, F. Iovino, and M.S. Wicha. 2008. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene.* 27:6120-30.
- 15 Kwoh, D.Y., G.R. Davis, K.M. Whitfield, H.L. Chappelle, L.J. DiMichele, and T.R. Gingeras. 1989. Transcriptionbased amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:1173-7.
- Lai, R., L. Visser, and S. Poppema. 1991. Tissue distribution of restricted leukocyte common antigens. A comprehensive study with protein- and carbohydrate-specific CD45R antibodies. *Lab Invest.* 64:844-54.
- 20 Landegren, U., R. Kaiser, J. Sanders, and L. Hood. 1988. A ligase-mediated gene detection technique. *Science.* 241:1077-80.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M.A. Caligiuri, and J.E. Dick. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 367:645-8.
- 25 Laxman, B., D.S. Morris, J. Yu, J. Siddiqui, J. Cao, R. Mehra, R.J. Lonigro, A. Tsodikov, J.T. Wei, S.A. Tomlins, and A.M. Chinnaiyan. 2008. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res.* 68:645-9.
- 30 Lee, J., S. Kotliarova, Y. Kotliarov, A. Li, Q. Su, N.M. Donin, S. Pastorino, B.W. Purow, N. Christopher, W. Zhang, J.K. Park, and H.A. Fine. 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell.* 9:391-403.
- 35 Lewis, C.D., S.P. Clark, G. Felsenfeld, and H. Gould. 1988. An erythrocyte-specific protein that binds to the poly(dG) region of the chicken beta-globin gene promoter. *Genes Dev.* 2:863-73.
- Li, B., Y.W. Zheng, Y. Sano, and H. Taniguchi. 2011. Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation. *PLoS One.* 6:e17092.
- 40 Li, C., D.G. Hcidt, P. Dalcra, C.F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M.F. Clarke, and D.M. Simeone. 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67:1030-7.
- 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.
- Lim, S.C., and S.H. Oh. 2005. The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol Res Pract.* 201:479-86.
- 50 Liu, G., X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I.R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K.L. Black, and J.S. Yu. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 5:67.
- Lu, K.H., A.P. Patterson, L. Wang, R.T. Marquez, E.N. Atkinson, K.A. Baggerly, L.R. Ramoth, D.G. Rosen, J. Liu, I. Hellstrom, D. Smith, L. Hartmann, D. Fishman, A. Berchuck, R. Schmandt, R. Whitaker, D.M. Gershenson, G.B. Mills, and R.C. Bast, Jr. 2004. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin Cancer Res.* 10:3291-300.
- 55 Lunter, P.C., J.W. van Kilsdonk, H. van Beek, I.M. Cornelissen, M. Bergers, P.H. Willems, G.N. van Muijcn, and G.W. Swart. 2005. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a novel actor in invasive growth, controls matrix metalloproteinase activity. *Cancer Res.* 65:8801-8.
- 60 Luo, L.Y., D. Katsaros, A. Scorilas, S. Fracchioli, R. Piccinno, I.A. Rigault de la Longrais, D.J. Howarth, and E.P. Diamandis. 2001. Prognostic value of human kallikrein 10 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 7:2372-9.
- 65

- Magklara, A., A. Scorilas, W.J. Catalona, and E.P. Diamandis. 1999. The combination of human glandular kallikrein and free prostate-specific antigen (PSA) enhances discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in patients with moderately increased total PSA. *Clin Chem.* 45:1960-6.
- 5 Magro, G., D. Perissinotto, M. Schiappacassi, S. Goletz, A. Otto, E.C. Muller, M. Bisceglia, G. Brown, T. Ellis, S. Grasso, A. Colombatti, and R. Penis. 2003. Proteomic and postproteomic characterization of keratan sulfate-glycanated isoforms of thyroglobulin and transferrin uniquely elaborated by papillary thyroid carcinomas. *Am J Pathol.* 163:183-96.
- 10 Marafioti, T., C. Mancini, S. Ascani, E. Sabattini, P.L. Zinzani, M. Pozzobon, K. Pulford, B. Falini, E.S. Jaffe, H.K. Muller-Hermelink, D.Y. Mason, and S.A. Pileri. 2004. Leukocyte-specific phosphoprotein-1 and PU.1: two useful markers for distinguishing T-cell-rich Lymphoma de células B from lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *Haematologica.* 89:957-64.
- 15 Masuoka, K., T. Toyosaki, Y. Tohya, J. Norimine, C. Kai, and T. Mikami. 1992. Monoclonal antibodies to feline lymphocyte membranes recognize the leukocyte-common antigen (CD45R). *J Vet Med Sci.* 54:865-70.
- Matsui, T., K. Ohsumi, N. Ozawa, K. Shimada, S. Sumitomo, K. Shimane, M. Kawakami, H. Nakayama, S. Sugii, Y. Ozawa, and S. Tohma. 2006. CD64 on neutrophils is a sensitive and specific marker for detection of infection in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 33:2416-24.
- 20 Matsui, W., C.A. Huff, Q. Wang, M.T. Malehorn, J. Barber, Y. Tanhehco, B.D. Smith, C.I. Civin, and R.J. Jones. 2004. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood.* 103:2332-6.
- 25 Matthews, J.B., G.I. Mason, and R.M. Browne. 1988. Epithelial cell markers and proliferating cells in odontogenic jaw cysts. *J Pathol.* 156:283-90.
- Mattick, J.S. 2004. RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet.* 5:316-23.
- 30 McGuckin, M.A., M.D. Walsh, B.G. Hohn, B.G. Ward, and R.G. Wright. 1995. Prognostic significance of MUC1 epithelial mucin expression in breast cancer. *Hum Pathol.* 26:432-9.
- Miele, E.A., D.R. Mills, and F.R. Kramer. 1983. Autocatalytic replication of a recombinant RNA. *J Mol Biol.* 171:281-95.
- 35 Min-Oo, G., A. Fortin, M.F. Tam, P. Gros, and M.M. Stevenson. 2004. Phenotypic expression of pyruvate kinase deficiency and protection against malaria in a mouse model. *Genes Immun.* 5:168-75.
- 40 Monzani, E., F. Facchetti, E. Galmozzi, E. Corsini, A. Benetti, C. Cavazzin, A. Gritti, A. Piccinini, D. Porro, M. Santinami, G. Invernici, E. Parati, G. Alessandri, and C.A. La Porta. 2007. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur J Cancer.* 43:935-46.
- 45 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. Armstrong, 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 USA.* 91:360-4.
- 50 Naundorf, S., S. Preithner, P. Mayer, S. Lippold, A. Wolf, F. Hanakam, I. Fichtner, P. Kufer, T. Raum, G. Riethmuller, P.A. Baeuerle, and T. Dreier. 2002. In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancreatic carcinoma treatment. *Int J Cancer.* 100:101-10.
- 55 Neve, R.M., K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F.L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J.P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P.T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N.J. Wang, W.L. Kuo, J.L. Stilwell, D. Pinkel, D.G. Albertson, F.M. Waldman, F. McCormick, R.B. Dickson, M.D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar, and J.W. Gray. 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 10:515-27.
- 60 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.
- 65 Nishitani, Y., M. Iwano, Y. Yamaguchi, K. Harada, K. Nakatani, Y. Akai, T. Nishino, H. Shiiki, M. Kanauchi, Y. Saito, and E.G. Neilson. 2005. Fibroblast-specific protein 1 is a specific prognostic marker for renal survival in patients with IgAN. *Kidney Int.* 68:1078-85.

- Niv, Y. 2008. MUC1 and colorectal cancer pathophysiology considerations. *World J Gastroenterol.* 14:2139-41.
- O'Brien, C.A., A. Pollett, S. Gallinger, and J.E. Dick. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 445:106-10.
- 5 Oberneder, R., D. Weckermann, B. Ebner, C. Quadt, P. Kirchinger, T. Raum, M. Locher, N. Prang, P.A. Baeuerle, and E. Leo. 2006. A phase I study with adecatumumab, a human antibody directed against epithelial cell adhesion molecule, in hormone refractory prostate cancer patients. *Eur J Cancer.* 42:2530-8.
- Oldenborg, P.A., A. Zheleznyak, Y.F. Fang, C.F. Lagenaur, H.D. Gresham, and F.P. Lindberg. 2000. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science.* 288:2051-4.
- 10 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 USA.* 86:2766-70.
- 15 Orozco, A.F., and D.E. Lewis. 2010. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry A.* 77:502-14.
- Ottaiano, A., A. di Palma, M. Napolitano, C. Pisano, S. Pignata, F. Tatangelo, G. Botti, A.M. Acquaviva, G. Castello, P.A. Ascirto, R.V. Iaffaioli, and S. Scala. 2005 Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 54:781-91.
- 20 Partin, A.W., W.J. Catalona, J.A. Finlay, C. Darte, D.J. Tindall, C.V. Young, G.G. Klee, D.W. Chan, H.G. Rittenhouse, R.L. Wolfert, and D.L. Woodrum. 1999. Use of human glandular kallikrein 2 for the detection of prostate cancer: preliminary analysis. *Urology.* 54:839-45.
- Pelloski, C.E., K.V. Ballman, A.F. Furth, L. Zhang, E. Lin, E.P. Sulman, K. Bhat, J.M. McDonald, W.K. Yung, H. Colman, S.Y. Woo, A.B. Heimberger, D. Suki, M.D. Prados, S.M. Chang, F.G. Barker, 2nd, J.C. Buckner, C.D. James, and K. Aldape. 2007. Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *J Clin Oncol.* 25:2288-94.
- 25 Prince, M.E., R. Sivanandan, A. Kaczorowski, G.T. Wolf, M.J. Kaplan, P. Dalerba, I.L. Weissman, M.F. Clarke, and L.E. Ailles. 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:973-8.
- 30 Prinetti, A., M. Aureli, G. Illuzzi, S. Prioni, V. Nocco, F. Scandroglio, N. Gagliano, G. Tredici, V. Rodriguez-Menendez, V. Chigorno, and S. Sonnino. 2010. GM3 synthase overexpression results in reduced cell motility and in cavcolin-1 upregulation in human ovarian carcinoma cells. *Glycobiology.* 20:62-77.
- 35 Punnoose, E.A., S.K. Atwal, J.M. Spoerke, H. Savage, A. Pandita, R.F. Yeh, A. Pirzkall, B.M. Fine, L.C. Amler, D.S. Chen, and M.R. Lackner. 2010. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS One.* 5:c12517.
- 40 Rangel, L.B., R. Agarwal, T. D'Souza, E.S. Pizer, P.L. Alo, W.D. Lancaster, L. Gregoire, D.R. Schwartz, K.R. Cho, and P.J. Morin. 2003. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res.* 9:2567-75.
- 45 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. *J Exp Med.* 183:1161-72.
- Ricci-Vitiani, L., D.C. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle, and R. De Maria. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 445:111-5.
- 50 Rittenhouse, H.G., J.A. Finlay, S.D. Mikolajczyk, and A.W. Partin. 1998. Human Kallikrein 2 (hK2) and prostatespecific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 35:275-368.
- Rosen, D.G., L. Wang, J.N. Atkinson, Y. Yu, K.H. Lu, E.P. Diamandis, I. Hellstrom, S.C. Mok, J. Liu, and R.C. Bast, Jr. 2005. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 99:267-77.
- 55 Ross, J.S., C.E. Sheehan, H.A. Fisher, R.P. Kaufman, Jr., P. Kaur, K. Gray, I. Webb, G.S. Gray, R. Mosher, and B.V. Kallakury. 2003. Correlation of primary tumor prostatespecific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. *ClinCancer Res.* 9:6357-62.
- 60 Rudolph, P., B. Schubert, H.H. Wacker, R. Parwaresch, and C. Schubert. 1997. Immunophenotyping of dermal spindle cell tumors: diagnostic value of monocyte marker Ki-M1p and histogenetic considerations. *Am J Surg Pathol.* 21:791-800.
- 65

- Ruppert, J., D. Friedrichs, H. Xu, and J.H. Peters. 1991. IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency. *Immunobiology*. 182:449-64.
- 5 Sagiv, E., L. Memeo, A. Karin, D. Kazanov, J. Jacob-Hirsch, M. Mansukhani, G. Rechavi, H. Hibshoosh, and N. Arber. 2006. CD24 is a new oncogene, early at the multistep process of colorectal cancer carcinogenesis. *Gastroenterology*. 131:630-9.
- Sainte-Laudy, J., and P. Belon. 2006. Improvement of flow cytometric analysis of basophil activation inhibition by high histamine dilutions. A novel basophil specific marker: CD 203c. *Homeopathy*. 95:3-8.
- 10 Salmaggi, A., A. Boiardi, M. Gelati, A. Russo, C. Calatuzzolo, E. Ciusani, F.L. Sciacca, A. Ottolina, E.A. Parati, C. La Porta, G. Alessandri, C. Man-as, D. Croci, and M. De Rossi. 2006. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia*. 54:850-60.
- 15 Santin, A.D., S. Bellone, J.J. Roman, J.K. McKenney, and S. Pecorelli. 2008. Trastuzumab treatment in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma overexpressing HER2/neu. *Int J Gynaecol Obstet*. 102:128-31.
- 20 Schatton, T., G.F. Murphy, N.Y. Frank, K. Yamaura, A.M. Waaga-Gasser, M. Gasser, Q. Zhan, S. Jordan, L.M. Duncan, C. Weishaupt, R.C. Fuhlbrigge, T.S. Kupper, M.H. Sayegh, and M.H. Frank. 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*. 451:345-9.
- Shan, B., T. Sugiura, and U. Yamashita. 1998. Five monoclonal antibodies against glycoprotein A of human erythrocyte recognize glycoprotein of bovine erythrocyte. *Hybridoma*. 17:55-62.
- 25 Shangguan, D., Z. Cao, L. Meng, P. Mallikaratchy, K. Sefah, H. Wang, Y. Li, and W. Tan. 2008. Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells. *J Proteome Res*. 7:2133-9.
- 30 Sheu, J.J., and M. Shih Ie. 2007. Clinical and biological significance of HLA-G expression in ovarian cancer. *Semin Cancer Biol*. 17:436-43.
- Shih Ie, M., and B. Davidson. 2009. Pathogenesis of ovarian cancer: clues from selected overexpressed genes. *Future Oncol*. 5:1641-57.
- 35 Shmelkov, S.V., J.M. Butler, A.T. Hooper, A. Hormigo, J. Kushner, T. Milde, R. St Clair, M. Baljevic, I. White, D.K. Jin, A. Chadburn, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, N.W. Gale, G. Thurston, G.D. Yancopoulos, M. D'Angelica, N. Kemeny, D. Lyden, and S. Rafii. 2008. CD 133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*. 118:2111-20.
- 40 Siegel, N., A. Valli, C. Fuchs, M. Rosner, and M. Hengstschlager. 2009. Induction of mesenchymal/epithelial marker expression in human amniotic fluid stem cells. *Reprod Biomed Online*. 19:838-46.
- Singh, S.K., I.D. Clarke, M. Terasaki, V.E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, and P.B. Dirks. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 63:5821-8.
- 45 Singh, S.K., C. Hawkins, I D Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano, and P.B. Dirks. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 432:396-401.
- Skog, J., T. Wurdinger, S. van Rijn, D.H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W.T. Curry, 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.
- 50 Smith, L.M., A. Nesterova, M.C. Ryan, S. Duniho, M. Jonas, M. Anderson, R.F. Zabinski, M.K. Sutherland, H.P. Gerber, K.L. Van Orden, P.A. Moore, S.M. Ruben, and P.J. Carter. 2008. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br J Cancer*. 99:100-9.
- 55 Spiekermann, K., J. Roesler, J. Elsner, M.L. Lohmann-Matthes, K. Welte, H. Malech, J.I. Gallin, and A. Emmendorff. 1996. Identification of the antigen recognized by the monoclonal antibody 31D8. *Exp Hematol*. 24:453-8.
- 60 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*. 3:31-3.
- 65 Stott, S.L., C.H. Hsu, D.I. Tsukrov, M. Yu, D.T. Miyamoto, B.A. Waltman, S.M. Rothenberg, A.M. Shah, M.E. Smas, G.K. Korir, F.P. Floyd, Jr., A.J. Gilman, J.B. Lord, D. Winokur, S. Springer, D. Irimia, S. Nagrath, L.V. Sequist, R.J.

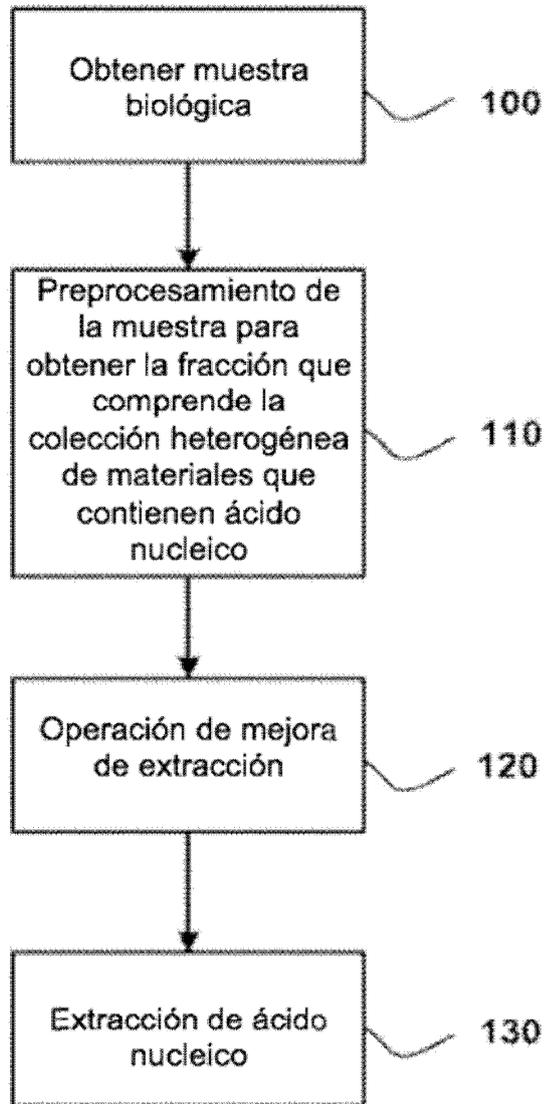
- Lee, K.J. Isselbacher, S. Maheswaran, D.A. Haber, and M. Toner. 2010. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Prot Natl Acad Sci U S A.* 107:18392-7.
- 5 Strojnik, T., G.V. Rosland, P.O. Sakariassen, R. Kavalari, and T. Lah. 2007. Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surg Neurol.* 68:133-43; discussion 143-4.
- Strutz, F., H. Okada, C.W. Lo, T. Danoff, R.L. Carone, J.E. Tomaszewski, and E.G. Neilson. 1995. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP 1. *J Cell Biol.* 130:393-405.
- 10 Sun, Y.X., A. Schneider, Y. Jung, J. Wang, J. Dai, K. Cook, N.I. Osman, A.J. Koh-Paige, H. Shim, K.J. Picnta, E.T. Keller, L.K. McCauley, and R.S. Taichman. 2005. Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J Bone Miner Res.* 20:318-29.
- 15 Tao, D., Y. Shen, X. Feng, and H. Chen. 2000. The application of CD71 and Hoechst33258 to staining method for sorting fetal nucleated red blood cells in the peripheral blood of pregnant women. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 17:352-4.
- 20 Taylor-Papadimitriou, J., J. Burchell, D.W. Miles, and M. Dalziel. 1999. MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1455:301-13.
- Taylor, D.D., and C. Gercel-Taylor. 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 110:13-21.
- 25 Taylor, M.D., H. Poppleton, C. Fuller, X. Su, Y. Liu, P. Jensen, S. Magdaleno, J. Dalton, C. Calabrese, J. Board, T. Macdonald, J. Rutka, A. Guha, A. Gajjar, T. Curran, and R.J. Gilbertson. 2005. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell.* 8:323-35.
- 30 Telen, M.J., and J.A. Chasis. 1990. Relationship of the human erythrocyte Wrb antigen to an interaction between glycoprotein A and band 3. *Blood.* 76:842-8.
- Thibert, V., S. Bellucci, M. Cristofari, E. Gluckman, and C. Legrand. 1995. Increased platelet CD36 constitutes a common marker in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol.* 91:618-24.
- 35 Thomas, S.N., Z. Tong, K.J. Stebe, and K. Konstantopoulos. 2009. Identification, characterization and utilization of tumor cell selectin ligands in the design of colon cancer diagnostics. *Biorheology.* 46:207-25.
- Ting, D.T., D. Lipson, S. Paul, B.W. Brannigan, S. Akhavanfard, E.J. Coffman, G. Contino, V. Deshpande, A.J. lafrate, S. Letovsky, M.N. Rivera, N. Bardeesy, S. Maheswaran, and D.A. Haber. 2011. Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science.* 331:593-6.
- 40 Todaro, M., M.P. Alea, A.B. Di Stefano, P. Cammareri, L. Vermeulen, F. Iovino, C. Tripodo, A. Russo, G. Gulotta, J.P. Medema, and G. Stassi. 2007. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell.* 1:389-402.
- 45 Tu, L., J.C. Poe, T. Kadono, G.M. Venturi, D.C. Bullard, T.F. Tedder, and D.A. Steeber. 2002. A functional role for circulating mouse L-selectin in regulating leukocyte/endothelial cell interactions in vivo. *J Immunol.* 169:2034-43.
- 50 Uchida, N., D.W. Buck, D. He, M.J. Rcitsma, M. Masck, T.V. Phan, A.S. Tsukamoto, F.H. Gage, and I.L. Weissman. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:14720-5.
- Valent, P., O. Majdic, D. Maurer, M. Bodger, M. Muhm, and P. Bettelheim. 1990. Further characterization of Surface membrane structures expressed on human basophils and mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 91:198-203.
- 55 Velculescu, V.E., L. Zhang, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science.* 270:484-7.
- Venturi, G.M., L. Tu, T. Kadono, A.1. Khan, Y. Fujimoto, P. Oshel, C.B. Bock, A.S. Miller, R.M. Albrecht, P. Kubes, D.A. Steeber, and T.F. Tedder. 2003. Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity.* 19:713-24.
- 60 Visintin, I., Z. Feng, G. Longton, D.C. Ward, A.B. Alvero, Y. Lai, J. Tenthorey, A. Leiser, R. Flores-Saaib, H. Yu, M. Azori, T. Rutherford, P.E. Schwartz, and G. Mor. 2008. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 14:1065-72.
- 65

- Walker, F., L. Abramowitz, D. Benabderrahmane, X. Duval, V. Descatoire, D. Henin, T. Lehy, and T. Aparicio. 2009. Growth factor receptor expression in anal squamous lesions: modifications associated with oncogenic human papillomavirus and human immunodeficiency virus. *Hum Pathol.* 40:1517-27.
- 5 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.
- Yang, Y.M., and J.W. Chang. 2008. Bladder cancer initiating cells (BCICs) are among EMACD44v6+ subset: novel methods for isolating undetermined cancer stem (initiating) cells. *Cancer Invest.* 26:725-33.
- 10 Yang, Z.F., D.W. Ho, M.N. Ng, C.K. Lau, W.C. Yu, P. Ngai, P.W. Chu, C.T. Lam, R.T. Poon, and S.T. Fan. 2008. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell.* 13:153-66.
- Yin, B.W., A. Dnistrian, and K.O. Lloyd. 2002. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int J Cancer.* 98:737-40.
- 15 Yin, B.W., and K.O. Lloyd. 2001. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem.* 276:27371-5.
- 20 Yokohama, A., N. Tsukamoto, N. Hatsumi, M. Suto, T. Akiba, H. Uchiumi, T. Maehara, T. Matsushima, M. Karasawa, H. Murakami, S. Shinonome, H. Saito, and Y. Nojima. 2002. Acute basophilic leukemia lacking basophil-specific antigens: the importance of cytokine receptor expression in differential diagnosis. *Int J Hematol.* 75:309-13.
- Young, D. 2007. Patent WO2007098571. Arius Research Inc.
- 25 Yousef, G.M., M.E. Polymeris, L. Grass, A. Soosaipillai, P.C. Chan, A. Scorilas, C. Borgono, N. Harbeck, B. Schmalfeldt, J. Dorn, M. Schmitt, and E.P. Diamandis. 2003a. Human kallikrein 5: a potential novel serum biomarker for breast and ovarian cancer. *Cancer Res.* 63:3958-65.
- 30 Yousef, G.M., M.E. Polymeris, G.M. Yacoub, A. Scorilas, A. Soosaipillai, C. Popalis, S. Fracchioli, D. Katsaros, and E.P. Diamandis. 2003b. Parallel overexpression of seven kallikrein genes in ovarian cancer. *Cancer Res.* 63:2223-7.
- Yuan, X., J. Curtin, Y. Xiong, G. Liu, S. Waschsmann-Hogiu, D.L. Farkas, K.L. Black, and J.S. Yu. 2004. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 23:9392-400.
- 35 Zeppemick, F., R. Ahmadi, B. Campos, C. Dictus, B.M. Helmke, N. Becker, P. Lichter, A. Unterberg, B. Radlwimmer, and C.C. Herold-Mende. 2008. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res.* 14:123-9.
- 40 Zhong, W.D., Y.X. Liang, S.X. Lin, L. Li, H.C. He, X.C. Bi, Z.D. Han, Q.S. Dai, Y.K. Ye, Q.B. Chen, Y.S. Wang, G.H. Zeng, G. Zhu, Z. Zhang, Z.N. Chen, and C.L. Wu. 2011. Expression of CD 147 is associated with prostate cancer progression. *Int J Cancer.*
- 45 Zwicker, J.I., H.A. Liebman, D. Neuberg, R. Lacroix, K.A. Bauer, B.C. Furie, and B. Furie. 2009. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res.* 15:6830-40.

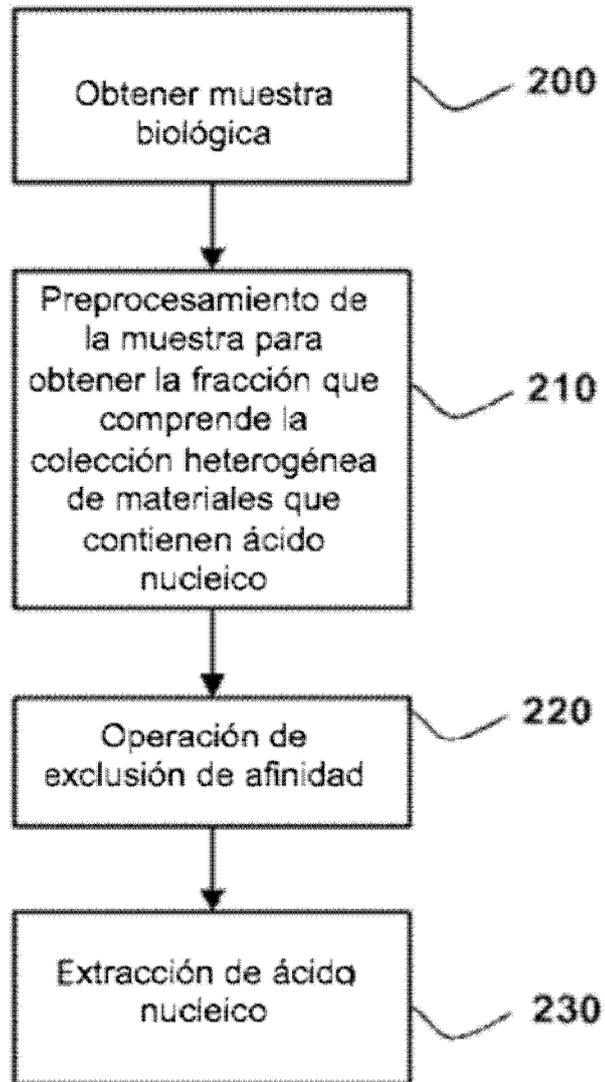
## REIVINDICACIONES

1. Un método para extraer ácido nucleico de una muestra biológica, que comprende los pasos de:

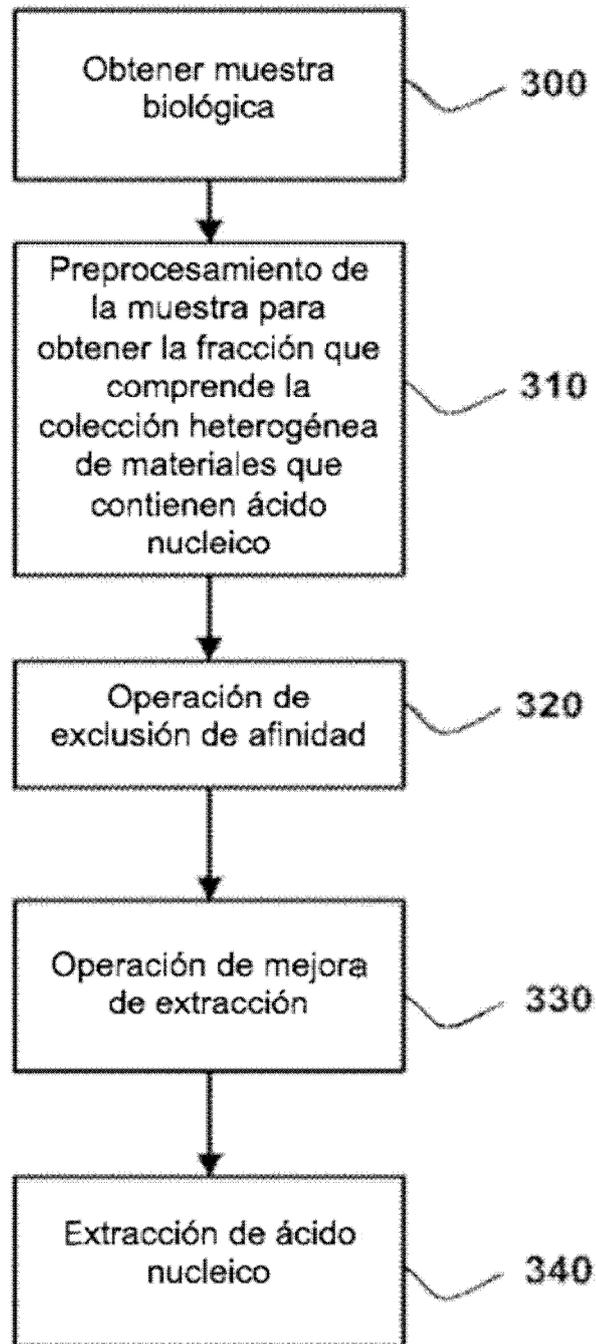
- 5 (a) proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto, en el que la muestra comprende una colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico que comprenden células o microvesículas, o ambos;
- 10 (b) realizar un paso de preprocesamiento de muestra en la muestra biológica para obtener una fracción que comprende la colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico, en el que el paso de preprocesamiento excluye proteínas, lípidos, restos de células muertas y otros contaminantes potenciales e inhibidores PCR de los materiales que contienen ácido nucleico heterogéneo;
- 15 (c) realizar una operación de exclusión por afinidad poniendo en contacto la colección heterogénea de materiales que contienen ácido nucleico con un agente de afinidad que se une a un marcador de superficie y eliminando los materiales de ácido nucleico que se unen al agente de afinidad para agotar los materiales que contienen ácido nucleico procedentes de un célula de tipo donante específico o un tipo de célula tumoral específica, seguido de una operación de mejora de extracción, en el que el marcador de superficie es un marcador tumoral seleccionado de los marcadores listados en la Tabla 2, y en el que la operación de mejora de extracción comprende el uso de un agente seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de RNasa, una proteasa, un agente reductor, un sustrato señuelo, un receptor soluble, un ARN de interferencia corta, una molécula de unión a ARN, una sustancia desnaturizante de RNasa y cualquier combinación de los mismos, en combinación con un paso de procesamiento seleccionada del grupo que consiste en lavar los materiales que contienen ácido nucleico; separación por tamaño de RNasas de la muestra biológica; desnaturización de proteínas en la muestra biológica; y combinaciones de los mismos; y
- 20 (d) extraer ácido nucleico de los materiales resultantes.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que el agente de afinidad comprende un anticuerpo, un aptámero, un análogo de aptámero o un polímero impreso molecularmente específico para el marcador.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es orina, suero o plasma.
- 35 4. El método de la reivindicación 1, en el que el sustrato señuelo comprende ARN sintético; o en el que la molécula de unión a ARN comprende un anticuerpo anti-ARN, proteína chaperona o una proteína inhibidora de RNasa; o en el que la sustancia desnaturizante de RNasa comprende una solución o detergente de alta osmolaridad.
- 40 5. El método de la reivindicación 1, en el que la operación de mejora de extracción comprende la adición de un inhibidor de RNasa, opcionalmente en el que:
- 45 (a) el inhibidor de RNasa tiene una concentración mayor que concentración [1X]; alternativamente, mayor o igual a concentración [5X]; alternativamente, mayor o igual a concentración [10X]; alternativamente, mayor o igual a concentración [25X]; y alternativamente, mayor o igual a concentración [50X]; o
- (b) el inhibidor de RNasa es una proteasa.
- 50 6. El método de la reivindicación 1, en el que el marcador de superficie es glicoforina A (CD235).
7. El método de la reivindicación 1, en el que la operación de exclusión de afinidad es seguida por una operación de enriquecimiento de afinidad con un agente de afinidad que une uno o más marcadores de superficie.
- 55 8. El método de la reivindicación 7, en el que el uno o más marcadores de superficie se selecciona de P-selectina, CD45, L1cam, CD44, CD184, PDGFR, RH, CD3, CD19, CD20, CD56, CD11, CD14, CD90, CD326, o CD324.
9. El método de la reivindicación 7, en el que el uno o más marcadores de superficie se seleccionan de L1cam, CD45, CD3, CD44 o CD184.



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**