

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 962 275**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6827** (2008.01)

**C12Q 1/6886** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2018 PCT/EP2018/066604**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2018 WO18234463**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2018 E 18731849 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2023 EP 3642360**

54 Título: **Métodos relacionados con la captura de exosomas positivos para CA-IX**

30 Prioridad:

**21.06.2017 EP 17177190**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.03.2024**

73 Titular/es:

**EXOSOMICS S.P.A. (100.0%)  
Strada del Petriccio e Belriguardo 35  
53100 Siena, IT**

72 Inventor/es:

**CHIESI, ANTONIO;  
ZAROVNI, NATASA y  
ZOCCO, DAVIDE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**Observaciones:**

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

**ES 2 962 275 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

Métodos relacionados con la captura de exosomas positivos para CA-IX

- 5 La presente invención se refiere a métodos para el aislamiento de exosomas derivados de tumores por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX, a métodos para cuantificar secuencias de ácido nucleico relacionadas con tumores a partir de tales exosomas aislados y a métodos para determinar *in vitro* la presencia de un tumor en un sujeto.

10 **Antecedentes de la invención**

Los exosomas son vesículas membranosas de 30-100 nm de diámetro de origen endocítico. Son nanovesículas extracelulares lipídicas naturales producidas y liberadas prácticamente por todos los tipos celulares de manera finamente regulada y funcionalmente relevante, de modo que la composición de secuencias de ácido nucleico y proteínas refleja el tipo y estado de una célula progenitora. Estas vesículas tienen, de manera intrínseca, estabilidad y capacidad para atravesar barreras biológicas, de modo que los exosomas originados a partir de diferentes tejidos puedan encontrarse en líquidos biológicos fácilmente accesibles, tales como la sangre. Dadas sus funciones y características biológicas, los exosomas se consideran centinelas tempranos de las alteraciones en la homeostasis y el metabolismo celular y tisular, y son una atractiva fuente para la identificación de novedosos biomarcadores relevantes de las enfermedades, así como la exhibición de marcadores tisulares conocidos en un paradigma de biopsias líquidas. Esto es una premisa trascendental y una promesa de uso de ensayos dirigidos a exosomas en el diagnóstico de enfermedades complejas, tales como el cáncer. El desafío principal reside en la asociación de marcadores asociados a exosomas a un tejido particular, en una condición particular, y la optimización de soluciones y ensayos fiables, asequibles y no invasivos, dirigidos a exosomas, que puedan implementarse de manera realista en la investigación y práctica clínicas.

Existe la necesidad de desarrollar métodos que puedan aislar exosomas derivados de tumores a partir de muestras biológicas, y detectar y cuantificar, de manera significativa, secuencias de ácido nucleico relacionadas con tumores tales como las mutaciones puntuales del gen de BRAF BRAFV600E, BRAFV600K, BRAFV600R, BRAFV600M y BRAFV600D, la amplificación del gen de BRAF de tipo natural (WT) (4, 5), mutaciones puntuales del gen de KRAS tales como KRAS G12C, KRAS G12S, KRAS G12V, KRAS G12A, KRAS G12D, KRAS G13D y la amplificación del gen de KRAS WT (6), mutaciones puntuales del gen de NRAS tales como NRAS G12C y NRAS G12D, NRAS Q61K, NRAS Q61R (7, 8), mutaciones puntuales del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tales como EGFR T790M, EGFR L858R, delección del exón 19 de EGFR, delección del exón 20 de EGFR (9, 10), amplificación y sobreexpresión del gen de c-Myc (11, 12), transcritos de ARN de retrotransposones tales como elemento nuclear entremezclado corto y largo (SINE, LINE) y repeticiones del retrovirus endógeno humano (HERV) (12), mutaciones puntuales del gen del receptor de andrógenos (AR) tales como AR L702H, AR W742C, AR H875Y, AR F877L, AR T878A, amplificación del gen de AR WT y AR-V7 de variantes de corte y empalme (13-15).

40 **Técnica anterior**

B. J. Tauro *et al.*, Molecular & Cellular Proteomics, vol. 12, n.º 3, diciembre de 2012, páginas 587-598, da a conocer un procedimiento para la inmunopurificación de exosomas derivados de tumores usando anticuerpos dirigidos contra A33 y EpCAM. Sin embargo, A33 no es más específico que la precipitación genérica de exosomas.

La anhidrasa carbónica IX (CA-IX) es un biomarcador tumoral conocido con valor en diagnóstico y pronóstico, y una posible diana para el desarrollo de fármacos antineoplásicos (1-2). Una forma soluble de CA-IX puede detectarse en el suero de pacientes con cáncer (3).

El documento WO2012115885 cita a CA-IX como un biomarcador que puede medirse a partir de los exosomas.

Dorai (16) describe cómo las células de carcinoma renal, cuando se ven forzadas a sobreexpresar CA-IX, aumentan la diseminación de exosomas.

A. Abols *et al.*, United European Gastroenterology Journal, vol. 4, suplemento n.º 5, octubre de 2016, página A284, declaran que CA-IX se sobreexpresa en una variedad de cánceres, incluyendo cáncer de colon, y desempeña una función crucial en el mantenimiento de la ventaja selectiva de las células cancerosas.

Los anticuerpos anti-CA-IX, ya sea monoclonales o policlonales, y dirigidos a diversas especies tales como ser humano, rata o ratones, se encuentran disponibles comercialmente de, por ejemplo, ThermoFisher Scientific Inc.

60 **Breve descripción de los dibujos**

65 La figura 1 representa los niveles de BRAF y BRAFV600E medidos a partir de exosomas aislados de un plasma

de paciente positivo para V600E, o bien por precipitación genérica o bien por inmunocaptura con diversos anticuerpos, incluyendo CA-IX.

5 Las figuras 2A y B representan los niveles génicos de BRAF medidos en exosomas aislados del plasma de pacientes sanos, con cáncer colorrectal o con melanoma, o bien por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX o bien por precipitación genérica.

10 La figura 2C representa la frecuencia alélica de AR T878 cuando se mide a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes con cáncer de próstata, por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX o por precipitación genérica de EV.

15 La figura 3 representa los niveles génicos de BRAF medidos en exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer colorrectal, o bien por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX o bien por inmunocaptura con un anticuerpo anti-EPCAM.

La figura 4 representa la puntuación Z de los niveles de BRAF cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer colorrectal por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

20 La figura 5 representa la puntuación Z de los niveles de BRAF cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de próstata por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 6 representa la puntuación Z de los niveles de BRAF cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer gástrico por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

25 La figura 7 representa la puntuación Z de los niveles de BRAF cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer ovárico por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

30 La figura 8 representa la puntuación Z de los niveles de KRAS cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos, con cáncer colorrectal, con hiperplasia prostática benigna o con cáncer de próstata por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 9 representa la puntuación de los niveles de EGFR cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de pulmón por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

35 La figura 10 representa la puntuación de los niveles de HERV-W cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de pulmón por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

40 La figura 11 representa la puntuación de los niveles de LINE cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de pulmón por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 12 representa la puntuación de los niveles de c-Myc cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de pulmón por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

45 La figura 13 representa la puntuación de los niveles de HERV-W cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de mama por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 14 representa la puntuación de los niveles de LINE cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de mama por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

50 La figura 15 representa la puntuación de los niveles de AR-WT cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de próstata por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

55 La figura 16 representa la puntuación de los niveles de AR-T878A cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de próstata por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 17 representa la puntuación de los niveles de HERV-W cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer colorrectal por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

60 La figura 18 representa la puntuación de los niveles de LINE cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer colorrectal por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

65 La figura 19 representa la puntuación de los niveles de HERV-W cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer gástrico por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 20 representa la puntuación de los niveles de LINE cuando se miden a partir de exosomas aislados del

plasma de pacientes sanos o con cáncer gástrico por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 21 representa la puntuación de los niveles de c-Myc cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer ovárico por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

5 La figura 22 representa la puntuación de los niveles de HERV-W cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de pulmón por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

10 La figura 23 representa la puntuación de los niveles de c-Myc cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de pulmón por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 24 representa la puntuación de los niveles de LINE cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de pulmón por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

15 La figura 25 representa la puntuación de los niveles de LINE cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer colorrectal por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 26 representa la puntuación de los niveles de EGFR cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer colorrectal por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

20 La figura 27 representa la puntuación de los niveles de HERV-W cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer colorrectal por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

25 La figura 28 representa la puntuación de los niveles de LINE cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de mama por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 29 representa la puntuación de los niveles de HERV-W cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con melanoma por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

30 La figura 30 representa la puntuación de los niveles de HERV-W cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer ovárico por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 31 representa la puntuación de los niveles de AR-WT cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de próstata por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

35 La figura 32 representa la puntuación de los niveles de AR-V7 cuando se miden a partir de exosomas aislados del plasma de pacientes sanos o con cáncer de próstata por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

40 La figura 33 representa la puntuación de los niveles de LINE cuando se miden a partir de exosomas aislados de la orina de pacientes sanos o con cáncer de vejiga por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 34 representa la puntuación de los niveles de HERV-W cuando se miden a partir de exosomas aislados de la orina de pacientes sanos o con cáncer de vejiga por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

45 La figura 35 representa la puntuación de los niveles de c-Myc cuando se miden a partir de exosomas aislados de la orina de pacientes sanos o con cáncer de vejiga por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

La figura 36 representa la puntuación de los niveles de LINE cuando se miden a partir de exosomas aislados de la orina de pacientes sanos o con cáncer de vejiga por inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX.

50

#### **Descripción detallada de la invención**

Se ha encontrado sorprendentemente que, cuando un anticuerpo anti-CA-IX se usa para capturar exosomas a partir de un líquido biológico, permite el aislamiento de exosomas derivados de tumores.

55 Por consiguiente, en un primer aspecto de esta invención, se proporciona un método para el aislamiento *in vitro* de exosomas derivados de tumores a partir de un líquido biológico, comprendiendo tal método capturar exosomas a partir de una muestra de ese líquido biológico con un anticuerpo anti-CA-IX.

60 También se ha encontrado sorprendentemente que, cuando un anticuerpo anti-CA-IX se usa para capturar exosomas a partir de un líquido biológico, permite la detección y cuantificación significativas de secuencias de ácido nucleico relacionadas con tumores, y discriminar entre pacientes que están afectados por un tumor y aquellos que no lo están.

65 Por consiguiente, en un segundo aspecto de esta invención, se proporciona un método para la cuantificación *in vitro* de una secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores a partir de un líquido biológico, comprendiendo

tal método

a) capturar exosomas a partir de una muestra de tal líquido biológico con un anticuerpo anti-CA-IX, y

5 b) detectar el nivel de secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores presente en los exosomas capturados en la etapa a).

En un tercer aspecto de esta invención, se proporciona un método para determinar *in vitro* la presencia de un tumor en un sujeto que comprende

10

a) capturar exosomas a partir de una muestra de líquido biológico de ese sujeto con un anticuerpo anti-CA-IX,

b) determinar el nivel de una secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores presente en los exosomas aislados en la etapa a), y

15

c) comparar el nivel de secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores determinado en la etapa b) con uno o más valores de referencia.

Aunque un kit no se encuentra dentro del alcance de las reivindicaciones, en el presente documento también se da a conocer un kit para su uso en el aislamiento de exosomas derivados de tumores a partir de un líquido biológico. Tal kit comprende un anticuerpo anti-CA-IX. Es adecuado para su uso en la cuantificación de una secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores en exosomas a partir de un líquido biológico o para determinar *in vitro* la presencia de un tumor en un sujeto a partir de exosomas aislados de un líquido biológico. El kit puede comprender además un conjunto de cebadores dirigidos a la secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores.

20

En una realización según cualquier aspecto, el tumor se selecciona de la lista de cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer ovárico y melanoma.

30

En una realización según cualquier aspecto de esta invención, el líquido biológico se selecciona de la lista de sangre, plasma, suero, orina y saliva.

En una realización según cualquier aspecto de esta invención, la secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores se selecciona de la lista de una secuencia de ADN bicatenario, una secuencia de ADN monocatenario y una secuencia de ARN.

35

En una realización, la secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores de ADN bicatenario es una secuencia de tipo natural de un gen diana seleccionado del grupo que consiste en el gen de BRAF, el gen de KRAS, el gen de NRAS, el gen de EGFR y el gen de AR.

40

En otra realización, la secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores de ADN bicatenario es una secuencia mutada de un gen diana seleccionado del grupo que consiste en el gen de BRAF, el gen de KRAS, el gen de NRAS, el gen de EGFR y el gen de AR. En una realización específica, la secuencia mutada se selecciona de la lista de una amplificación, una mutación puntual, una delección y una inserción.

45

En una realización, la secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores de ADN bicatenario se selecciona de la lista de una amplificación del gen de BRAF WT, una mutación puntual del gen de BRAF, una amplificación del gen de KRAS WT, una mutación puntual del gen de KRAS, una amplificación del gen de NRAS WT, una mutación puntual del gen de NRAS, una amplificación del gen de cMyc WT, una amplificación del gen de EGFR WT, una mutación puntual del gen de EGFR, una delección del gen de EGFR, una inserción del gen de EGFR, el gen de AR WT y una mutación puntual del gen de AR.

50

En una realización, la secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores de ADN monocatenario se selecciona de la lista de una amplificación del gen de cMyc WT, un retrotransposón del elemento nuclear entremezclado largo (LINE), un retrotransposón del elemento nuclear entremezclado corto (SINE) y un retrotransposón del retrovirus endógeno humano (HERV).

55

En una realización, el retrotransposón de HERV se selecciona de la lista de HERV-H, HERV-K, HERV-C y HERV-W.

60

En una realización, la secuencia de ARN se selecciona de la lista de ARNm de cMyc WT, ARNm de LINE, ARNm de SINE, ARNm de HERV, ARNm de receptor de andrógenos (AR) WT y ARNm de la variante de corte y empalme del gen de AR.

65

En una realización, la secuencia de ARNm de HERV se selecciona de la lista de ARNm de HERV-H, ARNm de

HERV-K, ARNm de HERV-C y ARNm de HERV-W.

En una realización, la mutación puntual del gen de BRAF es una mutación BRAF V600.

- 5 En una realización específica, la mutación BRAFV600 se selecciona de la lista de BRAFV600E, BRAFV600K, BRAFV600R, BRAFV600M y BRAFV600D.

En una realización, la mutación puntual del gen de KRAS es una mutación KRAS G12.

- 10 En una realización específica, la mutación KRAS G12 se selecciona de la lista de KRAS G12C, KRAS G12S, KRAS G12V, KRAS G12A y KRAS G12D.

En una realización, la mutación puntual del gen de KRAS es una mutación KRAS G13.

- 15 En una realización específica, la mutación KRAS G13 es KRAS G13D.

En una realización, la mutación puntual del gen de NRAS es una mutación NRAS G12.

En una realización específica, la mutación NRAS G12 se selecciona de la lista de NRAS G12C y NRAS G12D.

- 20 En una realización, la mutación puntual del gen de NRAS es una mutación NRAS Q61.

En una realización específica, la mutación NRAS Q61 se selecciona de la lista de NRAS Q61K y NRAS Q61R.

- 25 En una realización, la mutación puntual del gen de EGFR es una mutación EGFR T790.

En una realización específica, la mutación EGFR T790 es EGFR T790M.

En una realización, la mutación puntual del gen de EGFR es una mutación EGFR L858.

- 30 En una realización específica, la mutación EGFR L858 es EGFR L858R.

En una realización, la delección del gen de EGFR es una delección del exón 19 de EGFR.

- 35 En una realización, la inserción del gen de EGFR es la inserción del exón 20 de EGFR.

En una realización, la mutación puntual del gen de AR se selecciona de la lista de una mutación AR L702, una mutación AR W742, una mutación AR H875, una mutación AR F877 y una mutación AR T878.

- 40 En una realización específica, la mutación AR L702 es AR L702H.

En una realización específica, la mutación AR W742 es AR W742C.

En una realización específica, la mutación AR H875 es AR H875Y.

- 45 En una realización específica, la mutación AR F877 es AR F877L.

En una realización específica, la mutación AR T878 es AR T878A.

- 50 En una realización, la variante de corte y empalme del gen de AR es AR-V7.

Todas las realizaciones pueden combinarse.

### Ejemplos

- 55 La invención se describe ahora por medio de ejemplos no limitativos. Algunas de las secuencias nucleotídicas citadas en los ejemplos contienen uno o más nucleósidos de LNA, que se identifican por el símbolo "+" seguido por la letra relevante (A, C, G o T/U). Las fórmulas estructurales de los nucleósidos modificados con LNA se ilustran en el presente documento a continuación:

60

LNA-unidad	Fórmula
LNA-Adenosina	
LNA-Timidina	
LNA 5-Metilcitosina	
LNA-Guanosina	

### Materiales y métodos

#### A) Extracción y fraccionamiento de sangre

5

Todos los pacientes habían ayunado desde la medianoche antes de la extracción de sangre en la mañana. La sangre se extrajo en tubos con K2-EDTA para plasma (VACUTAINER® Becton Dickinson, tapa morada, REF 367864, 6,0 ml) o tubos regulares para suero (VACUTAINER® Becton Dickinson, tapa roja, REF 366881, 5,0 ml). Los tubos se invirtieron posteriormente 5 ó 6 veces, se mantuvieron en posición vertical y se almacenaron a temperatura ambiente (20-25 °C). Se realizó un procesamiento adicional en el plazo de una hora a partir de la

10

extracción por centrifugación a 1500 *g* durante 15 minutos a 20-25 °C. El plasma se extrajo usando una pipeta Pasteur desechable (Steroglass, REF: LPMW032653; 5 ml), evitando resuspenderlo al detenerse 3-4 mm por arriba de la capa leucoplaquetaria. Las muestras se comprobaron visualmente para detectar trazas de lípidos, bilis (*Itterum*) o hemólisis. El plasma se extrajo en tubos Falcon de 15 ml, se invirtió suavemente y se distribuyó en alícuotas en criotubos etiquetados (REF: n°BSM 535, Biosigma) y se almacenó a -80 °C.

B) Preparaciones de reactivos y plasma

Las muestras de plasma se centrifugaron a 1200 *g* durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA) para eliminar glóbulos rojos y residuos celulares. Luego se recogió el sobrenadante y se centrifugó una vez más a 10000 *g* durante 30 minutos a TA para eliminar vesículas y residuos. Se recogió el sobrenadante resultante y se diluyó en una razón en volumen de 1:1 de tampón fosfato (PBS). Se añadió un microlitro de cóctel de inhibidores de proteasas (1000X; n.º de cat. de Sigma P-834) a cada muestra para conservar los biomarcadores proteicos. Los reactivos para la purificación de ADN, incluyendo tampones de lavado, se prepararon según las instrucciones del fabricante (HansaBioMed OU, Estonia). Los cebadores y las sondas se reconstituyeron en agua Milli-Q o tampón TE, se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

C) Aislamiento de exosomas a partir de plasma

Los anticuerpos anti-CAIX y anti-CAXII, usados para capturar exosomas derivados de tumores, se proporcionaron amablemente por el Dr. Reinhard Zeidler (Helmoltz Zentrum Munchen, Alemania). Los anticuerpos anti-cMET (n.º de cat. PA5-27235; Thermo Fisher), anti-CD73 (n.º de cat. ab91086; Abcam), anti-CAV (n.º de cat. 611338; BD Biosciences), anti-TM9SF4 (Cat Núm.: LS-A9852; Lifespan Biosciences, Inc.) y anti-EPCAM (n.º de cat. PA5-29634; Thermo Fisher) se adquirieron de proveedores comerciales. Se adquirieron perlas de látex de un proveedor comercial (HansaBioMed OU, Estonia) y se recubrieron usando 1 µg de anticuerpo por muestra. Para aislar una población genérica de exosomas, se usó el péptido Vn96 según las instrucciones del fabricante (ME-kit, New England Peptide, EE.UU.).

Se añadieron diez microlitros de perlas recubiertas con anticuerpos o 50 µg de péptido Vn96 a la muestra de plasma diluido previamente aclarado para aislar los exosomas. Las muestras se mezclaron al pipetear hacia arriba y hacia abajo, y se incubaron durante dos horas a TA bajo rotación. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 5000 *g* durante 10 minutos a TA. El sobrenadante obtenido se descartó luego cuidadosamente sin perturbar el sedimento de perlas. El sedimento se lavó con PBS y se sedimentó por centrifugación a 5000 *g* durante 10 minutos. La etapa de lavado se repitió luego una vez más y el sedimento final se resuspendió en 200 µl de PBS 1X.

D) Aislamiento de exosomas a partir de orina

Antes del aislamiento, la orina se concentró 10X usando unidades de filtración EMD Millipore Amicon Ultra-15 con un corte de 100 kDa (n.º de cat. UFC910024, Millipore).

Luego se añadieron diez microlitros de perlas recubiertas con anti-CAIX a 1 ml de orina concentrada. Después de un aislamiento de 2 horas, las perlas se sedimentaron y lavaron, tal como se describió anteriormente, antes de la extracción de ARN.

E) Purificación y concentración de ADN

Se extrajo y concentró ADN asociado a exosomas (EV-ADN) usando un kit disponible comercialmente para la extracción de ADN circulante (EXO-DNAc-PS; HansaBioMed OU, Estonia). Brevemente, los exosomas unidos a perlas se lisaron con un tampón de lisis de propiedad exclusiva y se digirieron con proteinasa K para liberar el ADN de los complejos proteicos. La muestra se complementó luego con etanol, se cargó en una columna de centrifugación de membrana de sílice y se centrifugó a 10000 *g* durante 1 minuto. Después de la centrifugación, se descartó la fracción no retenida. Se realizaron dos etapas de lavado según las instrucciones del fabricante para deshacerse de los disolventes contaminantes e inhibidores derivados de plasma antes de la elución. El ADN eluido se complementó con tampón de unión y etanol, y se cargó en una nueva columna de centrifugación de membrana de sílice una vez más para su purificación y concentración adicionales. Se aplicaron dos etapas más de lavado antes de eluir el EV-ADN purificado en un volumen final de 15 µl de tampón de elución proporcionado por el kit.

F) Purificación de ARN

El ARN se extrajo directamente a partir del sedimento de perlas usando un kit disponible comercialmente para la extracción de ARN exosómico (sortEV™; Exosomics Siena Spa). Brevemente, los exosomas unidos a perlas se lisaron con un tampón a base de fenol y se agitaron con vórtex durante 30 segundos. La muestra se complementó luego con cloroformo y se centrifugó a 12000 *g* durante 10 minutos, con el fin de separar la fase acuosa de la orgánica. Después de la centrifugación, se recogió la fase acuosa, se complementó con etanol y se

cargó en una columna de centrifugación de membrana de sílice. La columna cargada se centrifugó a 14000 *g* durante 30 segundos y se descartó la fracción no retenida. Se realizaron dos etapas de lavado según las instrucciones del fabricante para deshacerse de los disolventes contaminantes e inhibidores derivados de plasma antes de la elución. El EV-ARN purificado se eluyó en un volumen final de 15 µl de tampón de elución proporcionado por el kit.

G) Amplificación por PCR de los genes *BRAF*, *KRAS*, *EGFR* y *cMyc* a partir de EV-ADN

La amplificación por PCR de EV-ADN es desafiante, debido a la baja abundancia y alta fragmentación del molde. Por tanto, se incluyó una etapa de preamplificación en el protocolo aguas arriba de la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para mejorar la detección de los genes diana *BRAF* y *KRAS*.

*Cebadores y sondas*

*Cebadores de preamplificación de BRAF:*

- a) WT FW: 5'-TAGGTGATTTGGTCTAGCTACAG+T-3' (SEQ ID NO: 1);
- b) WT RW: 5'-TTAATCAGTGGAAAAATAGCCTCA-3' (SEQ ID NO: 2);
- c) V600E FW: 5'-TAGGTGATTTGGTCTAGCTACAG+A-3' (SEQ ID NO: 3);
- d) V600E RW: 5'-TTAATCAGTGGAAAAATAGCCTCA-3' (SEQ ID NO: 4);

*Cebadores de preamplificación de KRAS:*

- a) WT FW: 5'-GGTAGTTGGAGCTGGTGGC-3' (SEQ ID NO: 5);
- b) RW: 5'-TGATTCTGAATTAGCTGTATCGTCAA-3' (SEQ ID NO: 6);

*Cebadores y sonda para qPCR de BRAF:*

- a) WT: FW: 5'-TAGGTGATTTGGTCTAGCTACAG+T-3' (SEQ ID NO: 7);
- b) WT RW: 5'-TTAATCAGTGGAAAAATAGCCTCA-3' (SEQ ID NO: 8);
- c) V600E FW: 5'-TAGGTGATTTGGTCTAGCTACAG+A-3' (SEQ ID NO: 9);
- d) V600E RW: 5'-TTAATCAGTGGAAAAATAGCCTCA-3' (SEQ ID NO: 10);
- e) Sonda: 5'-FAM-CCGAAGGGGATC+CAGACAA+CTGTTCAAACCTGCCTTCGG-3BHQ1-3' (SEQ ID NO: 11);

*Cebadores y sondas para qPCR de KRAS:*

- a) WT FW: 5'-GGTAGTTGGAGCTGGTGGC-3' (SEQ ID NO: 12);
- b) RW: 5'-TGATTCTGAATTAGCTGTATCGTCAA-3' (SEQ ID NO: 13);
- c) Sonda: 5'-FAM-CACTCTTGCCTACGC-MGB-3' (SEQ ID NO: 14);

*Cebadores y sondas para qPCR de EGFR:*

- a) FW: 5'-GCAGCATGTCAAGATCACAGATT-3' (SEQ ID NO: 15);
- b) RW: 5'-CCTCCTTCTGCATGGTATTCTTTCT-3' (SEQ ID NO: 16);
- c) Sonda WT (VIC): 5'-AGTTTGGCCAGCCCAA-3' (SEQ ID NO: 17);

*Cebadores y sondas para qPCR de cMyc:*

- a) FW: 5'-CCCTCCACTCGGAAGGACTATC-3' (SEQ ID NO: 18);
- b) RW: 5'-AGGACTCTGACACTGTCCAAC-3' (SEQ ID NO: 19);
- c) Sonda WT (VIC): 5'-TGACCCTCTTGGCAGCAG-3' (SEQ ID NO: 20);

*Preamplificación de genes diana a partir de EV-ADN*

5 Todos los reactivos se descongelaron a TA durante al menos una hora y se mezclaron brevemente sin agitación con vórtex para evitar la inactivación de la enzima. Cada reacción de preamplificación incluyó 7 µl de ADN eluido, tampón Bioron High Fidelity 1X, MgCl<sub>2</sub> 3 mM; dNTP 200 µM, 1,25 unidades de polimerasa SNPasa (Bioron GmbH, Alemania) y 0,4 µl de cebadores (10 µM), en un volumen total de 20 µl. Cada reacción se realizó en un microvial compatible con PCR cargado en un termociclador de PCR, ejecutando el siguiente programa de PCR: 98 °C durante 30", 98 °C durante 10" y 72 °C durante 5", 4 °C en espera. El ADN preamplificado se diluyó en 80 µl de agua estéril y se usó inmediatamente para el análisis de qPCR o se almacenó a -20 °C durante hasta tres meses.

*Amplificación de genes diana por qPCR*

15 Para la amplificación de genes diana a partir de EV-ADN, cada reacción de qPCR incluyó 7 µl de ADN preamplificado, mezcla maestra de sondas SsoAdvanced Universal 1X (Biorad; EE.UU.), 0,625 µl de cebadores (10 µM) y 0,3125 µl de sonda fluorescente (10 µM) en un volumen total de 25 µl. Después de un mezclado cuidadoso, cada reacción se cargó por duplicado en una placa para PCR de 96 pocillos y se activó el siguiente programa de qPCR: 95 °C durante 3', 40 ciclos a 95 °C durante 5" y 60 °C durante 30", seguido de una etapa de espera final a 4 °C.

20 Para la amplificación de genes diana a partir de EV-ARN, se cargó directamente un microlitro de EV-ARN en una reacción RT-qPCR de una sola etapa de 20 µl y se amplificó según las instrucciones del fabricante (iTaQ Universal OneStep qPCR; Biorad).

25 *Amplificación de elementos de retrotransposones por qPCR*

Se cargó directamente un microlitro de EV-ADN o EV-ARN en la mezcla de qPCR y se amplificó tal como se describió anteriormente. Se usaron los siguientes cebadores y sondas:

30 *Cebadores y sondas para qPCR de LINE:*

- a) FW: 5'-TCAACAAGAAGAGCTAACTATCC-3' (SEQ ID NO: 21);
- b) RW: 5'-TTGTAGGTCCTCAGGACTTGC-3' (SEQ ID NO: 22);
- 35 c) Sonda (5,6-TAMRA)-TGCACCCAATACAGGAGCACCCAGATTCA-BHQ2 (SEQ ID NO: 23);

*Cebadores y sondas para qPCR de HERV-W:*

- 40 a) FW: 5'-CTTCCAGAATTGAAGCTGTAAAGC-3' (SEQ ID NO: 24);
- b) RW: 5'-GGGTTGTGCAGTTGAGATTTCC-3' (SEQ ID NO: 25);
- c) Sonda FAM-5'-TTCTTCAAATGGAGCCCCAGATGCAG-3'-TAMRA (SEQ ID NO: 26);

45 *Análisis de datos de qPCR e interpretación de resultados*

La cuantificación de los genes diana de BRAF y KRAS WT se expresó como valores de ciclo de umbral (Ct) y se representó gráficamente en un eje Y invertido. Alternativamente, se usó un valor de puntuación Z para definir un umbral para distinguir las muestras sanas de las enfermas, tal como se publicó previamente (15). Brevemente, las muestras con un valor de una puntuación Z positiva se consideraron negativas para enfermedad, mientras que las muestras con una puntuación Z negativa se clasificaron como positivas para cáncer. En algunos casos aislados, el patrón opuesto también se observó como resultado de la regulación por disminución de los niveles de elementos de retrotransposones.

55 *Amplificación de genes diana por PCR digital*

Se usó una plataforma de PCR digital basada en chips (dPCR) (QuantStudio 3D Digital PCR System Platform, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU.) para la detección de mutaciones. La detección de mutaciones por dPCR se basó en una sonda TaqMan-MGB conjugada con FAM que selecciona como diana la mutación AR T878A y una sonda TaqMan-MGB conjugada con VIC que selecciona como diana el gen de tipo natural correspondiente (ensayo de genotipado de SNP C\_175239649\_10; Fisher Scientific). Los ensayos de variantes de corte y empalme de AR-WT y AR-V7 se personalizaron con los siguientes cebadores y sondas:

- 65 a) AR-WT FW: 5'-CAGCCTATTGCGAGAGAGCTG-3' (SEQ ID NO: 27);

b) AR-WT RW: 5'-GAAAGGATCTTGGGCACTTGC-3' (SEQ ID NO: 28);

c) Sonda AR-WT: MGB 5'-AGTTCACCTTTGACCTGC-3' (SEQ ID NO: 29);

5 d) AR-V7 FW: 5'-CCATCTTGTCGTCTTCGGAAATGTTA-3' (SEQ ID NO: 30);

e) AR-V7 RW: 5'-TTTGAATGAGGCAAGTCAGCCTTTCT-3' (SEQ ID NO: 31);

10 f) Sonda AR-V7: MGB 5'-AAGCAGGGATGACTCTG-3' (SEQ ID NO: 32).

15 Se prepararon dieciséis microlitros de mezcla de reacción que contenía 8 µl de mezcla maestra para PCR digital QuantStudio 3D 2X (Life Technologies), 0,4 µl de ensayo de sonda TaqMan-MGB-FAM 40X, 1,1 µl de ADN diluido (50 ng/µl) y 6,5 µl de agua libre de nucleasas (Qiagen) en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción de controles negativos contenía 8 µl de mezcla maestra para PCR digital QuantStudio 3D 2X, 0,4 µl de ensayo de sonda TaqMan-MGB-FAM 40X y 7,6 µl de agua libre de nucleasas.

20 Para cuantificar las copias de genes de AR T878A, AR-V7 y wt, se cargaron 15 µl de mezcla de reacción en un chip 20K para PCR digital QuantStudio 3D usando el cargador automático de chips según las instrucciones del fabricante (Life Technologies). La carga divide la reacción en 20.000 microrreacciones de un volumen final de 865 pl, correspondiente a los 20.000 micropocillos en la superficie del chip. Cada chip cargado se sometió a las siguientes condiciones de ciclado usando el sistema de PCR ProFlex: 95 °C durante 8', 40 ciclos a 95 °C durante 15" y 60 °C durante 1', seguido de una etapa de extensión final a 60 °C durante 2'. Después del termociclado, se obtuvieron imágenes de los chips en el instrumento QuantStudio 3D, que calcula la concentración estimada de la secuencia de ácido nucleico seleccionada como diana por la sonda. Se realizó un análisis de datos usando el software QuantStudio 3D Analysis Suite Cloud después de configurar manualmente el umbral analítico y excluir emisiones aberrantes. La señal de todos los controles negativos resultó conforme al valor de 5000 UFR en FAM, por lo que este umbral se fijó para la discriminación de emisión positiva y negativa para AR T878A, mientras que 2100 UFR en VIC resultó como umbral de emisión de AR wt. También se consideraron negativas aquellas muestras con 2 copias o menos de mutante por ml.

30 Ejemplo 1: La captura de exosomas con anticuerpo anti-CA-IX permite un enriquecimiento en exosomas derivados de tumores

35 La figura 1 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de BRAF de tipo natural (WT) y mutado V600E por PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real en ADN extraído de plasma de pacientes con melanoma positivos para BRAF V600E después del inmunoadsorbimiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpos anti-anhidrasa carbónica IX (CAIX), anti-anhidrasa carbónica XII (CAXII), anti-cMET, anti-CD73, anti-caveolina (CAV) y anti-TM9SF4, o por precipitación genérica de vesículas extracelulares (EV). Los anticuerpos se seleccionaron basándose en su capacidad para seleccionar como diana biomarcadores tumorales conocidos. El inmunoadsorbimiento con anticuerpos anti-CAIX enriqueció para más exosomas derivados de tumores que todos los otros enfoques de inmunocaptura y la precipitación genérica de EV, tal como sugieren los mayores niveles del gen de BRAF V600E en comparación con el gen de BRAF WT. Los datos se expresan como valores de ciclo de umbral (Ct) y se representan gráficamente en una escala Y invertida.

45 Ejemplo 2: En comparación con el aislamiento genérico de exosomas por ultracentrifugación, la inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX permite discriminar entre pacientes sanos y con cáncer

50 Las figuras 2A y B muestran los resultados de un análisis cuantitativo del gen de BRAF WT por qPCR en ADN extraído de plasma de donantes sanos (HD) y de pacientes con A) cáncer colorrectal (CRC) o B) melanoma metastásico (MEL) después del inmunoadsorbimiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX o precipitación genérica de vesículas extracelulares (EV). Se encontró que los niveles del gen de BRAF WT derivado de exosomas tumorales eran significativamente mayores en plasma de pacientes tanto con CRC como con MEL, en comparación con muestras de plasma de donantes sanos después de la inmunocaptura con anticuerpo anti-CAIX, lo que sugiere el aislamiento de exosomas derivados de tumores positivos para CAIX. Por el contrario, no se observó ninguna diferencia entre cohortes después de la precipitación genérica de EV, debido al coadsorbimiento de exosomas no derivados de tumores que llevan copias del gen de BRAF WT. Los datos se expresan como valores de ciclo de umbral (Ct) y se representan gráficamente en una escala Y invertida. De manera similar, la figura 2C muestra el resultado de un análisis cuantitativo de la frecuencia alélica de AR T878 frente a AR WT en dos pacientes con cáncer de próstata (PCa).

60 Ejemplo 3: En comparación con el aislamiento de exosomas por inmunocaptura con un anticuerpo anti-EPCAM, la inmunocaptura con un anticuerpo anti-CA-IX permite discriminar entre pacientes sanos y con cáncer

65 La figura 3 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de BRAF WT por qPCR en ADN extraído de plasma de pacientes HD y pacientes con CRC después del inmunoadsorbimiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX o perlas recubiertas con anticuerpo anti-molécula de adhesión celular

epitelial (EPCAM). EPCAM se eligió como marcador de exosomas tumorales de referencia. Los exosomas aislados usando perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX tuvieron bajos niveles del gen de BRAF WT en ambas muestras de plasma de HD y altos niveles en ambas muestras de CRC. Por el contrario, los exosomas aislados con perlas recubiertas con anticuerpo anti-EPCAM tuvieron altos niveles del gen de BRAF WT en una muestra de HD y en ambas muestras de CRC probablemente debido a la menor capacidad de los anticuerpos anti-EPCAM para aislar con eficiencia exosomas derivados de CRC, en comparación con los anticuerpos anti-CAIX. Los datos se expresan como valores de ciclo de umbral (Ct) y se representan gráficamente en una escala Y invertida.

#### 10 Ejemplo 4: Diagnóstico de cáncer colorrectal con BRAF

La figura 4 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de BRAF WT por qPCR en ADN extraído de plasma de pacientes HD (n = 13) y pacientes con CRC (n = 13) después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico. Las muestras con una puntuación Z positiva se consideraron negativas para cáncer, mientras que aquellas con una puntuación Z negativa se consideraron positivas para cáncer. En este experimento, 10 de 13 (80%) muestras de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer. Por el contrario, 10 de 13 (80%) muestras de CRC tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. Estos datos definen un umbral de diagnóstico para distinguir a individuos sanos de pacientes con CRC con la prueba descrita.

#### 20 Ejemplo 5: Diagnóstico de cáncer de próstata con BRAF

La figura 5 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de BRAF WT por qPCR en ADN extraído de pacientes HD (n = 5), pacientes con hiperplasia prostática benigna (BPH; n = 5) y con cáncer de próstata (PCa; n = 5) después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. En este experimento, 4 de 5 (80%) muestras de plasma de HD o BPH tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer. 4 de 5 (80%) muestras de PCa tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. Estos datos definen un umbral de diagnóstico para distinguir a individuos sanos o pacientes con BPH de pacientes con PCa con la prueba descrita.

#### 30 Ejemplo 6: Diagnóstico de cáncer gástrico con BRAF

La figura 6 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de BRAF WT por qPCR en ADN extraído de pacientes HD (n = 5) y pacientes con cáncer gástrico (cáncer gástrico; n = 6) después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. En este experimento, 5 de 5 (100%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer. 5 de 6 (83%) muestras de PCa tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. Estos datos definen un umbral de diagnóstico para distinguir a individuos sanos de pacientes con cáncer gástrico con la prueba descrita.

#### 40 Ejemplo 7: Diagnóstico de cáncer ovárico con BRAF

La figura 7 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de BRAF de tipo natural (WT) por PCR en tiempo real en ADN extraído de pacientes HD (n = 5) y pacientes con cáncer ovárico (ovario; n = 6) después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. En este experimento, 4 de 5 (80%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer. 4 de 6 (66%) muestras de PCa tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. Estos datos definen un umbral de diagnóstico para distinguir a individuos sanos de pacientes con cáncer ovárico con la prueba descrita.

#### 50 Ejemplo 8: Diagnóstico de cáncer colorrectal o de próstata con KRAS

La figura 8 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de KRAS de tipo natural (WT) por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD, con BPH y con cáncer después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. A) 4 de 5 (80%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 5 (80%) muestras de plasma de CRC tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. B) 4 de 5 (80%) muestras de plasma de HD y BPH tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 5 (80%) muestras de plasma de PCa tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos o pacientes con enfermedad benigna de los pacientes con cáncer, puede generarse usando el gen de KRAS WT en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 9: Diagnóstico de cáncer de pulmón con EGFR

5 La figura 9 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de EGFR de tipo natural (WT) por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de pulmón después del inmunoadsorción de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 11 de 15 (77%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 5 de 9 (60%) muestras de plasma de cáncer de pulmón tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de pulmón, puede generarse usando el gen de EGFR WT en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 10: Diagnóstico de cáncer de pulmón con HERV-W

15 La figura 10 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón HERV-W por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de pulmón después del inmunoadsorción de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 8 de 10 (80%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 6 de 7 (85%) muestras de plasma de cáncer de pulmón tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de pulmón, puede generarse usando el elemento de retrotransposón HERV-W en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 11: Diagnóstico de cáncer de pulmón con LINE

25 La figura 11 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón LINE por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de pulmón después del inmunoadsorción de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 9 de 10 (90%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 6 (67%) muestras de plasma de cáncer de pulmón tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de pulmón, puede generarse usando el elemento de retrotransposón LINE en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 12: Diagnóstico de cáncer de pulmón con el gen de c-Myc

40 La figura 12 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de c-Myc por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de pulmón después del inmunoadsorción de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 7 de 7 (100%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z de cero o positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 6 (67%) muestras de plasma de cáncer de pulmón tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de pulmón, puede generarse usando el gen de c-Myc en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 13: Diagnóstico de cáncer de mama con HERV-W

50 La figura 13 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón HERV-W por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de mama después del inmunoadsorción de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 7 de 9 (78%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 5 (80%) muestras de plasma de cáncer de mama tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de mama, puede generarse usando el elemento de retrotransposón HERV-W en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 14: Diagnóstico de cáncer de mama con LINE

65 La figura 14 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón LINE por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de mama después del inmunoadsorción de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0

se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 9 de 10 (90%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 5 (80%) muestras de plasma de cáncer de mama tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de mama, puede generarse usando el elemento de retrotransposón LINE en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

#### Ejemplo 15: Diagnóstico de cáncer de próstata con AR-WT

La figura 15 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de AR WT por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de próstata después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 1 de 1 (100%) muestra de plasma de HD tuvo una puntuación Z positiva y se consideró como negativa para cáncer, mientras que 15 de 16 (93%) muestras de plasma de cáncer de próstata tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de próstata, puede generarse usando el gen de AR WT en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

#### Ejemplo 16: Diagnóstico de cáncer de próstata con AR-T878A

La figura 16 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de AR T878A por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de próstata después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 1 de 1 (100%) muestra de plasma de HD tuvo una puntuación Z positiva y se consideró como negativa para cáncer, mientras que 2 de 2 (100%) muestras de plasma de cáncer de próstata tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de próstata, puede generarse usando el gen de AR T878A en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

#### Ejemplo 17: Diagnóstico de cáncer colorrectal con HERV-W

La figura 17 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón HERV-W por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer colorrectal (CRC) después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 8 de 10 (80%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 9 de 10 (90%) muestras de plasma de CRC tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con CRC, puede generarse usando el elemento de retrotransposón HERV-W en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

#### Ejemplo 18: Diagnóstico de cáncer colorrectal con LINE

La figura 18 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón LINE por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer colorrectal (CRC) después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 7 de 9 (77%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 8 de 10 (80%) muestras de plasma de CRC tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con CRC, puede generarse usando el elemento de retrotransposón LINE en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

#### Ejemplo 19: Diagnóstico de cáncer gástrico con HERV-W

La figura 19 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón HERV-W por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer gástrico después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 7 de 10 (70%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 5 (80%) muestras de plasma de cáncer gástrico tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer gástrico, puede generarse usando el elemento de retrotransposón HERV-W en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 20: Diagnóstico de cáncer gástrico con LINE

La figura 20 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón LINE por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer gástrico después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 7 de 10 (70%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 5 (80%) muestras de plasma de cáncer gástrico tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer gástrico, puede generarse usando el elemento de retrotransposón LINE en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 21: Diagnóstico de cáncer ovárico con c-Myc

La figura 21 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de c-Myc por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer ovárico después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 2 de 3 (70%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 2 de 2 (100%) muestras de plasma de cáncer ovárico tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer ovárico, puede generarse usando el gen de c-Myc en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 22: Diagnóstico de cáncer de pulmón con HERV-W

La figura 22 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón HERV-W por PCR en tiempo real en ARN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de pulmón después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 6 de 8 (77%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 5 (80%) muestras de plasma de cáncer de pulmón tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de pulmón, puede generarse usando el elemento de retrotransposón HERV-W a partir de ARN en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 23: Diagnóstico de cáncer de pulmón con c-Myc

La figura 23 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del ARN mensajero (ARNm) de c-Myc por PCR en tiempo real en ARN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de pulmón después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 4 de 5 (80%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 5 de 6 (85%) muestras de plasma de cáncer de pulmón tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de pulmón, puede generarse usando el ARNm de c-Myc en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 24: Diagnóstico de cáncer de pulmón con LINE

La figura 24 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón LINE por PCR en tiempo real en ARN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de pulmón después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 12 de 15 (80%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 6 (67%) muestras de plasma de cáncer de pulmón tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de pulmón, puede generarse usando el elemento de retrotransposón LINE a partir de ARN en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 25: Diagnóstico de cáncer colorrectal con LINE

La figura 25 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón LINE por PCR en tiempo real en ARN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer colorrectal (CRC) después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 7 de 9 (77%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 5

(80%) muestras de plasma de CRC tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con CRC, puede generarse usando el elemento de retrotransposón LINE a partir de ARN en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

5

#### Ejemplo 26: Diagnóstico de cáncer colorrectal con EGFR

La figura 26 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del ARN mensajero (ARNm) de EGFR WT por PCR en tiempo real en ARN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer colorrectal (CRC) después del inmunoadsorción de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 5 de 5 (100%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 3 de 5 (60%) muestras de plasma de CRC tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con CRC, puede generarse usando el ARNm de EGFR WT en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

10

15

#### Ejemplo 27: Diagnóstico de cáncer colorrectal con HERV-W

La figura 27 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón HERV-W por PCR en tiempo real en ARN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer colorrectal (CRC) después del inmunoadsorción de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 6 de 8 (75%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 5 (80%) muestras de plasma de CRC tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con CRC, puede generarse usando el retrotransposón HERV-W en ARN en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

20

25

#### Ejemplo 28: Diagnóstico de cáncer de mama con LINE

La figura 28 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón LINE por PCR en tiempo real en ARN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de mama después del inmunoadsorción de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 12 de 15 (80%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 5 de 8 (62%) muestras de plasma de cáncer de mama tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de mama, puede generarse usando el elemento de retrotransposón LINE a partir de ARN en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

35

40

#### Ejemplo 29: Diagnóstico de melanoma con HERV-W

La figura 29 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón HERV-W por PCR en tiempo real en ARN extraído de muestras de pacientes HD y con melanoma después del inmunoadsorción de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 2 de 3 (66%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 4 de 4 (100%) muestras de plasma de melanoma tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con melanoma, puede generarse usando el elemento de retrotransposón HERV-W a partir de ARN en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

45

50

#### Ejemplo 30: Diagnóstico de cáncer ovárico con HERV-W

La figura 30 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón HERV-W por PCR en tiempo real en ARN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer ovárico después del inmunoadsorción de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 2 de 3 (66%) muestras de plasma de HD tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 2 de 2 (100%) muestras de plasma de cáncer ovárico tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer ovárico, puede generarse usando el elemento de retrotransposón HERV-W a partir de ARN en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

55

60

Ejemplo 31: Diagnóstico de cáncer de próstata con AR-WT

La figura 31 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen del receptor de andrógenos (AR)-WT por PCR en tiempo real en ARN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de próstata después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 1 de 1 (100%) muestra de plasma de HD tuvo una puntuación Z positiva y se consideró como negativa para cáncer, mientras que 12 de 15 (80%) muestras de plasma de próstata tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de próstata, puede generarse usando el gen de AR-WT a partir de ARN en lugar del gen de BRAF WT como lectura de PCR.

Ejemplo 32: Diagnóstico de cáncer de próstata con AR-V7

La figura 32 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de la variante 7 de corte y empalme del receptor de andrógenos (AR-V7) por PCR en tiempo real en ARN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de próstata después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 1 de 1 (100%) muestra de plasma de HD tuvo una puntuación Z positiva y se consideró como negativa para cáncer. 4 de 6 (67%) pacientes con cáncer de próstata, que respondían a inhibidores de AR, tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron respondedores verdaderos, mientras que 5 de 10 (50%) muestras de plasma de cáncer de próstata, que no respondían a inhibidores de AR, tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como no respondedores verdaderos. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos y pacientes con cáncer de próstata respondedores de los pacientes con cáncer no respondedores, puede generarse usando el gen de AR-V7 a partir de ARN.

Ejemplo 33: Diagnóstico de cáncer de vejiga con LINE

La figura 33 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón LINE por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de vejiga después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 2 de 2 (100%) muestras de orina de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 3 de 4 (75%) muestras de orina de cáncer de vejiga tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de vejiga, puede generarse usando el elemento de retrotransposón LINE.

Ejemplo 34: Diagnóstico de cáncer de vejiga con HERV-W

La figura 34 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del elemento de retrotransposón HERV-W por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de vejiga después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 2 de 2 (100%) muestras de orina de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 3 de 4 (75%) muestras de orina de cáncer de vejiga tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de vejiga, puede generarse usando el elemento de retrotransposón HERV-W.

Ejemplo 35: Diagnóstico de cáncer de vejiga con c-Myc

La figura 35 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del gen de c-Myc por PCR en tiempo real en ADN extraído de muestras de pacientes HD y con cáncer de vejiga después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 2 de 2 (100%) muestras de orina de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 3 de 4 (75%) muestras de orina de cáncer de vejiga tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de vejiga, puede generarse usando el gen de c-Myc.

Ejemplo 36: Diagnóstico de cáncer de vejiga con LINE

La figura 36 muestra los resultados de un análisis cuantitativo del ARN del elemento de retrotransposón LINE por PCR en tiempo real a partir de muestras de pacientes HD y con cáncer de vejiga después del inmunoaislamiento de exosomas con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CAIX. Un valor de puntuación Z de 0 se usó como umbral de diagnóstico, tal como se describió anteriormente. 2 de 2 (100%) muestras de orina de HD tuvieron una puntuación Z positiva y se consideraron como negativas para cáncer, mientras que 3 de 4 (75%) muestras de orina de cáncer de vejiga tuvieron una puntuación Z negativa y se consideraron como positivas para cáncer. En

general, estos datos indican que un umbral de diagnóstico, para distinguir a los individuos sanos de los pacientes con cáncer de vejiga, puede generarse usando el elemento de retrotransposón LINE.

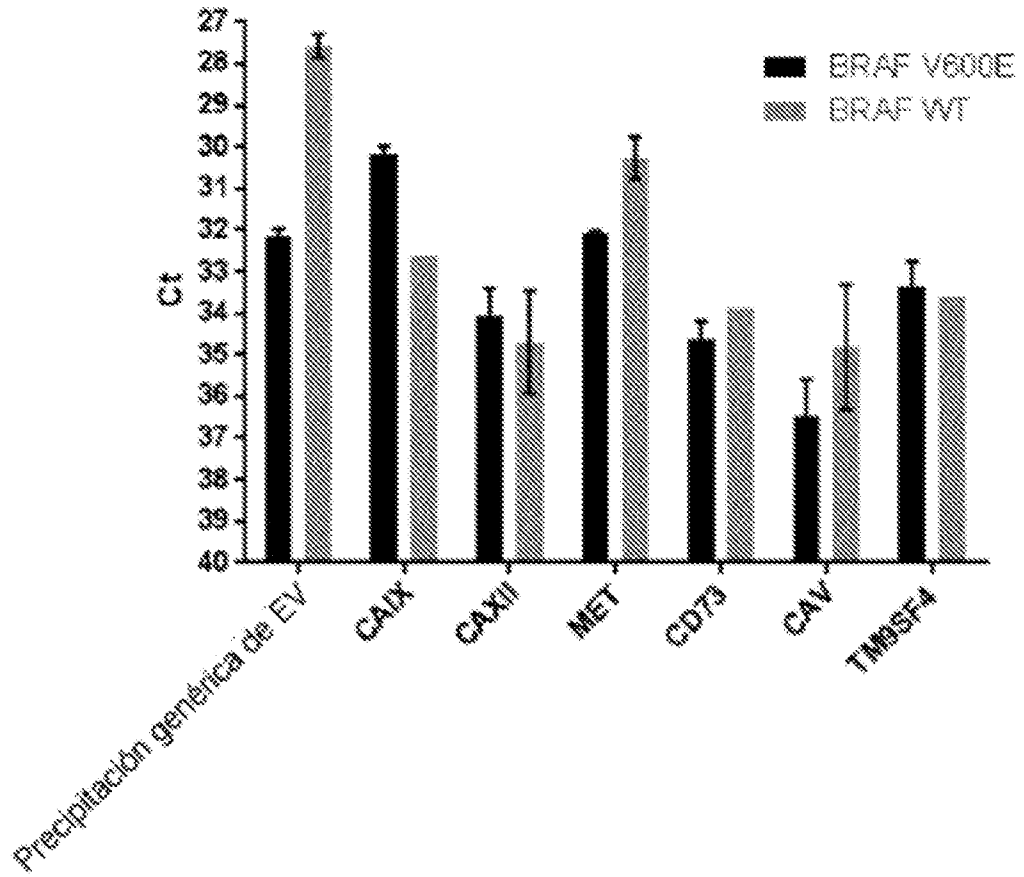
### Bibliografía

- 5 1) Chamie K, Klöpfer P, Bevan P, Störkel S, Said J, Fall B, Beldegrun AS, Pantuck AJ. Carbonic anhydrase-IX score is a novel biomarker that predicts recurrence and survival for high-risk, nonmetastatic renal cell carcinoma: Data from the phase III ARISER clinical trial. *Urol Oncol*. Mayo de 2015;33(5):204.
- 10 2) Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use. *Semin Cancer Biol*. Abril de 2015;31:52-64.
- 15 3) Takacova M, Bartosova M, Skvarkova L, Zatovicova M, Vidlickova I, Csaderova L, Barathova M, Breza J Jr, Bujdak P, Pastorek J, Breza J Sr, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma. *Oncol Lett*. Enero de 2013;5(1):191-197. Mutations of the BRAF gene in human cancer.
- 20 4) Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutation of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 27 de junio de 2002;417(6892):949-54.
- 25 5) Corcoran RB, Dias-Santagata D, Bergethon K, Iafrate AJ, Settleman J, Engelman JA BRAF gene amplification can promote acquired resistance to MEK inhibitors in cancer cells harboring the BRAF V600E mutation. *Sci Signal*. 23 de noviembre de 2010;3(149):ra84.
- 30 6) Perincheri S, Hui P. KRAS mutation testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn*. Marzo de 2015;15(3):375-84.
- 35 7) Cercek A, Braghiroli MI, Chou JF, Hechtman JF, Kemeny NE, Saltz L, Capanu M, Yaeger R Clinical features and outcomes of patients with colorectal cancers harboring NRAS mutations. *Clin Cancer Res*. 26 de abril de 2017. 164.
- 8) Mandalà M, Merelli B, Massi D. Nras in melanoma: targeting the undruggable target. *Crit Rev Oncol Hematol*. Noviembre de 2014;92(2):107-22.
- 40 9) Passaro A, Guerini-Rocco E, Pochesci A, Vacirca D, Spitaleri G, Catania CM, Rappa A, Barberis M, de Marinis F. Targeting EGFR T790M mutation in NSCLC: From biology to evaluation and treatment *Pharmacol Res*. Marzo de 2017;117:406-415.
- 45 10) Fang S, Wang Z. EGFR mutations as a prognostic and predictive marker in non-small-cell lung cancer. *Drug Des Devel Ther*. 26 de septiembre de 2014;8:1595-611.
- 11) Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2 de junio de 2014;4(6).
- 50 12) Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun*. 1 de febrero de 2011;2:180.
- 55 13) Romanel A, Gasi Tandefelt D, Conteduca V, Jayaram A, Casiraghi N, Wetterskog D, Salvi S, Amadori D, Zafeiriou Z, Rescigno P, Bianchini D, Gurioli G, Casadio V, Carreira S, Goodall J, Wingate A, Ferraldeschi R, Tunariu N, Flohr P, De Giorgi U, de Bono JS, Demichelis F, Attard G. Plasma AR and abiraterone-resistant prostate cancer. *Sci Transl Med*. 4 de noviembre de 2015;7(312):312re10.
- 60 14) Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, Chen Y, Mohammad TA, Chen Y, Fedor HL, Lotan TL, Zheng Q, De Marzo AM, Isaacs JT, Isaacs WB, Nadal R, Paller CJ, Denmeade SR, Carducci MA, Eisenberger MA, Luo J. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*. 11 de septiembre de 2014;371(11):1028-38.
- 15) Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. *J Mol Diagn*. Mayo de 2003;5(2):73-81.
- 65 16) Dorai Y, *The Journal of Urology*, (2010), 183(4) suplemento, e145, resumen 366.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para el aislamiento *in vitro* de exosomas derivados de tumores a partir de un líquido biológico, comprendiendo tal método capturar exosomas a partir de una muestra de ese líquido biológico con un anticuerpo anti-CA-IX.
- 10 2. Método para la cuantificación *in vitro* de una secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores a partir de un líquido biológico, comprendiendo tal método
- 10 a) capturar exosomas a partir de una muestra de tal líquido biológico con un anticuerpo anti-CA-IX, y
- b) detectar el nivel de secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores presente en los exosomas capturados en la etapa a).
- 15 3. Método para determinar *in vitro* la presencia de un tumor en un sujeto que comprende
- a) capturar exosomas a partir de una muestra de líquido biológico de ese sujeto con un anticuerpo anti-CA-IX,
- 20 b) determinar el nivel de una secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores presente en los exosomas aislados en la etapa a), y
- c) comparar el nivel de secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores determinado en la etapa b) con uno o más valores de referencia.
- 25 4. Método según las reivindicaciones 1-3, en el que el tumor se selecciona de la lista de cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer ovárico y melanoma.
- 30 5. Método según las reivindicaciones 2-3, en el que la secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores se selecciona de la lista de una secuencia de ADN bicatenario, una secuencia de ADN monocatenario y una secuencia de ARN.
- 35 6. Método según la reivindicación 5, en el que la secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores de ADN bicatenario es una secuencia de tipo natural de un gen diana seleccionado del grupo que consiste en el gen de BRAF, el gen de KRAS, el gen de NRAS, el gen de EGFR y el gen de AR.
- 40 7. Método según la reivindicación 5, en el que la secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores de ADN bicatenario es una secuencia mutada de un gen diana seleccionado del grupo que consiste en el gen de BRAF, el gen de KRAS, el gen de NRAS, el gen de EGFR y el gen de AR.
- 40 8. Método según la reivindicación 7, en el que la secuencia mutada se selecciona de la lista de una amplificación, una mutación puntual, una delección y una inserción.
- 45 9. Método según la reivindicación 5, en el que la secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores de ADN bicatenario se selecciona de la lista de una amplificación del gen de BRAF WT, una mutación puntual del gen de BRAF, una amplificación del gen de KRAS WT, una mutación puntual del gen de KRAS, una amplificación del gen de NRAS WT, una mutación puntual del gen de NRAS, una amplificación del gen de cMyc WT, una amplificación del gen de EGFR WT, una mutación puntual del gen de EGFR, una delección del gen de EGFR, una inserción del gen de EGFR, el gen de AR WT y una mutación puntual del gen de AR.
- 50 10. Método según la reivindicación 5, en el que la secuencia de ácido nucleico relacionada con tumores de ADN monocatenario se selecciona de la lista de una amplificación del gen de cMyc WT, un retrotransposón del elemento nuclear entremezclado largo (LINE), un retrotransposón del elemento nuclear entremezclado corto (SINE) y un retrotransposón del retrovirus endógeno humano (HERV).
- 55 11. Método según la reivindicación 5, en el que la secuencia de ARN se selecciona de la lista de ARNm de cMyc WT, ARNm de LINE, ARNm de SINE, ARNm de HERV, ARNm de receptor de andrógenos (AR) WT y ARNm de la variante de corte y empalme del gen de AR.
- 60 12. Método según las reivindicaciones 1-11, en el que el líquido biológico se selecciona de la lista de sangre, plasma, suero, orina y saliva.

Fig. 1



**Fig. 2**

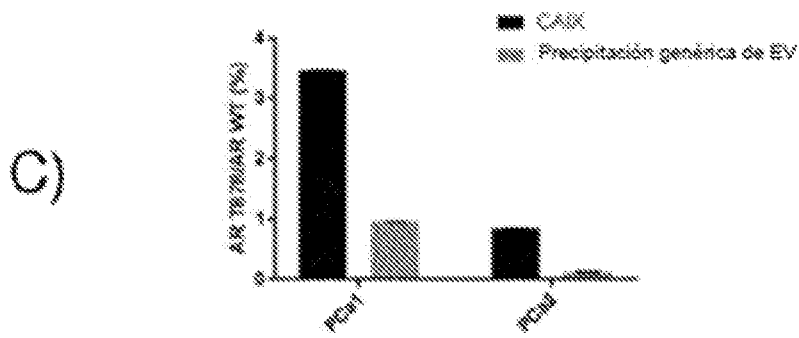
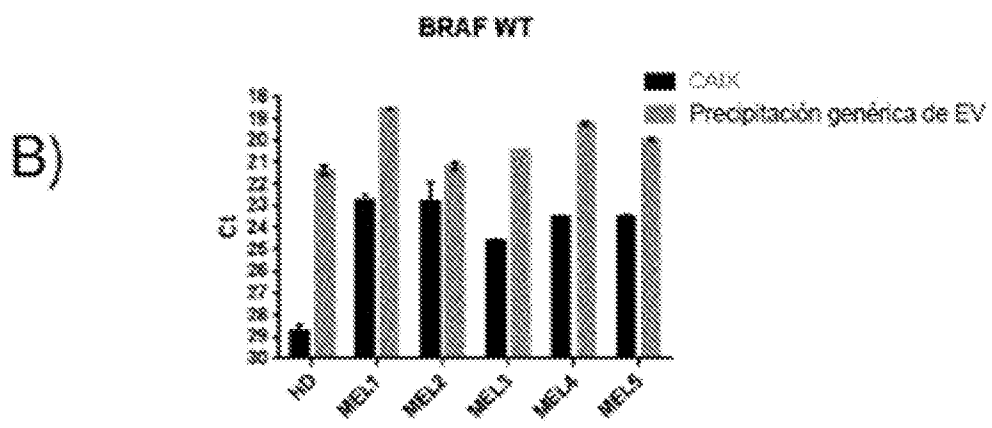
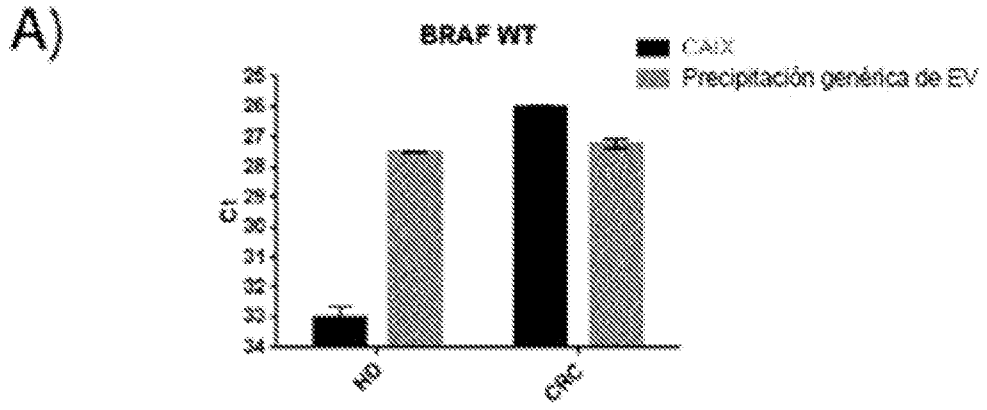


Fig. 3

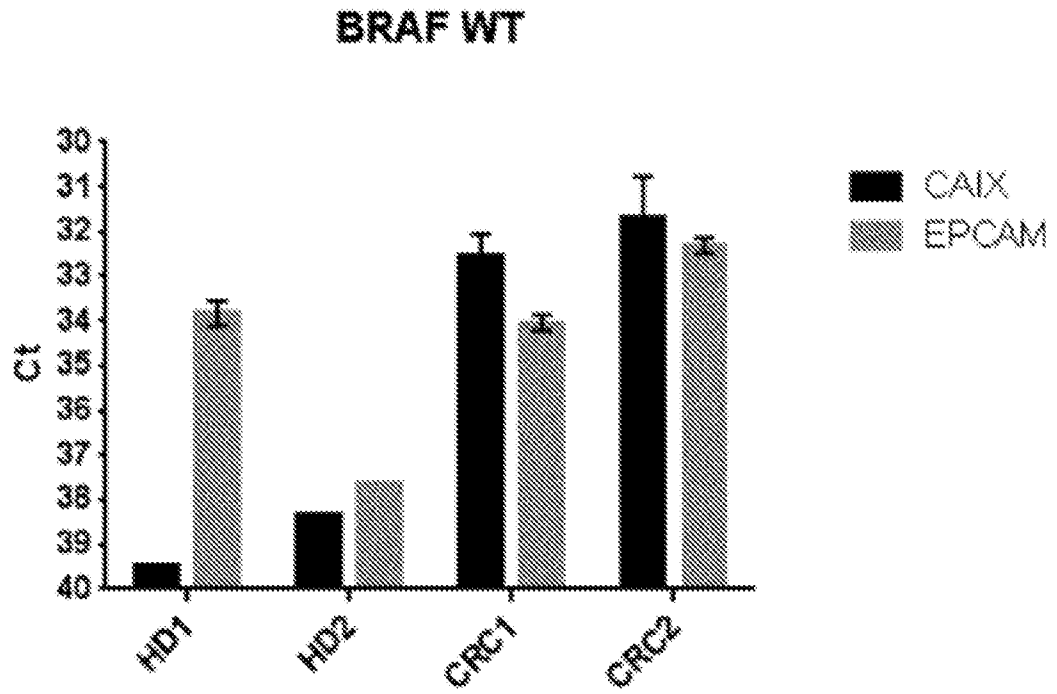


Fig. 4

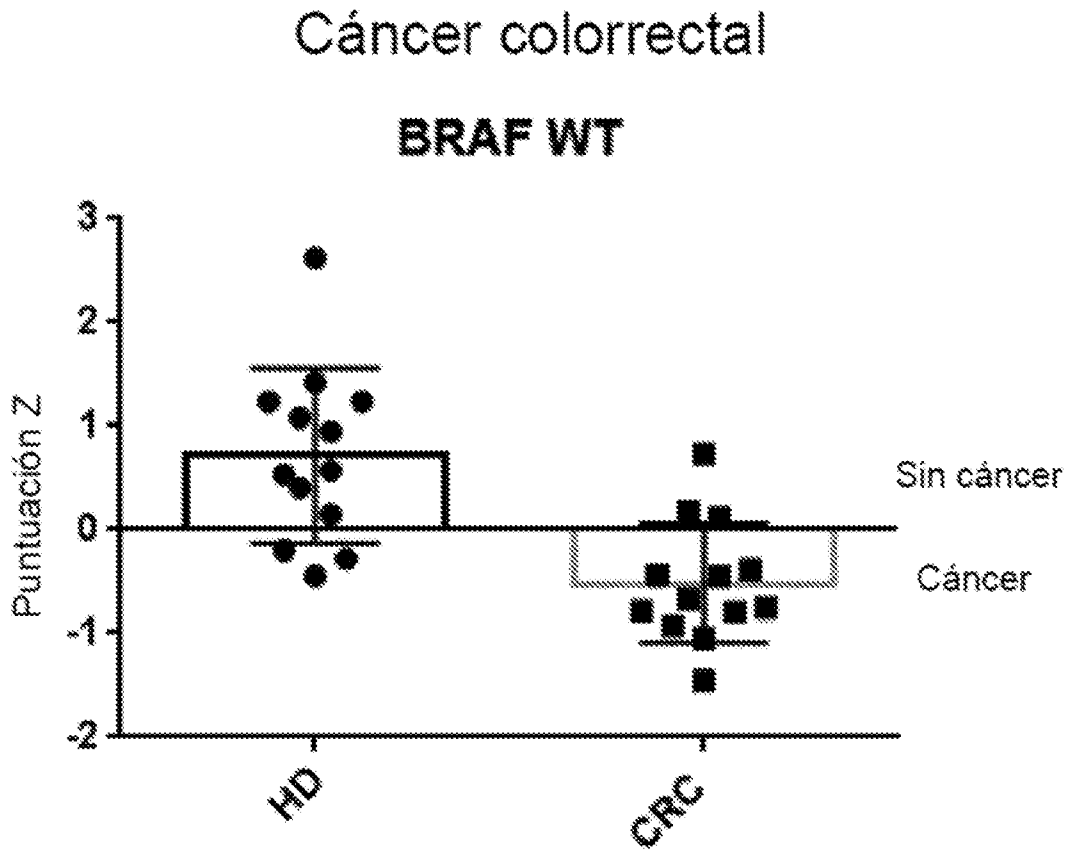


Fig. 5

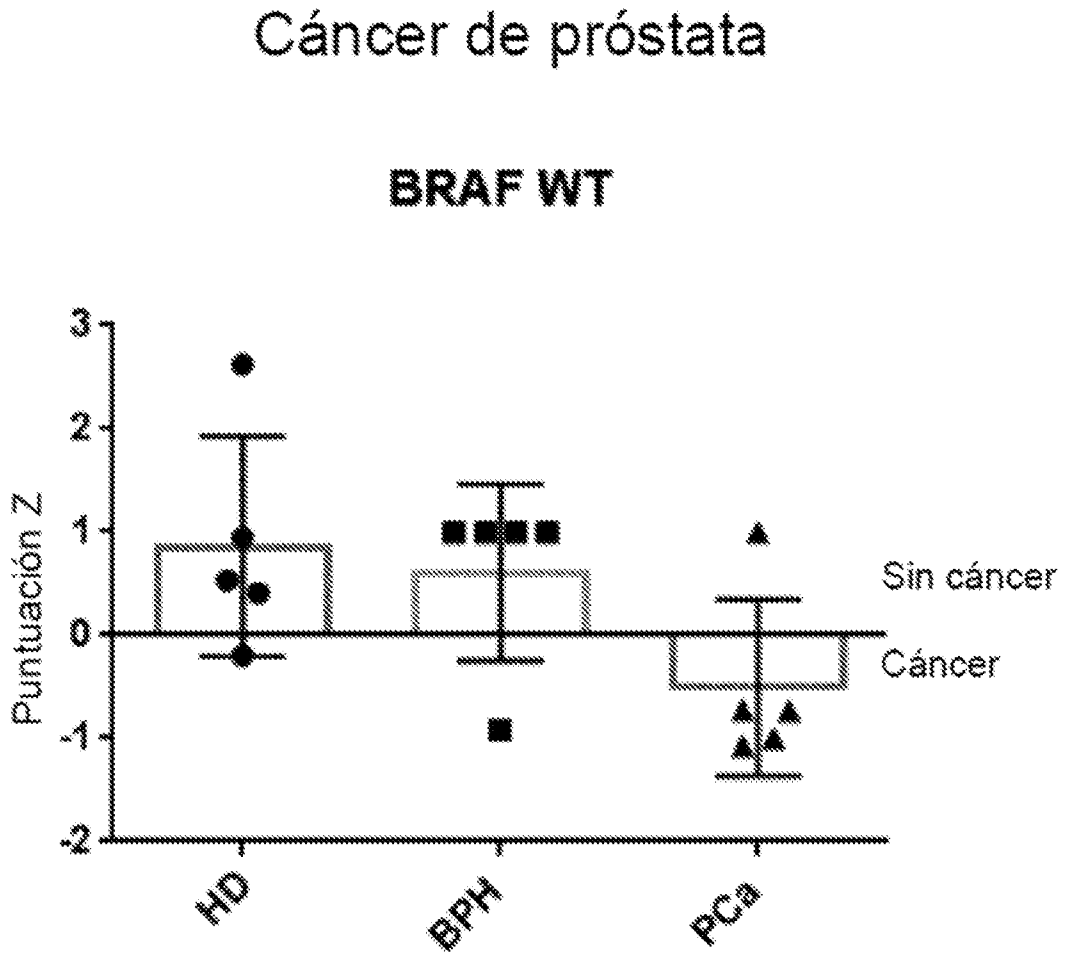


Fig. 6

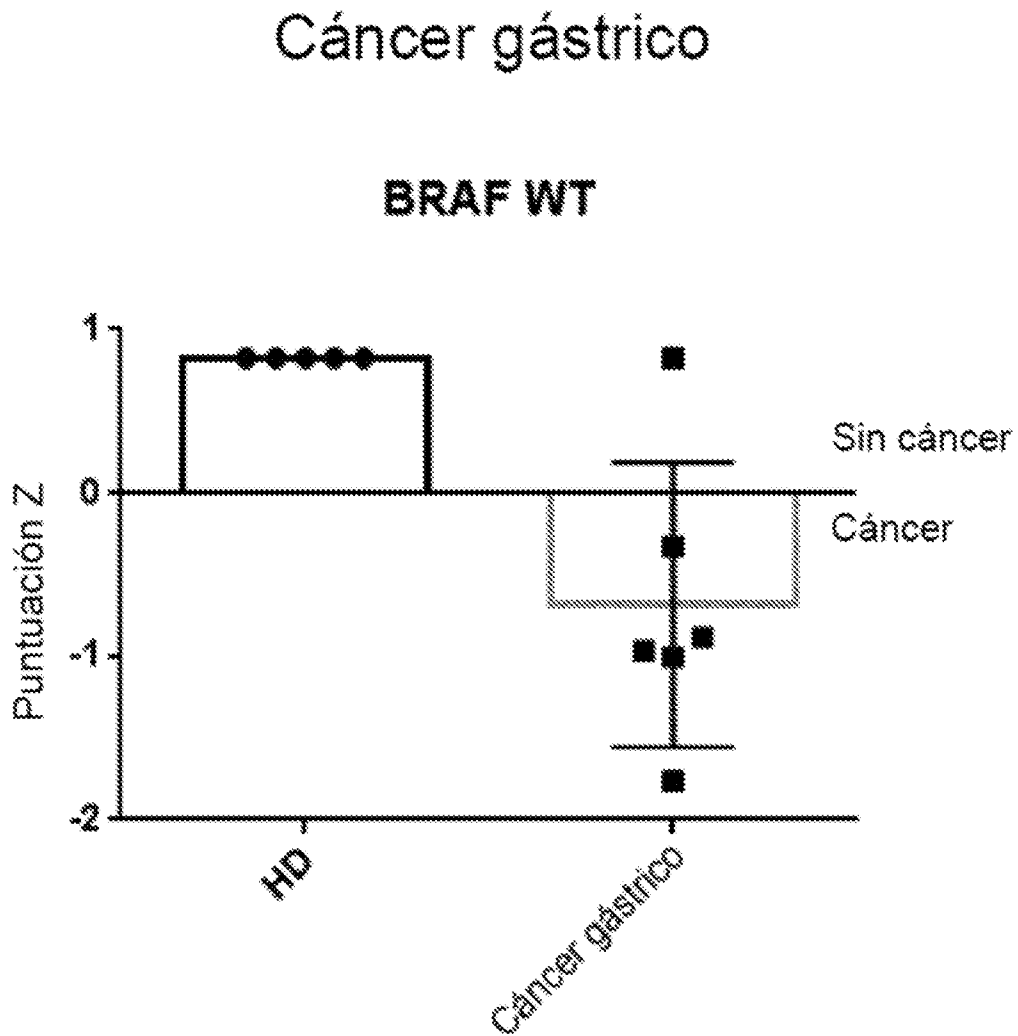


Fig.7

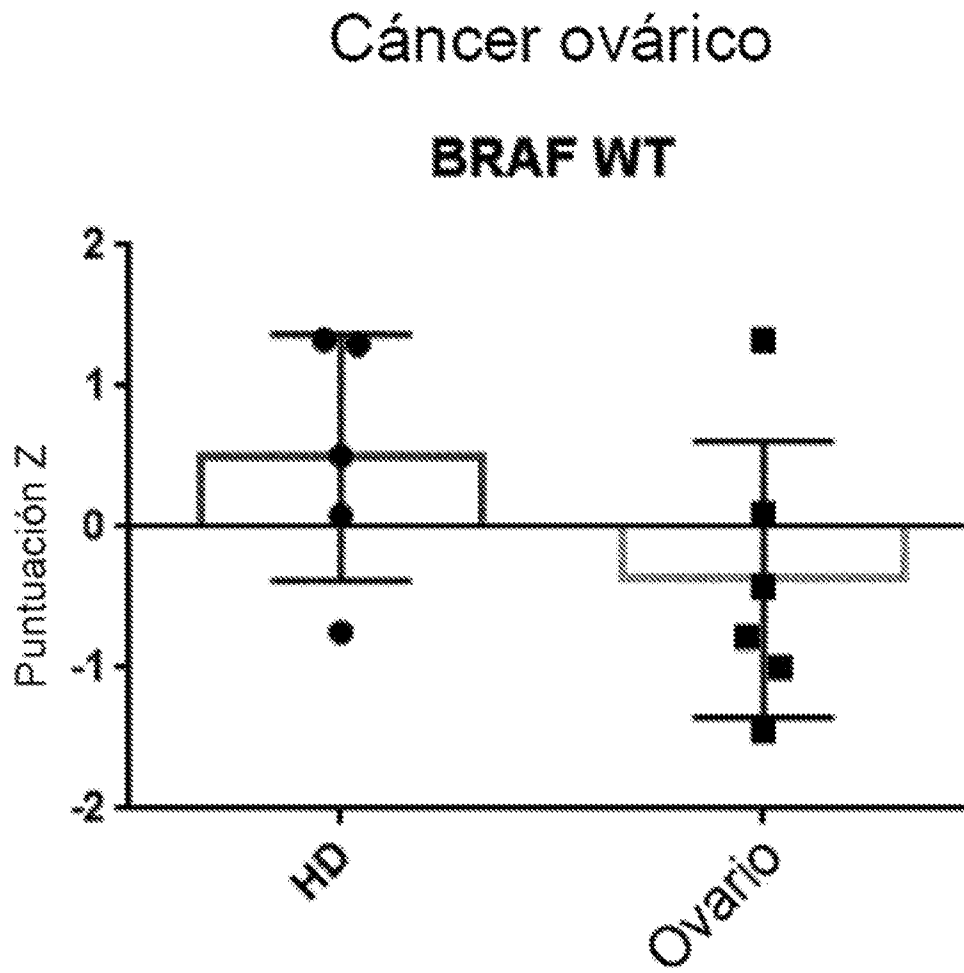
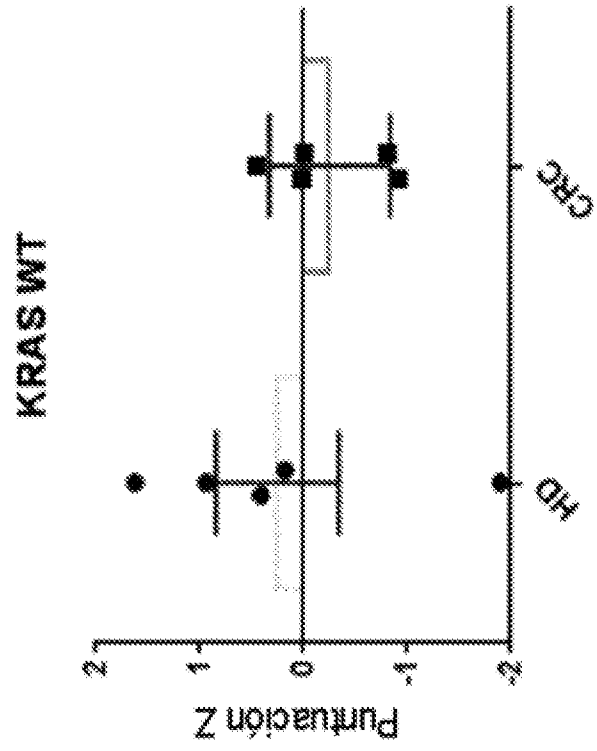


Fig. 8

A)



B)

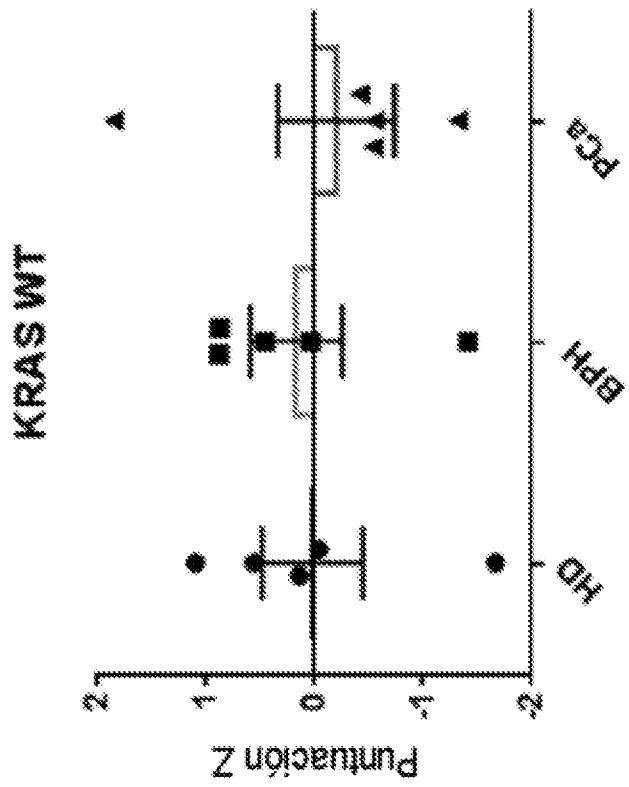


Fig. 9

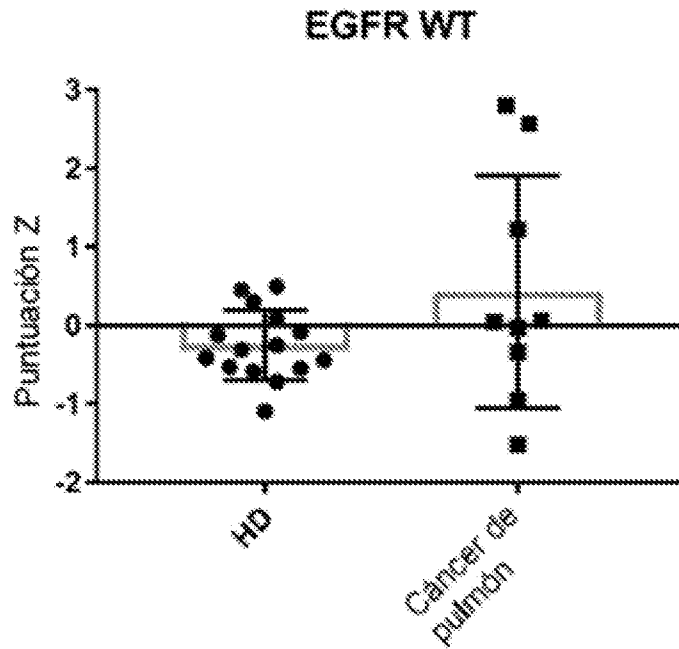


Fig. 10

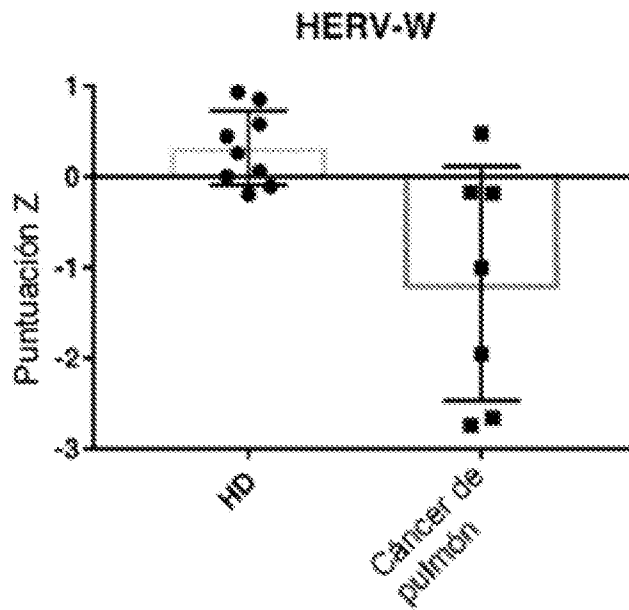


Fig. 11

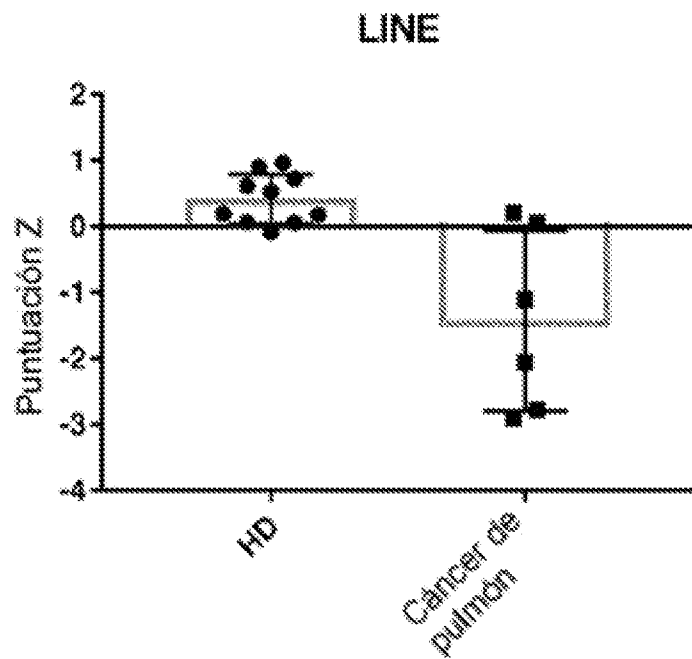


Fig. 12

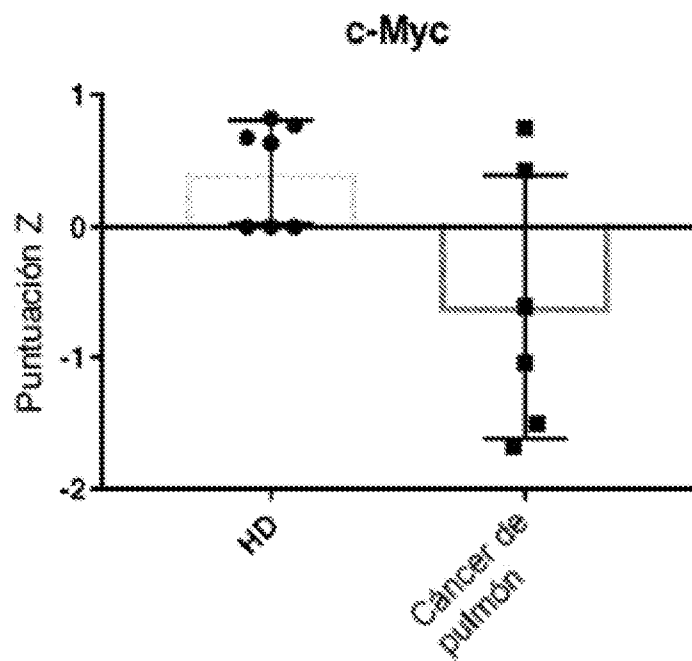


Fig. 13

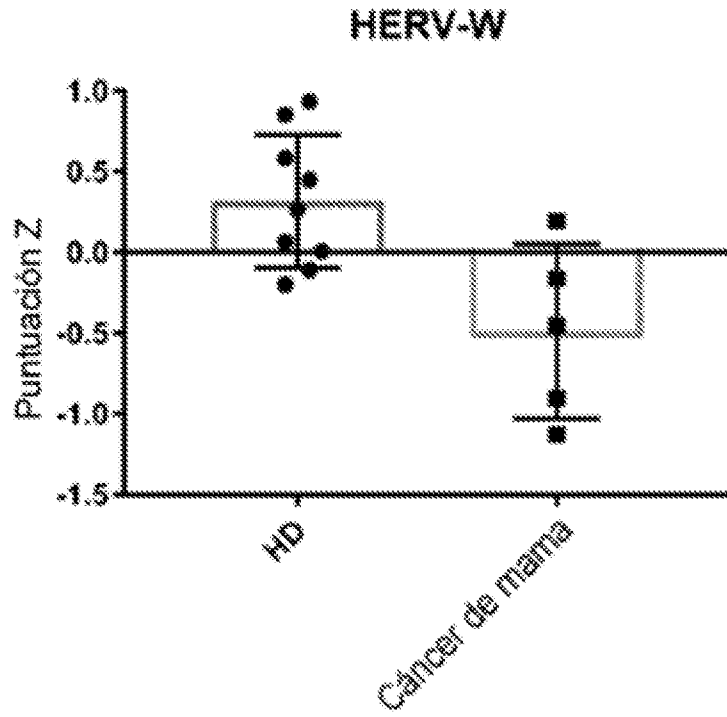


Fig. 14

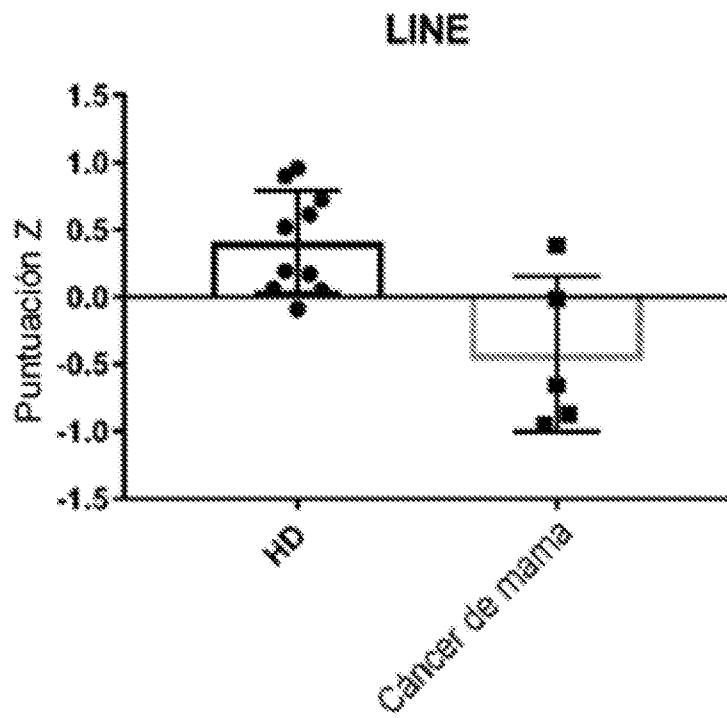


Fig. 15

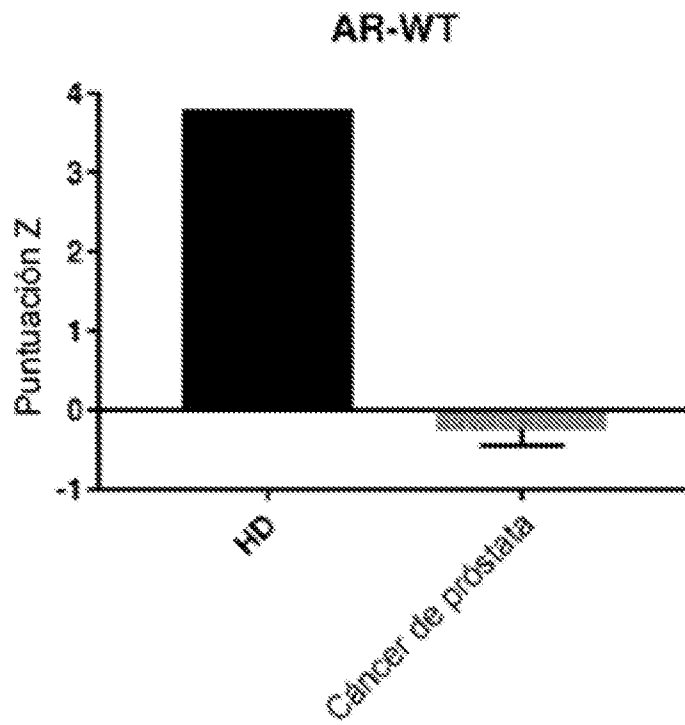


Fig. 16

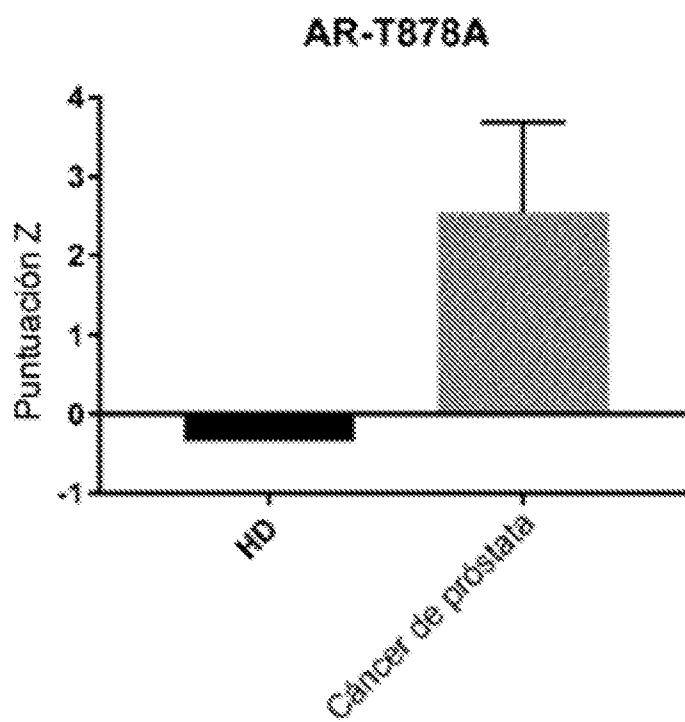


Fig. 17

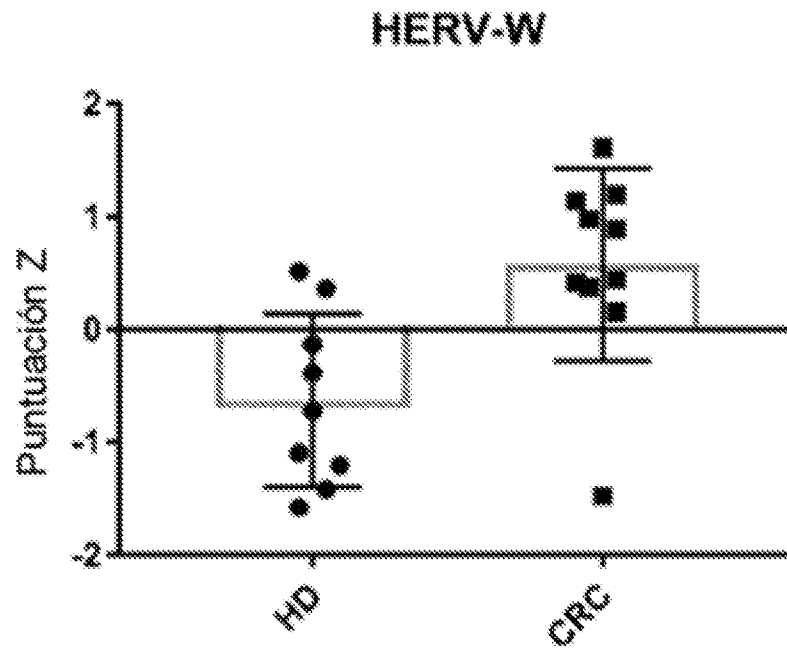


Fig. 18

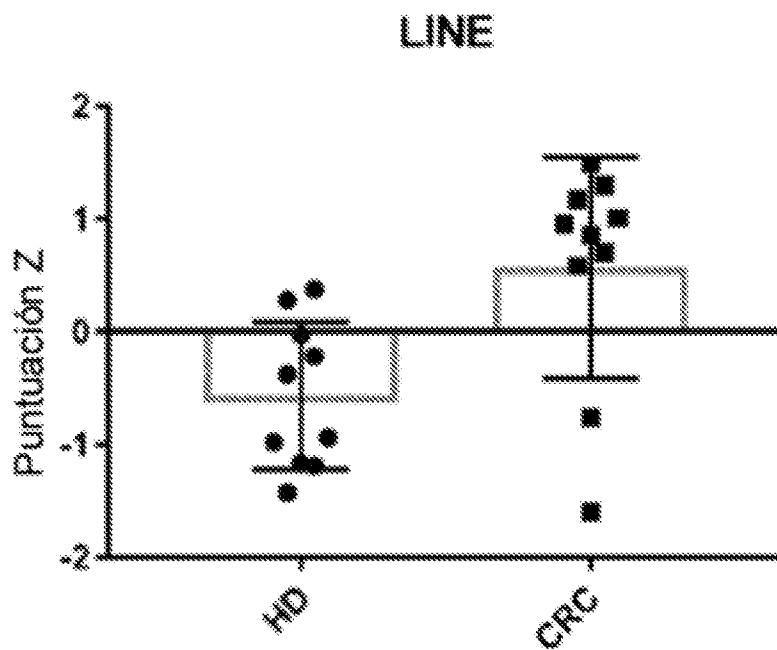


Fig. 19

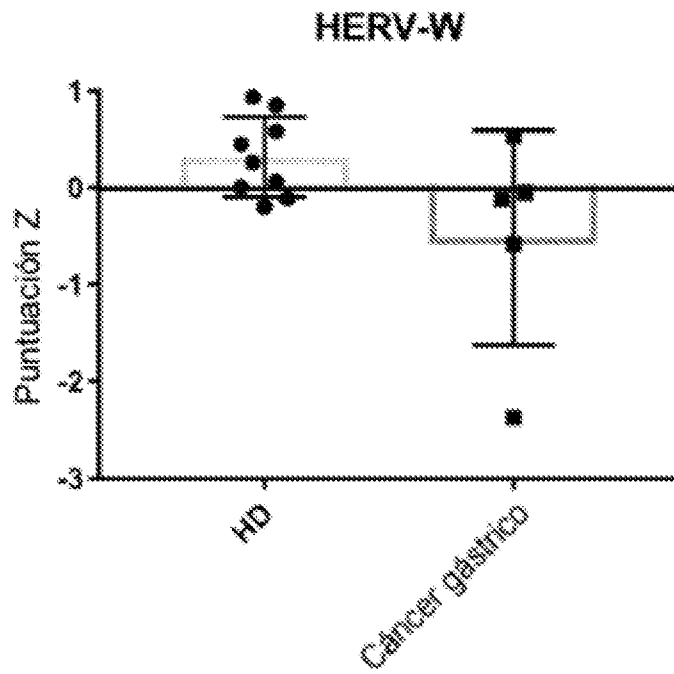
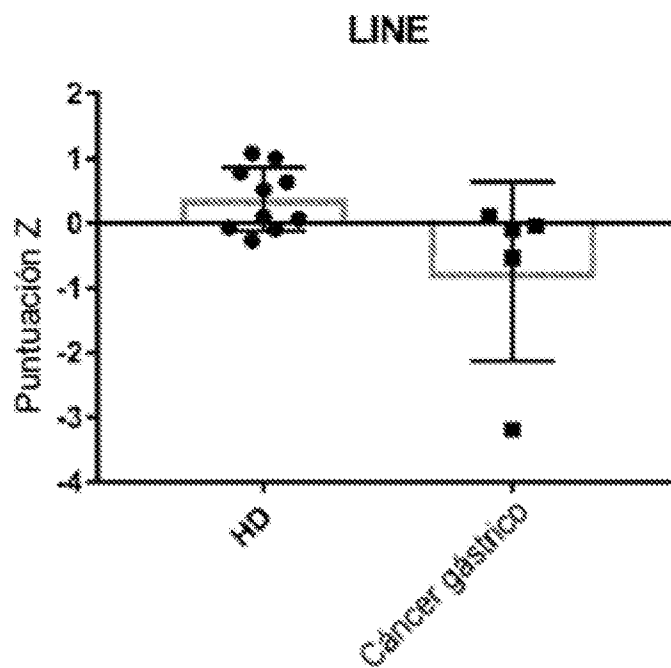
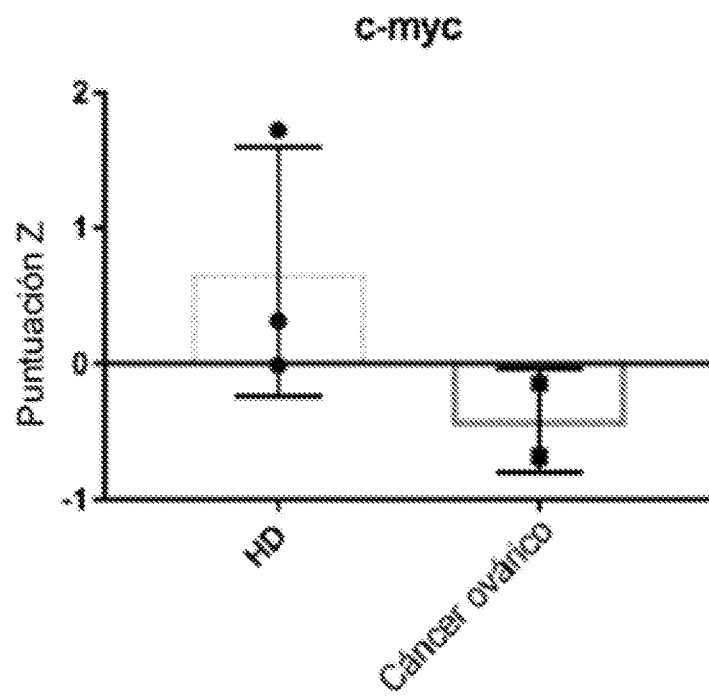


Fig. 20



**Fig. 21**



**Fig. 22**

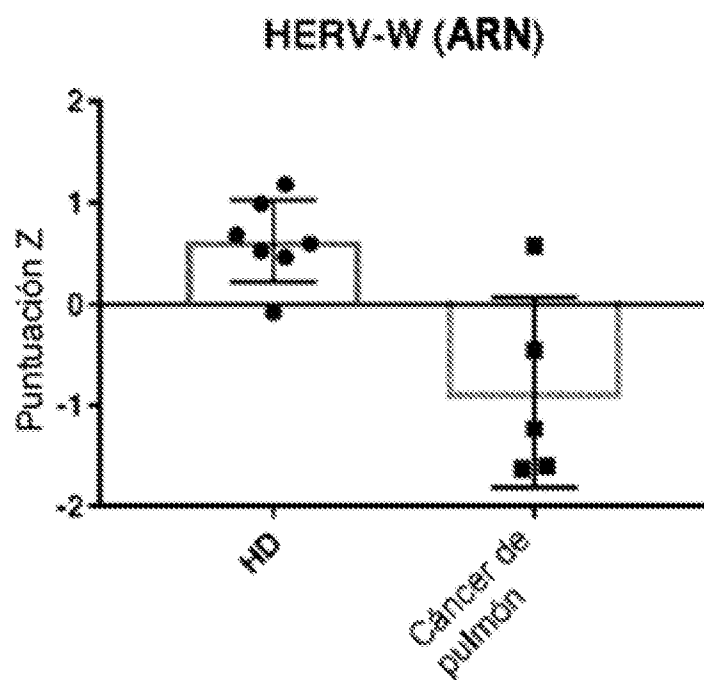


Fig. 23

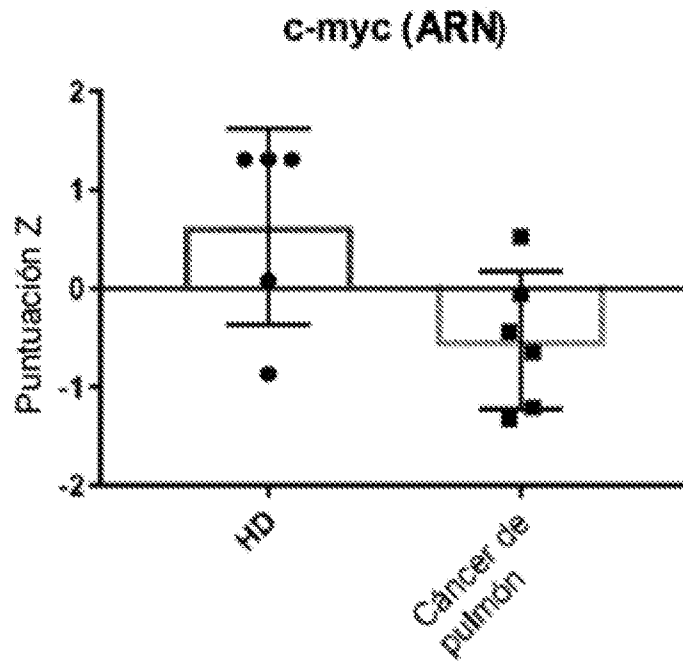


Fig. 24

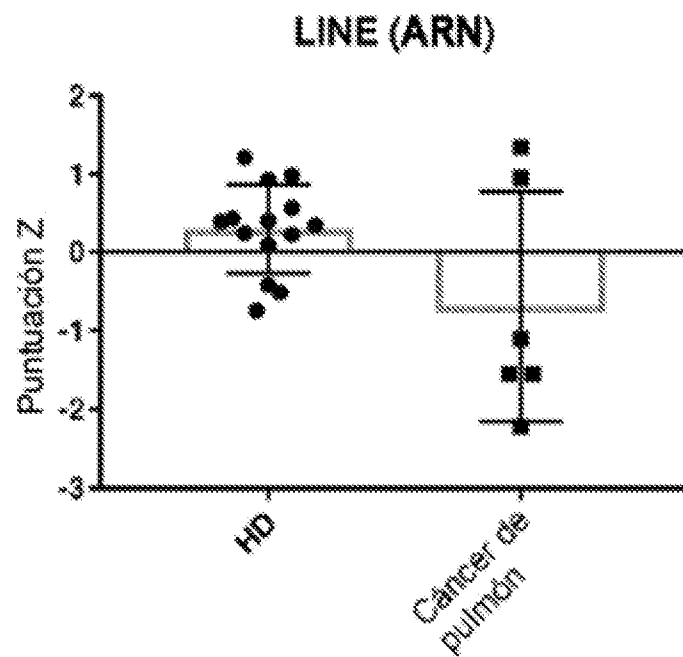


Fig. 25

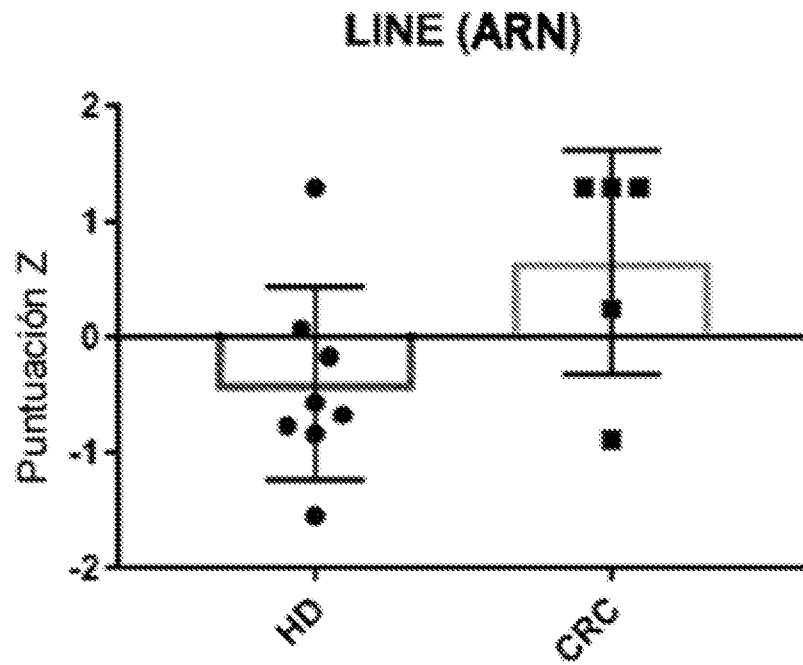


Fig. 26

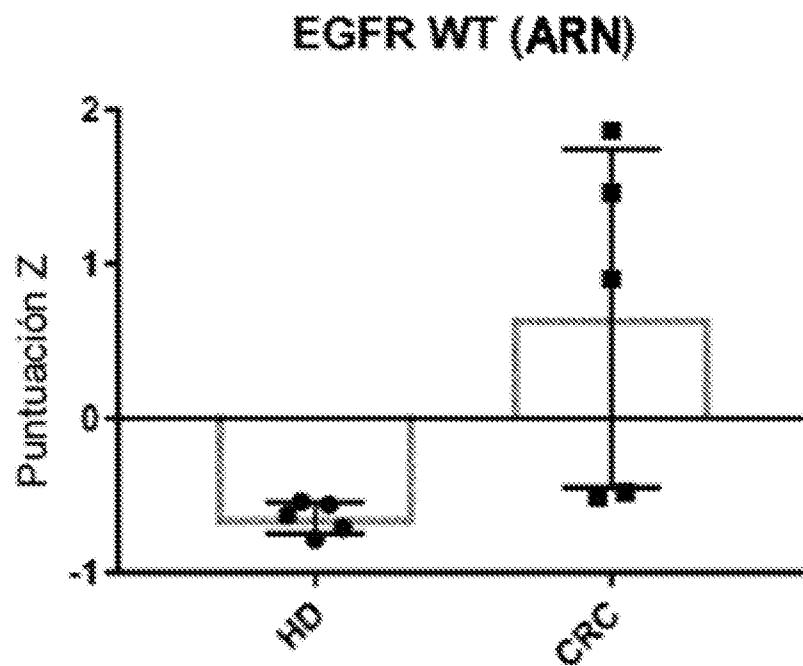


Fig. 27

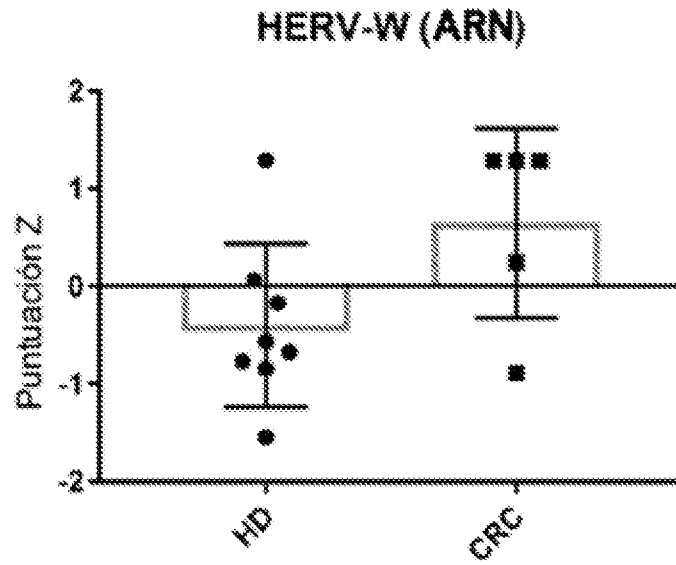


Fig. 28

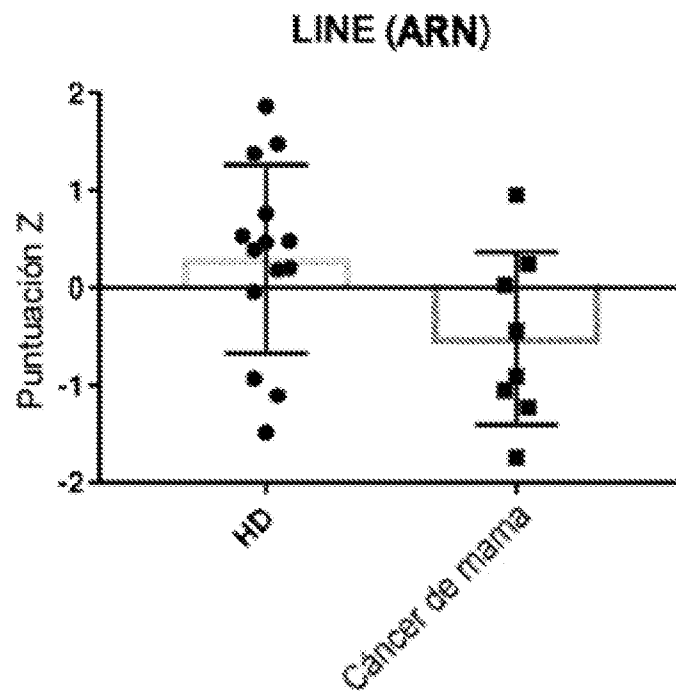


Fig. 29

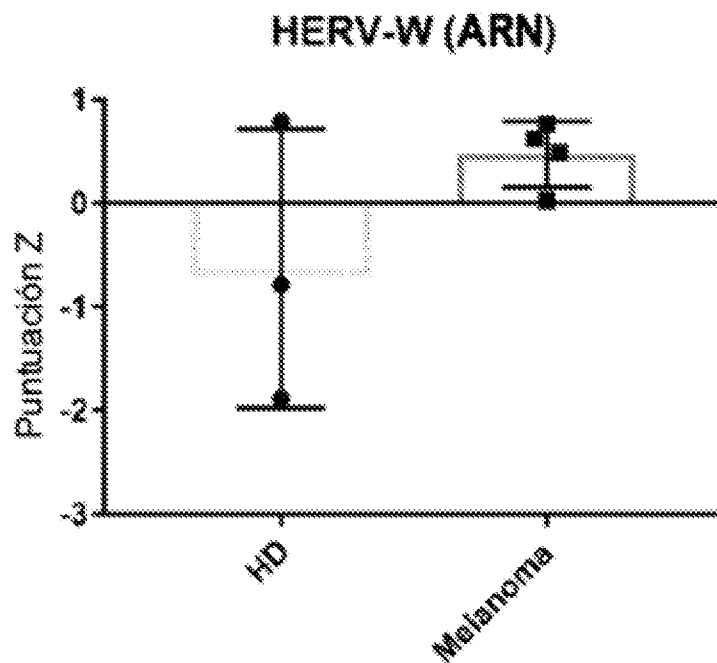


Fig. 30

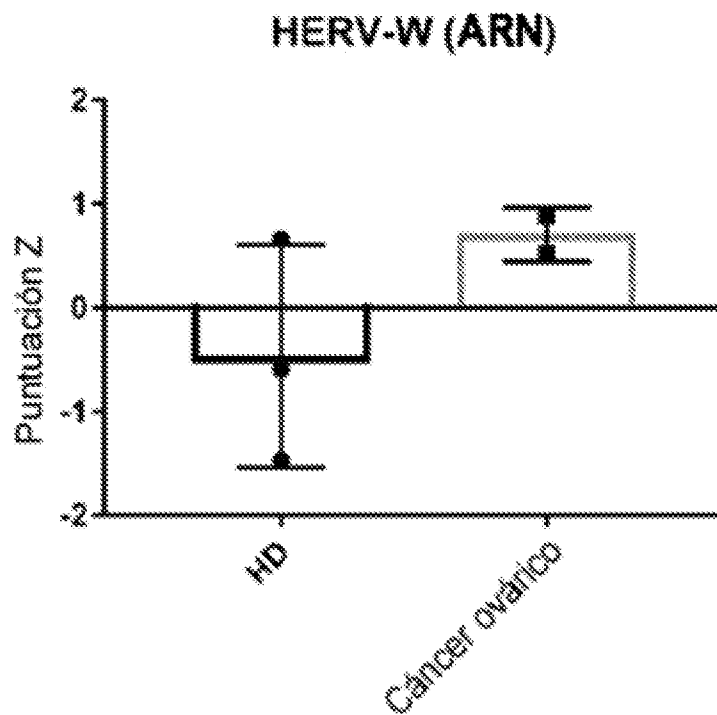


Fig. 31

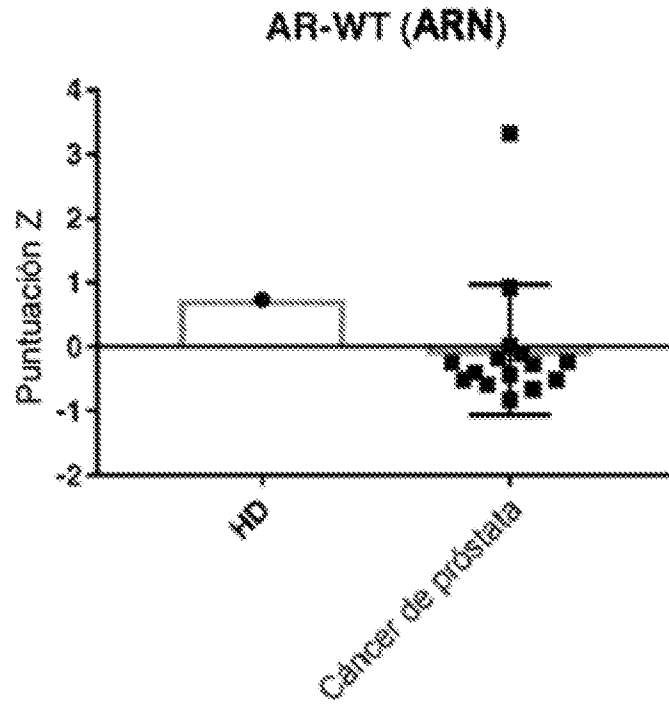


Fig. 32

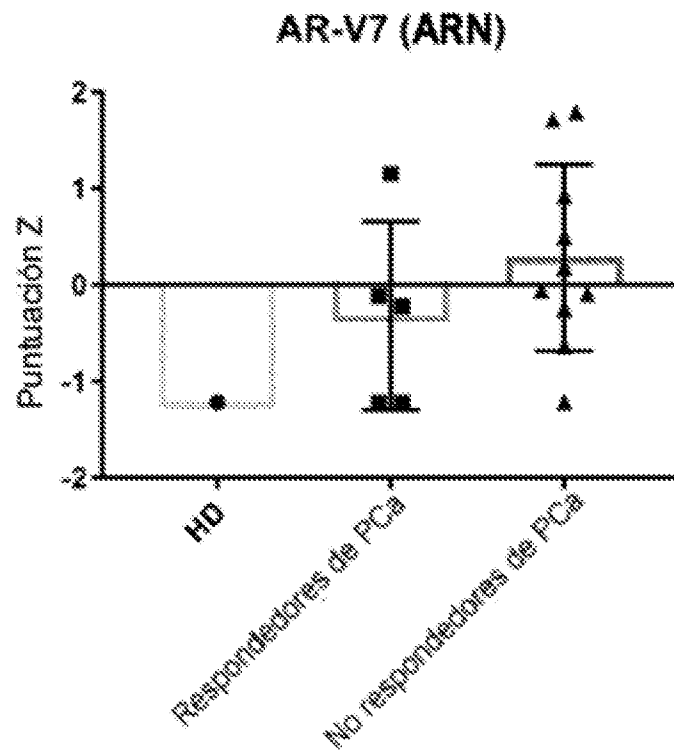


Fig. 33

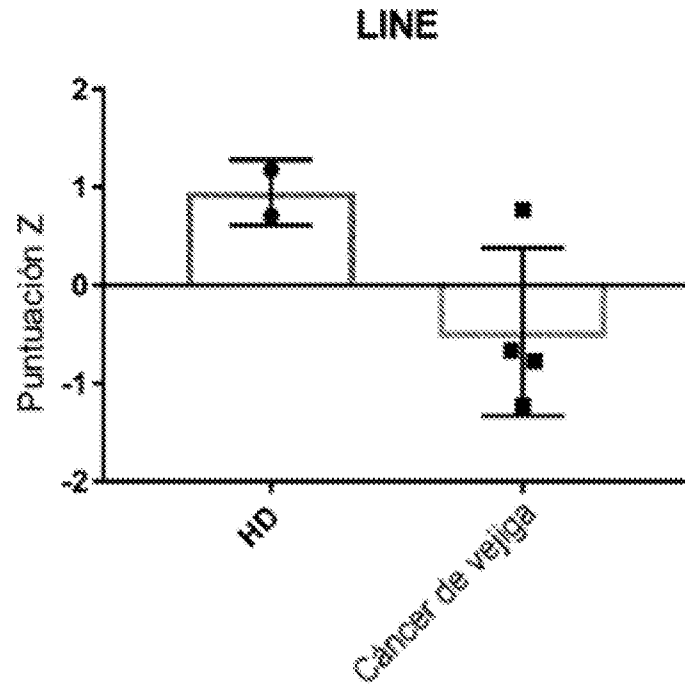
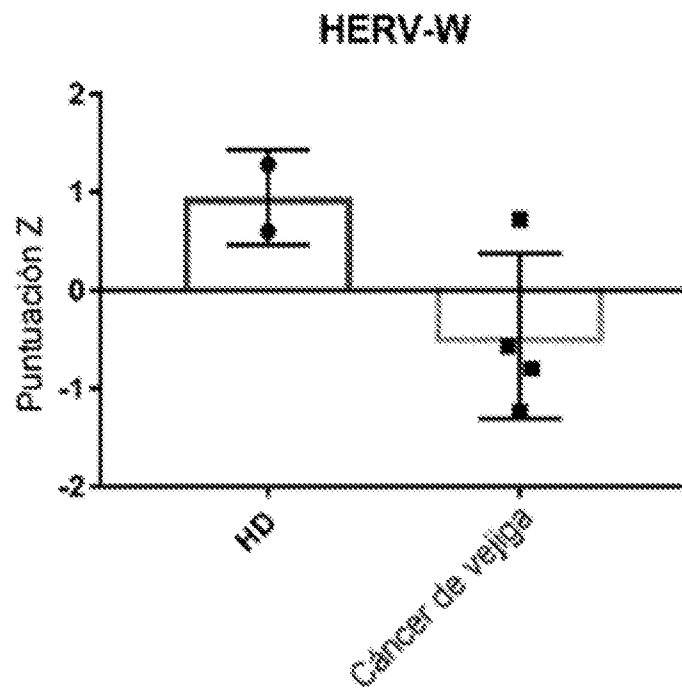
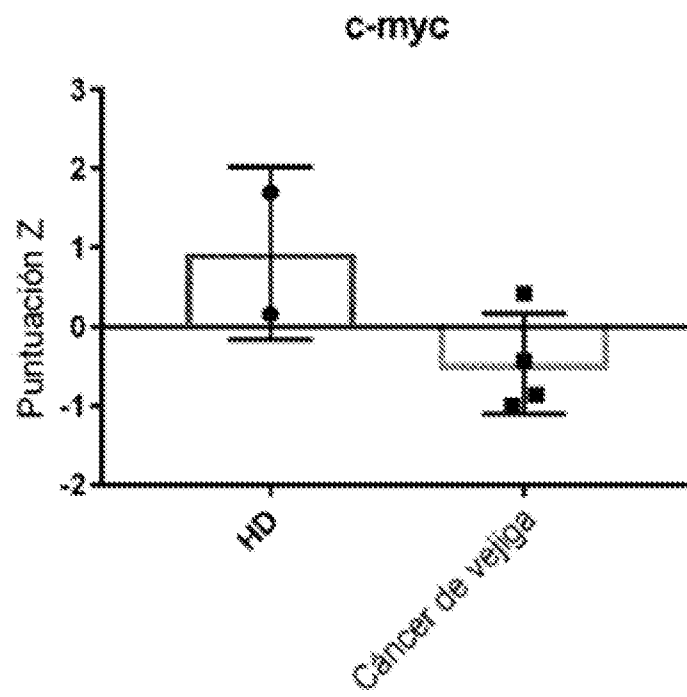


Fig. 34



**Fig. 35**



**Fig. 36**

