República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112015009138-5 A2

(22) Data do Depósito: 23/10/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 20/10/2020

(54) Título: MÉTODOS PARA CARACTERIZAR UM CÂNCER

(51) Int. Cl.: C12N 15/115; C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 02/01/2013 US 61/748,437; 03/04/2013 US 61/808,144; 05/07/2013 US 61/843,256; 06/08/2013 US 61/862,809; 06/09/2013 US 61/874,621; (...).

(71) Depositante(es): CARIS LIFE SCIENCES SWITZERLAND HOLDINGS, S.A.R.L..

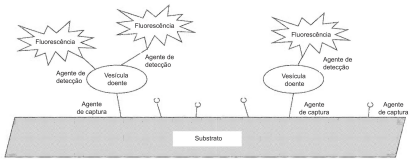
(72) Inventor(es): DAVID D. HALBERT; VALERIY DOMENYUK; DAVID SPETZLER; TASSILO HORNUNG; FRANK SCHAFER; NICK XIAO.

(86) Pedido PCT: PCT IB2013003092 de 23/10/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/068408 de 08/05/2014

(85) Data da Fase Nacional: 22/04/2015

(57) Resumo: MÉTODOS PARA CARACTERIZAR UM CÂNCER. A presente invenção refere-se a métodos e composições para aptâmeros específicos e conjuntos de aptâmeros que se ligam a biomarcadores de interesse, tais como, antígenos de superfície de microvesícula ou fragmentos funcionais dos antígenos de superfície de microvesícula. Em diversas modalidades, os aptâmeros da invenção são usados em processos de diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico para avaliar uma amostra biológica quanto à presença ou níveis de biomarcadores, tais como, microvesículas que são determinadas a fornecer uma leitura de diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico. O diagnóstico, prognóstico, ou teragnóstico pode ser relacionado a câncer ou outras doenças e distúrbios. A invenção também fornece métodos e composição para facilitar a avaliação de biblioteca de aptâmeros e métodos de detecção de aptâmeros.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS PARA CARACTERIZAR UM CÂNCER".**

REFERÊNCIA CRUZADA

[0001] Este pedido reivindica o benefício dos Pedidos de Patente Provisórios nº US 61/717.566, depositado em 23 de outubro de 2012; 61/731.419, depositado em 29 de novembro de 2012; 61/735.915, depositado em 11 de dezembro de 2012; 61/748.437, depositado em 2 de janeiro de 2013; 61/749.773, depositado em 7 de janeiro de 2013; 61/750.331, depositado em 8 de janeiro de 2013; 61/754.471, depositado em 18 de janeiro de 2013; 61/767.131, depositado em 20 de fevereiro de 2013; 61/769.064, depositado em 25 de fevereiro de 2013; 61/805.365, depositado em 26 de março de 2013; 61/808.144, depositado em 3 de abril de 2013; 61/820.419, depositado em 7 de maio de 2013; 61/826.957, depositado em 23 de maio de 2013; 61/838.762, depositado em 24 de junho de 2013; 61/843.256, depositado em 5 de julho de 2013; 61/862.809, depositado em 6 de agosto de 2013; 61/863.828, depositado em 8 de agosto de 2013; 61/866.014, depositado em 14 de agosto de 2013; 61/867.978, depositado em 20 de agosto de 2013; 61/871.107, depositado em 28 de agosto de 2013; e 61/874.621, depositado em 6 de setembro de 2013; em que todos tais pedidos estão incorporados ao presente a título de referência em sua totalidade.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS APRESENTADA POR MEIO DE EFS-WEB

[0002] O conteúdo inteiro da seguinte apresentação eletrônica da listagem de sequências por meio do servidor USPTO EFS-WEB, conforme autorizado e apresentado no MPEP § 1730 II. B.2, é incorporado ao presente a título de referência em sua totalidade para todos os propósitos. A listagem de sequências está dentro do arquivo de texto depositado eletronicamente que é identificado conforme segue:

17/06/2015 860150123953 13:44 NPWB

0000921503534757

Protocolo

BR 11 2015 009138 5

Número

Código QR

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Diretoria de Patentes
Sistema e-Patentes/Depósito

DIRPA e-PATENTES

Tipo de Documento:	DIRPA	Página:
Recibo de Peticionamento Eletrônico		1 / 2

Título do Documento:

Recibo

DIRPA-FQ002 - Petição Relacionada com Pedido, Patente ou Certificado de Adição

Código:	Versão:
RECIBO	01

Modo: **Produção**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial informa:

Este é um documento acusando o recebimento de sua petição conforme especificado abaixo:

Dados do INPI:

Número de processo:	BR 11 2015 009138 5
Número da GRU principal:	00.000.9.2.15.0353475.7 (serviço 260)
Número do protocolo:	860150123953
Data do protocolo:	17 de Junho de 2015, 13:44 (BRT)
Número de referência do envio:	115291

Dados do requerente ou interessado:

Tipo de formulário enviado:	DIRPA-FQ002 v.004
Referência interna:	P213306-csa-EVO
Primeiro requerente ou interessado:	CARIS LIFE SCIENCES SWITZERLAND HOLDINGS, S.A.R.L.
CNPJ do primeiro requerente ou interessado:	Não informado
Número de requerentes ou interessados:	1
Título do pedido:	"APTÂMEROS E USOS DOS MESMOS"

Arquivos enviados:

Arquivo enviado	Documento representado pelo arquivo	Número de páginas
[package-data.xml]	Arquivo com informações do pacote em XML	---
[brf102-request.xml]	Formulário de petição relacionada com pedido, patente ou certificado de adição em XML	---
[application-body.xml]	Arquivo com dados do corpo do conteúdo patentário em XML	---
[brf102-request.pdf]	Formulário de petição relacionada com pedido, patente ou certificado de adição em PDF	
ANEXO EV EMENDAS 29-5-2015 P213306.PDF *[DOCUMENTO.PDF]*	Arquivo com conteúdo técnico-patentário da petição *- Modificações no relatório descritivo* *páginas 1 a 415* *- Modificações nas reivindicações* *páginas 416 a 485* *- Modificações no resumo* *página 486*	486
Desenhos 2,30MB.PDF *[DOCUMENTO-1.PDF]*	Arquivo com conteúdo técnico-patentário da petição *- Modificações nos Desenhos* *páginas 1 a 78*	78
SUBSTABELECIMENTO PARA DEPÓSITO.pdf *[OUTROS-1.pdf]*	Documentos de qualquer outra natureza em formato eletrônico PDF	3
GUIA P213306 260 05-14-2015 1156529.PDF *[GRU-1.PDF]*	Guia de Recolhimento da União (GRU) paga com comprovante de pagamento em formato eletrônico PDF *[Código de serviço: 260, Número: 00.000.9.2.15.0353475.7, Nome do sacado: CARIS LIFE SCIENCES SWITZERLAND HOLDINGS, S.A.R.L.]*	1
esclarecimento.pdf *[INDEXADO-1.pdf]*	Esclarecimentos quanto ao processo em formato eletrônico PDF	1
pROCURAÇÃO.pdf *[INDEXADO-2.pdf]*	Procuração em formato eletrônico PDF	2
Cessão completa 419 p213306.pdf *[INDEXADO-3.pdf]*	Documento de cessão ou autorização do inventor em formato eletrônico PDF	7
Cessão completa 566 p213306.pdf *[INDEXADO-4.pdf]*	Documento de cessão ou autorização do inventor em formato eletrônico PDF	7
Cessão completa 915 P213306.pdf *[INDEXADO-5.pdf]*	Documento de cessão ou autorização do inventor em formato eletrônico PDF	7

Arquivo enviado	Documento representado pelo arquivo	Número de páginas
Documento de alteração de nome p213306.pdf *[OUTROS-2.pdf]*	Documentos de qualquer outra natureza em formato eletrônico PDF	6

Dados sobre o envio:

Responsável pelo envio:	Thaisa Blanco Lopes:285e4847720aa3a3426c39810a1a9a1a
Assinatura (Requerente, Interessado ou Procurador):	CARLOS CEZAR CORDEIRO PIRES:75203014787,OU=Autenticado por Certisign Certificadora Digital,OU=(EM BRANCO),OU=RFB e-CPF A3,OU=Secretaria da Receita Federal do Brasil - RFB,O=ICP-Brasil,C=BR
Método de envio:	Eletrônico pela Internet
Código de segurança:	B4:93:BE:51:82:4E:0D:D1:C9:E5:2A:A2:A5:D2:54:AA:22:D4:C6:93

BANCO DO BRASIL | 001-9 | RECIBO DO SACADO

Local de Pagamento
Pagável em qualquer banco

Vencimento
Vencimento contra apresentação

Cedente
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Agência/Código cedente
2234-9/333.028-1

Data do documento	No documento	Espécie doc.	Aceite	Data Proces.
14/05/2015	1503534757	RC	N	14/05/2015

Nosso Número
00.000.9.2.15.0353475.7

Uso do banco	Carteira	Espécie.	Quantidade	x Valor
	18/027	R$		

(=) Valor documento
90,00

Processo: 1120150091385 NN Complementar: V2.2
Peticionamento: Eletrônico
Cod: 260 Serviço: 260 - Outras petições
Petição Vinculada: RPI: Valor (R$): 90,00

(-) Desconto / Abatimento

(-) Outras deduções

(+) Mora / Multa

(+) Outros acréscimos

P213306 - 23/10/2013 (ACC)
API: 192 Escritório: Dannemann Siemsen Bigler & Ipanema Moreira
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança

(=)Valor Cobrado
90,00

Sacado
Caris Life Sciences Switzerland Holdings, S.a.r.l.
St. Jacobstrasse 199, Citygate Basel, CH/,

Sacador/Avalista

Corte na linha pontilhada

Autenticação mecânica - Controle do Cedente

Bradesco

Comprovante de pagamento de boleto de cobrança

Número comprovante....: 505.640
Meio de pagamento.....: **Captura eletronica via CBCA**
Número do retorno.....: 14.721

Linha digitável.....: 00191000000000090009536310000092150353475721
Cedente.....: INPI-Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Data vencimento.....: 14/05/2015
Data pagamento.....: 14/05/2015
Valor pago.....: R$ 90,00
Agência/conta débito.....: 33693/01104152

Código de barras.....:

o valor referente ao pagamento foi debitado da conta acima identificado.

Recomendamos que seja feita conciliação de conta corrente relativa ao pagamento.

Conciliação conta corrente x Pagamento boleto cobrança:
[ ] Pagamento conciliado
[ ] Pagamento não conciliado

Havendo divergência, contatar com o Gerente Bradesco de sua Agência.

POWER OF ATTORNEY / PROCURAÇÃO

The undersigned / O(s) abaixo assinado(s)

Name/Nome: **Caris Life Sciences Switzerland Holdings, S.a.r.l.** , sociedade suíça

Address/Endereço: St. Jacobstrasse 199, Citygate, CH-4052 Basel (CH) - Suíça

This Power of Attorney is specific and limited to the filing and prosecution of application PCT/IB2013/003092 in Brazil.
Esta procuração é específica e limitada ao depósito e processamento do pedido PCT/IB2013/003092 no Brasil.

hereby grant(s) powers to DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA, PROPRIEDADE INDUSTRIAL LTDA., CNPJ 33.163.049/0001-14, with offices at Rua Marquês de Olinda, nº 70, in the city of Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro and at Avenida Indianópolis, nº 739, in the city of São Paulo, State of São Paulo, Brazil, to represent the grantor(s) before the competent federal, state and municipal governmental agencies and authorities in Brazil, Banks, Central Bank of Brazil for the purposes of obtaining and maintaining intellectual property rights, such as patents of invention and utility models, certificates of addition to patents of invention, registration of trade, service, collective and certification marks as well as registration of geographical indications, and of industrial designs and software. To that end, the grantee is empowered to apply for renewal of protection, make declarations, file oppositions, contestations, replies or appeals; request voluntary reversal of decisions, respond to oppositions and appeals, have access to the official records; comply with official requirements; present written or oral defences; desist, answer, settle, and/or effect payments and receive returns, and emit the respective receipts, of official fees of any nature, including governmental taxes; receive, submit and withdraw documents; apply for and reply to applications for forfeiture; initiate or submit replies to administrative nullity proceedings; apply for or contest applications for compulsory licenses; comply with any formal requirements; apply for the recordal of transfer of title and ownership, and/or change of name and address; apply for the recordal of patent, design and trade mark license agreements as well as of any agreements related to intellectual property rights and transfer of know-how, including franchise agreements; serve extrajudicial cease and desist and warning letters; represent the grantor(s) before the courts, receive summonses on behalf of the grantor(s) exclusively in cases specifically relating to industrial property matters and finally, to take any steps necessary in order to defend the interests of the grantor(s). The grantee is further entitled to substitute the powers hereby granted, in whole or in part. Any acts previously practised by the grantee on behalf of the grantor(s) are hereby expressly ratified.

pela presente concede(m) poderes a DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA, PROPRIEDADE INDUSTRIAL LTDA., CNPJ 33.163.049/0001-14, com escritórios na Rua Marquês de Olinda, 70, na cidade do Rio de Janeiro, RJ, e na Avenida Indianópolis, 739, na cidade de São Paulo, SP, República Federativa do Brasil, para representar a(s) outorgante(s) perante as autoridades e órgãos governamentais federais, estaduais e municipais do Brasil, bancos e instituições financeiras, Banco Central do Brasil, com vistas a obter e manter a proteção de direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção e de modelo de utilidade, certificado de adição de invenção, registro de marca de produto e de serviço, de marca coletiva, de marca de certificação e das indicações geográficas, registro de desenho industrial, registro de "software", podendo, para tanto, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, de taxas, retribuições e impostos, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e de sede, de contratos de licença de exploração de patente, de licença de uso de marca, de licença de uso de desenho industrial, bem como de qualquer outro contrato que envolva propriedade intelectual e transferência de tecnologia, inclusive contratos de franquia, promover notificações, interpelações e protestos extrajudiciais e mais quaisquer outros atos em defesa dos interesses da(s) outorgante(s), representar a(s) outorgante(s) em juízo, receber citações unicamente em litígios relativos especificamente à propriedade industrial e, ainda, substabelecer, no todo ou em parte, os presentes poderes, ficando expressamente ratificados todos os atos anteriormente praticados pela outorgada em nome da(s) outorgante(s).

Place & date / Local e data : Irving, Texas, United States /

Signed by / Assinada por : **Ramin Akhavan**

duly authorised by the grantor(s) / devidamente autorizado(s) pela(s) outorgante(s)

Position / Cargo : General Counsel (Conselheiro geral)

Nationality(ies) / Nacionalidade(s) : American (norte-americana)

Address(es) / Domicílio(s) : 6655 North MacArthur Boulevard, Irving, Texas 75039

(08 de junho de 2015)

Signature(s) / Assinatura(s) : 6/8/2015

No legalisation required / Nenhuma legalização exigida

13º Ofício de Notas
Bruno Marcos Salomão Fialho
Escrevente
Matr. 94114939

Nº DSBIM: **P213306 (1/3)** [INGLÊS]

INSTRUMENTO DE CESSÃO DE DIREITOS DE PATENTE

Número da Pasta: 37901-811.103

CONSIDERANDO QUE, o(s) abaixo assinado(s):

1. *DOMENYUK, Valeriy*
   Tempe, AZ [Arizona], e
2. *SPETZLER, David*
   Scottsdale, AZ [Arizona]

[aqui doravante, "Inventor(es)"], é/são autor(es) de certos aperfeiçoamentos novos e úteis em

"**APTAMEROS 'EpCAM'**",

[ ] para os quais é assinado um Pedido de Patente Norte-Americano na mesma data do presente;

[x] para os quais foi depositado o Pedido Processo Número *61/731.419,* aos *vinte e nove de novembro de dois mil e doze,* na Repartição de Patentes dos Estados Unidos da América;

[ ] para os quais foi depositado o Pedido Processo Número _____, a(os) _____, na Repartição Receptora Norte-Americana do Tratado de Cooperação de Patentes (PCT);

[ ] para os quais foi depositado o Pedido Processo Número _____, a(os) _____, na Repartição de Patentes _____; e/ou

[ ] para os quais foi depositado um pedido sobre o qual expediu-se uma Patente Norte-Americana a/

aos _____, como Patente Norte –Americana Número _____,
[aqui doravante, “Pedido(s)”].

CONSIDERANDO QUE, ***Caris Life Sciences Luxembourg Holdings,*** uma sociedade constituída em conformidade com as leis **de Luxemburgo,** tendo um local de negócios em **102 Rue de Maraîchers, L2124 Luxemburgo, Grão-Ducado de Luxemburgo** [aqui doravante, “Cessionária”], deseja adquirir o total direito, título e interesse em e sobre citado(s) Pedido(s) e as invenções nele(s) reveladas, e em e sobre todas incorporações das invenções, anteriormente concebidas, feitas ou descobertas, seja conjunta ou separadamente, pelo/pelos referido(s) Inventor(es) [aqui doravante, coletivamente, designada(s) como “Invenções”], assim como em e sobre quaisquer e todas patentes, certificados de inventor e outras formas de proteção [aqui doravante, “Patente(s)”] sobre a mesmas concedidas nos Estados Unidos da América, países estrangeiros, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional;

ASSIM SENDO, em consideração de compensação boa e valiosa, reconhecido pelo(s) referido(s) Inventor(es) como tendo sido recebida na íntegra da referida Cessionária:

1. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito vende(m), cede(m), transfere(m) e transmite(m) à referida Cessionária o total direito, título e interesse (a) em e sobre mencionadas Invenções, incluindo o direito de reivindicar prioridade sobre mencionadas Invenções; (b) em e sobre todos direitos sobre todos pedidos de patente e patente(s) norte-americanos e correspondentes não-norte-americanos, incluindo aqueles depositados sob a Convenção de Paris para a Proteção da Propriedade Industrial, o Tratado de Cooperação de Patentes (PCT) ou de outra forma; (c) em e sobre quaisquer e todos pedidos depositados e qualquer/quaisquer e toda(s) patente(s) concedida(s) sobre mencionadas Invenções nos Estados Unidos da América, em qualquer país estrangeiro, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional, incluindo cada e todo pedido depositado e qualquer(quaisquer) e toda(s) patente(s) concedida(s) sobre qualquer pedido que seja uma divisão, substituição, continuação ou continuação em parte de qualquer(quaisquer) de citado(s) pedido(s); e (d) em e sobre cada e toda reemissão, reexame ou extensões de qualquer(quaisquer) da(s) patente(s).

2. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito compromete(m)-se e acorda(m) em cooperar

com dita Cessionária para possibilitar à dita Cessionária desfrutar, no mais amplo sentido, o direito, título e interesse neste transmitidos, nos Estados Unidos da América, países estrangeiros, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional. Tal cooperação pelo(s) referido(s) Inventor(es) incluirá pronta apresentação de fatos e documentos pertinentes, prestação de testemunho, outorga de petições, juramentos, relatórios, declarações ou outros papéis, assim como outra assistência, tudo à medida do considerado necessário ou aconselhável pela referida Cessionária (a) para consumar à dita Cessionária o direito, título e interesse neste transmitidos; (b) para processar quaisquer pedidos cobrindo mencionadas Invenções; (c) para depositar e processar pedidos substitutos, de divisão, continuação ou adicionais cobrindo mencionadas Invenções; (d) para depositar e processar pedidos para reemissão de qualquer(quaisquer) referida(s) patente(s); (e) para interferência ou outros procedimentos de prioridade envolvendo mencionadas Invenções; e (d) para procedimentos legais envolvendo mencionadas Invenções e quaisquer respectivos pedidos e qualquer/quaisquer patente(s) concedida(s) sobre os mesmos, incluindo, sem limitação, reemissões e reexames, procedimentos de oposição, procedimentos de cancelamento,

contestações de prioridade, procedimentos de uso público, ações por infração e ações judiciais; estabelecido, entretanto, que as despesas incorridas pelo(s) referido(s) Inventor(es) ao prestar tal assistência serão custeadas pela referida Cessionária.

3. Os termos e compromissos deste instrumento de cessão reverterão em benefício da referida Cessionária, seus sucessores, cessionários e outros representantes legais, e obrigarão o(s) referido(s) Inventor(es), seus respectivos herdeiros, representantes legais e cessionários.

4. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito garante(m) e declara(m) que não celebrou/celebraram, e não celebrará/celebrarão qualquer cessão, contrato ou compromisso com o presente conflitante.

5. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito solicita(m) que qualquer(quaisquer) patente(s) emitida(s), nos Estados Unidos da América, países estrangeiros, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional, seja(m) emitida(s) em nome da Cessionária, ou seus sucessores e cessionários, para o uso exclusivo de dita Cessionária, seus sucessores, representantes legais e cessionários.

EM TESTEMUNHO DO QUE, dito(s) Inventor(es) outorgou/outorgaram e liberou/liberaram este instrumento

à referida Cessionária, na(s) data(s) a seguir escrita(s):

Data: Sete de janeiro de dois mil e treze.

(assinatura ilegível)

Valeriy Domenyuk.

Data: Sete de janeiro de dois mil e treze.

(assinatura ilegível)

David Spetzler.

RECEBIDO E ACORDADO PELA CESSIONÁRIA:

Data: Quinze de junho de dois mil e quinze.

Por: (assinatura ilegível)

Nome: Ramin Akhavan

Cargo: Vice-Presidente & Consultor em Propriedade Intelectual Chefe.

PATENT ASSIGNMENT	Docket Number 37901-811.103

WHEREAS, the undersigned:

1. DOMENYUK, Valeriy
Tempe, AZ

2. SPETZLER, David
Scottsdale, AZ

(hereinafter "Inventor(s)),"" have invented certain new and useful improvements in

EpCAM APTAMERS

- ☐ for which a United States patent application is executed on even date herewith;
- ☒ for which Application No. 61/731,419 was filed on November 29, 2012 in the United States Patent Office;
- ☐ for which Application No. ___ was filed on ___ in the U.S. Receiving Office of the Patent Cooperation Treaty;
- ☐ for which Application No. ___ was filed on ___ in the ___ Patent Office; and/or
- ☐ for which an application was filed upon which a United States Patent issued on ___, as U.S. Patent No.

(hereinafter "Application(s)").

WHEREAS, Curis Life Sciences Luxembourg Holdings, a corporation of the State OR Commonwealth of Luxembourg, having a place of business at 102 Rue de Maraîchers, L2124 Luxembourg, Grand-Duché de Luxembourg, (hereinafter "Assignee"), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said Application(s) and the inventions disclosed therein, and in and to all embodiments of the inventions, heretofore conceived, made or discovered, whether jointly or severally, by said Inventor(s) (hereinafter collectively referred to as "Inventions"), and in and to any and all patents, inventor's certificates and other forms of protection (hereinafter "Patent(s)") thereon granted in the United States, foreign countries, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty.

NOW, THEREFORE, in consideration of good and valuable consideration acknowledged by said Inventor(s) to have been received in full from said Assignee:

1. Said Inventor(s) do hereby sell, assign, transfer and convey unto said Assignee the entire right, title and interest (a) in and to said Inventions, including the right to claim priority to said Inventions; (b) in and to all rights to all United States and corresponding non-United States patent applications and Patent(s), including those filed under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, The Patent Cooperation Treaty or otherwise; (c) in and to any and all applications filed and any and all Patent(s) granted on said Inventions in the United States, in any foreign country, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty, including each and every application filed and any and all Patent(s) granted on any application which is a divisional, substitution, continuation, or continuation-in-part of any of said Application(s); and (d) in and to each and every reissue, reexamination, or extensions of any of said Patent(s).

2. Said Inventor(s) hereby covenant and agree to cooperate with said Assignee to enable said Assignee to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States, foreign countries, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty. Such cooperation by said Inventor(s) shall include prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said Assignee (a) for perfecting in said Assignee the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any applications covering said Inventions; (c) for filing and prosecuting substitute, divisional, continuing or additional applications covering said Inventions; (d) for filing and prosecuting applications for reissuance of any said Patent(s); (e) for interference or other priority proceedings involving said Inventions; and (f) for legal proceedings involving said Inventions and any applications therefor and any Patent(s) granted thereon, including without limitation reissues and reexaminations, opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said Inventor(s) in providing such cooperation shall be paid for by said Assignee.

3. The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said Assignee, its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said Inventor(s), their respective heirs, legal representatives and assigns.

4. Said Inventor(s) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

5. Said Inventor(s) hereby request that any Patent(s) issuing in the United States, foreign countries, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty, be issued in the name of the Assignee, or its successors and assigns, for the sole use of said Assignee, its successors, legal representatives and assigns.

IN WITNESS WHEREOF, said Inventor(s) have executed and delivered this instrument to said Assignee as of the dates written below:

Date: 01/04/13 Valeriy Domenyuk

Date: 1/7/13 David Spetzler

RECEIVED AND AGREED TO BY ASSIGNEE:

Date: 6/15/2015

By: _____
Name: Ramin Akhavan
Title: VP & Chief IP Counsel

Nº DSBIM: **P213306 (2/3)** [INGLÊS]

INSTRUMENTO DE CESSÃO DE DIREITOS DE PATENTE

Número da Pasta: 37901-812.101

CONSIDERANDO QUE, o(s) abaixo assinado(s):

1. *SPETZLER, David*
   Scottsdale, AZ [Arizona]
2. *DOMENYUK, Valeriy*
   Tempe, AZ [Arizona], e
3. *BROWN, Kirk*
   Phoenix, AZ [Arizona]

[aqui doravante, "Inventor(es)"], é/são autor(es) de certos aperfeiçoamentos novos e úteis em

"**COMPOSIÇÕES DE APTAMERO E MÉTODOS**",

[ ] para os quais é assinado um Pedido de Patente Norte-Americano na mesma data do presente;

[x] para os quais foi depositado o Pedido Processo Número *61/717.566,* aos *vinte e três de outubro de dois mil e doze,* na Repartição de Patentes dos Estados Unidos da América;

[ ] para os quais foi depositado o Pedido Processo Número _____, a(os) _____, na Repartição Receptora Norte-Americana do Tratado de Cooperação de Patentes (PCT);

[ ] para os quais foi depositado o Pedido Processo Número _____, a(os) _____, na Repartição de Patentes _____; e/ou

[ ] para os quais foi depositado um pedido sobre o qual expediu-se uma Patente Norte-Americana a/aos _____, como Patente Norte –Americana Número _____,
[aqui doravante, “Pedido(s)”].

CONSIDERANDO QUE, ***Caris Life Sciences Luxembourg Holdings, sàrl,*** uma sociedade constituída em conformidade com as leis **de Luxemburgo,** tendo um local de negócios em **102 Rue de Maraîchers, L2124 Luxemburgo, Grão-Ducado de Luxemburgo** [aqui doravante, “Cessionária”], deseja adquirir o total direito, título e interesse em e sobre citado(s) Pedido(s) e as invenções nele(s) reveladas, e em e sobre todas incorporações das invenções, anteriormente concebidas, feitas ou descobertas, seja conjunta ou separadamente, pelo/pelos referido(s) Inventor(es) [aqui doravante, coletivamente, designada(s) como “Invenções”], assim como em e sobre quaisquer e todas patentes, certificados de inventor e outras formas de proteção [aqui doravante, “Patente(s)”] sobre a mesmas concedidas nos Estados Unidos da América, países estrangeiros, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional;

ASSIM SENDO, em consideração de compensação boa e valiosa, reconhecido pelo(s) referido(s) Inven-

tor(es) como tendo sido recebida na íntegra da referida Cessionária:

1. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito vende(m), cede(m), transfere(m) e transmite(m) à referida Cessionária o total direito, título e interesse (a) em e sobre mencionadas Invenções, incluindo o direito de reivindicar prioridade sobre mencionadas Invenções; (b) em e sobre todos direitos sobre todos pedidos de patente e patente(s) norte-americanos e correspondentes não-norte-americanos, incluindo aqueles depositados sob a Convenção de Paris para a Proteção da Propriedade Industrial, o Tratado de Cooperação de Patentes (PCT) ou de outra forma; (c) em e sobre quaisquer e todos pedidos depositados e qualquer/quaisquer e toda(s) patente(s) concedida(s) sobre mencionadas Invenções nos Estados Unidos da América, em qualquer país estrangeiro, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional, incluindo cada e todo pedido depositado e qualquer(quaisquer) e toda(s) patente(s) concedida(s) sobre qualquer pedido que seja uma divisão, substituição, continuação ou continuação em parte de qualquer(quaisquer) de citado(s) pedido(s); e (d) em e sobre cada e toda reemissão, reexame ou extensões de qualquer(quaisquer) da(s) patente(s).

2. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito compromete(m)-se e acorda(m) em cooperar com dita Cessionária para possibilitar à dita Cessionária desfrutar, no mais amplo sentido, o direito, título e interesse neste transmitidos, nos Estados Unidos da América, países estrangeiros, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional. Tal cooperação pelo(s) referido(s) Inventor(es) incluirá pronta apresentação de fatos e documentos pertinentes, prestação de testemunho, outorga de petições, juramentos, relatórios, declarações ou outros papéis, assim como outra assistência, tudo à medida do considerado necessário ou aconselhável pela referida Cessionária (a) para consumar à dita Cessionária o direito, título e interesse neste transmitidos; (b) para processar quaisquer pedidos cobrindo mencionadas Invenções; (c) para depositar e processar pedidos substitutos, de divisão, continuação ou adicionais cobrindo mencionadas Invenções; (d) para depositar e processar pedidos para reemissão de qualquer(quaisquer) referida(s) patente(s); (e) para interferência ou outros procedimentos de prioridade envolvendo mencionadas Invenções; e (d) para procedimentos legais envolvendo mencionadas Invenções e quaisquer respectivos pedidos e qualquer/quaisquer patente(s) concedida(s) sobre os mesmos, in-

cluindo, sem limitação, reemissões e reexames, procedimentos de oposição, procedimentos de cancelamento, contestações de prioridade, procedimentos de uso público, ações por infração e ações judiciais; estabelecido, entretanto, que as despesas incorridas pelo(s) referido(s) Inventor(es) ao prestar tal assistência serão custeadas pela referida Cessionária.

3. Os termos e compromissos deste instrumento de cessão reverterão em benefício da referida Cessionária, seus sucessores, cessionários e outros representantes legais, e obrigarão o(s) referido(s) Inventor(es), seus respectivos herdeiros, representantes legais e cessionários.

4. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito garante(m) e declara(m) que não celebrou/celebraram, e não celebrará/celebrarão qualquer cessão, contrato ou compromisso com o presente conflitante.

5. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito solicita(m) que qualquer(quaisquer) patente(s) emitida(s), nos Estados Unidos da América, países estrangeiros, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional, seja(m) emitida(s) em nome da Cessionária, ou seus sucessores e cessionários, para o uso exclusivo de dita Cessionária, seus sucessores, representantes legais e cessionários.

EM TESTEMUNHO DO QUE, dito(s) Inventor(es) outorgou/outorgaram e liberou/liberaram este instrumento à referida Cessionária, na(s) data(s) a seguir escrita(s):

Data: Vinte e quatro de outubro de dois mil e doze.

(assinatura ilegível)

David Spetzler.

Data: Vinte e quatro de outubro de dois mil e doze.

(assinatura ilegível)

Valeriy Domenyuk.

Data: Vinte e quatro de outubro de dois mil e doze.

(assinatura ilegível)

Kirk Brown.

RECEBIDO E ACORDADO PELA CESSIONÁRIA:

Data: Quinze de junho de dois mil e quinze.

Por: (assinatura ilegível)

Nome: Ramin Akhavan

Cargo: Vice-Presidente & Consultor em Propriedade Intelectual Chefe.

PATENT ASSIGNMENT	Docket Number 37901-812.101

WHEREAS, the undersigned:

1. SPETZLER, David
Scottsdale, AZ

2. DOMENYUK, Valeriy
Tempe, AZ

3. BROWN, Kirk
Phoenix, AZ

(hereinafter "Inventor(s)," have invented certain new and useful improvements in

APTAMER COMPOSITIONS AND METHODS

- ☐ for which a United States patent application is executed on even date herewith;
- ☒ for which Application No. 61/717,566 was filed on October 23, 2012 in the United States Patent Office;
- ☐ for which Application No. ___ was filed on ___ in the U.S. Receiving Office of the Patent Cooperation Treaty;
- ☐ for which Application No. ___ was filed on ___ in the ___ Patent Office; and/or
- ☐ for which an application was filed upon which a United States Patent issued on ___, as U.S. Patent No.

(hereinafter "Application(s)").

WHEREAS, Caris Life Sciences Luxembourg Holdings, sàrl, a company organized under the laws of Luxembourg, having a place of business at 102 Rue de Marnichers, L-2124 Luxembourg, Grand-Duché de Luxembourg, (hereinafter "Assignee"), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said Application(s) and the inventions disclosed therein, and in and to all embodiments of the inventions, heretofore conceived, made or discovered, whether jointly or severally, by said Inventor(s) (hereinafter collectively referred to as "Inventions"), and in and to any and all patents, inventor's certificates and other forms of protection (hereinafter "Patent(s)") thereon granted in the United States, foreign countries, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty.

NOW, THEREFORE, in consideration of good and valuable consideration acknowledged by said Inventor(s) to have been received in full from said Assignee:

1. Said Inventor(s) do hereby sell, assign, transfer and convey unto said Assignee the entire right, title and interest (a) in and to said Inventions, including the right to claim priority to said Inventions; (b) in and to all rights to all United States and corresponding non-United States patent applications and Patent(s), including those filed under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, The Patent Cooperation Treaty or otherwise; (c) in and to any and all applications filed and any and all Patent(s) granted on said Inventions in the United States, in any foreign country, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty, including each and every application filed and any and all Patent(s) granted on any application which is a divisional, substitution, continuation, or continuation-in-part of any of said Application(s); and (d) in and to each and every reissue, reexamination, or extensions of any of said Patent(s).

2. Said Inventor(s) hereby covenant and agree to cooperate with said Assignee to enable said Assignee to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States, foreign countries, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty. Such cooperation by said Inventor(s) shall include prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said Assignee (a) for perfecting in said Assignee the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any applications covering said Inventions; (c) for filing and prosecuting substitute, divisional, continuing or additional applications covering said Inventions; (d) for filing and prosecuting applications for reissuance of any said Patent(s); (e) for interference or other priority proceedings involving said Inventions; and (f) for legal proceedings involving said Inventions and any applications therefor and any Patent(s) granted thereon, including without limitation reissues and reexaminations, opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said Inventor(s) in providing such cooperation shall be paid for by said Assignee.

3. The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said Assignee, its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said Inventor(s), their respective heirs, legal representatives and assigns.

4. Said Inventor(s) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

5. Said Inventor(s) hereby request that any Patent(s) issuing in the United States, foreign countries, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty, be issued in the name of the Assignee, or its successors and assigns, for the sole use of said Assignee, its successors, legal representatives and assigns.

IN WITNESS WHEREOF, said Inventor(s) have executed and delivered this instrument to said Assignee as of the dates written below:

Date: 10/24/12 _____
David Spetzler

Date: 10/24/12 _____
Valeriy Domenyuk

Date: 10-24 _____
Kirk Brown

RECEIVED AND AGREED TO BY ASSIGNEE:

Date: 11/15/2012

By: _____
Name: Ramin Akhavan
Title: VP & Chief IP Counsel

Nº DSBIM: **P213306 (3/3)** [INGLÊS]

INSTRUMENTO DE CESSÃO DE DIREITOS DE PATENTE

Número da Pasta: 37901-812.102

CONSIDERANDO QUE, o(s) abaixo assinado(s):

1. *SPETZLER, David*
   Scottsdale, AZ [Arizona], e
2. *DOMENYUK, Valeriy*
   Tempe, AZ [Arizona]

[aqui doravante, "Inventor(es)"], é/são autor(es) de certos aperfeiçoamentos novos e úteis em

"**COMPOSIÇÕES DE APTAMERO E MÉTODOS**",

[ ] para os quais é assinado um Pedido de Patente Norte-Americano na mesma data do presente;

[x] para os quais foi depositado o Pedido Processo Número *61/735.915,* aos *onze de dezembro de dois mil e doze,* na Repartição de Patentes dos Estados Unidos da América;

[ ] para os quais foi depositado o Pedido Processo Número _____, a(os) _____, na Repartição Receptora Norte-Americana do Tratado de Cooperação de Patentes (PCT);

[ ] para os quais foi depositado o Pedido Processo Número _____, a(os) _____, na Repartição de Patentes _____; e/ou

[ ] para os quais foi depositado um pedido sobre o qual expediu-se uma Patente Norte-Americana a/

aos _____, como Patente Norte –Americana Número _____,
[aqui doravante, “Pedido(s)”].

CONSIDERANDO QUE, ***Caris Life Sciences Luxembourg Holdings, sàrl,*** uma sociedade constituída em conformidade com as leis **de Luxemburgo,** tendo um local de negócios em **102 Rue de Maraîchers, L2124 Luxemburgo, Grão-Ducado de Luxemburgo** [aqui doravante, “Cessionária”], deseja adquirir o total direito, título e interesse em e sobre citado(s) Pedido(s) e as invenções nele(s) reveladas, e em e sobre todas incorporações das invenções, anteriormente concebidas, feitas ou descobertas, seja conjunta ou separadamente, pelo/pelos referido(s) Inventor(es) [aqui doravante, coletivamente, designada(s) como “Invenções”], assim como em e sobre quaisquer e todas patentes, certificados de inventor e outras formas de proteção [aqui doravante, “Patente(s)”] sobre a mesmas concedidas nos Estados Unidos da América, países estrangeiros, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional;

ASSIM SENDO, em consideração de compensação boa e valiosa, reconhecido pelo(s) referido(s) Inventor(es) como tendo sido recebida na íntegra da referida Cessionária:

1. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito vende(m), cede(m), transfere(m) e transmite(m) à referida Cessionária o total direito, título e interesse (a) em e sobre mencionadas Invenções, incluindo o direito de reivindicar prioridade sobre mencionadas Invenções; (b) em e sobre todos direitos sobre todos pedidos de patente e patente(s) norte-americanos e correspondentes não-norte-americanos, incluindo aqueles depositados sob a Convenção de Paris para a Proteção da Propriedade Industrial, o Tratado de Cooperação de Patentes (PCT) ou de outra forma; (c) em e sobre quaisquer e todos pedidos depositados e qualquer/quaisquer e toda(s) patente(s) concedida(s) sobre mencionadas Invenções nos Estados Unidos da América, em qualquer país estrangeiro, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional, incluindo cada e todo pedido depositado e qualquer(quaisquer) e toda(s) patente(s) concedida(s) sobre qualquer pedido que seja uma divisão, substituição, continuação ou continuação em parte de qualquer(quaisquer) de citado(s) pedido(s); e (d) em e sobre cada e toda reemissão, reexame ou extensões de qualquer(quaisquer) da(s) patente(s).

2. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito compromete(m)-se e acorda(m) em cooperar

com dita Cessionária para possibilitar à dita Cessionária desfrutar, no mais amplo sentido, o direito, título e interesse neste transmitidos, nos Estados Unidos da América, países estrangeiros, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional. Tal cooperação pelo(s) referido(s) Inventor(es) incluirá pronta apresentação de fatos e documentos pertinentes, prestação de testemunho, outorga de petições, juramentos, relatórios, declarações ou outros papéis, assim como outra assistência, tudo à medida do considerado necessário ou aconselhável pela referida Cessionária (a) para consumar à dita Cessionária o direito, título e interesse neste transmitidos; (b) para processar quaisquer pedidos cobrindo mencionadas Invenções; (c) para depositar e processar pedidos substitutos, de divisão, continuação ou adicionais cobrindo mencionadas Invenções; (d) para depositar e processar pedidos para reemissão de qualquer(quaisquer) referida(s) patente(s); (e) para interferência ou outros procedimentos de prioridade envolvendo mencionadas Invenções; e (d) para procedimentos legais envolvendo mencionadas Invenções e quaisquer respectivos pedidos e qualquer/quaisquer patente(s) concedida(s) sobre os mesmos, incluindo, sem limitação, reemissões e reexames, procedimentos de oposição, procedimentos de cancelamento,

contestações de prioridade, procedimentos de uso público, ações por infração e ações judiciais; estabelecido, entretanto, que as despesas incorridas pelo(s) referido(s) Inventor(es) ao prestar tal assistência serão custeadas pela referida Cessionária.

3. Os termos e compromissos deste instrumento de cessão reverterão em benefício da referida Cessionária, seus sucessores, cessionários e outros representantes legais, e obrigarão o(s) referido(s) Inventor(es), seus respectivos herdeiros, representantes legais e cessionários.

4. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito garante(m) e declara(m) que não celebrou/celebraram, e não celebrará/celebrarão qualquer cessão, contrato ou compromisso com o presente conflitante.

5. Dito(s) Inventor(es) nesta e melhor forma de direito solicita(m) que qualquer(quaisquer) patente(s) emitida(s), nos Estados Unidos da América, países estrangeiros, ou sob qualquer convenção, acordo, protocolo ou tratado internacional, seja(m) emitida(s) em nome da Cessionária, ou seus sucessores e cessionários, para o uso exclusivo de dita Cessionária, seus sucessores, representantes legais e cessionários.

EM TESTEMUNHO DO QUE, dito(s) Inventor(es) outorgou/outorgaram e liberou/liberaram este instrumento

à referida Cessionária, na(s) data(s) a seguir escrita(s):

Data: Vinte e quatro de janeiro de dois mil e treze.

(assinatura ilegível)

David Spetzler.

Data: Vinte e cinco de janeiro de dois mil e treze.

(assinatura ilegível)

Valeriy Domenyuk.

RECEBIDO E ACORDADO PELA CESSIONÁRIA:

Data: Quinze de junho de dois mil e quinze.

Por: (assinatura ilegível)

Nome: Ramin Akhavan

Cargo: Vice-Presidente & Consultor em Propriedade Intelectual Chefe.

PATENT ASSIGNMENT	Docket Number 37901-812.102

WHEREAS, the undersigned:

1. SPETZLER, David
Scottsdale, AZ

2. DOMENYUK, Valeriy
Tempe, AZ

(hereinafter "Inventor(s)," have invented certain new and useful improvements in

APTAMER COMPOSITIONS AND METHODS

- ☐ for which a United States patent application is executed on even date herewith;
- ☒ for which Application No. 61/735,915 was filed on December 11, 2012 in the United States Patent Office;
- ☐ for which Application No. ___ was filed on ___ in the U.S. Receiving Office of the Patent Cooperation Treaty;
- ☐ for which Application No. ___ was filed on ___ in the ___ Patent Office; and/or
- ☐ for which an application was filed upon which a United States Patent issued on ___, as U.S. Patent No.

(hereinafter "Application(s)").

WHEREAS, Caris Life Sciences Luxembourg Holdings, sàrl, a company organized under the laws of Luxembourg, having a place of business at 102 Rue de Maraîchers, L2124 Luxembourg, Grand-Duché de Luxembourg, (hereinafter "Assignee"), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said Application(s) and the inventions disclosed therein, and in and to all embodiments of the inventions, heretofore conceived, made or discovered, whether jointly or severally, by said Inventor(s) (hereinafter collectively referred to as "Inventions"), and in and to any and all patents, inventor's certificates and other forms of protection (hereinafter "Patent(s)") thereon granted in the United States, foreign countries, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty.

NOW, THEREFORE, in consideration of good and valuable consideration acknowledged by said Inventor(s) to have been received in full from said Assignee:

1. Said Inventor(s) do hereby sell, assign, transfer and convey unto said Assignee the entire right, title and interest (a) in and to said Inventions, including the right to claim priority to said Inventions; (b) in and to all rights to all United States and corresponding non-United States patent applications and Patent(s), including those filed under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, The Patent Cooperation Treaty or otherwise; (c) in and to any and all applications filed and any and all Patent(s) granted on said Inventions in the United States, in any foreign country, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty, including each and every application filed and any and all Patent(s) granted on any application which is a divisional, substitution, continuation, or continuation-in-part of any of said Application(s); and (d) in and to each and every reissue, reexamination, or extensions of any of said Patent(s).

2. Said Inventor(s) hereby covenant and agree to cooperate with said Assignee to enable said Assignee to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States, foreign countries, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty. Such cooperation by said Inventor(s) shall include prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said Assignee (a) for perfecting in said Assignee the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any applications covering said Inventions; (c) for filing and prosecuting substitute, divisional, continuing or additional applications covering said Inventions; (d) for filing and prosecuting applications for reissuance of any said Patent(s); (e) for interference or other priority proceedings involving said Inventions; and (f) for legal proceedings involving said Inventions and any applications therefor and any Patent(s) granted thereon, including without limitation reissues and reexaminations, opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said Inventor(s) in providing such cooperation shall be paid for by said Assignee.

3. The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said Assignee, its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said Inventor(s), their respective heirs, legal representatives and assigns.

4. Said Inventor(s) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

5. Said Inventor(s) hereby request that any Patent(s) issuing in the United States, foreign countries, or under any international convention, agreement, protocol, or treaty, be issued in the name of the Assignee, or its successors and assigns, for the sole use of said Assignee, its successors, legal representatives and assigns.

IN WITNESS WHEREOF, said Inventor(s) have executed and delivered this instrument to said Assignee as of the dates written below:

Date: 1/24/13 David Spetzler

Date: 1/25/13 Valeriy Domenyuk

RECEIVED AND AGREED TO BY ASSIGNEE:

Date: 4/15/2015

By: _____
Name: Ramin Akhavan
Title: VP & Chief IP Counsel

Fase Nacional Brasileira do pedido PCT/IB2013/003092 de 23/10/2013
em nome de CARIS LIFE SCIENCES SWITZERLAND HOLDINGS, S.A.R.L.
Data da entrada fase Nacional: 22/04/2015
No. Oficial: BR112015009138-5
Referência do procurador: P213306

ESCLARECIMENTOS/REQUERIMENTOS

1. em 22/04/2015 a requerente apresentou tempestivamente nesse órgão a fase nacional do pedido PCT em referência. Com sua petição de depósito foram anexados, além dos dados completos do pedido internacional, texto em INGLÊS do PCT em questão, incluindo relatório descritivo, reivindicações, resumo e desenhos,

2. nos termos da Resolução PR Nº 77/2013, a requerente apresenta agora o correspondente texto do pedido em língua vernácula, anexando a correspondente guia de recolhimento;

3. Por economia processual e nos termos do disposto no ART. 220 da Lei 9279/96 de 14.05.96, requer-se a juntada da presente ao processo supra para que produza os devidos efeitos legais, com o consequente processamento do mesmo de forma regular.

4. Esclarece a requerente que a divergência do nome da depositante constante do pedido Internacional / fase nacional brasileira (**Caris Life Sciences <u>Switzerland</u> Holdings, S.a.r.l.**) versus nome constante nos pedidos prioritários reivindicados no presente pedido PCT ((**Caris Life Sciences** <u>Luxembourgh</u> **Holdings, S.a.r.l.**) se deve a mera alteração de endereço (país) e consequentemente nome da depositante, conforme exposto na cópia simples do extrato e registro de comércio.

CCP/ASG

DANNEMANN
SIEMSEN
BIGLER &
IPANEMA MOREIRA

PROPRIEDADE INDUSTRIAL

DECLARAÇÃO

Declaro, sob as penas da lei, que os documentos anexos a presente petição constituem cópias fiéis dos originais, reproduzindo-lhes a forma e o conteúdo.

Rio de Janeiro,

Nome: Ana Cláudia Marques da Conceição

CPF: 076.142.287-07

13º OFÍCIO DE NOTAS
Ricardo da Silva Diniz
Substituto
Matrícula 91/49
Av. Rio Branco 135 - 3º
Grupos 312/319 - RJ
Rio de Janeiro

DANNEMANN – 103

P R O C U R A Ç Ã O BASTANTE QUE FAZ: **DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA, PROPRIEDADE INDUSTRIAL LTDA,** NA FORMA ABAIXO:

CERTIDÃO

LIVRO: 851 FOLHAS: 024/025 ATO: 17 DATA: 25/02/2015

SAIBAM quantos este público instrumento de procuração bastante virem que, no ano dois mil e quinze, aos 25 (vinte e cinco) dias do mês de Fevereiro, nesta cidade do Rio de Janeiro, neste cartório do 13º Ofício de Notas, sito na Av. Rio Branco nº 135/3º andar, perante mim, **RICARDO DA SILVA DINIZ,** Substituto, compareceu como **OUTORGANTE: DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA, PROPRIEDADE INDUSTRIAL LTDA,** Sociedade de agentes da propriedade industrial, com escritório na Rua Marquês de Olinda, 70 nesta cidade, inscrita no CNPJ sob o n.º 33.163.049/0001-14, neste ato representada por seu sócio **Carlos Cezar Cordeiro Pires,** brasileiro, solteiro, agente da propriedade industrial, API n.º 282, portador da carteira de identidade n.º 82100473-6, expedida pelo CREA/RJ, inscrito no CPF/MF sob o n.º 752.030.147-87, domiciliado à Rua Marquês de Olinda, 70, nesta cidade; por mim identificado, conforme documentos mencionados, do que dou fé, e por ele me foi dito que, por este público instrumento, a outorgante nomeava e constituía seus bastante procuradores: **Ivan Bacellar Ahlert,** brasileiro, casado, agente da propriedade industrial, API n.º 204, portador da carteira de identidade n.º 04335754-0, expedida pelo Instituto Felix Pacheco, inscrito no CPF/MF sob o n.º 752.030.737-91, domiciliado à Rua Marquês de Olinda, 70, nesta cidade; **Maria Carmen de Souza Brito,** brasileira, solteira, agente da propriedade industrial, API n.º 304, portadora da carteira de identidade n.º 04681696-3, expedida pelo Instituto Felix Pacheco, inscrita no CPF/MF sob o n.º 609.674.397-87, domiciliada à Rua Marquês de Olinda, 70, nesta cidade; **Raul Hey,** brasileiro, casado, agente da propriedade industrial, API n.º 137, portador da carteira de identidade n.º 66.370, expedida pela OAB/RJ, inscrito no CPF/MF sob o n.º 430.330.327-53, domiciliado à Rua Marquês de Olinda, 70, nesta cidade; **Markus Michael de Mendonça Wolff,** casado, agente da propriedade industrial, API nº 1651, portador da carteira de identidade nº 851013717-D, expedida pelo CREA/RJ, inscrito no CPF/MF sob o nº 667.250.547-49, domiciliado à Rua Marquês de Olinda, 70, nesta cidade; **José Marcelo de Oliveira Fernandes,** brasileiro, casado, agente da propriedade industrial, API nº 1822, portador da carteira de identidade nº 006.972.983-8, expedida pelo Detran/RJ, inscrito no CPF/MF sob o nº 020.575.407-40, domiciliado à Rua Marquês de Olinda, 70; **Bruno Lopes Holfinger,** brasileiro, solteiro, agente da propriedade industrial, portador da carteira de identidade nº 149524, expedida pela OAB/RJ, inscrito no CPF/MF sob o nº 078741457-39, API nº 1662, domiciliado à Rua Marquês de Olinda, 70, nesta cidade; **Maurício Teixeira Desiderio da Silva,** brasileiro, casado, agente da propriedade industrial, portador da carteira de identidade nº 08111297-1, inscrito no CPF/MF sob o nº 008436137-93, API nº 1675, domiciliado à Rua Marquês de Olinda, 70 e **Roberto da Silveira Torres Junior,** brasileiro, casado, advogado e agente da propriedade industrial, API nº 1367, portador da carteira de identidade nº 91.617, expedida pela OAB/RJ, inscrito no CPF/MF sob o nº 908.887.407-78, domiciliado à Rua Marquês de Olinda, 70, nesta cidade, com poderes para **em conjunto de dois ou isoladamente,** representarem a **Outorgante**

perante as Autoridades e Órgãos Governamentais Federais, Estaduais e Municipais no Brasil, incluindo o **Instituto Nacional da Propriedade Industrial**, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior e suas delegacias e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; podendo para tanto assinar quaisquer documentos, requerimentos, petições, enfim, representar a **Outorgante** com os poderes e para os fins aludidos nas procurações a ela conferidas por seus clientes e que instruam processos de seus interesses em trâmite naquele órgão federal, para os devidos fins, os poderes ora conferidos permanecerão em vigor até 31.12.2015 (trinta e um de dezembro de dois mil e quinze). O nome e dados do procurador e os elementos relativos ao objeto do presente instrumento, foram fornecidos e conferidos pela Outorgante que por eles se responsabiliza. Os poderes ora conferidos são meramente enunciativos e não restritivos, atendendo aos fins colimados. Lavrada sob minuta apresentada. Certifico que os valores devidos pelo presente ato foram recolhidos ao Cartório de acordo com a Portaria de 1772/2014 da Corregedoria Geral de Justiça do Rio de Janeiro, da seguinte forma: custas R$ 41,61 (tab. 7, 2, d); atos gratuitos e PMCMV – R$ 0,83; arquivamento de documentos R$ 8,53 (tab. 1,4); comunicação ao distribuidor R$ 9,89 (tab. 1,5); comunicação à Junta Comercial R$ 9,89; Mútua, Acoterj e Anoreg R$ 12,24; Recolhido o acréscimo de 20% instituído pela lei 3217/99, no valor de R$ 13,98 devido ao FETJ, o acréscimo de 5% instituído pela Lei 4664/2005, no valor de R$ 3,49 devido ao FUNDPERJ e o acréscimo de 5% instituído pela Lei Complementar n.º 111/2006, no valor de R$: 3,49 devido ao FUNPERJ; o acréscimo de 4% instituído pela Lei nº. 6281/2012 no valor de R$ 2,79, devido ao FUNARPEN; distribuição R$ 29,72 (Lei n.º 5.358/2008). Certidões R$ 33,32. E, de como assim o disseram, pediram-me lhes lavrasse nestas notas a presente escritura, o que fiz, li em voz alta perante todos que a acharam conforme, aceitaram, outorgaram e assinam, dispensando a presença e assinatura de testemunhas no presente instrumento, segundo permite o Artigo 373, da Consolidação das Normas da Egrégia Corregedoria Geral da Justiça-RJ. Eu, (ass) **RICARDO DA SILVA DINIZ**, Matricula 94/4921, Substituto, lavrei, li e colho a assinatura. E eu (ass) **LUIZ FERNANDO CARVALHO DE FARIA**, Tabelião, mat. 06/1774 IPERJ, a encerro e a subscrevo. **(ass) CARLOS CEZAR CORDEIRO PIRES.** Certificada nesta data. Eu ___ digitei. E eu _____ a subscrevo e assino.

13º OFÍCIO DE NOTAS
Ricardo da Silva Diniz
Substituto
Matrícula 94/4921
Av. Rio Branco 135, 3º
Andar - Centro RJ
Rio de Janeiro

Poder Judiciário – TJERJ
Corregedoria Geral da Justiça
Selo de Fiscalização Eletrônico
EATS 12227 CET
Consulte a validade do(s) selo(s) em:
https://www3.tjrj.jus.br/sitepublico

Nº DSBIM: **P213306** [INGLÊS]

CERTIFICAÇÃO

O abaixo assinado, Dr. Alexander Blaeser, advogado, de Baker & McKenzie Zurich, Holbeinstrasse 30, 8008 Zurique, Suiça, certifica ser a tradução para o idioma Inglês anexa, do extrato original do Registro Comercial do Cantão de Basiléia-Cidade, datado de nove de outubro de dois mil e quatorze, referente à *Caris Life Sciences Switzerland Holdings GmbH* (companhia número CHE-272.189.713), uma tradução fiel para o idioma Inglês.

Zurique, quatorze de outubro de dois mil e quatorze.

(assinatura ilegível)

Dr. Alexander Blaeser.

Registro Comercial do Cantão de Basiléia-Cidade

Número da Companhia – Natureza Jurídica – Inscrição

CHE-272.189.713 – Companhia de Responsabilidade Limitada – Quinze de outubro de dois mil e treze

Todos registros

Nome da Companhia – Sede

Caris Life Sciences Switzerland Holdings GmbH

(*Caris Life Sciences Switzerland Holdings Sàrl*) (*Caris Life Sciences Switzerland Holdings LLC*) – Basiléia

Capital (Francos Suiços) – Ações – Acionistas (vide dados pessoais) – Endereço da Companhia

30.000,00 – 300x100,00 – *Caris Life Sciences (Gibral-*

tar) Limited – St. Jakobs-Str. 199, Citygate, 4052 Basiléia

Observações

Comunicações aos acionistas serão feitas por escrito ao último endereço registrado no registro de ações (incluindo fax ou e-mail), ou através de publicação no *SOGC* [Diário Oficial Suiço do Comércio];

Caris Life Sciences Luxembourg Holdings S.à.r.l. (B 150587), uma companhia de responsabilidade limitada consoante a lei de Luxemburgo, com sua sede social em Luxemburgo (LU), inscrita no Registro do Comércio e das Sociedades de Luxemburgo, transferiu sua sede social para a Suiça, mediante resolução datada de dez de outubro de dois mil e treze, sem Liquidação, de acordo com as disposições da *PILA.*

Mediante declaração datada de primeiro de outubro de dois mil e treze, a Companhia renunciou à auditoria limitada.

Data do Contrato Social

Dez de outubro de dois mil e treze.

Dados Pessoais – Cargo – Poder de Assinatura

Caris Life Sciences (Gibraltar) Limited, de Gibraltar (GI) – Acionista - ...;

Halbert, David Dean, cidadão americano, de Colleyville (TX [Texas]/US [Estados Unidos da América]) – Presiden-

te de Assembléias da Junta de Diretores Administrativos – Assinatura simples;

Thomas, Stephanie Semira, cidadão americano, de Keller (TX [Texas]/US [Estados Unidos da América]) – Vice-Presidente de Assembléias da Junta de Diretores Administrativos – Assinatura simples;

Walker, Ian Anthony, cidadão britânico, de Basiléia – Assinatura simples;

Martino, Gerard Anthony, cidadão americano, de Southlake (TX [Texas]/US [Estados Unidos da América]) – Assinatura simples.

Este exrato do Registro Comercial Cantonal não tem validade sem a certificação original anexa. Este extrato contém toda informação registrada que seja atualmente válida referente à companhia, juntamente com toda informação anteriormente válida que tenha sido cancelada. Mediante solicitação especial, um extrato pode ser emitido contendo somente os registros atualmente válidos.

Basiléia, nove de outubro de dois mil e quatorze, 09:13 da manhã.

[Carimbo do Registro Comercial do Cantão de Basiléia-Cidade]

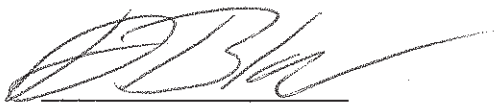
[Carimbo do Registro Comercial de Basiléia-Cidade]

[Assinatura]

CERTIFICATION

The undersigned Dr. Alexander Blaeser, attorney at law, Baker & McKenzie Zurich, Holbeinstrasse 30, 8008 Zurich, Switzerland, certifies that the attached English translation of the original excerpt from the Commercial Register of the Canton of Basel-City dated October 9, 2014, concerning Caris Life Sciences Switzerland Holdings GmbH (company number CHE-272.189.713) is a true English translation.

Zurich, October 14, 2014



Dr. Alexander Blaeser

B

Commercial Register of the Canton of Basel-City

Company Number	Legal form	Entry (In)	Cancelled (Ca)	Carried CH-270.4.004.111-3 from:	1
CHE-272.189.713	**Limited Liability Company**	15.10.2013		to:	

All registrations

In	Ca	Company name	Ref	Domicile
1 1		**Caris Life Sciences Switzerland Holdings GmbH** (Caris Life Sciences Switzerland Holdings Sàrl) (Caris Life Sciences Switzerland Holdings LLC)	1	Basel

Ref	Capital (CHF)
1	30'000.00

In	Mo	Ca	Quotas	Quotaholders (see Personal data)
1			300x100.00	Caris Life Sciences (Gibraltar) Limited

In	Ca	Company Address
1		St. Jakobs-Str. 199 Citygate 4052 Basel

In	Ca	Purpose Clause
1		The purpose of the Company is to research, develop, market, sell, and otherwise commercialize products, services and applications having direct or indirect utility in the field of life sciences, biosciences, human health or medical care or to invest in, enable or facilitate any of the foregoing. The purpose of the Company is also to actively license, manage and further develop certain intellectual property related in general to the life sciences, biosciences, human health, or medical care, including, but not limited to, molecular diagnostics in the field of oncology. The Company may also hold and develop related intellectual property or industrial property rights, trademarks, service marks, licenses, or other industrial and intellectual property rights acquired in the conduct of similar or complementary activities. The Company purpose of the Company also is also to the acquisition of participations, in Switzerland or abroad, in companies or enterprises in any form whatsoever and the management of such participations. The Company may in particular acquire by subscription, purchase, exchange or in any other manner any stock, shares, and other participation securities, bonds, debentures, certificates of deposit and other debt instruments and more generally any securities and financial instruments issued by any public or private entity whatsoever. The Company may borrow in any form except by way of public offer. It may issue by way of private placement only, notes, bonds and debentures and any kind of debt and/or equity securities. The Company may lend funds including the proceeds of any borrowings and/or issues of debt securities to its subsidiaries, to any affiliated companies or to any other company being part of the same group of companies as the Company. It may also give guarantees and grant securities in favor of third parties to secure its obligations or the obligations of its subsidiaries, affiliated companies or any other company. The Company may further pledge, transfer, encumber or otherwise create security over all or over some of its assets. The Company may generally employ any techniques and instruments relating to its investments for the purpose of their efficient management, including techniques and instruments designed to protect the Company against credit, currency exchange, interest rate risks and other risks. The Company can perform all commercial, technical and financial operations, connected directly or indirectly in all areas as described above in order to facilitate the accomplishment of its purpose.

In	Ca	Postal Address

In	Ca	Remarks	Ref	Date of Articles of Incorporation
1		Communications to the quotaholders shall be made in writing to the latest address registered in the quota register (including facsimile or e-mail) or through publication in the SOGC.	1	10.10.2013
1		Caris Life Sciences Luxembourg Holdings S.à.r.l. (B 150587), a limited liability company according to Luxembourg law with its corporate domicile in Luxembourg (LU), registered with the Registre de Commerce et des Sociétés Luxembourg, has transferred its corporate domicile to Switzerland with resolution dated 10.10.2013 without Liquidation, in accordance with the provisions of the PILA.		
1		By declaration dated 01.10.2013 the Company has waived the limited audit.		

Basel, 09.10.2014 09:13

Continuation on the following page

13

Commercial Register of the Canton of Basel-City

CHE-272.189.713	Caris Life Sciences Switzerland Holdings GmbH	Basel	2

All registrations

In	Ca	Qualified matters	Ref	Official publication
			1	SOGC

In	Ca	Additional payments and statutory duties of accessory payments	In	Ca	Branch Office(s)

Vis.	Ref	Journal no.	Journal date	SOGC no.	SOGC date	Page/Id	Vis.	Ref	Journal no.	Journal date	SOGC no.	SOGC date	Page/Id
BS	1	5752	15.10.2013	202	18.10.2013	1135189							
BS	2	3824	07.07.2014	131	10.07.2014	1605957							

In	Mo	Ca	Personal data	Function	Signatory power
1			Caris Life Sciences (Gibraltar) Limited, in Gibraltar (GI)	Quotaholder	
1			Halbert, David Dean, American citizen, in Colleyville (TX/US)	Chairman of the Board of Managing Officers	Single signature
1			Thomas, Stephanie Semira, American citizen, in Keller (TX/US)	Vice-chairman of the Board of Managing Officers	Single signature
1			Walker, Ian Anthony, British citizen, in Basel		Single signature
1			Martino, Gerard Anthony, American citizen, in Southlake (TX/US)		Single signature
1		2	~~Lam, Winston, American citizen, in Dallas (TX/US)~~		~~Single signature~~

Basel, 09.10.2014 09:13 MA

This excerpt from the cantonal Commercial Register has no validity without the alongside original certification. This excerpt contains all registered information which is currently valid for the company, along with all previously valid information which has been canceled. Upon special request, an excerpt may be issued which contains only the presently valid registrations.

[Stamp of the Commercial
Register of the Canton of Basel-City]

[Stamp of the Commercial Register Basel-City]
[Signature]

AB

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"APTÂMEROS E USOS DOS MESMOS".**

REFERÊNCIA CRUZADA

[0001] Este pedido reivindica o benefício dos Pedidos de Patente Provisórios nº US 61/717.566, depositado em 23 de outubro de 2012; 61/731.419, depositado em 29 de novembro de 2012; 61/735.915, depositado em 11 de dezembro de 2012; 61/748.437, depositado em 2 de janeiro de 2013; 61/749.773, depositado em 7 de janeiro de 2013; 61/750.331, depositado em 8 de janeiro de 2013; 61/754.471, depositado em 18 de janeiro de 2013; 61/767.131, depositado em 20 de fevereiro de 2013; 61/769.064, depositado em 25 de fevereiro de 2013; 61/805.365, depositado em 26 de março de 2013; 61/808.144, depositado em 3 de abril de 2013; 61/820.419, depositado em 7 de maio de 2013; 61/826.957, depositado em 23 de maio de 2013; 61/838.762, depositado em 24 de junho de 2013; 61/843.256, depositado em 5 de julho de 2013; 61/862.809, depositado em 6 de agosto de 2013; 61/863.828, depositado em 8 de agosto de 2013; 61/866.014, depositado em 14 de agosto de 2013; 61/867.978, depositado em 20 de agosto de 2013; 61/871.107, depositado em 28 de agosto de 2013; e 61/874.621, depositado em 6 de setembro de 2013; em que todos tais pedidos estão incorporados ao presente a título de referência em sua totalidade.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS APRESENTADA POR MEIO DE EFS-WEB

[0002] O conteúdo inteiro da seguinte apresentação eletrônica da listagem de sequências por meio do servidor USPTO EFS-WEB, conforme autorizado e apresentado no MPEP § 1730 II. B.2, é incorporado ao presente a título de referência em sua totalidade para todos os propósitos. A listagem de sequências está dentro do arquivo de texto depositado eletronicamente que é identificado conforme segue:

[0003] Nome do arquivo: 37901811601SeqList.txt

[0004] Data de Criação: 23 de outubro de 2013

[0005] Tamanho (bytes: 82.464.193 bytes

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0006] A presente invenção refere-se em geral ao campo de aptâmeros que podem ligar-se a antígenos de superfície de microvesícula, que são úteis como terapêuticos para e diagnósticos de câncer e/ou outras doenças ou distúrbios em que microvesículas estão implicadas. A invenção refere-se, ainda, a materiais e métodos para a administração de aptâmeros que podem ligar-se a microvesículas. As microvesículas podem ser derivadas de células indicativas de câncer.

[0007] Os aptâmeros são moléculas de ácido nucleico que têm afinidade de ligação específica a moléculas através de interações além do pareamento de bases de Watson-Crick clássico.

[0008] Aptâmeros, como peptídeos gerados por exibição de fago ou anticorpos monoclonais ("mAbs"), podem ligar-se especificamente a alvos selecionados e modular a atividade do alvo, por exemplo, aptâmeros de ligação passante podem bloquear a capacidade de funcionamento de seu alvo. Criados por um processo de seleção in vitro a partir de conjuntos de oligonucleotídeos de sequência aleatória, aptâmeros foram gerados para mais de 100 proteínas, incluindo fatores de crescimento, fatores de transcrição, enzimas, imunoglobulinas e receptores. Um aptâmero típico de 10 a 15 kDa de tamanho (30 a 45 nucleotídeos), liga-se a seu alvo com afinidade subnanomolar e discrimina-se contra alvos proximamente relacionados (por exemplo, os aptâmeros tipicamente não se ligarão a outras proteínas da mesma família genética). Uma série de estudos estruturais mostrou que os aptâmeros podem usar os mesmos tipos de interações de ligação (por exemplo, ligação de hidrogênio, complementaridade eletrostática, contatos hidrofóbicos, exclusão estérica) que induzem afinidade e especificidade

em complexos de anticorpo e antígeno.

[0009] Os aptâmeros têm diversas características desejáveis para uso como agentes terapêuticos e diagnósticos, incluindo alta especificidade e afinidade, eficácia biológica e propriedades farmacocinéticas excelentes. Adicionalmente, oferecem vantagens competitivas específicas em relação aos anticorpos e outras biologias proteicas, por exemplo:

[0010] Velocidade e controle. Os aptâmeros são produzidos por um processo totalmente *in vitro*, permitindo a geração rápida de vantagens iniciais, incluindo vantagens terapêuticas. A seleção *in vitro* permite que a especificidade e a afinidade do aptâmero sejam rigidamente controladas e permite a geração de vantagens, incluindo vantagens contra alvos tanto tóxicos como não imunogênicos.

[0011] Toxicidade e Imunogenicidade. Os aptâmeros, como uma classe, têm demonstrado pouca ou nenhuma toxicidade ou imunogenicidade. Em dosagem crônica de ratos ou marmotas com níveis altos de aptâmero (10 mg/kg diariamente por 90 dias), nenhuma toxicidade é observada por qualquer medida clínica, celular ou bioquímica. Apesar de a eficácia de muitos anticorpos monoclonais poder ser severamente limitada por resposta imunológica aos próprios anticorpos, é extremamente difícil produzir anticorpos para aptâmeros mais provavelmente devido ao fato de que os aptâmeros não podem ser apresentados por células T por meio do MHC e a resposta imunológica é em geral treinada para não reconhecer fragmentos de ácido nucleico.

[0012] Administração. Apesar de os agentes terapêuticos de anticorpo mais recentemente aprovados serem administrados por infusão intravenosa (tipicamente por 2 a 4 horas), os aptâmeros podem ser administrados por injeção subcutânea (biodisponibilidade de aptâmero por meio de administração subcutânea é >80% em estudos com macacos (Tucker et al., J. Chromatography B. 732: 203 a 212, 1999)).

Essa diferença é principalmente devido à solubilidade comparativamente baixa e, portanto, volumes grandes necessários para a maioria dos mAbs terapêuticos. Com boa solubilidade (>150 mg/ml) e peso molecular comparativamente baixo (aptâmero: 10 a 50 kDa; anticorpo: 150 kDa), uma dose semanal de aptâmero pode ser entregue por injeção em um volume de menos do que 0,5 ml. Adicionalmente, o tamanho pequeno dos aptâmeros permite que os mesmos penetrem em áreas de constrições conformacionais que não permites que anticorpos ou fragmentos de anticorpos penetrem, apresentando ainda outra vantagem de agentes terapêuticos e profilaxia baseados em aptâmero.

[0013] Escalabilidade e custo. Os aptâmeros são quimicamente sintetizados e são facilmente escalonados conforme necessário para atender a demanda de produção para aplicações diagnósticas e terapêuticas. Apesar de as dificuldades no escalonamento de produção serem atualmente limitantes à disponibilidade de alguns produtos biológicos e o custo capital de uma usina de produção de proteína em larga escala ser enorme, um único sintetizador de oligonucleotídeo de larga escala pode produzir acima de 100 kg/ano e exige um investimento inicial relativamente modesto. O custo atual de produtos para síntese de aptâmero na escala de quilogramas é estimado em $100/g, comparável àquele para anticorpos altamente otimizados.

[0014] Estabilidade. Os aptâmeros são quimicamente robustos. São intrinsicamente adaptados para recuperar atividade após exposição a fatores, tais como calor e desnaturantes, e podem ser armazenados por períodos estendidos (>1 ano) em temperatura ambiente como pós liofilizados.

INCORPORAÇÃO A TÍTULO DE REFERÊNCIA

[0015] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados neste relatório descritivo são incorporados ao presente documento a título de referência na mesma extensão como se cada pu-

blicação, patente ou pedido de patente individual estivesse específica e individualmente indicado como incorporado a título de referência.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0016] As composições e os métodos da invenção fornecem aptâmeros que se ligam a biomarcadores de interesse, tais como antígenos de superfície de microvesícula ou fragmentos funcionais de antígenos de superfície de microvesícula. Em várias modalidades, os aptâmeros da invenção são usados em processos de diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico para avaliar uma amostra biológica quanto à presença ou níveis de biomarcadores, tais como, antígenos de superfície de microvesícula, que são determinados a fornecer uma leitura de diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico. O diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico pode estar relacionado a câncer. A invenção também fornece métodos e composição para facilitar a avaliação de biblioteca de aptâmeros e métodos de detecção de aptâmeros.

[0017] Em um aspecto, a invenção fornece um aptâmero que se liga a uma microvesícula, que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga de qualquer uma dentre: a) SEQ ID NOs. 230900-230903, 230908, 230913-230927 ou uma sequência variável de qualquer sequência anterior conforme descrito na Tabela 18; ou b) um fragmento funcional de qualquer sequência anterior. O aptâmero pode compreender qualquer uma dentre SEQ ID NOs. 230900-230903, 230908, 230913-230927 ou um fragmento funcional das mesmas. O fragmento funcional pode compreender qualquer fragmento que mantenha a capacidade de ligar-se ao alvo de aptâmero, incluindo, sem limitação, uma região de "Sequência Variável" conforme indicado na Tabela 18. Em algumas modalidades, a microvesícula é vertida a partir de uma célula de câncer de próstata.

[0018] Em outro aspecto, a invenção fornece um aptâmero que se

liga a uma microvesícula, que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga de qualquer uma dentre: a) SEQ ID NOs. 231018-231031 ou uma sequência variável das mesmas conforme descrito na Tabela 23; b) SEQ ID NOs. 231032-231051 ou uma sequência variável das mesmas conforme descrito na Tabela 24; c) SEQ ID NOs. 231032-241535; ou d) um fragmento funcional de qualquer sequência anterior. O aptâmero pode compreender qualquer uma das SEQ ID NOs. 231018-231031 ou um fragmento funcional das mesmas. O aptâmero pode também compreender qualquer uma das SEQ ID NOs. 231032-231051 ou um fragmento funcional das mesmas. O fragmento funcional pode compreender qualquer fragmento que mantenha a capacidade de ligar-se ao alvo de aptâmero, incluindo, sem limitação, uma região de "Sequência Variável" conforme indicado nas Tabelas 23 e 24. Em algumas modalidades, a microvesícula é vertida a partir de uma célula de câncer de mama.

[0019] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um aptâmero que se liga a uma proteína de molécula de adesão de célula epitelial (EpCAM), que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga de qualquer uma dentre: a) SEQ ID NOs. 1-230810; b) SEQ ID NOs. 230822-230899, 230904-230907, 230909-230911 ou uma sequência variável de qualquer uma das mesmas conforme descrito nas Tabelas 11, 12, 13, 15; ou c) um fragmento funcional de qualquer sequência anterior. O aptâmero pode compreender qualquer um dentre Aptamer4 (SEQ ID NO. 1), 0ligo6 (SEQ ID NO. 230810), 0ligo4B (SEQ ID NO. 183132), CAR003 (SEQ ID NO. 230822 ou SEQ ID NO. 230823), CAR016 (SEQ ID NO. 230840), ou um fragmento funcional dos mesmos. O aptâmero pode ser de qualquer uma das Tabelas 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 15, 16, ou um fragmento funcional

dos mesmos. O fragmento funcional pode compreender qualquer fragmento que mantenha a capacidade de ligar-se ao alvo de aptâmero, incluindo, sem limitação, uma região de "Sequência Variável" conforme indicado em qualquer uma das Tabelas 11, 12, 13, 15, ou um fragmento funcional dos mesmos. Em algumas modalidades, o aptâmero tem a capacidade de modular a transdução de sinal de EpCAM *in vitro*. Ademais, o aptâmero pode ter a capacidade de modular a transdução de sinal de EpCAM *in vivo*.

[0020] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um aptâmero que se liga a uma proteína de antígeno de membrana de antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga de qualquer uma dentre: a) SEQ ID NOs. 230932-230935 ou uma sequência variável das mesmas conforme descrito na Tabela 20; ou b) um fragmento funcional de qualquer sequência anterior.

[0021] Os aptâmeros da invenção podem ser identificados no presente documento na forma de DNA ou RNA. A não ser que especificado de outro modo, um versado na técnica perceberá que um aptâmero pode em geral ser sintetizado em várias formas de ácido nucleico. Os aptâmeros podem também portar várias modificações químicas e permanecer dentro do escopo da invenção.

[0022] Em algumas modalidades, um aptâmero da invenção é modificado para compreender pelo menos uma modificação química. A modificação pode incluir, sem limitação, uma substituição química em uma posição de açúcar; uma substituição química em uma posição de fosfato; e uma substituição química em uma posição de base do ácido nucleico. Em algumas modalidades, a modificação é selecionada a partir do grupo que consiste em: biotinilação, incorporação de uma identificação fluorescente, incorporação de um nucleotídeo modificado,

uma pirimidina modificada em 2’, terminação 3’, conjugação com um ligante amina, conjugação com um composto não imunogênico de alto peso molecular, conjugação com um composto lipofílico, conjugação com um fármaco, conjugação com uma porção citotóxica e identificação com um radioisótopo, ou outra modificação conforme revelada no presente documento. A posição da modificação pode ser variada conforme desejado. Por exemplo, a biotinilação, a identificação fluorescente ou a porção citotóxica pode ser conjugada à extremidade 5' do aptâmero. A biotinilação, a identificação fluorescente ou a porção citotóxica pode ser também conjugada à extremidade 3' do aptâmero.

[0023] Em algumas modalidades, a porção citotóxica é encapsulada em uma nanopartícula. A nanopartícula pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em: lipossomas, dendrímeros e polímeros tipo pente. Em outras modalidades, a porção citotóxica compreende uma porção citotóxica de molécula pequena. A porção citotóxica de molécula pequena pode incluir, sem limitação, vinblastina hidrazida, caliqueamicina, vinca alcaloide, uma criptoficina, uma tubulisina, dolastatina-10, dolastatina-15, auristatina E, rizoxina, epotilona B, epitilona D, taxoides, maitansinoides e quaisquer variantes e derivados dos mesmos. Em ainda outras modalidades, a porção citotóxica compreende uma toxina proteica. Por exemplo, a toxina proteica pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em toxina da difteria, ricina, abrina, a gelonina e exotoxina A de Pseudomonas. Os compostos de alto peso molecular não imunogênicos para uso com a invenção incluem polialquileno glicóis, por exemplo, polietileno glicol. Os radioisótopos apropriados incluem ítrio-90, índio-111, iodo-131, lutécio-177, cobre-67, rênio-186, rênio-188, bismuto-212, bismuto-213, astatina-211 e actínio-225. O aptâmero pode ser identificado com um radioisótopo emissor gama.

[0024] Em algumas modalidades da invenção, um agente ativo é

conjugado ao aptâmero. Por exemplo, o agente ativo pode ser um agente terapêutico ou um agente de diagnóstico. O agente terapêutico pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em inibidores de tirosina-quinase, inibidores de quinase, agentes biologicamente ativos, moléculas biológicas, radionuclídeos, antibióticos adriamicina, ansamicina, asparaginase, bleomicina, busulfan, cisplatina, carboplatina, carmustina, capecotabina, clorambucil, citarabina, ciclofosfamida, camptotecina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dexrazoxano, docetaxel, doxorrubicina, etopósido, epotilonas, floxuridina, fludarabina, fluorouracila, gencitabina, hidroxiureia, idarrubicina, ifosfamida, irinotecano, lomustina, mecloretamina, mercaptopurina, melfalano, metotrexato, rapamicina (sirolimus), mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nitrosureia, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, procarbazina, rituximabe, estreptozocina, teniposida, tioguanina, tiotepa, taxanos, vinblastina, vincristina, vinorelbina, taxol, combretastatinas, discodermolidas, transplatina, compostos de fator de crescimento endotelial antivascular ("anti-VEGFs"), compostos receptores de fator de crescimento antiepidérmico ("anti-EGFRs"), 5-fluorouracila e derivados, radionuclídeos, toxinas polipeptídicas, indutores de apoptose, sensibilizadores de terapia, enzima ou fragmento ativo da mesma, e combinações dos mesmos.

[0025] A invenção fornece ainda uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do aptâmero descrito acima ou um sal do mesmo e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável. A invenção fornece também uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do aptâmero ou um sal do mesmo e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável. De um modo semelhante, a invenção fornece um método para tratar ou melhorar uma doença ou distúrbio que compreende administrar a composição farmacêutica a um indivíduo

em necessidade da mesma. Administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição ao indivíduo pode resultar em: (a) um aprimoramento da entrega do agente ativo a um sítio de doença em relação à entrega do agente ativo sozinho; ou (b) um aprimoramento de depuração microvesicular que resulta em uma redução de pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90% em um nível sanguíneo de microvesículas alvejadas pelo aptâmero; ou (c) uma redução na atividade biológica de microvesículas alvejadas pelo aptâmero de pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90%. Em uma modalidade, a atividade biológica de microvesículas compreende supressão imunológica ou transferência de informações genéticas. A doença ou o distúrbio pode incluir, sem limitação, aqueles revelados no presente documento. Por exemplo, a doença ou o distúrbio pode compreender uma doença ou um distúrbio neoplástico, proliferativo ou inflamatório, metabólico, cardiovascular ou neurológico. Consulte a seção "Fenótipos".

[0026] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um aptâmero revelado no presente documento ou uma composição farmacêutica do mesmo.

[0027] Em um aspecto, a invenção fornece um método que compreende colocar o aptâmero conforme descrito acima em contato com uma amostra biológica e detectar a presença ou a ausência de ligação do aptâmero a uma microvesícula na amostra biológica. Conforme revelado no presente documento, a amostra biológica pode ser uma amostra de tecido, fluido ou cultura celular. Por exemplo, a amostra biológica pode compreender sangue ou um componente do sangue. Em algumas modalidades, o aptâmero é conjugado a um substrato antes de entrar em contato com a amostra biológica. Por exemplo, o substrato pode compreender uma esfera ou um poço de placa. O aptâmero pode também ser conjugado a uma identificação detectável.

Várias configurações do método são fornecidas no presente documento. Consulte, por exemplo, as Figuras 1A e 1B.

[0028] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para detectar uma presença ou um nível de uma população de microvesículas em uma amostra biológica suspeita de conter a população de microvesículas, que compreende colocar a amostra biológica em contato com um ou mais agentes de ligação específicos para a população de microvesículas e um ou mais aptâmeros, conforme descrito acima, e detectar microvesículas que são reconhecidas tanto pelo um ou mais agentes de ligação como pelo um ou mais aptâmeros, detectando, assim, a presença ou o nível da população de microvesículas na amostra biológica.

[0029] A amostra biológica pode ser uma amostra de tecido, uma cultura de células ou um fluido corporal. O fluido corporal pode ser qualquer fluido útil, incluindo, sem limitação, um ou mais dentre sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de Cowper ou fluido de pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural e peritoneal, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreção vaginal, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares, fluido de cavidade blastocística ou sangue do cordão umbilical. Em algumas modalidades, o fluido corporal compreende sangue, soro ou plasma.

[0030] Qualquer agente de ligação útil pode ser usado nos métodos em questão. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de ligação compreende um anticorpo ou um aptâmero em um antígeno de superfície de microvesícula selecionado a partir da Tabela 3, Tabela 4,

e uma combinação dos mesmos. O um ou mais agentes de ligação podem ser também um anticorpo ou um aptâmero em um antígeno de superfície de microvesícula selecionado a partir de um alvo na tabela 26. Por exemplo, o um ou mais agentes de ligação podem ser um anticorpo ou um aptâmero em um antígeno de superfície de microvesícula selecionado a partir do grupo que consiste em EpCam, CD9, PCSA, CD63, CD81, PSMA, B7H3, PSCA, ICAM, STEAP, KLK2, SSX2, SSX4, PBP, SPDEF, EGFR e uma combinação dos mesmos. O um ou mais agentes de ligação podem também compreender um anticorpo ou um aptâmero em um antígeno de superfície de microvesícula selecionado a partir do grupo que consiste em EGFR, PBP, EpCAM, KLK2 e uma combinação dos mesmos.

[0031] A invenção contempla várias configurações. Por exemplo, um formato de "sanduiche" pode ser usado. Consulte, por exemplo, as Figuras 1A e 1B. Em algumas modalidades do método, o um ou mais agentes de ligação são conjugados a um substrato antes de entrar em contato com a amostra biológica. Nessa configuração, o um ou mais agentes de ligação podem ser conjugados a uma identificação detectável para servir como um agente detector. Em outras modalidades, o um ou mais agente de ligação são conjugados a uma identificação detectável. Nessa configuração, o um ou mais aptâmeros podem ser conjugados a um substrato antes de entrar em contato com a amostra biológica para servir como um agente de captura. Além disso, o um ou mais aptâmeros podem ser conjugados a um substrato antes de entrar em contato com a amostra biológica e/ou o um ou mais aptâmeros são conjugados a uma identificação detectável. Em tais casos o um ou mais aptâmeros podem atuar como qualquer um ou ambos dentre um agente de captura e um agente de detecção.

[0032] O método para detectar uma presença ou um nível de uma população de microvesículas em uma amostra biológica pode ser usa-

do para fornecer um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico de uma doença ou um distúrbio. A doença ou o distúrbio pode incluir, sem limitação, aqueles revelados no presente documento. Por exemplo, a doença ou o distúrbio pode compreender uma doença ou um distúrbio neoplástico, proliferativo ou inflamatório, metabólico, cardiovascular ou neurológico. Consulte a seção "Fenótipos". Em uma modalidade, a doença compreende um câncer. Por exemplo, a doença pode ser uma leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cânceres relacionados à AIDS; linfoma relacionado à AIDS; câncer anal; câncer do apêndice; astrocitomas; tumor teratoide/rabdoide atípico; carcinoma basocelular; câncer de bexiga; glioma tronco cerebral; tumor cerebral (incluindo glioma tronco cerebral, tumor teratoide/rabdoide atípico do sistema nervoso central, tumores embrionários do sistema nervoso central, astrocitomas, craniofaringioma, ependimoblastoma, ependimoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais e pineoblastoma); câncer de mama; tumores brônquicos; linfoma de Burkitt; câncer de sítio primário desconhecido; tumor carcinoide; carcinoma de sítio primário desconhecido; tumor teratoide/rabdoide atípico do sistema nervoso central; tumores embrionários do sistema nervoso central; câncer cervical; cânceres infantis; cordoma; leucemia linfocítica crônica; leucemia mieloide crônica; distúrbios mieloproliferativos crônicos; câncer de cólon; câncer colorretal; craniofaringioma; linfoma cutâneo de células T; tumores endócrinos de células das ilhotas pancreáticas; câncer endometrial; ependimoblastoma; ependimoma; câncer esofágico; estesioneuroblastoma; sarcoma de Ewing; tumor de células germinativas extracraniano; tumor de células germinativas extragonadal; câncer de ducto biliar extra-hepático; câncer de vesícula biliar; câncer gástrico (estômago); tumor carcinoide gastrointestinal; tumor de célula estromal

gastrointestinal; tumor estromal gastrointestinal (GIST); tumor trofoblástico gestacional; glioma; leucemia de células pilosas; câncer de cabeça e pescoço; câncer de coração; linfoma de Hodgkin; câncer de hipofaringe; melanoma intraocular; tumores de células da ilhota; sarcoma de Kaposi; câncer de rim; histiocitose de células de Langerhans; câncer de laringe; câncer de lábio; câncer de fígado; câncer de pulmão; câncer ósseo histiocitoma fibroso maligno; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; carcinoma de células de Merkel; carcinoma de células epiteliais de Merkel; mesotelioma; câncer cervical escamoso metastático primário oculto; câncer de boca; síndromes neoplásicas endócrinas múltiplas; mieloma múltiplo; mieloma múltiplo/neoplasia de células plasmáticas; micose fungoide; síndromes mielodisplásicas; neoplasias mieloproliferativas; câncer de cavidade nasal; câncer de nasofaringe; neuroblastoma; linfoma não Hodgkin; câncer de pele não melanoma; câncer de pulmão de células não pequenas; câncer oral; câncer da cavidade oral; câncer de orofaringe; osteossarcoma; outros tumores cerebrais e da medula espinhal; câncer de ovário; câncer epitelial de ovário; tumor de células germinativas do ovário; tumor de ovário de baixo potencial de malignidade; câncer pancreático; papilomatose; câncer de seios paranasais; câncer de paratireoide; câncer pélvico; câncer de pênis; câncer de faringe; tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária; pineoblastoma; tumor pituitário; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiplo; blastoma pleuropulmonar; linfoma do sistema nervoso central (CNS) primário; câncer de fígado hepatocelular primário; câncer de próstata; câncer retal; câncer renal; câncer de células renais (rim); câncer de células renais; câncer do trato respiratório; retinoblastoma; rabdomiossarcoma; câncer das glândulas salivares; síndrome de Sézary; câncer de pulmão de pequenas células; câncer de intestino delgado; sarcoma de tecidos moles; carcinoma de células escamosas; câncer cervical escamoso; câncer de es-

tômago (gástrico); tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais; linfoma de células T; câncer de testículo; câncer de garganta; carcinoma tímico; timoma; câncer de tireoide; câncer de células de transição; câncer de células de transição da pelve renal e ureter; tumor trofoblástico; câncer de ureter; câncer de uretra; câncer uterino; sarcoma uterino; câncer vaginal; câncer vulvar; macroglobulinemia de Waldenstrom; ou tumor de Wilms. O câncer pode ser um câncer de próstata. O câncer pode ser um câncer de mama.

[0033] Em outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método para caracterizar uma doença ou um distúrbio que compreende: (a) colocar uma amostra de teste biológico em contato com um ou mais aptâmeros, conforme fornecido no presente documento; (b) detectar uma presença ou nível de um complexo entre o um ou mais aptâmeros e o alvo ligado pelo um ou mais aptâmeros na amostra de teste biológico formada na etapa (a); e (c) comparar a presença ou nível detectado na etapa (b) a um nível de referência de uma amostra de controle biológico caracterizando, desse modo, a doença ou distúrbio. O nível de referência pode ser derivado de um nível do alvo em um indivíduo de amostra saudável, por exemplo, um que não tem ou não se sabe se tem a doença ou o distúrbio. O nível de referência pode também ser derivado de um indivíduo ou uma amostra que tem uma doença tratada, controlada ou alternada.

[0034] A amostra de teste biológico e a amostra de controle biológico pode, cada uma, compreender uma amostra de tecido, uma cultura de células ou um fluido biológico. Em algumas modalidades, o fluido biológico compreende um fluido corporal. O fluido corporal pode ser qualquer fluido útil, incluindo, sem limitação, um ou mais dentre sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoal-

veolar, sêmen, fluido prostático, fluido de Cowper ou fluido de pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural e peritoneal, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreção vaginal, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares, fluido de cavidade blastocística ou sangue do cordão umbilical. Em algumas modalidades, o fluido corporal compreende sangue, soro ou plasma. O fluido biológico pode compreender ou ser suspeito de compreender microvesículas.

[0035] O um ou mais aptâmeros podem ligar-se a um polipeptídeo ou fragmento do mesmo. A ligação pode ser indiscriminada ou seletiva, conforme desejado. O polipeptídeo ou fragmento do mesmo pode ser solúvel ou ligado à membrana, por exemplo, na membrana de uma microvesícula ou fragmento de célula. O polipeptídeo ou fragmento do mesmo compreende um biomarcador na Tabela 3, Tabela 4 ou Tabela 26. O um ou mais aptâmeros podem ligar-se a um antígeno de superfície de microvesícula na amostra biológica.

[0036] O método no presente documento pra caracterizar uma doença ou um distúrbio pode incluir fornecer um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico da doença ou do distúrbio. A doença ou o distúrbio pode incluir, sem limitação, aqueles revelados no presente documento. Por exemplo, a doença ou o distúrbio pode compreender um câncer, uma afecção pré-maligna, uma doença inflamatória, uma doença imune, uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio cardiovascular, uma doença ou distúrbio neurológico, uma doença infecciosa e/ou dor. Consulte a seção "Fenótipos" no presente documento. Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio compreende um câncer. O câncer compreende uma leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cânceres relacionados à

AIDS; linfoma relacionado à AIDS; câncer anal; câncer do apêndice; astrocitomas; tumor teratoide/rabdoide atípico; carcinoma basocelular; câncer de bexiga; glioma tronco cerebral; tumor cerebral (incluindo glioma tronco cerebral, tumor teratoide/rabdoide atípico do sistema nervoso central, tumores embrionários do sistema nervoso central, astrocitomas, craniofaringioma, ependimoblastoma, ependimoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais e pineoblastoma); câncer de mama; tumores brônquicos; linfoma de Burkitt; câncer de sítio primário desconhecido; tumor carcinoide; carcinoma de sítio primário desconhecido; tumor teratoide/rabdoide atípico do sistema nervoso central; tumores embrionários do sistema nervoso central; câncer cervical; cânceres infantis; cordoma; leucemia linfocítica crônica; leucemia mieloide crônica; distúrbios mieloproliferativos crônicos; câncer de cólon; câncer colorretal; craniofaringioma; linfoma cutâneo de células T; tumores endócrinos de células das ilhotas pancreáticas; câncer endometrial; ependimoblastoma; ependimoma; câncer esofágico; estesioneuroblastoma; sarcoma de Ewing; tumor de células germinativas extracraniano; tumor de células germinativas extragonadal; câncer de ducto biliar extra-hepático; câncer de vesícula biliar; câncer gástrico (estômago); tumor carcinoide gastrointestinal; tumor de célula estromal gastrointestinal; tumor estromal gastrointestinal (GIST); tumor trofoblástico gestacional; glioma; leucemia de células pilosas; câncer de cabeça e pescoço; câncer de coração; linfoma de Hodgkin; câncer de hipofaringe; melanoma intraocular; tumores de células da ilhota; sarcoma de Kaposi; câncer de rim; histiocitose de células de Langerhans; câncer de laringe; câncer de lábio; câncer de fígado; câncer de pulmão; câncer ósseo histiocitoma fibroso maligno; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; carcinoma de células de Merkel; carcinoma de células epiteliais de Merkel; mesoteli-

oma; câncer cervical escamoso metastático primário oculto; câncer de boca; síndromes neoplásicas endócrinas múltiplas; mieloma múltiplo; mieloma múltiplo/neoplasia de células plasmáticas; micose fungoide; síndromes mielodisplásicas; neoplasias mieloproliferativas; câncer de cavidade nasal; câncer de nasofaringe; neuroblastoma; linfoma não Hodgkin; câncer de pele não melanoma; câncer de pulmão de células não pequenas; câncer oral; câncer da cavidade oral; câncer de orofaringe; osteossarcoma; outros tumores cerebrais e da medula espinhal; câncer de ovário; câncer epitelial de ovário; tumor de células germinativas do ovário; tumor de ovário de baixo potencial de malignidade; câncer pancreático; papilomatose; câncer de seios paranasais; câncer de paratireoide; câncer pélvico; câncer de pênis; câncer de faringe; tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária; pineoblastoma; tumor pituitário; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiplo; blastoma pleuropulmonar; linfoma do sistema nervoso central (CNS) primário; câncer de fígado hepatocelular primário; câncer de próstata; câncer retal; câncer renal; câncer de células renais (rim); câncer de células renais; câncer do trato respiratório; retinoblastoma; rabdomiossarcoma; câncer das glândulas salivares; síndrome de Sézary; câncer de pulmão de pequenas células; câncer de intestino delgado; sarcoma de tecidos moles; carcinoma de células escamosas; câncer cervical escamoso; câncer de estômago (gástrico); tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais; linfoma de células T; câncer de testículo; câncer de garganta; carcinoma tímico; timoma; câncer de tireoide; câncer de células de transição; câncer de células de transição da pelve renal e ureter; tumor trofoblástico; câncer de ureter; câncer de uretra; câncer uterino; sarcoma uterino; câncer vaginal; câncer vulvar; macroglobulinemia de Waldenstrom; ou tumor de Wilms. O câncer pode ser um câncer de próstata. O câncer pode ser um câncer de mama.

[0037] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um reagente para executar os métodos no presente documento e também o uso do reagente para executar os métodos. O reagente pode compreender um aptâmero revelado no presente documento e/ou outros componentes conforme revelados no presente documento.

[0038] A invenção fornece composições e métodos para uso de um conjunto de aptâmeros que compreende uma pluralidade de oligonucleotídeos para detectar biomarcadores de interesse. Tais composições e métodos podem facilitar a caracterização de um fenótipo em uma amostra biológica. Em um aspecto, a invenção fornece uma composição de matéria que compreende uma pluralidade de oligonucleotídeos selecionados a partir de SEQ ID NOs. 1-230810, 230811-230899, 230900-230927 ou 231018-241535, cujos oligonucleotídeos têm capacidade para ligar-se a uma pluralidade de alvos presentes em uma amostra biológica. A composição de matéria pode também compreender um oligonucleotídeo selecionado a partir de SEQ ID NOs. 1-230810, 230811-230899, 230900-230927 ou 231018-241535. Em uma modalidade, as composições compreendem pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000 ou todos os oligonucleotídeos listados nas SEQ ID NOs. 231018-241535. Em outra modalidade, as composições compreendem pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000 ou todos os oligonucleotídeos listados nas SEQ ID NOs. 1-230810. A invenção também fornece uma composição de matéria que compreende um ou mais oligonucleotídeos apresentados em qualquer uma das Tabelas 23 a 24 que têm capacidade para ligar-se a uma pluralidade de alvos

presentes em uma amostra biológica. A composição de matéria pode compreender um ou mais oligonucleotídeos listados em qualquer uma das Tabelas 23 a 24. Em algumas modalidades, a composição compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 oligonucleotídeos listados na Tabela 23 ou na Tabela 24.

[0039] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para caracterizar uma condição para uma amostra de teste que compreende: colocar uma amostra de microvesícula em contato com uma pluralidade de oligonucleotídeos com capacidade para ligar um ou mais alvo(s) presente(s) na dita amostra de microvesícula, identificar um conjunto de oligonucleotídeos que formam um complexo com a amostra em que o conjunto é predeterminado para caracterizar uma condição para amostra caracterizando, desse modo, uma condição para uma amostra identificar oligonucleotídeos pode compreender realizar sequenciamento de todos ou alguns dos oligonucleotídeos. Identificar pode também compreender realizar amplificação de todos ou alguns dos oligonucleotídeos, por exemplo, por meio de metodologia PC e variantes da mesma (RT-PCR, qPCR, etc). Identificar pode também compreender realizar hibridização de todos ou alguns dos oligonucleotídeos em um arranjo. A afecção pode ser uma doença ou um distúrbio. Por exemplo, a afecção pode ser um câncer, uma afecção pré-maligna, uma doença inflamatória, uma doença imune, uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio cardiovascular, uma doença ou distúrbio neurológico, uma doença infecciosa e/ou dor. Consulte a seção "Fenótipos" no presente documento.

[0040] Em outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método para identificar um conjunto de oligonucleotídeos associados a uma amostra de teste que compreende: (a) colocar uma amostra de microvesícula em contato com uma pluralidade de oligonucleotídeos, isolar um conjunto de oligonucleotídeos que formam um complexo com

a amostra de microvesícula, (b) determinar uma sequência e/ou um número de cópias para cada um dos oligonucleotídeos que formou um complexo com a amostra de microvesícula em (a), identificar, desse modo, um conjunto de oligonucleotídeos associados à amostra de teste. A etapa (b) pode incluir realizar sequenciamento de alto rendimento. A etapa (b) pode também incluir realizar hibridização em um arranjo ou amplificação. Em uma modalidade, a amostra é proveniente de um indivíduo suspeito de ter ou predisposto a ter um câncer. Em algumas modalidades, a pluralidade de oligonucleotídeos tem capacidade para ligar preferencialmente uma microvesícula que é vertida a partir de células doentes versus células normais. As células doentes podem estar associadas a um câncer, uma afecção pré-maligna, uma doença inflamatória, uma doença imune, uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio cardiovascular, uma doença ou distúrbio neurológico, uma doença infecciosa e/ou dor.

[0041] Em ainda outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método para diagnosticar uma amostra como cancerosa ou predisposta a ser cancerosa, que compreende colocar uma amostra de microvesícula em contato com uma pluralidade de oligonucleotídeos que são predeterminados a formar preferencialmente um complexo com microvesículas a partir de uma amostra de câncer em comparação às microvesículas a partir de uma amostra de não câncer.

[0042] Em algumas modalidades, a pluralidade de oligonucleotídeos é pré-selecionada através de uma ou etapas de seleção positiva ou negativa, em que a seleção positiva compreende a seleção de oligonucleotídeos contra uma amostra que tem características substancialmente similares em comparação à amostra de teste e em que a seleção negativa compreende a seleção de oligonucleotídeos contra uma amostra que tem características substancialmente diferentes em comparação à amostra de teste.

[0043] Em outro ainda aspecto relacionado, a invenção fornece um método para caracterizar uma doença ou um distúrbio que compreende: (a) colocar uma amostra de teste biológico em contato com um conjunto de aptâmeros; (b) detectar uma presença ou nível de um complexo formado na etapa (a) entre cada um dos membros do conjunto de aptâmeros e da amostra de teste biológico; e (c) comparar a presença ou nível detectado na etapa (b) a um nível de referência caracterizando, desse modo, a doença ou distúrbio. O nível de referência pode ser derivado de um nível do alvo em uma amostra saudável individual, por exemplo, uma que não tem ou não se sabe se tem a doença ou o distúrbio. O nível de referência pode também ser derivado de um indivíduo ou uma amostra que tem uma doença tratada, controlada ou alternada. A amostra de teste biológico pode compreender uma amostra de tecido, uma cultura de células ou um fluido biológico. Em algumas modalidades, o fluido biológico compreende um fluido corporal. O fluido corporal pode ser qualquer fluido útil, incluindo, sem limitação, um ou mais dentre sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de Cowper ou fluido de pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural e peritoneal, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreção vaginal, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares, fluido de cavidade blastocística ou sangue do cordão umbilical. Em algumas modalidades, o fluido corporal compreende sangue, soro ou plasma. O fluido biológico pode compreender ou ser suspeito de compreender microvesículas. Em tais casos, o conjunto de aptâmeros pode ser escolhido para ligar-se a microvesículas. As mi-

crovesículas podem ser isoladas antes de entrar em contato com o conjunto de aptâmeros ou a amostra de teste pode ser colocada em contato diretamente com o conjunto de aptâmeros antes de isolar as microvesículas.

[0044] Conforme citado, as composições e os métodos para uso de um conjunto de aptâmeros que compreende uma pluralidade de oligonucleotídeos podem ser usados para detectar, diagnosticar, prognosticar ou teragnosticar várias doenças e distúrbios, incluindo, sem limitação, um câncer, uma afecção pré-maligna, uma doença inflamatória, uma doença imune, uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio cardiovascular, uma doença ou distúrbio neurológico, uma doença infecciosa ou dor. Nas modalidades, o câncer compreende uma leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cânceres relacionados à AIDS; linfoma relacionado à AIDS; câncer anal; câncer do apêndice; astrocitomas; tumor teratoide/rabdoide atípico; carcinoma basocelular; câncer de bexiga; glioma tronco cerebral; tumor cerebral (incluindo glioma tronco cerebral, tumor teratoide/rabdoide atípico do sistema nervoso central, tumores embrionários do sistema nervoso central, astrocitomas, craniofaringioma, ependimoblastoma, ependimoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais e pineoblastoma); câncer de mama; tumores brônquicos; linfoma de Burkitt; câncer de sítio primário desconhecido; tumor carcinoide; carcinoma de sítio primário desconhecido; tumor teratoide/rabdoide atípico do sistema nervoso central; tumores embrionários do sistema nervoso central; câncer cervical; cânceres infantis; cordoma; leucemia linfocítica crônica; leucemia mieloide crônica; distúrbios mieloproliferativos crônicos; câncer de cólon; câncer colorretal; craniofaringioma; linfoma cutâneo de células T; tumores endócrinos de células das ilhotas pan-

creáticas; câncer endometrial; ependimoblastoma; ependimoma; câncer esofágico; estesioneuroblastoma; sarcoma de Ewing; tumor de células germinativas extracraniano; tumor de células germinativas extragonadal; câncer de ducto biliar extra-hepático; câncer de vesícula biliar; câncer gástrico (estômago); tumor carcinoide gastrointestinal; tumor de célula estromal gastrointestinal; tumor estromal gastrointestinal (GIST); tumor trofoblástico gestacional; glioma; leucemia de células pilosas; câncer de cabeça e pescoço; câncer de coração; linfoma de Hodgkin; câncer de hipofaringe; melanoma intraocular; tumores de células da ilhota; sarcoma de Kaposi; câncer de rim; histiocitose de células de Langerhans; câncer de laringe; câncer de lábio; câncer de fígado; câncer de pulmão; câncer ósseo histiocitoma fibroso maligno; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; carcinoma de células de Merkel; carcinoma de células epiteliais de Merkel; mesotelioma; câncer cervical escamoso metastático primário oculto; câncer de boca; síndromes neoplásicas endócrinas múltiplas; mieloma múltiplo; mieloma múltiplo/neoplasia de células plasmáticas; micose fungoide; síndromes mielodisplásicas; neoplasias mieloproliferativas; câncer de cavidade nasal; câncer de nasofaringe; neuroblastoma; linfoma não Hodgkin; câncer de pele não melanoma; câncer de pulmão de células não pequenas; câncer oral; câncer da cavidade oral; câncer de orofaringe; osteossarcoma; outros tumores cerebrais e da medula espinhal; câncer de ovário; câncer epitelial de ovário; tumor de células germinativas do ovário; tumor de ovário de baixo potencial de malignidade; câncer pancreático; papilomatose; câncer de seios paranasais; câncer de paratireoide; câncer pélvico; câncer de pênis; câncer de faringe; tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária; pineoblastoma; tumor pituitário; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiplo; blastoma pleuropulmonar; linfoma do sistema nervoso central (CNS) primário; câncer de fígado hepatocelular primário; câncer de próstata;

câncer retal; câncer renal; câncer de células renais (rim); câncer de células renais; câncer do trato respiratório; retinoblastoma; rabdomiossarcoma; câncer das glândulas salivares; síndrome de Sézary; câncer de pulmão de pequenas células; câncer de intestino delgado; sarcoma de tecidos moles; carcinoma de células escamosas; câncer cervical escamoso; câncer de estômago (gástrico); tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais; linfoma de células T; câncer de testículo; câncer de garganta; carcinoma tímico; timoma; câncer de tireoide; câncer de células de transição; câncer de células de transição da pelve renal e ureter; tumor trofoblástico; câncer de ureter; câncer de uretra; câncer uterino; sarcoma uterino; câncer vaginal; câncer vulvar; macroglobulinemia de Waldenstrom; ou tumor de Wilms. A afecção pré-maligna pode ser Esôfago de Barrett. Em algumas modalidades, a doença autoimune compreende doença inflamatória do intestino (IBD), doença de Crohn (CD), colite ulcerativa (UC), inflamação pélvica, vasculite, psoríase, diabetes, hepatite autoimune, esclerose múltipla, miastenia gravis, diabetes do Tipo I, artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), tireoidite de Hashimoto, doença de Graves, doença de Espondilite Anquilosante Sjogren, síndrome CREST, Escleroderma, Doença Reumática, rejeição de órgão, Colangite Esclerosante Primária e sepse. Em outras modalidades, a doença cardiovascular compreende aterosclerose, insuficiência cardíaca congestiva, placa vulnerável, acidente vascular cerebral, isquemia, pressão arterial elevada, estenose, oclusão de vaso ou um evento trombótico. A doença neurológica pode incluir, sem limitação, Esclerose Múltipla (MS), Doença de Parkinson (PD), Doença de Alzheimer (AD), esquizofrenia, distúrbio bipolar, depressão, autismo, Doença de Príon, Doença de Pick, demência, Doença de Huntington (HD), síndrome de Down, doença cerebrovascular, encefalite de Rasmussen, meningite viral, lúpus eritematoso sistêmico neuropsiquiátrico (NPSLE), esclerose lateral

amiotrófica, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker, encefalopatia espongiforme transmissível, lesões de reperfusão isquêmica (por exemplo, acidente vascular cerebral), trauma cerebral, infecção microbiana ou síndrome da fadiga crônica. A dor pode incluir fibromialgia, dor neuropática crônica ou dor neuropática periférica. Nas modalidades, a doença infecciosa compreende uma infecção bacteriana, infecção viral, infecção por leveduras, Doença de Whipple, Doença de Príon, cirrose, Staphylococcus aureus resistente à meticilina, HIV, HCV, hepatite, sífilis, meningite, malária, tuberculose, gripe (influenza).

[0045] Nos métodos para uso de um conjunto de aptâmeros que compreende uma pluralidade de oligonucleotídeos, a pluralidade de oliognucleotídeos pode ser uma composição conforme fornecida no presente documento.

[0046] Em outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método para realizar sequenciamento de alto rendimento que compreende: (a) realizar pelo menos uma (i) seleção negativa ou (ii) uma seleção positiva de uma pluralidade de oligonucleotídeos com uma amostra de microvesícula; (b) obter um conjunto de oligonucleotídeos para fornecer um subconjunto aglutinante negativo ou subconjunto aglutinante positivo da pluralidade de oligonucleotídeos, em que o subconjunto aglutinante negativo da pluralidade de oligonucleotídeos não se liga à amostra de microvesícula e em que o subconjunto aglutinante positivo da pluralidade de oligonucleotídeos não se liga à amostra de microvesícula; (c) colocar o subconjunto aglutinante negativo ou subconjunto aglutinante positivo em contato com uma amostra de teste; (d) eluir os oligonucleotídeos que se ligam à amostra de teste para fornecer uma pluralidade de oligonucleotídeos eluídos; e (e) realizar o sequenciamento de alto rendimento da pluralidade de oligonucleotídeos eluídos para identificar a sequência e/ou número de cópias dos

membros da pluralidade de oligonucleotídeos eluídos.

[0047] Em outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método para identificar oligonucleotídeos específicos para uma amostra de teste que compreende: (a) enriquecer uma pluralidade de oligonucleotídeos para uma amostra fornecer um conjunto de oligonucleotídeos predeterminados para formar um complexo com uma amostra alvo; (b) colocar a pluralidade em (a) em contato com uma amostra de teste para permitir a formação de complexos de oligonucleotídeos com a amostra de teste; (c) recuperar oligonucleotídeos que formaram complexos em (b) para fornecer um subconjunto recuperado de oligonucleotídeos; e (d) perfilar o subconjunto recuperado de oligonucleotídeos por sequenciamento, amplificação ou hibridização de alto rendimento identificando, desse modo, oligonucleotídeos específicos para uma amostra de teste. A amostra de teste pode incluir uma pluralidade de microvesículas. Os oligonucleotídeos podem ser RNA, DNA ou ambos. O método pode compreender adicionalmente realizar a análise informática para identificar um subconjunto de oligonucleotídeos que compreendem identidade de sequência de pelo menos 90%.

[0048] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um reagente para executar os métodos de uso de um conjunto de aptâmeros e também o uso do reagente para executar tais métodos. O reagente pode compreender uma composição ou aptâmero relacionado revelado no presente documento e/ou outros componentes conforme revelados no presente documento.

[0049] A invenção também fornece métodos para identificar o conjunto de aptâmeros. Em um aspecto, tal método para identificar um perfil de aptâmero alvo específico para uma amostra biológica compreende colocar uma amostra de teste biológico em contato com um conjunto de moléculas de aptâmero, colocar o conjunto em contato com uma amostra biológica de controle ou referência, identificar um ou

mais aptâmeros que se ligam a um componente na dita amostra de teste, porém, não à amostra de controle ou referência identificando, desse modo, um perfil de aptâmero para a dita amostra de teste biológico.

[0050] Em outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método para selecionar um conjunto de aptâmeros que compreende: (a) colocar uma amostra de controle biológico em contato com um conjunto de oligonucleotídeos; (b) isolar um primeiro subconjunto do conjunto de oligonucleotídeos que não se ligam à amostra de controle biológico; (c) colocar a amostra de teste biológico em contato com o primeiro subconjunto do conjunto de oligonucleotídeos; e (d) isolar um segundo subconjunto do conjunto de oligonucleotídeos que se ligam à amostra de teste biológico selecionado, desse modo, o conjunto de aptâmeros. O conjunto de partida de oligonucleotídeos pode compreender um número grande de sequências, por exemplo, pelo menos 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15}, 10^{16}, 10^{17} ou pelo menos 10^{18} oligonucleotídeos. As etapas (a) a (d) podem ser repetidas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou pelo menos 20 vezes, em que o conjunto de aptâmeros selecionados na etapa (d) é usado como o conjunto de oligonucleotídeos na etapa (a) em cada iteração.

[0051] Em algumas modalidades, a amostra de teste biológico e a amostra de controle biológico compreendem microvesículas. A amostra de teste biológico e, opcionalmente, a amostra de controle biológico podem ser qualquer amostra biológica útil, conforme revelado no presente documento. Por exemplo, podem compreender um fluido corporal. O fluido corporal pode incluir, sem limitação, sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoalveolar, sêmen, fluido prostáti-

co, fluido de Cowper ou fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural, fluido peritoneal, fluido de malignidade, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreção vaginal, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares ou outros fluidos de lavagem. A amostra de teste biológico e, opcionalmente, a amostra de controle biológico podem compreender também uma amostra de tecido ou uma cultura de células. A amostra de teste biológico pode ser uma amostra doente e a amostra de controle biológico pode ser uma amostra não doente. Tal configuração pode permitir a identificação de grupos de aptâmeros que reconhecem preferencialmente uma amostra doente ou reconhecem preferencialmente uma amostra não doente.

[0052] Em ainda outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método para selecionar um conjunto de aptâmeros que compreende: (a) colocar um conjunto de aptâmeros em contato com uma população de microvesículas a partir de uma primeira amostra; (b) enriquecer um subconjunto de aptâmeros que mostram afinidade com a população de microvesículas da primeira amostra; (c) colocar o subconjunto em contato com uma segunda população de microvesículas a partir de uma segunda amostra; e (d) depletar um segundo subconjunto de aptâmeros que mostram afinidade com a segunda população de microvesículas a partir da segunda amostra selecionando, desse modo, o grupo de aptâmeros que têm afinidade preferencial com a população de microvesículas a partir da primeira amostra.

[0053] A primeira e/ou a segunda amostra podem ser qualquer amostra biológica útil conforme revelado no presente documento. Por exemplo, podem compreender um fluido corporal. O fluido corporal pode incluir, sem limitação, sangue periférico, soro, plasma, ascite,

urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de Cowper ou fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural, fluido peritoneal, fluido de malignidade, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreção vaginal, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares ou outros fluidos de lavagem. A primeira amostra e/ou a segunda amostra podem, cada uma, compreender uma amostra agrupada, isto é, uma amostra agrupada em conjunto a partir de várias fontes, tais como diferentes indivíduos. A primeira amostra pode ser uma amostra doente enquanto a segunda amostra compreende uma amostra de controle, opcionalmente, em que a amostra de controle é uma amostra não doente. Alternativamente, a primeira amostra pode ser uma amostra de controle enquanto a segunda amostra compreende uma amostra doente, opcionalmente, em que a amostra de controle é uma amostra não doente.

[0054] As etapas (a) a (d) podem ser repetidas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 vezes, em que o grupo de aptâmeros selecionados na etapa (d) é usado como o conjunto de aptâmeros na etapa (a) em cada iteração. Nas modalidades, a primeira amostra e/ou a segunda amostra são substituídas por uma amostra diferentes antes de repetir as etapas (a) a (d). Por exemplo, a primeira amostra e/ou a segunda amostra podem ser de um indivíduo diferente ou compreender um conjunto de amostras diferente.

[0055] O método pode compreender, ainda, identificar os membros do grupo selecionado de aptâmeros, opcionalmente, em que a identificação é realizada por sequenciamento, amplificação ou hibridização de alto rendimento.

[0056] Em um aspecto, a invenção fornece um método para selecionar um grupo de aptâmeros que compreende: (a) colocar um conjunto de candidatos de aptâmero em contato com uma amostra que compreende uma molécula alvo; (b) remover os candidatos de aptâmero não ligados; (c) colocar a amostra em contato com um ligante para a molécula alvo; e (d) isolar os candidatos de aptâmero que são desassociados da molécula alvo através da competição com o ligante selecionando, desse modo, o grupo de aptâmeros que se ligam ao mesmo alvo que o ligante. A molécula alvo pode ser uma proteína, incluindo, sem limitação, um antígeno de superfície de microvesícula. A molécula alvo é ancorada a um substrato. Em algumas modalidades, a molécula alvo é um antígeno de superfície de uma microvesícula e a microvesícula é ancorada a um substrato. O ligante pode ser uma molécula ou proteína pequena, por exemplo, o ligante pode se rum anticorpo. As etapas (a) a (d) podem ser repetidas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 vezes, em que os candidatos de aptâmeros selecionados na etapa (d) são usados como o conjunto de candidatos de aptâmeros inseridos na etapa (a) em cada iteração. O método pode compreender, ainda, identificar os membros do grupo selecionado de aptâmeros, opcionalmente, em que a identificação é realizada por sequenciamento, amplificação ou hibridização de alto rendimento. A primeira amostra pode ser uma amostra doente enquanto a segunda amostra compreende uma amostra de controle, opcionalmente, em que a amostra de controle é uma amostra não doente. Alternativamente, a primeira amostra pode ser uma amostra de controle enquanto a segunda amostra compreende uma amostra doente, opcionalmente, em que a amostra de controle é uma amostra não doente.

[0057] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para selecionar um ou mais de aptâmeros que ligam um alvo de inte-

resse que compreende: (a) separar o alvo de uma primeira amostra biológica para formar uma amostra biológica depletada alvo; (b) ancorar o alvo separado a um substrato; (c) misturar o alvo ancorado a uma amostra biológica interferente; (d) colocar a mistura de c) em contato com uma biblioteca de aptâmeros inicial; e (e) recuperar membros da biblioteca de aptâmeros que se liga, preferencialmente, ao alvo ancorado selecionando, desse modo, o um ou mais aptâmeros que se ligam ao alvo. O substrato pode ser uma superfície de esfera ou plana. A amostra biológica interferente pode compreender a amostra biológica depletada alvo de a). O alvo pode ser uma microvesícula. Em algumas modalidades, o alvo compreende uma microvesícula de interesse e a amostra biológica interferente compreende uma microvesícula não alvo. A microvesícula não alvo pode ser ancorada a um substrato diferente daquele da microvesícula alvo antes da etapa (c). Em algumas modalidades, o substrato compreende uma esfera magnética e o substrato diferente compreende uma esfera não magnética ou o substrato compreende uma esfera não magnética e o substrato diferente compreende uma esfera magnética.

[0058] A primeira amostra biológica e/ou a amostra biológica interferente podem ser qualquer amostra biológica útil, conforme revelado no presente documento. Por exemplo, podem compreender um fluido corporal. O fluido corporal pode incluir, sem limitação, sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de Cowper ou fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural, fluido peritoneal, fluido de malignidade, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreção vaginal, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático,

fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares ou outros fluidos de lavagem. Em uma modalidade, a primeira amostra biológica compreende uma amostra doente e a amostra biológica interferente compreende uma amostra não doente. Alternativamente, a primeira amostra biológica pode compreender uma amostra não doente enquanto a amostra biológica interferente compreende uma amostra doente.

[0059] A invenção fornece métodos para avaliar uma biblioteca de agentes de ligação, tais como aptâmeros, para identificar agentes de ligação para um alvo de interesse. Em um aspecto, a invenção fornece um método para identificar uma pluralidade de ligantes alvo que compreende: (a) colocar uma população de microvesículas de referência em contato com uma pluralidade de ligantes que têm capacidade para se ligar a um ou mais marcadores de superfície de microvesícula; (b) isolar uma pluralidade de ligantes de referência, em que a pluralidade de ligantes de referência compreende um subconjunto da pluralidade de ligantes que não têm uma afinidade com a população de microvesículas de referência; (c) colocar uma ou mais microvesículas de teste em contato com a pluralidade de ligantes de referência; e (d) identificar um subconjunto de ligantes a partir da pluralidade de ligantes de referência que formam complexos com um marcador de superfície na uma ou mais microvesículas de teste identificando, desse modo, a pluralidade de ligantes alvo. O método compreende, ainda, identificar o marcador de superfície da microvesícula alvo. A pluralidade de ligantes pode ser aptâmeros e/ou anticorpos.

[0060] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para identificar um aptâmero específico para um alvo de interesse que compreende: (a) colocar um conjunto de aptâmeros candidatos em contato com um ou mais componentes de ensaio, em que os componentes de ensaio não compreendem o alvo de interesse; (b) recuperar

os membros do conjunto de aptâmeros candidatos que não se ligam a um ou mais componentes de ensaio em (a); (c) colocar os membros do conjunto de aptâmeros candidatos recuperados em (b) em contato com o alvo de interesse na presença de um ou mais alvos de confusão; e (d) recuperar um aptâmero candidato que se liga ao alvo de interesse na etapa (c) identificando, desse modo, o aptâmero específico para o alvo de interesse. O método pode remover aptâmeros candidatos que ligam moléculas não alvo. As etapas (a) a (b) podem ser repetidas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou pelo menos 20 vezes antes da etapa (c) ser realizada. Adicionalmente, as etapas (c) a (d) podem ser repetidas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou pelo menos 20 vezes antes de identificar o aptâmero específico para o alvo de interesse. O conjunto de partida de aptâmeros candidatos pode incluir pelo menos 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15}, 10^{16}, 10^{17} ou pelo menos 10^{18} sequências de ácidos nucleicos. O um ou mais componentes de ensaio podem incluir, sem limitação, um ou mais dentre um substrato, uma esfera, um arranjo plano, uma coluna, um tubo, um poço ou um filtro.

[0061] Em uma modalidade, o alvo de interesse e o um ou mais alvos de confusão compreendem uma proteína. O alvo de interesse e o um ou mais alvos de confusão compreendem uma microvesícula. Em algumas modalidades, o alvo de interesse e o um ou mais alvos de confusão compreendem um ou mais antígenos de superfície de microvesícula. O antígeno de superfície de microvesícula pode ser selecionado a partir das Tabelas 3, 4 e/ou 26. A título de exemplo não limitante, o alvo de interesse pode ser uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste em SSX4, SSX2, PBP, KLK2, SPDEF, enquanto o um ou mais alvos de confusão compreendem os outros membros do grupo.

[0062] O um ou mais antígenos de superfície de microvesícula podem ser um biomarcador de uma doença ou um distúrbio, incluindo, sem limitação, aqueles revelados no presente documento. Em algumas modalidades, a doença compreende um câncer, uma afecção pré-maligna, uma doença inflamatória, uma doença imune, uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio cardiovascular, uma doença ou distúrbio neurológico, uma doença infecciosa ou dor. O câncer pode ser uma leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cânceres relacionados à AIDS; linfoma relacionado à AIDS; câncer anal; câncer do apêndice; astrocitomas; tumor teratoide/rabdoide atípico; carcinoma basocelular; câncer de bexiga; glioma tronco cerebral; tumor cerebral (incluindo glioma tronco cerebral, tumor teratoide/rabdoide atípico do sistema nervoso central, tumores embrionários do sistema nervoso central, astrocitomas, craniofaringioma, ependimoblastoma, ependimoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais e pineoblastoma); câncer de mama; tumores brônquicos; linfoma de Burkitt; câncer de sítio primário desconhecido; tumor carcinoide; carcinoma de sítio primário desconhecido; tumor teratoide/rabdoide atípico do sistema nervoso central; tumores embrionários do sistema nervoso central; câncer cervical; cânceres infantis; cordoma; leucemia linfocítica crônica; leucemia mieloide crônica; distúrbios mieloproliferativos crônicos; câncer de cólon; câncer colorretal; craniofaringioma; linfoma cutâneo de células T; tumores endócrinos de células das ilhotas pancreáticas; câncer endometrial; ependimoblastoma; ependimoma; câncer esofágico; estesioneuroblastoma; sarcoma de Ewing; tumor de células germinativas extracraniano; tumor de células germinativas extragonadal; câncer de ducto biliar extra-hepático; câncer de vesícula biliar; câncer gástrico (estômago); tumor carcinoide gastroin-

testinal; tumor de célula estromal gastrointestinal; tumor estromal gastrointestinal (GIST); tumor trofoblástico gestacional; glioma; leucemia de células pilosas; câncer de cabeça e pescoço; câncer de coração; linfoma de Hodgkin; câncer de hipofaringe; melanoma intraocular; tumores de células da ilhota; sarcoma de Kaposi; câncer de rim; histiocitose de células de Langerhans; câncer de laringe; câncer de lábio; câncer de fígado; câncer de pulmão; câncer ósseo histiocitoma fibroso maligno; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; carcinoma de células de Merkel; carcinoma de células epiteliais de Merkel; mesotelioma; câncer cervical escamoso metastático primário oculto; câncer de boca; síndromes neoplásicas endócrinas múltiplas; mieloma múltiplo; mieloma múltiplo/neoplasia de células plasmáticas; micose fungoide; síndromes mielodisplásicas; neoplasias mieloproliferativas; câncer de cavidade nasal; câncer de nasofaringe; neuroblastoma; linfoma não Hodgkin; câncer de pele não melanoma; câncer de pulmão de células não pequenas; câncer oral; câncer da cavidade oral; câncer de orofaringe; osteossarcoma; outros tumores cerebrais e da medula espinhal; câncer de ovário; câncer epitelial de ovário; tumor de células germinativas do ovário; tumor de ovário de baixo potencial de malignidade; câncer pancreático; papilomatose; câncer de seios paranasais; câncer de paratireoide; câncer pélvico; câncer de pênis; câncer de faringe; tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária; pineoblastoma; tumor pituitário; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiplo; blastoma pleuropulmonar; linfoma do sistema nervoso central (CNS) primário; câncer de fígado hepatocelular primário; câncer de próstata; câncer retal; câncer renal; câncer de células renais (rim); câncer de células renais; câncer do trato respiratório; retinoblastoma; rabdomiossarcoma; câncer das glândulas salivares; síndrome de Sézary; câncer de pulmão de pequenas células; câncer de intestino delgado; sarcoma de tecidos moles; carcinoma de células es-

camosas; câncer cervical escamoso; câncer de estômago (gástrico); tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais; linfoma de células T; câncer de testículo; câncer de garganta; carcinoma tímico; timoma; câncer de tireoide; câncer de células de transição; câncer de células de transição da pelve renal e ureter; tumor trofoblástico; câncer de ureter; câncer de uretra; câncer uterino; sarcoma uterino; câncer vaginal; câncer vulvar; macroglobulinemia de Waldenstrom; ou tumor de Wilms. A afecção pré-maligna pode ser Esôfago de Barrett. Em algumas modalidades, a doença autoimune compreende doença inflamatória do intestino (IBD), doença de Crohn (CD), colite ulcerativa (UC), inflamação pélvica, vasculite, psoríase, diabetes, hepatite autoimune, esclerose múltipla, miastenia gravis, diabetes do Tipo I, artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), tireoidite de Hashimoto, doença de Graves, doença de Espondilite Anquilosante Sjogren, síndrome CREST, Escleroderma, Doença Reumática, rejeição de órgão, Colangite Esclerosante Primária e sepse. Em outras modalidades, a doença cardiovascular compreende aterosclerose, insuficiência cardíaca congestiva, placa vulnerável, acidente vascular cerebral, isquemia, pressão arterial elevada, estenose, oclusão de vaso ou um evento trombótico. A doença neurológica pode incluir, sem limitação, Esclerose Múltipla (MS), Doença de Parkinson (PD), Doença de Alzheimer (AD), esquizofrenia, distúrbio bipolar, depressão, autismo, Doença de Príon, Doença de Pick, demência, Doença de Huntington (HD), síndrome de Down, doença cerebrovascular, encefalite de Rasmussen, meningite viral, lúpus eritematoso sistêmico neuropsiquiátrico (NPSLE), esclerose lateral amiotrófica, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker, encefalopatia espongiforme transmissível, lesões de reperfusão isquêmica (por exemplo, acidente vascular cerebral), trauma cerebral, infecção microbiana ou síndrome da fadiga crônica. A dor pode incluir fibromialgia, dor neu-

ropática crônica ou dor neuropática periférica. Nas modalidades, a doença infecciosa compreende uma infecção bacteriana, infecção viral, infecção por leveduras, Doença de Whipple, Doença de Príon, cirrose, Staphylococcus aureus resistente à meticilina, HIV, HCV, hepatite, sífilis, meningite, malária, tuberculose, gripe.

[0063] A invenção fornece métodos para identificar agentes de ligação que compreende colocar uma pluralidade de microvesículas extracelulares em contato com uma biblioteca gerada aleatoriamente de agentes de ligação e identificar um subconjunto da biblioteca de agentes de ligação que tem uma afinidade a um ou mais componentes das microvesículas extracelulares. Os agentes de ligação podem ser aptâmeros e/ou anticorpos.

[0064] Os ligantes, incluindo aptâmeros de oligonucleotídeo identificado pelos métodos da invenção, podem ser usados em ensaios para caracterizar um fenótipo de uma amostra, por exemplo, para fornecer um diagnóstico, prognóstico e/ou teragnóstico de uma doença ou um distúrbio. Tal método para caracterizar um fenótipo pode compreender colocar uma amostra biológica de teste em contato com o um ou mais ligantes ou aptâmeros que ligam um alvo de interesse. O fenótipo pode incluir detectar uma doença ou um distúrbio, conforme revelado no presente documento.

[0065] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um reagente para executar os métodos para avaliar bibliotecas de ligantes e aptâmeros contra um ou mais alvos de interesse. A invenção fornece também o uso do reagente para executar os métodos para avaliar bibliotecas de ligantes e aptâmeros contra um ou mais alvos de interesse. O reagente pode compreender uma composição ou biblioteca de aptâmeros revelada no presente documento e/ou outros componentes conforme revelados no presente documento.

[0066] Os métodos para avaliar as bibliotecas de ligantes e aptâ-

meros contra um ou mais alvos de interesse pode incluir, ainda, identificar um ou mais alvos dos ligantes/aptâmeros selecionados. Tais métodos não revelados no presente documento e/ou são conhecidos na técnica. Consulte, por exemplo, a Figura 14. Em tal aspecto, a invenção fornece um método para identificar um alvo de um agente de ligação que compreende: (a) colocar o agente de ligação em contato com o alvo para ligar o alvo ao agente de ligação, em que o alvo compreende um antígeno de superfície de uma microvesícula; (b) romper a microvesícula sob condições que não rompem a ligação do alvo com o agente de ligação; (c) isolar o complexo entre o alvo e o agente de ligação; e (d) identificar o alvo ligado pelo agente de ligação. O agente de ligação pode ser um ligante ou um aptâmero identificado pelos métodos de avaliação acima ou em outra parte no presente documento. Consulte, por exemplo, as Figuras 13A e 13B. O alvo do agente de ligação pode ser qualquer biomarcador apropriado, incluindo uma proteína, um ácido nucleico, um lipídeo, um carboidrato ou uma microvesícula.

[0067] Em algumas modalidades, o alvo é reticulado ao agente de ligação antes da etapa (b). A reticulação pode compreender fotorreticulação, um reticulador de imidoéster, suberimidato de dimetila, um reticulador de N-Hidroxissuccinimida-éster, suberato de bissulfosuccinimidila (BS3), um aldeído, acroleína, crotonaldeído, formaldeído, um reticulador de carbodiimida, N,N'-dicicloexilcarbodiimida (DDC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), cloridrato de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC ou EDAC), Succinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (SMCC), e Sulfossuccinimidil-4-(V-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (Sulfo-SMCC), a Sulfo-N-hidroxissuccinimidil-2-(6-[biotinamido]-2-(p-azido benzamido)-hexanoamido) etil-1,3'-ditioproprionato (Sulfo-SBED), 2-[N2-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil)-N6-(6-biotina-amidocaproil)-L-lisinil]etil me-

tanotiossulfonato (Mts-Atf-Biotina), 2-{N2-[N6-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil-6-amino-caproil)-N6-(6-biotinamidocaproil)-L-lisinilamido]} metanotiossultonato de etila (Mts-Atf-LC-Biotina), um aminoácido fotorreativo, L-Foto-Leucina, L-Foto-Metionina, um reticulador de N-Hidroxissuccinimida (NHS), um reagente de NHS-Azida, NHS-Azida, NHS-PEG4-Azida, NHS-PEG12-Azida, um reagente de NHS-Fosfina, NHS-Fosfina, Sulfo-NHS-Fosfina, ou qualquer combinação ou modificação desses. Romper a microvesícula na etapa (b) pode incluir o uso de um ou mais dentre um detergente, um tensoativo, um solvente, uma enzima, cisalhamento mecânico, moinho de esferas, homogeneização, microfluidização, sonicação, Prensa Francesa, colisão, um moinho coloidal, descompressão, choque osmótico, termólise, congelamento-descongelamento e dessecação. A enzima pode ser uma ou mais dentre lisozima, lisostafina, zimoliase, celulase, mutanolisina, uma glicanase, uma protease e manase. Os detergentes úteis incluem um ou mais dentre um octiltioglucosídeo (OTG), octil beta-glucosídeo (OG), um detergente não iônico, Triton X, Tween 20, um álcool graxo, um álcool cetílico, um álcool estearílico, álcool cetoestearílico, um álcool oleílico, um éter alquílico de polioxietileno glicol (Brij), éter monododecílico de octaetileno glicol, éter monododecílico de pentaetileno glicol, um éter alquílico de polioxipropileno glicol, um éter alquílico de glucosídeo, decil glicosídeo, lauril glicosídeo, octil glicosídeo, um polioxietileno glicol octilfenol éter, um polioxietileno glicol alquilfenol éter, nonoxinol-9, um éster alquílico de glicerol, laurato de glicerila, um éster alquílico de polioxietileno glicol sorbitano, polissorbato, um éster alquílico de sorbitano, cocamida MEA, cocamida DEA, óxido de dodecildimetilamina, copolímeros de bloco de polietileno glicol e polipropileno glicol, poloxâmeros, amina de sebo polietoxilado (POEA), um detergente zwitteriônico, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanossulfonato (CHAPS), um alquilbenzeno sulfonato linear (LAS),

um alquil fenol etoxilado (APE), cocamidopropil hidroxissultaína, uma betaína, cocamidopropil betaína, lecitina, um detergente iônico, dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetrimônio (CTAB), cloreto de cetil trimetilamônio (CTAC), diidrocloreto de octenidina, cloreto de cetilpiridínio (CPC), cloreto de benzalcônio (BAC), cloreto de benzetônio (BZT), 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano, cloreto de dimetildioctadecilamônio, brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), desoxicolato de sódio, nonil fenoxipolietoxiletanol (Tergitol-tipo NP-40; NP-40), lauril sulfato de amônio, lauret sulfato de sódio (lauril éter sulfato de sódio (SLES)), miret sulfato de sódio, um carboxilato de alquila, estearato de sódio, lauroil sarcosinato de sódio, um fluorotensoativo à base de carboxilato, perfluorononanoato, perfluorooctanoato (PFOA ou PFO) e um biotensoativo.

[0068] Em uma modalidade, o agente de ligação é ancorado a um substrato. Consulte, por exemplo, a Figura 14. O substrato pode ser uma microesfera ou um substrato plano. O agente de ligação pode ser identificado. Em algumas modalidades, isolar o complexo entre o alvo e o agente de ligação compreende capturar o agente de ligação por meio da identificação. A identificação pode ser uma identificação de biotina.

[0069] Nas modalidades em que o alvo compreende uma proteína, identificar o alvo pode compreender o uso de espectrometria de massa (MS), impressão digital de massa de peptídeo (PMF; impressão digital de proteína), sequenciamento, análise de aminoácidos N-terminais, análise de aminoácidos C-terminais, degradação de Edman, cromatografia, eletroforese, eletroforese em gel bidimensional (gel 2D), arranjo de anticorpo e imunoensaio.

[0070] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um reagente para executar os métodos de identificação de alvo. A invenção fornece também o uso do reagente para executar os métodos de iden-

tificação de alvo. O reagente pode compreende vários substratos, ligantes, detergentes e/ou outros componentes, conforme revelado no presente documento.

[0071] A invenção fornece composições e métodos para facilitar a avaliação de biblioteca de aptâmeros e ensaios baseados em aptâmero. Esses incluem, sem limitação, aptâmeros de controle negativo e bloqueio. Em tal aspecto, a invenção fornece um ácido nucleico que compreende uma sequência pelo menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% homóloga a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em qualquer uma dentre SEQ ID NOs. 230938-231008. A invenção também fornece um ácido nucleico que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em qualquer uma dentre SEQ ID NOs. 230938-231008. A invenção fornece, ainda, um ácido nucleico isolado que compreende uma sequência pelo menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou 100% homóloga a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em qualquer uma dentre SEQ ID NOs. 230938-231008. A invenção fornece um ácido nucleico isolado que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em qualquer uma dentre SEQ ID NOs. 230938-231008. Os ácidos nucleicos podem ser, ainda, modificados para compreenderem pelo menos uma modificação química. A modificação pode incluir, sem limitação, uma substituição química em uma posição de açúcar; uma substituição química em uma posição de fosfato; e uma substituição química em uma posição de base do ácido nucleico. A modificação pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em: incorporação de um nucleotídeo modificado, terminação 3', pirimidina modificada em 2', biotinilação, conjugação com um ligante amina, conjugação com um composto não imunogênico de alto peso molecular, conjugação com um composto lipofílico. Nas modalidades, o composto de alto peso

molecular não imunogênico é um polialquileno glicol, por exemplo, polietileno glicol.

[0072] A invenção fornece uma composição que compreende um ácido nucleico acima e também um kit que compreende um ácido nucleico acima ou a composição. A invenção fornece, ainda, uma composição de controle negativo que compreende um ácido nucleico de ligação não alvo ligado a um substrato. O ácido nucleico de ligação não alvo pode ser ligado covalentemente a um substrato. Alternativamente, o ácido nucleico de ligação não alvo pode ser ligado não covalentemente a um substrato. O ácido nucleico de ligação não alvo pode ser um ácido nucleico acima (por exemplo, como em referência a qualquer uma dentre SEQ ID NOs. 230938-231008). O ácido nucleico de ligação não alvo pode compreender uma sequência embaralhada de qualquer uma dentre SEQ ID NOs. 1-241535 ou um fragmento funcional das mesmas. Uma sequência embaralhada inclui uma sequência que é rearranjada aleatoriamente em todo ou em parte.

[0073] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para detectar uma presença ou um nível de entidade biológica em uma amostra biológica suspeita de conter a atividade biológica que compreende: (a) fornecer uma composição que compreende um substrato e uma composição de controle negativo, conforme descrito acima, em que o substrato compreende um ou mais agentes de ligação para a entidade biológica; (b) colocar a amostra biológica em contato com a composição fornecida na etapa (a); (c) detectar um sinal alvo que corresponde à quantidade de entidades biológicas reconhecidas pelo um ou mais agentes de ligação na etapa (b); e (d) normalizar o sinal alvo detectado na etapa (c) para um sinal de controle que corresponde à quantidade de sinais produzidos pela composição de controle negativo detectando, desse modo, a presença ou nível da entidade biológica na amostra biológica. Normalizar o sinal alvo pode compreender subtrair

o sinal de controle do sinal alvo.

[0074] Em uma modalidade, o um ou mais agentes de ligação compreendem um anticorpo ou um aptâmero. A entidade biológica pode ser uma proteína. A entidade biológica pode ser uma microvesícula. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de ligação são específicos para um antígeno de superfície de microvesícula, incluindo, sem limitação, um antígeno de superfície de microvesícula selecionado a partir de qualquer uma dentre as Tabelas 3 a 4 ou 26. A entidade biológica, por exemplo, uma proteína, uma microvesícula ou um antígeno de superfície de microvesícula, pode ser escolhida como um biomarcador de uma doença ou um distúrbio. Em tais casos, o método pode fornecer um diagnóstico, um prognóstico ou um teragnóstico da doença ou do distúrbio conforme descrito adicionalmente no presente documento.

[0075] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um reagente para executar o método. A invenção fornece também o uso do reagente para executar os métodos. O reagente pode compreender a composição de controle negativo.

[0076] Em outro aspecto relacionado, a invenção fornece uma composição de bloqueio que compreende um ácido nucleico de ligação não alvo. O ácido nucleico de ligação não alvo pode compreender um ácido nucleico revelado acima, por exemplo, como em referência a qualquer uma dentre SEQ ID NOs. 230938-231008. A composição de bloqueio pode, ainda, incluir uma ou mais seleções de componente a partir do grupo que consiste em albumina de soro bovino (BSA), caseína, pepticase, tensoativos não iônicos, Tween® 20, Triton® X-100), um anticorpo não reagente ou fragmento do mesmo, FSG (gelatina de pele de peixe), gelatina pura, uma hidrolase de gelatina, polietileno glicol (PEG), soro não reagente e uma proteína não reagente.

[0077] Em ainda outro aspecto relacionado, a invenção fornece um

método para detectar uma presença ou um nível de entidade biológica em uma amostra biológica suspeita de conter a atividade biológica que compreende: (a) colocar um substrato em contato com uma composição de bloqueio, conforme descrito acima, em que o substrato compreende um ou mais agentes de ligação para a entidade biológica; (b) colocar a amostra biológica em contato com o substrato bloqueado fornecido na etapa (a); e (c) detectar se a entidade biológica é reconhecida pelo um ou mais agentes de ligação na etapa (b) detectando, desse modo, a presença ou nível da entidade biológica na amostra biológica.

[0078] Em uma modalidade, o um ou mais agentes de ligação compreendem um anticorpo ou um aptâmero. A entidade biológica pode ser uma proteína. A entidade biológica pode ser uma microvesícula. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de ligação são específicos para um antígeno de superfície de microvesícula, incluindo, sem limitação, um antígeno de superfície de microvesícula selecionado a partir de qualquer uma dentre as Tabelas 3 a 4 ou 26. A entidade biológica, por exemplo, uma proteína, uma microvesícula ou um antígeno de superfície de microvesícula, pode ser escolhida como um biomarcador de uma doença ou um distúrbio. Em tais casos, o método pode fornecer um diagnóstico, um prognóstico ou um teragnóstico da doença ou do distúrbio conforme descrito adicionalmente no presente documento.

[0079] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um reagente para executar o método. A invenção fornece também o uso do reagente para executar os métodos. O reagente pode compreender a composição de controle negativo.

[0080] Em um aspecto, a invenção fornece um aptâmero que se liga especificamente a um grupo funcional. O aptâmero de ligação de grupo funcional pode compreender um ácido nucleico revelado acima,

por exemplo, como em referência a qualquer uma dentre SEQ ID NOs. 230938-231008. Em algumas modalidades, o aptâmero de ligação de grupo funcional serve como um agente de bloqueio por bloqueio de vários grupos funcionais e pode, portanto, ser usado para aprimorar o desempenho de um ensaio.

[0081] O grupo funcional pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em um hidrocarboneto, um halogênio, um grupo contendo oxigênio (isto é, ligações C-O), um grupo contendo nitrogênio, um grupo contendo enxofre, um grupo contendo fósforo ou um grupo contendo boro. Em algumas modalidades, o hidrocarboneto é selecionado a partir do grupo que consiste em alcanos, alcenos, alcinos, derivados de benzeno, derivados de tolueno, alcanos ramificados ou de anel, carbocátions e carboânions. Em outras modalidades, o halogênio é selecionado a partir do grupo que consiste em haloalcanos, fluoroalcanos, cloroalcanos, bromoalcanos e iodoalcanos. Em ainda outras modalidades, o grupo contendo oxigênio é selecionado a partir do grupo que consiste em álcoois, cetonas, aldeídos, haletos de acila, carbonatos, carboxilatos, ácidos carboxílicos, ésteres, hidroperóxidos, éteres, hemiacetais, hemicetais, acetais, cetais, ortoésteres e ortocarbonatos. O grupo contendo nitrogênio pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em amidas, aminas, iminas, imidas, azidas, compostos azo, cianatos, nitratos, nitrilos, nitritos, compostos nitro, compostos nitrosos e derivados de piridina. O grupo contendo enxofre pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em tióis, sulfetos, dissulfetos, sulfóxidos, sulfonas, ácidos sulfúnicos, ácidos sulfônicos, tiocianatos, isotianatos, tionas e tiais Em uma modalidade, o grupo contendo fósforo é selecionado a partir do grupo que consiste em fosfinas, fosfanos, ácidos fosfônicos, fosfatos e fosfodiésteres. O grupo contendo boro pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em ácidos borônicos, ésteres borônicos, ácidos borínicos e ésteres borínicos.

[0082] O grupo funcional pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em acetais, grupos acila, haletos de acila, grupos alquenila, alcóxidos, grupos alcóxi, grupos alquinila, amidas, óxidos de amina, aminas, carbodiimidas, carboximidatos, ácidos carboxílicos, cianamidas, cianatos, ditiocarbamatos, enóis, ésteres, éteres, hidrazinas, hidrazonas, ácidos hidroxâmicos, imidas, isocianatos, isocianetos, isotiocianatos, cetais, cetenos, cetonas, grupos de saída, nitrilas, organoaletos, organofósforo, ortoésteres, oximas, fosfonofluoridatos, fosfonotioatos, fosforamidotioatos, fosforoditioatos, fosforofluoridatos, fosforotioatos, grupos de proteção, pirofosfatos, semicarbazidas, semicarbazonas, sulfamatos, ésteres de sulfonato, sulfonas, ácidos sulfônicos, grupos sulfonila, sulfoximinas, compostos sulfurila, tioamidas, tiocianatos, tioésteres, tiolatos, tionas, compostos tiofosforila e tiossulfinatos. O grupo funcional pode ser também selecionado a partir do grupo que consiste em acetal, grupo acetóxi, acetileto, anidrido ácido, grupo de ativação, cloreto de acila, haleto de acila, acilal, aciloína, acilsilano, álcool, aldeído, aldimina, alcano, alceno, alcóxido, cicloalcano de alquila, nitritos de alquila, alcino, aleno, amida, amidina, aminal, óxido de amina, azida, azina, aziridina, azóxi, bifuncional, bistiosemicarbazona, biureto, ácido borônico, carbamato, carbamino, carbazida, carbeno, carbinol, éster de carbonato, carbonila, carboxamida, carboximidato, ácido carboxílico, formato de cloro, cumuleno, éster de cianato, cianimida, cianoidrina, grupos de desativação, depsídeo, diazo, diol, ditiocarbamato, enamina, enediina, enol, éter de enol, enona, enina, epissulfeto, epóxido, éster, éter, fluorossulfonato, haloidrina, halocetona, hemiacetal, hemiaminal, hemitioacetal, hidrazida, hidrazona, ácido hidroxâmico, hidroxila, hidroxilamina, imina, imínio, isotiourônio, ceteno, cetenimina, cetona, cetila, lactam, lactol, lactona, metina, grupo metila, nitrato, ileto de nitrila, nitrilimina, composto nitro, nitroamina, nitronato, nitrona, íon de nitrônio, nitrosamina, nitroso, ortoéster, osazona, oxa-

ziridina, oxima, sal de n-oxoamônio, peróxido, ácido peróxi, carbeno persistente, fenóis, fosfaalceno, fosfaalcino, fosfato, fosfinato, fosfina, fosfina oxeto, fosfinito, fosfonato, fosfonito, fosfônio, fosforano, s-nitrosotiol, base de schiff, selenol, ácido selenônico, selona, semicarbazeto, semicarbazona, enol éter de silila, éter de silila, sulfenameto, ácido sulfênico, cloreto de sulfenila, sulfeto, sulfilimina, sulfanameto, ácido sulfínico, éster de sulfito, sulfonameto, sulfonanileto, sulfonato, sulfonila, haleto de sulfonila, sulfoxeto, sulfurila, sultona, telurol, tial, tioacetal, tioameto, tiocarbamato, tiocarbóxi, tiocianato, tioéster, tioéter, tiocetal, tiocetona, tiol, tiolactona, tioureia, tosilidrazona, triazeno, triol, ureia, vanilila, xantato, ileto e inolato. Em algumas modalidades, o grupo funcional compreende um grupo carboxila, um grupo amino, um grupo hidroxila, um grupo hidrazida e/ou um grupo clorometila. Por exemplo, o grupo funcional pode ser um grupo carboxila.

[0083] A invenção fornece, também, uma composição que compreende o aptâmero de ligação de grupo funcional e um substrato. O substrato pode ser qualquer substrato útil, por exemplo, um substrato plano ou uma microesfera. Consulte, por exemplo, as Figuras 16A e 16B. O substrato pode ser modificado, por exemplo, com uma ou mais modificações selecionadas a partir do grupo que consiste em modificado por carboxila, modificado por amino, modificado por hidroxila, modificado por hidrazida, modificado por clorometila e uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade, o substrato compreende um grupo carboxila. O aptâmero pode ser ligado ao grupo carboxila. O substrato pode também compreende um agente de ligação, incluindo, sem limitação, um anticorpo ou um aptâmero. Em algumas modalidades, a composição compreende, ainda, uma microvesícula.

[0084] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um reagente e o uso do reagente, em que o reagente pode compreender um aptâmero de ligação de grupo funcional e/ou a composição descrita

acima.

[0085] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método que compreende colocar um aptâmero de ligação de grupo funcional, conforme descrito acima, em contato com um substrato, por exemplo, um substrato plano ou uma microesfera. Conforme descrito acima, o substrato pode ser modificado, por exemplo, com uma ou mais modificações selecionadas a partir do grupo que consiste em modificado por carboxila, modificado por amino, modificado por hidroxila, modificado por hidrazida, modificado por clorometila e uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade, o substrato compreende um grupo carboxila. O aptâmero pode ser ligado ao grupo carboxila. O substrato pode também compreende um agente de ligação, incluindo, sem limitação, um anticorpo ou um aptâmero. Em algumas modalidades, a composição compreende, ainda, uma microvesícula. O método pode compreender, ainda, colocar o substrato em contato com um alvo do agente de ligação, por exemplo, uma proteína ou uma microvesícula.

[0086] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um reagente para executar o método. A invenção fornece também o uso do reagente para executar os métodos. O reagente pode compreender um aptâmero de ligação de grupo funcional e/ou a composição descrita acima.

[0087] Em outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método para detectar uma presença ou um nível de entidade biológica em uma amostra biológica suspeita de conter a atividade biológica que compreende: (a) fornecer uma composição que compreende um ou mais agentes de ligação específicos à entidade biológica ligados a um substrato carboxilado, em que o substrato carboxilado é ligado a um aptâmero de ligação de grupo funcional; (b) colocar a amostra biológica em contato com a composição fornecida na etapa (a); e (c) detectar se a entidade biológica é reconhecida pelo um ou mais agentes de li-

gação na etapa (b), desse modo detectar a presença ou nível da entidade biológica na amostra biológica. O aptâmero de ligação de grupo funcional pode ser um aptâmero de ligação de grupo funcional descrito acima.

[0088] Em uma modalidade, o um ou mais agentes de ligação compreendem um anticorpo ou um aptâmero. A entidade biológica pode ser uma proteína. A entidade biológica pode ser uma microvesícula. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de ligação são específicos para um antígeno de superfície de microvesícula, incluindo, sem limitação, um antígeno de superfície de microvesícula selecionado a partir de qualquer uma dentre as Tabelas 3 a 4 ou 26. A entidade biológica, por exemplo, uma proteína, uma microvesícula ou um antígeno de superfície de microvesícula, pode ser escolhida como um biomarcador de uma doença ou um distúrbio. Em tais casos, o método pode fornecer um diagnóstico, um prognóstico ou um teragnóstico da doença ou do distúrbio conforme descrito adicionalmente no presente documento.

[0089] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um reagente para executar o método. A invenção fornece também o uso do reagente para executar os métodos. O reagente pode compreender um ou mais dentre o aptâmero de ligação de grupo funcional o substrato.

[0090] Em outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método para aprimorar a ligação de compreende: (a) colocar um substrato em contato com um aptâmero que tem capacidade para ligar um grupo carboxila, em que o substrato também compreende uma ou mais moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeo selecionadas; e (b) colocar o substrato em contato com um agente de ligação que tem capacidade para ligar a molécula de ácido nucleico ou polipeptídeo, pelo qual o aptâmero que se liga ao grupo carboxila aprimora a ligação do

agente de ligação à molécula de ácido nucleico ou polipeptídeo. O aptâmero de ligação de grupo funcional pode ser um aptâmero de ligação de grupo funcional descrito acima. O substrato pode ser qualquer substrato útil, por exemplo, um substrato plano ou uma microesfera. O ácido nucleico ou o peptídeo pode ser ligado covalentemente a um grupo carboxila por meio de uma ligação amida. Em algumas modalidades, a substrato compreende o agente de ligação.

[0091] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um reagente para executar o método. A invenção fornece também o uso do reagente para executar os métodos. O reagente pode compreender um ou mais dentre o aptâmero de ligação de grupo funcional o substrato.

[0092] A invenção fornece composições que compreendem um complexo entre um substrato e uma amostra e métodos de uso do mesmo. Em tal aspecto, a invenção fornece um método para selecionar um ou mais agentes de ligação que compreende: (a) colocar um substrato em contato com uma amostra biológica para permitir a formação de um complexo de substrato-amostra biológica; (b) colocar o complexo de substrato-amostra biológica em contato com uma pluralidade de agentes de ligação candidatos; e (c) identificar um ou mais elementos da pluralidade de agentes de ligação candidatos que se associa ao complexo de substrato-amostra biológica, desse modo, selecionando o um ou mais agentes de ligação. O um ou mais agentes de ligação podem ser um ácido nucleico, molécula de DNA, molécula de RNA, anticorpo, conjugado de anticorpo, fragmento de anticorpo, aptâmero, peptoide, zDNA, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), lectina, polipeptídeo, peptídeo, dendrímero, agente de identificação de proteína de membrana, composto químico, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o um ou mais agentes de ligação compreendem um aptâmero.

[0093] A amostra biológica pode ser qualquer amostra útil, por exemplo, uma amostra de tecido, uma amostra de cultura de células ou um fluido biológico. Em algumas modalidades, a amostra biológica compreende um fluido corporal, em que, opcionalmente, o fluido corporal compreende sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de Cowper ou fluido de pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural e peritoneal, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreção vaginal, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares, fluido da cavidade blastocística, sangue do cordão umbilical, ou um derivado de qualquer um dos mesmos. A amostra biológica pode incluir uma população de microvesículas heterogênea ou uma população de microvesículas homogênea.

[0094] Em algumas modalidades, a amostra biológica é uma amostra de plasma concentrado, uma amostra de soro, uma amostra de soro clarificado, ou uma amostra de plasma clarificado. A amostra de soro clarificado ou plasma clarificado pode ter níveis reduzidos de uma ou mais proteínas abundantes em comparação a uma amostra de controle não clarificada. A uma ou mais proteínas abundantes podem ser uma proteína sanguínea. Tais proteínas abundantes incluem, sem limitação, albumina, IgG, transferrina, fibrinogênio, fibrina, IgA, α2-Macroglobulina, IgM, α1-Antitripsina, complemento C3, haptoglobulina, apolipoproteína A1, A3 e B; α1-Glicoproteína Ácida, ceruloplasmina, complemento C4, C1q, IgD, prealbumina (transtiretina), plasminogênio, um derivado de qualquer um desses e uma combinação dos mesmos. A uma ou mais proteínas abundantes podem compreender um ou mais

dentre Albumina, Imunoglobulinas, Fibrinogênio, Pré-albumina, Alfa 1 antitripsina, Alfa 1 glicoproteína alfa, Alfa 1 fetoproteína, Haptoglobina, Alfa 2 macroglobulina, Ceruloplasmina, Transferrina, proteínas de complemento C3 e C4, Beta 2 microglobulina, Beta lipoproteína, Gama proteínas globulina, proteína C-reativa (CRP), Lipoproteínas (quilomícrons, VLDL, LDL, HDL), outras globulinas (tipos alfa, beta e gama), Protrombina, Lectina de ligação à manose (MBL), um derivado de qualquer um desses, e uma combinação dos mesmos.

[0095] Em algumas modalidades, a uma ou mais proteínas abundantes são separadas a partir da amostra de soro clarificado ou plasma clarificado em todo ou em parte por cromatografia, cromatografia por exclusão de tamanho, cromatografia de troca iônica, cromatografia por afinidade, imunoafinidade, precipitação, ou uma combinação das mesmas. A uma ou mais proteínas abundantes podem ser também separadas da amostra de soro clarificado ou plasma clarificado após colocar uma amostra biológica em contato com a tromboplastina. Em algumas modalidades, pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% da uma ou mais proteínas abundantes são separados da amostra de soro clarificado ou plasma clarificado em comparação com a amostra de controle não clarificada.

[0096] O complexo de substrato-amostra biológica pode compreender uma reticulação entre o substrato e um componente da amostra biológica, opcionalmente em que a reticulação compreende uma fotorreticulação, um reticulador de imidoéster, suberimidato de dimetila, um reticulador de lipídeo, um reticulador de N-Hidroxissuccinimida-éster, suberato de bissulfosuccinimidila (BS3), um aldeído, acroleína, crotonaldeído, formaldeído, um reticulador de carbodiimida, N,N'-dicicloexilcarbodiimida (DDC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), cloridrato de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC ou EDAC),

Succinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (SMCC), um Sulfossuccinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (Sulfo-SMCC), um Sulfo-N-hidroxissuccinimidil-2-(6-[biotinamido]-2-(p-azido benzamido)-hexanoamido) etil-1,3'-ditioproprionato (Sulfo-SBED), 2-[N2-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil)-N6-(6-biotina-amidocaproil)-L-lisinil]etil metanotiossulfonato (Mts-Atf-Biotina), 2-{N2-[N6-(4-Azido-2,3,5,6 etrafluorobenzol-6-amino-caproil)-N6-(6-biotinamidocaproil)-L-lisinilamido]} etil metanotiossulfonato (Mts-Atf-LC-Biotina), um aminoácido fotorreativo, L-Foto-Leucina, L-Foto-Metionina, um reticulador de N-Hidroxissuccinimida (NHS), um reagente de NHS-Azida, NHS-Azida, NHS-PEG4-Azida, NHS-PEG12-Azida, um reagente de NHS-Fosfina, NHS-Fosfina, Sulfo-NHS-Fosfina, ou qualquer combinação ou modificação dos mesmos. O substrato pode ser diretamente reticulado ao componente da amostra biológica ou o substrato pode ser reticulado ao componente da amostra biológica por meio de um ligante.

[0097] Em algumas modalidades do método, o componente da amostra biológica compreende uma microvesícula. Quando um ligante é usado, o ligante pode ser incorporado dentro da membrana de microvesícula. Consulte, por exemplo, as Figuras 10A e 10B. Tal ligante pode incluir, sem limitação, um lipídeo funcionalizado, em que opcionalmente o lipídeo funcionalizado compreende 16:0 Biotinila PE 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(biotinila) (sal de sódio), 18: 1 Biotinila PE 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(biotinila) (sal de sódio), 16:0 Biotinila Cap PE 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(cap biotinila) (sal de sódio), 18: 1 Biotinila Cap PE 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(cap biotinila) (sal de sódio), ou uma combinação os mesmos.

[0098] O ligante pode também compreender um diacil glicerol, diacil fosfoglicerol (fosfolipídeo) ou esterol, dialquil glicerol, dialquil- ou diacil-1-amino-2,3-diidroxipropano, alquila ou acila de cadeia longa,

esfingolipídeo, ceramida, fosfolipídeo, sequência de fixação de membrana de glicosil fosfatidilinositol (GPI), fixação de membrana de glicofosfolipídeo, fragmento de receptor de membrana, receptor de ligação à proteína, receptor de quelação de metal, receptor de ligação à imunoglobulina Fc, citocina ou receptor de ligação ao fator de crescimento, receptor de ligação ao fármaco, receptor de simulação de lipídeo, receptor de transmembrana, receptor de ligação à proteína sintético, receptor de quelação de metal sintético, receptor de ligação de Fc imunoglobulina sintético, receptor de ligação à citocina ou fator de crescimento sintético, receptor de ligação ao fármaco sintético, receptor de simulação de lipídeo sintético, receptor de transmembrana sintético, proteína, peptídeo, peptidomimético, esfingolipídeo, esteroide, colesterol, diidrocolesterol, ergosterol, brassicasterol, colesterilamina, diidrocolesterilamina, ergosterilamina, brassicasterilamina, 3-colesterilamina, 3-diidrocolesterilamina, 3-ergosterilamina, 3-brassicasterilamina 3β-colesterilamina, 3-diidrocolesterilamina, 3β-ergosterilamina, 3β-brassicasterilamina ou um fragmento funcional ou derivado de qualquer um dos mesmos.

[0099] Em algumas modalidades do método, o substrato é conjugado com um agente de ligação ao componente da amostra biológica. O agente de ligação pode ser anticorpo, um aptâmero, ou uma lectina, opcionalmente em que a lectina compreende concanavalina A (ConA). O componente da amostra biológica pode ser uma microvesícula, opcionalmente em que o agente de ligação compreende um agente de ligação para um antígeno de superfície de microvesícula. Consulte, por exemplo, as Figuras 7A a 7D.

[00100] O método pode compreender, ainda, identificar o um ou mais agente de ligação, por exemplo, com o uso dos métodos revelados no presente documento.

[00101] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma com-

posição de matéria que compreende um complexo de substrato-microvesícula, em que o substrato compreende um substrato sintético. Tal substrato pode ser uma esfera, um poço ou um substrato plano, opcionalmente, em que a esfera compreende uma esfera magnética ou uma esfera de poliestireno.

[00102] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um reagente para executar o método. A invenção fornece também o uso do reagente para executar os métodos. O reagente pode compreender um ou mais dentre um complexo de substrato-microvesícula e um agente ligante. O reagente pode compreender a composição acima.

[00103] Em outro aspecto relacionado, a invenção fornece método para produzir um complexo de substrato-microvesícula estável que compreende colocar um substrato em contato com uma microvesícula, em que o substrato é funcionalizado com um grupo químico que tem capacidade para ligar-se diretamente a pelo menos um componente presente na superfície da microvesícula. O substrato pode ser uma esfera, um poço, uma matriz ou um substrato plano. O pelo menos um componente pode ser um biomarcador útil, incluindo, sem limitação, um peptídeo, polipeptídeo, proteína, lipídeo, carboidrato, um derivado do mesmo, ou uma combinação dos mesmos. O grupo químico pode ser um peptoide, zDNA, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), lectina, peptídeo/polipeptídeo, dendrímero, agente de identificação de proteína de membrana, composto químico, uma fotorreticulação, um reticulador de imidoéster, suberimidato de dimetila, um reticulador de lipídeo, um reticulador de N-Hidroxissuccinimida-éster, suberato de bisSulfossuccinimidila (BS3), um aldeído, acroleína, crotonaldeído, formaldeído, um reticulador de carbodiimida, N,N'-dicicloexilcarbodiimida (DDC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), cloridrato de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC ou ED AC), Succinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (SMCC), um

Sulfossuccinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (Sulfo-SMCC), um Sulfo-N-hidroxissuccinimidil-2-(6-[biotinamido]-2-(p-azido benzamido)-hexanoamido) etil-1,3'-ditioproprionato (Sulfo-SBED), 2-[N2-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil)-N6-(6-biotina-amidocaproil)-L-lisinil]etil metanotiossulfonato (Mts-Atf-Biotina), 2-{N2-[N6-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil-6-amino-caproil)-N6-(6-biotinamidocaproil)-L-lisinilamido]} metanotiossulfonato de etila (Mts-Atf-LC-Biotina), um aminoácido fotorreativo, L-Foto-Leucina, L-Foto-Metionina, um reticulador de N-Hidroxissuccinimida (NHS), um reagente de NHS-Azida, NHS-Azida, NHS-PEG4-Azida, NHS-PEG12-Azida, um reagente de NHS-Fosfina, NHS-Fosfina, Sulfo-NHS-Fosfina, ou uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade, grupo químico compreende um hidrocarboneto, um halogênio, grupo contendo oxigênio (isto é, ligações C-O), um grupo contendo nitrogênio, um grupo contendo enxofre, um grupo contendo fósforo, um grupo contendo boro, ou uma combinação dos mesmos. Em outras modalidades, o hidrocarboneto é selecionado a partir do grupo que consiste em alcanos, alcenos, alcinos, derivados de benzeno, derivados de tolueno, alcanos ramificados ou de anel, carbocátions e carboânions. Em ainda outra modalidade, o halogênio é selecionado a partir do grupo que consiste em haloalcanos, fluoroalcanos, cloroalcanos, bromoalcanos e iodoalcanos. O grupo contendo oxigênio pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em álcoois, cetonas, aldeídos, haletos de acila, carbonatos, carboxilatos, ácidos carboxílicos, ésteres, hidroperóxidos, éteres, hemiacetais, hemicetais, acetais, cetais, ortoésteres, e ortocarbonatos. O grupo contendo nitrogênio pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em amidas, aminas, iminas, imidas, azidas, compostos azo, cianatos, nitratos, nitrilos, nitritos, compostos nitro, compostos nitrosos e derivados de piridina. Em algumas modalidades, o grupo contendo enxofre é selecionado a partir do grupo que consiste em tióis, sulfetos,

dissulfetos, sulfóxidos, sulfonas, ácidos sulfúnicos, ácidos sulfônicos, tiocianatos, isotianatos, tionas e tiais O grupo contendo fósforo pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em fosfinas, fosfanos, ácidos fosfônicos, fosfatos e fosfodiésteres. Nas modalidades, o grupo contendo boro é selecionado a partir do grupo que consiste em ácidos borônicos, ésteres borônicos, ácidos borínicos e ésteres borínicos.

[00104] O grupo químico pode compreender um acetal, grupo acila, haleto de acila, grupo alquenila, alcóxido, grupo alcóxi, grupo alquinila, amida, óxido de amina, amina, carbodiimida, carboximidato, ácido carboxílico, cianamida, cianato, ditiocarbamato, enol, éster, éter, hidrazina, hidrazona, ácido hidroxâmico, imida, isocianato, isocianeto, isotiocianato, cetal, ceteno, cetona, grupo de saída, nitrila, organoaleto, organofósforo, ortoéster, oxima, fosfonofluoridato, fosfonotioato, fosforamidotioato, fosforoditioato, fosforofluoridato, fosforotioato, grupo de proteção, pirofosfato, semicarbazida, semicarbazona, sulfamato, éster de sulfonato, sulfona, ácido sulfônico, grupo sulfonila, sulfoximina, composto sulfurila, tioamida, tiocianato, tioéster, tiolato, tiona, composto tiofosforila, e/ou tiossulfinatos. O grupo químico pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em acetal, grupo acetóxi, acetileto, anidrido ácido, grupo de ativação, cloreto de acila, haleto de acila, acilal, aciloína, acilsilano, álcool, aldeído, aldimina, alcano, alceno, alcóxido, cicloalcano de alquila, nitritos de alquila, alcino, aleno, amida, amidina, aminal, óxido de amina, azida, azina, aziridina, azóxi, bifuncional, bistiosemicarbazona, biureto, ácido borônico, carbamato, carbamino, carbazida, carbeno, carbinol, éster de carbonato, carbonila, carboxamida, carboximidato, ácido carboxílico, formato de cloro, cumuleno, éster de cianato, cianimida, cianoidrina, grupos de desativação, depsídeo, diazo, diol, ditiocarbamato, enamina, enediina, enol, éter de enol, enona, enina, episssulfeto, epóxido, éster, éter, fluorossulfonato, haloidrina, halocetona, hemiacetal, hemiaminal, hemitioacetal, hidrazi-

da, hidrazona, ácido hidroxâmico, hidroxila, hidroxilamina, imina, imínio, isotiourônio, ceteno, cetenimina, cetona, cetila, lactam, lactol, lactona, metina, grupo metila, nitrato, ileto de nitrila, nitrilimina, composto nitro, nitroamina, nitronato, nitrona, íon de nitrônio, nitrosamina, nitroso, ortoéster, osazona, oxaziridina, oxima, sal de n-oxoamônio, peróxido, ácido peróxi, carbeno persistente, fenóis, fosfaalceno, fosfaalcino, fosfato, fosfinato, fosfina, fosfina oxeto, fosfinito, fosfonato, fosfonito, fosfônio, fosforano, s-nitrosotiol, base de schiff, selenol, ácido selenônico, selona, semicarbazeto, semicarbazona, enol éter de silila, éter de silila, sulfenameto, ácido sulfênico, cloreto de sulfenila, sulfeto, sulfilimina, sulfanameto, ácido sulfínico, éster de sulfito, sulfonameto, sulfonanileto, sulfonato, sulfonila, haleto de sulfonila, sulfoxeto, sulfurila, sultona, telurol, tial, tioacetal, tioameto, tiocarbamato, tiocarbóxi, tiocianato, tioéster, tioéter, tiocetal, tiocetona, tiol, tiolactona, tioureia, tosilidrazona, triazeno, triol, ureia, vanilila, xantato, ileto e inolato. Nas modalidades, o grupo químico compreende um grupo carboxila, um grupo amino, um grupo hidroxila, um grupo hidrazida e/ou um grupo clorometila. Por exemplo, o grupo químico pode se rum grupo carboxila.

[00105] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma composição de matéria que compreende um complexo de substrato-microvesícula, em que o substrato compreende um substrato sintético, conforme descrito acima. A invenção fornece, ainda, uma composição de microvesícula estabilizada que compreende uma microvesícula conjugada diretamente a um substrato inerte. O substrato pode ser uma esfera, um poço, uma matriz ou um substrato plano, opcionalmente, em que a esfera compreende uma esfera magnética ou uma esfera de poliestireno. Consulte, por exemplo, qualquer uma das Figuras 7A a 7D, das Figuras 10A a 12E.

[00106] A invenção também fornece um kit que compreende um ou mais reagentes para executar o método acima, opcionalmente, em que

o um ou mais reagentes compreendem um ou mais dentre um complexo de substrato-microvesícula e um agente ligante. A invenção fornece, ainda, o uso do um ou mais reagentes para executar o método.

[00107] Em um aspecto, a invenção fornece um método para visualizar uma microvesícula. Consulte, por exemplo, as Figuras 11A a 12E. O método compreende: (a) colocar a microvesícula em contato com um agente de ligação a um antígeno de microvesícula, em que o agente de ligação compreende uma identificação; (b) fixar a microvesícula em contato a um substrato de microscopia eletrônica de varredura (SEM); (c) revestir por pulverização a microvesícula fixa; e (d) usar SEM para visualizar a microvesícula e a identificação. A microvesícula pode ser ligada a um substrato antes da etapa (a). A microvesícula pode ser ligada ao substrato por meio de ligação covalente. A microvesícula pode ser ligada ao substrato por meio de ligação por imunoafinidade. Consulte, por exemplo, as Figuras 7A a 7E; a Figura 10B.

[00108] O agente de ligação pode ser identificado diretamente ou o agente de ligação pode ser identificado indiretamente. A identificação indireta pode compreende um agente de ligação identificado que forma um complexo com o agente de ligação ao antígeno de microvesícula. Qualquer agente de ligação útil pode ser usado no método, por exemplo, um anticorpo, um fragmento de anticorpo funcional ou um aptâmero.

[00109] O antígeno de microvesícula pode ser escolhido para visualizar uma microvesícula de interesse. Em algumas modalidades, o antígeno é selecionado a partir da Tabela 3, da Tabela 4 ou da Tabela 26. Por exemplo, o antígeno de microvesícula pode ser um marcador de vesícula geral, incluindo, sem limitação, uma tetraspanina, CD9, CD63, CD81, ou qualquer combinação dos mesmos.

[00110] O revestimento por pulverização pode compreender revestimento de ouro e/ou paládio. O revestimento por pulverização pode

compreender revestimento de carbono. Em algumas modalidades, a SEM compreende modos de elétrons secundários (SE) para visualizar as microvesículas e/ou modo de elétrons retrodifundidos (BSE) para visualizar a identificação. A identificação pode compreender ouro.

[00111] Nas modalidades da invenção, (i) a microvesícula é ligada a um substrato antes da etapa (a) através da ligação covalente; (ii) o agente de ligação ao antígeno de microvesícula é um anticorpo indiretamente identificado, em que a identificação indireta compreende um anticorpo identificado com ouro que forma um complexo com o anticorpo para o antígeno de microvesícula; (iii) o antígeno de microvesícula é CD9; (iv) o revestimento por pulverização compreende revestimento de carbono; e (v) a SEM compreende modo de elétrons secundários (SE) para visualizar as microvesículas e/ou modo de elétrons retrodifundidos (BSE) para visualizar a identificação.

[00112] A invenção fornece, ainda, kits e usos de um ou mais reagentes para executar os métodos da invenção. O um ou mais reagentes podem compreender quaisquer reagentes úteis para executar os métodos em questão, incluindo, sem limitação, bibliotecas de aptâmeros, substratos, tais como microesferas ou arranjos ou poços planos, reagentes para isolamento de biomarcador e/ou microvesícula, aptâmeros direcionados a alvos específicos, conjuntos de aptâmeros que facilitam a detecção de um biomarcador/população de microvesículas, reagentes tais como iniciadores para sequenciamento ou amplificação de ácido nucleico, arranjos para hibridização de ácido nucleico, identificações detectáveis, solventes ou tampões e similares, vários ligantes, vários componentes de ensaio, bloqueadores e similares. O um ou mais reagentes podem também compreender várias composições fornecidas pela invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00113] As Figuras 1A a 1F ilustram métodos para avaliar biomar-

cadores, tais como antígenos de superfície de microvesícula. A Figura 1A é um esquema de um substrato plano revestido com um agente de captura, tal como um aptâmero ou anticorpo, que captura vesículas que expressam o antígeno alvo do agente de captura. O agente de captura liga uma proteína expressa na superfície de vesículas vertidas de células doentes ("vesícula doente"). O agente de detecção, que pode também ser um aptâmero ou anticorpo, porta uma identificação detectável, aqui, um sinal fluorescente. O agente de detecção liga-se à vesícula capturada e fornece um sinal detectável por meio de sua identificação fluorescente. O agente de detecção pode detectar um antígeno que está geralmente associado a vesículas ou está associado a uma célula de origem ou uma doença, por exemplo, um câncer. A Figura 1B é um esquema de uma esfera de partícula conjugada com um agente de captura, que captura vesículas que expressam o antígeno alvo do agente de captura. O agente de captura liga uma proteína expressa na superfície de vesículas vertidas de células doentes ("vesícula doente"). O agente de detecção, que pode também ser um aptâmero ou anticorpo, porta uma identificação detectável, aqui, um sinal fluorescente. O agente de detecção liga-se à vesícula capturada e fornece um sinal detectável por meio de sua identificação fluorescente. O agente de detecção pode detectar um antígeno que está geralmente associado a vesículas ou está associado a uma célula de origem ou uma doença, por exemplo, um câncer. A Figura 1C é um exemplo de um esquema de avaliação que pode ser realizado com o uso de diferentes combinações de agentes de captura e detecção para os biomarcadores indicados. As combinações de biomarcadores podem ser detectadas com o uso de ensaios, conforme mostrado nas Figuras 1A e 1B. As Figuras 1D e 1E apresentam esquemas ilustrativos para capturar e detectar vesículas para caracterizar um fenótipo. A Figura 1F apresenta esquemas ilustrativos para avaliar a carga útil de vesícula

para caracterizar um fenótipo.

[00114] As Figuras 2A e 2B ilustram uma estratégia de seleção de ensaio competitivo. Um grupo aleatório de candidatos de aptâmero de ácido nucleico (a biblioteca) é incubado com um alvo de interesse 202. Múltiplos ciclos de ligação podem ser realizados em que: 1) a biblioteca é incubada com o alvo; 2) a mistura de biblioteca e alvo é lavada para remover candidatos de aptâmero não ligados; 3) os candidatos de aptâmero ligados são eluídos do alvo; e 4) os candidatos de aptâmero eluídos são novamente adicionados ao alvo e deixados ligar-se. A Figura 2A ilustra um candidato de aptâmero 201 ligado ao alvo 202. Na etapa i), um anticorpo de competição 203 é então adicionado à reação. A Figura 2B ilustra um anticorpo candidato 203 que compete com o candidato de aptâmero 201 no epítopo do anticorpo. O candidato de aptâmero 201 é deslocado pelo anticorpo e então coletado.

[00115] A Figura 3 apresenta um esquema para identificar aptâmeros contra um alvo de interesse.

[00116] A Figura 4 ilustra resultados de um ensaio de ligação que mostra a afinidade de ligação de um aptâmero exemplificativo (Aptâmero ID BTX176881 (SEQ ID NO. 98883)) à proteína EpCAM alvo em várias concentrações de alvo. O aptâmero a ser testado é fixado a um substrato com o uso de uma cauda de biotina e é incubado com várias concentrações de alvo (125, 250 e 500 nM). O teste é realizado em uma máquina de ressonância de plásmon de superfície (SPR). A máquina SPR detecta a associação e a dissociação do aptâmero e do alvo. O alvo é aplicado até os eventos de associação e dissociação serem iguais, resultando em uma estabilização da curva. Equações que descrevem a curva em cada concentração podem ser então usadas para calcular o K_D do aptâmero (consulte a Tabela 5).

[00117] As Figuras 5A e 5B ilustram sequências de nucleotídeo de aptâmero e a previsão de estrutura secundária correspondente. A Fi-

gura 5A ilustra uma estrutura secundária de um oligonucleotídeo 32 mer, Aptâmero 4, com sequência 5'-CCCCCCGAATCACATGACTTGGGCGGGGGTCG (SEQ ID NO. 1). Na figura, a sequência é mostrada com 6 nucleotídeos timina adicionados à extremidade, que podem atuar como um espaçador para ligar uma molécula de biotina. Esse oligo particular tem uma alta afinidade de ligação ao alvo, EpCAM (consulte a Tabela 5). Aglutinantes de EpCAM candidatos adicionais são identificados por modelação do banco de dados inteiro de oligos sequenciados à estrutura secundária desse oligo. A Figura 5B ilustra outro oligo 32 mer com sequência 5'-ACCGGATAGCGGTTGGAGGCGTGCTCCACTCG (SEQ ID NO. 3840) que tem uma estrutura secundária diferente do aptâmero na Figura 5A. Esse aptâmero é também mostrado com uma cauda de 6 timinas.

[00118] A Figura 6 ilustra um processo para produzir um conjunto alvo-específico de aptâmeros com o uso de um método de subtração de célula, em que o alvo é um biomarcador associado a uma doença específica. Na Etapa 1, um conjunto aleatório de oligonucleotídeos é colocado em contato com uma amostra biológica de um paciente normal. Na Etapa 2, os oligos que não se ligaram na Etapa 1 são adicionados a uma amostra biológica isolada de pacientes doentes. Os oligos ligados nessa etapa são então eluídos, capturados por meio de sua ligação de biotina e então combinados novamente com amostra biológica normal. Os oligos não ligados são então adicionados à amostra biológica derivada de doença e isolados. Esse processo pode ser repetido várias vezes. Os aptâmeros eluídos finais são testados contra amostras de paciente para medir a sensibilidade e a especificidade do conjunto. As amostras biológicas podem incluir sangue, incluindo plasma ou soro, ou outros componentes do sistema circulatório, tais como microvesículas.

[00119] As Figuras 7A a 7D ilustra métodos para ligar microvesículas a um substrato. A Figura 7A ilustra a conjugação direta de uma microesfera carboxilada a um antígeno de superfície de vesícula. A Figura 7B ilustra a ancoragem de uma microvesícula a uma microesfera por meio de uma âncora de lipídeo funcionalizada por biotina. A Figura 7C ilustra a ligação de anticorpo a um antígeno de superfície de vesícula, em que o anticorpo é conjugado a uma microesfera carboxilada. A Figura 7D ilustra a ligação de aptâmero a um antígeno de superfície de vesícula, em que o aptâmero é conjugado a uma microesfera caboxilada.

[00120] As Figuras 8A e 8B ilustram a detecção de microvesículas derivadas de VCAP conjugadas a microesferas. As vesículas conjugadas a esfera foram detectadas com o uso de esferas MagPlex de acordo com o protocolo do fabricante (Luminex Corp., Austin TX). As microvesículas foram detectadas com anticorpos identificados com ficoeritrina (PE) a CD9 (Figura 8A) ou CD63 (Figura 8B), duas proteínas de superfície de microvesícula comuns. O eixo geométrico Y nas figuras mostra a intensidade fluorescente mediana (MFI) das microvesículas detectadas. Várias condições experimentais são indicadas ao longo do eixo geométrico X. Os ensaios foram realizados com vários agentes de bloqueio ("SBB": Bloco de Partida, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL.; "leite": tampão de bloqueio de lente seco; "Caseína (pbs)": tampão de bloqueio de caseína) ou sem bloqueio ("sem bloco"). Os controles foram executados sem detectores onde indicado.

[00121] As Figuras 9A a 9D ilustram a captura de microvesículas com o uso de microesferas conjugadas a anticorpo. A Figura 9A mostra titulações de microvesícula derivada de Vcap contra esferas conjugadas a Ab. As esferas MagPlex foram conjugadas a anticorpos para EpCAM, CD63 ou CD81 de acordo com o protocolo do fabricante (Luminex Corp., Austin TX). As microvesículas foram detectadas com an-

ticorpos identificados com ficoeritrina (PE) a CD9, uma proteína de superfície de microvesícula comum. O eixo geométrico Y nas figuras mostra a intensidade fluorescente mediana (MFI) das microvesículas detectadas. O eixo geométrico X indica a quantidade de inserção de vesícula VCap. A Figura 9B mostra a captura de microvesículas do plasma com o uso de anticorpos anti-CD63 conjugados à esfera para captura e anticorpos anti-CD9 identificados por PE para detecção. O gráfico mostra a detecção de vários números de microesferas conforme indicado para microvesículas isoladas sob várias condições: microvesículas após ultracentrifugação com gradiente de sacarose sem ou com 0,1% de Tween 20 ("UC-PBS" e "UC-PBST", respectivamente), microvesículas concentradas de plasma submetidas a ultrafiltração ("N3-Conc") e microvesículas purificadas com o uso de metodologia ExoQuick ("N3-Exo"). As amostras de "controle (PBS)" não têm microvesículas. A Figura 9C mostra a titulação de microvesículas capturadas com microesferas conjugadas a anticorpo com inserção que compreende microvesículas derivadas de plasma de dois pacientes. Em todas as amostras 5.000 microesferas foram detectadas. Microvesículas (cMVs) foram capturadas com o uso de anticorpos anti-CD81 ou anti-CD63 anticorpos conjugados à esfera, conforme indicado, e anticorpos anti-CD9 identificados por PE para detecção. O eixo geométrico X nos gráficos indica o número de vesículas na amostra. A Figura 9D mostra a estabilidade dos complexos de microesfera-microvesícula capturada-anticorpo. Microvesículas (cMVs) de três pacientes foram purificadas com o uso de tecnologia ExoQuick, então foram capturadas com o uso de anticorpos anti-CD81 conjugados à esfera e anticorpos anti-CD9 identificados por PE para detecção. Aproximadamente, 8,96E+07 microvesículas por 5.000 esferas foram detectadas antes e após a incubação das microvesículas capturadas por esfera por 1 hora a 800 rpm em temperatura ambiente.

[00122] As Figuras 10A a 10P ilustram a ancoragem de microvesículas a microesferas com o uso de um ligante heterobifuncional com um grupo funcional lipídeo. A Figura 10A ilustra uma âncora de lipídeo ilustrativa: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(cap biotinila) (sal de sódio) ("16:0 Biotilila Cap PE"). O peso molecular é 1.053,394. A Figura 10A mostra a estrutura química acima e a estrutura 3D abaixo. O reticulador está disponível junto à Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama. A Figura 10B ilustra a ancoragem de lipídeo funcionalizada por biotina de microvesículas às microesferas. Conforme mostrado, uma microesfera carboxilada 101 é conjugada a estreptavidina 102. O reticulador 103 é ligado à estreptavidina por meio de uma porção de biotina (consulte a Figura 10A). Finalmente, o ligante de lipídeo 103 é incorporado na membrana de bicamada de lipídeo da microvesícula 104. As Figuras 10C a 10E ilustram citometria de fluxo de microvesículas VCAP ancoradas a microesferas com o uso da âncora de lipídeo nas Figuras 10A e 10B. As microvesículas foram detectadas com o uso de anticorpos anti-CD9 e anti-CD63 identificados por PE. Na Figura 10C, nenhuma âncora de lipídeo foi usada. A Figura 10D é identificada para a Figura 10C com a adição da âncora de lipídeo. Esses dados ilustram microvesículas enriquecidas conjugadas a microesferas por meio da âncora de lipídeo. A Figura 10E e a Figura 10F ilustra a replicação independente dos experimentos na Figura 10C e na Figura 10D, respectivamente. A Figura 10G ilustra a titulação de várias quantidades de vesículas ancoradas por lipídeo detectadas como acima. A Figura 10H ilustra outra vista de titulação de várias quantidades de vesículas ancoradas por lipídeo detectadas como acima. A quantidade indicada de vesículas VCap (cMVs) foi detectada com o uso de um anticorpo IgG anti-rato identificado por PE como um controle ou anticorpos anti-CD9 e anti-CD63 identificados por PE. As Figuras 10I e 10J ilustram a captura de EVs de VCaP (40 mg/ml) por porção

de lipídeo em microesferas LumAvidin e detectadas com anti-CD9-PE e anti-CD63-PE por MoFlo (Figura 101) ou com anti-CD9-PE por Luminex (Figura 10J). As Figuras 10K e 10L ilustram a detecção de vesículas isoladas de amostras de plasma com o uso de ultracentrifugação. De outro modo, condições experimentais são como na Figura 10C e na Figura 10D, respectivamente. A Figura 10M e a Figura 10N ilustram a detecção de microvesículas VCAP ancoradas a microesferas com o uso da âncora de lipídeo nas Figuras 10A e 10B. As microvesículas foram detectadas com o uso de anticorpos anti-CD9 e anti-CD63 identificados por PE. Na Figura 10M, as condições são similares à Figura 10D e à Figura 10F. No entanto, no experimento mostrado na Figura 10N, 30 mg/ml de albumina de soro humano (HSA) foram adicionados às amostras antes da detecção. As Figuras 10O e 10P mostram os valores MFI de microvesículas conjugadas a microesfera antes (Dia 0; Figura 10O) e após (Dia 12; Figura 10P) 12 dias de armazenamento a -80 ℃. As vesículas isoladas com o uso de diferentes métodos foram testadas conforme indicado pelas condições ao longo do eixo geométrico X: 1) Kit ExoQuick™ (System Biosciences, Inc., Mountain View, CA) seguido por ultrafiltração; 2) ultracentrifugação; 3) ultracentrifugação seguida por Exoquick; 4) ExoQuick para Kit ExoMir™ (Bioo Scientific Corp., Austin TX); 5) preparação n° 1 de vesícula VCAP ultrafiltrada; 6) preparação n° 2 de vesícula VCAP ultrafiltrada; e 7) ultrafiltração seguida por ultracentrifugação.

[00123] As Figuras 11A a 11M ilustram o imageamento por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM) usado para avaliação de protocolos alternativos para ancorar microvesículas isoladas de plasma à superfície das microesferas. A Figura 11A mostra uma microesfera que não foi funcionalizada ou conjugada. A Figura 11B mostra a conjugação direta de microvesículas plasmáticas isoladas com o uso de ultracentrifugação a esferas não magnéticas. A Fi-

gura 11C mostra uma explosão da região indicada da Figura 11B. As setas apontam para várias microvesículas. A Figura 11D e a Figura 11E correspondem à Figura 11B e à Figura 11C, respectivamente, exceto pelo fato de que as esferas são magnéticas. As Figuras 11H a H mostram esferas magnéticas funcionalizadas. A Figura 11F mostra esferas conjugadas por avidina funcionalizadas com concanavalina biotinilada A (ConA), que é uma lecitina (isto é, uma proteína de ligação de carboidrato) que se liga especificamente a certas estruturas encontradas em vários açúcares, glicoproteínas e glicolipídeos , principalmente grupos α-D-manosila e α-D-glucosila terminais de não redução e internos. A Figura 11G mostra esferas conjugadas por avidina funcionalizadas com uma âncora de lipídeo biotinilada. A Figura 11H mostra esferas conjugadas diretamente com anticorpos anti-CD9. A Figura 11l shows mostra a captura de microvesículas plasmáticas isoladas com o uso de ultracentrifugação a esferas funcionalizadas por ConA. A Figura 11J mostra uma explosão da região indicada da Figura 111. As setas apontam para várias microvesículas. A Figura 11K shows mostra a captura por esfera de microvesículas plasmáticas isoladas com o uso de ultracentrifugação a esferas funcionalizadas por âncora de lipídeo. A Figura 11L mostra uma explosão da região indicada da Figura 11K. As setas apontam para várias microvesículas. A Figura 11M shows mostra a captura por esfera de microvesículas plasmáticas isoladas com o uso de ultracentrifugação a esferas funcionalizadas por âncora de lipídeo. A Figura 11N mostra uma explosão da região indicada da Figura 11M. As setas apontam para várias microvesículas.

[00124] As Figuras 12A a 12E ilustram o protocolo FE-SEM-ImmunoGold para imagear microvesículas conjugadas a microesferas. As imagens mostram imageamento de elétrons secundários (SE) e imagens de elétrons retrodifundidos (BSE) de esferas carboxiladas conjugadas com microvesículas. As Figuras 12A e 12B imageiam mi-

crovesículas manchadas com 10 µg/ml de anticorpo primário anti-CD9 identificado em suspensão. A Figura 12A mostra imageamento de SE e Figura 12B mostra imageamento de BSE. Na Figura 12B, as nanopartículas de ouro são pontos brilhantes brancos com setas. Os elementos maiores podem ser matérias inorgânicas (cristais de tampão) ou placas de lipídeo já que são mais densos e vistos em BSE. As Figuras 12C e 12D imageiam microvesículas manchadas com 10 µg/ml de anticorpo primário anti-CD9 identificado em lâminas de vidro. A Figura 12C mostra imageamento de SE e Figura 12D mostra imageamento de BSE. Na Figura 12D, as nanopartículas de ouro são pontos brilhantes brancos com setas. A Figura 12E mostra uma imagem de BSE (ImmunoGold) sobreposta sobre imagens de SE (microvesículas). As nanopartículas de ouro (10 nm) são retratadas com setas. Os elementos maiores podem ser matérias inorgânicas (cristais de tampão) ou placas de lipídeo já que são mais densos e vistos em BSE.

[00125] As Figuras 13A e 13B ilustram esquemas para avaliar uma biblioteca de aptâmeros para identificar um ou mais aptâmeros candidatos. A Figura 13A ilustra um esquema 1300 para ciclos positivos e opcionalmente negativos de avaliação de uma biblioteca de oligonucleotídeos contra um alvo de interesse. Uma biblioteca de candidatos de oligo é fornecida 1301. Para realizar a seleção positiva, os oligos são colocados em contato com o alvo de interesse 1302. A mistura é lavada para remover oligos não ligados e então os oligos são dissociados da mistura lavada e coletada 1303. Os oligos coletados podem ser usados conforme inserido a um novo ciclo de ligação alvo, que pode ser repetido qualquer número de vezes (indicado como 1...n). Entre os ciclos de seleção positiva, a seleção negativa é opcionalmente realizada em que oligos são colocados em contato com uma ou mais entidades não alvo 1304. Durante a seleção negativa, oligos que não ligam a uma ou mais entidades alvo são retidos e usados como inser-

ção a um novo ciclo de seleção positiva 1302. Os oligos coletados após os números desejados de ciclos de seleção positiva 1303 ou seleção negativa 1304 são coletados como aptâmeros candidatos que são indicados para ligar o alvo de interesse 1305. A Figura 13B ilustra um esquema para seleção de aptâmeros contra amostras de câncer versus amostras de controle de não câncer. O esquema mostra 8 amostras de câncer (Ca1 a Ca8) e 7 amostras de câncer (nCa1 a nCa7), em que cada uma consiste em amostras individuais ou amostras agrupadas. Sete seleções diferentes (Seleção 1 a Seleção 7) são executadas em paralelo. Em cada Seleção, um conjunto inserido de aptâmeros candidatos é enriquecido para aptâmeros contra uma das amostras de câncer ("seleção positiva") e então o conjunto é depletado de aptâmeros contra uma das amostras de controle ("seleção negativa"). Esse processo é repetido conforme indicado. A ordenação das amostras é alterada em cada Seleção para evitar tendência de seleção. Os aptâmeros que restam após o último ciclo de seleção positiva compreendem os aptâmeros selecionados, que podem ser então adicionalmente desenvolvidos, por exemplo, como parte de um ensaio para diferenciar amostras de câncer de amostras de não câncer. Os conjuntos de aptâmeros podem ser sequenciados após cada ciclo para rastrear enriquecimento, depleção, problemas potenciais, etc.

[00126] A Figura 14 compreende um esquema para identificar um alvo de um aptâmero selecionado, tal como um aptâmero selecionado pelo processo acima. A figura mostra um agente de ligação 1402, aqui, um aptâmero para propósitos de ilustração, ancorado a um substrato 1401. O agente de ligação 1402 pode ser ligado covalentemente ao substrato 1401. O agente de ligação 1402 pode ser também ligado não covalentemente. Por exemplo, o agente de ligação 1402 pode compreender uma identificação que pode ser ligada ao substrato, tal como um grupo biotina que pode formar um complexo com uma molécula de

avidina/estreptavidina que é ligada covalentemente ao substrato. O agente de ligação 1402 liga-se a um antígeno de superfície 1403 de microvesícula 1404. Na etapa indicada pela seta (i), a microvesícula é rompida enquanto deixa o complexo entre o agente de ligação 1402 e o antígeno de superfície 1403 intactos. A microvesícula rompida 1405 é removida, por exemplo, por meio de lavagem ou troca de tampão, na etapa indicada pela seta (ii). Na etapa indicada pela seta (iii), o antígeno de superfície 1403 é liberado do agente de ligação 1402. O antígeno de superfície 1403 pode ser analisado para determinar sua identidade.

[00127] As Figuras 15A e B ilustram o uso de aptâmeros nos métodos para caracterizar um fenótipo. A Figura 15A é um esquema 1500 que mostra uma configuração de ensaio que pode ser usada para detectar e/ou quantificar um alvo de interesse. Na figura, o aptâmero de captura 1502 é ligado ao substrato 1501. O alvo de interesse 1503 é ligado pelo aptâmero de captura 1502. O aptâmero de detecção 1504 é também ligado ao alvo de interesse 1503. O aptâmero de detecção 1504 porta uma identificação 1505 que pode ser detectada para identificar o alvo capturado ao substrato 1501 por meio do aptâmero de captura 1502. A Figura 15B é um esquema 1510 que mostra o uso de um conjunto de aptâmeros para caracterizar um fenótipo. Um conjunto de aptâmeros para um alvo de interesse é fornecido 1511. O conjunto é colocado em contato com uma amostra de teste a ser caracterizada 1512. A mistura é lavada para remover aptâmeros não ligados. Os aptâmeros remanescentes são dissociados e coletados 1513. Os aptâmeros coletados são identificados e a identidade dos aptâmeros retidos é usada para caracterizar o fenótipo 1514. A Figura 15C é um esquema 1520 que mostra uma implantação do método na Figura 15B. Um conjunto de aptâmeros identificado como ligação de uma população de microvesículas é fornecido 1521. A amostra inserida compre-

ende microvesículas que são isoladas de uma amostra de teste 1522. O conjunto é colocado em contato com as microvesículas isoladas a serem caracterizadas 1523. A mistura é lavada para remover aptâmeros não ligados e os aptâmeros remanescentes são dissociados e coletados 1525. Os aptâmeros coletados são identificados e a identidade dos aptâmeros retidos é usada para caracterizar o fenótipo 1526.

[00128] A Figura 16A ilustra a ligação de hidrogênio entre uma porção de um aptâmero 1601 a grupos carboxila 1602 ligados a um substrato plano 1603. A Figura 16B ilustra a ligação de hidrogênio entre uma porção de um aptâmero 1601 e grupos carboxila 1602 ligados a uma microesfera substrato 1604. Os grupos carboxila 1602 são, ainda, ligados a um anticorpo 1605.

[00129] A Figura 17A e a Figura 17B ilustra a ligação de hidrogênio entre uma porção de um aptâmero 1701 e grupos carboxila 1702 ligados a um substrato 1703. Na Figura 17A, o agente de ligação 1704 é também ligado ao substrato 1703. O agente de ligação tem especificidade para o alvo 1705, que pode ser uma entidade biológica, tal como uma proteína, um ácido nucleico, uma microvesícula, uma célula ou uma porção de qualquer um dos mesmos. Na Figura 17B, o alvo 1705, que pode ser uma entidade biológica, tal como uma proteína, um ácido nucleico, uma microvesícula, uma célula ou uma porção de qualquer um dos mesmos, é também ligado ao substrato 1703. O alvo 1705 é ligado pelo agente de ligação 1704.

[00130] As Figuras 18A a 18D ilustram o uso de um aptâmero anti-EpCAM (Aptâmero 4; SEQ ID NO. 1) para detectar uma população de microvesículas. As vesículas nas amostras de plasma do paciente foram capturadas com o uso de anticorpos conjugados com esfera aos antígenos de superfície de microvesícula indicados: Figura 18A) EGFR; Figura 18B) PBP; Figura 18C) EpCAM; e Figura 18D) KLK2. O Aptâmero 4 identificado por fluorescência foi usado como um detector

no ensaio de microesfera. As figuras mostram valores de fluorescência mediana média (valores MFI) para três amostras de câncer (C1 a C3) e três amostras normais (N1 a N3) em cada gráfico. Em cada gráfico, as amostras da esquerda para a direita são ordenadas como: C1, C2, C3, N1, N2, N3.

[00131] As Figuras 19A a 19E ilustram a seleção de aptâmeros para antígenos de interesse. Consulte o Exemplo 9. Cinco bibliotecas de aptâmero de DNA (identificadas como 1M a 5M), após a seleção negativa, conforme descrito no presente documento, foram incubadas com mistura de 4 antígenos (SSX2, SSX4, PBP, KLK2) conjugados a microesferas e suplementados com antígeno SPDEF conjugado a esferas magnéticas. As amostras foram processadas de acordo com um protocolo de seção positiva, conforme descrito no presente documento. Após a coleta das esferas magnéticas, os aptâmeros de DNA ligados foram extraídos das esferas e amplificados novamente. As Figuras 19A a 19C ilustram aptâmeros recuperados de cada biblioteca de partida após um (Figura 19A), dois (Figura 19B) e três ciclos (Figura 19C) de seleção positiva. As Figuras 19D e 19E ilustram a avaliação de 25 bibliotecas de aptâmeros após o 13º ciclo de seleção positiva contra antígeno específico (5 bibliotecas por cada um dentre antígenos SSX2, SSX4, PBP, KLK2 e SPDEF). A seleção de aptâmero após esse ciclo foi modificada com a inclusão de antígenos de confusão conforme descrito no Exemplo 9 (seção intitulada "Ciclo 14 de seleção positiva foi modificada conforme segue"). Os aptâmeros de DNA ligados a esferas magnéticas conjugadas aos aptâmeros de interesse foram extraídos das esferas e amplificados novamente. As bibliotecas recuperadas são mostradas na Figura 19D. A Figura 19E mostra as bibliotecas após um ciclo de adição de seleção e lavagem rigorosa.

[00132] A Figura 20A ilustra a sequência de aptâmeros de EPCAM CAR003 (SEQ ID NO. 230822). A Figura 20B ilustra a estrutura se-

cundária ideal de CAR003 com uma energia livre mínima (AG) de -30,00 kcal/mol. Para propósitos de ilustração, o aptâmero é mostrado como um aptâmero de RNA (SEQ ID NO. 230847) correspondente à sequência de DNA na Figura 20A. A Figura 20C ilustra a purificação de conjunto de aptâmeros. A figura compreende um cromatograma FPLC com todos os produtos e frações atribuídos em conjuntos após verificação de qualidade e gel. A Figura 20D ilustra um gel manchado por SYBR GOLD com diferentes frações FPLC de aptâmero CAR003 após síntese. As diferentes frações foram combinadas em conjuntos com base na quantidade de cadeias não terminadas na ordem alto para baixo (conjunto 1 a conjunto 3). Os conjuntos 1 a 3 correspondem àqueles indicados na Figura 20C. As Figuras 20E e F ilustram a ligação de CAR003 à proteína EPCAM em HEPES a 25 mM com PBS-BN (Figura 20E) ou em HEPES a 25 mM com $MgCl_2$ a 1 mM (Figura 20F). A Figura 20G ilustra ligação de CAR003 a EpCAM nos sais indicados com e sem adição de albumina de soro bovino (BSA). A Figura 20H ilustra o efeito de desnaturação sobre a ligação de CAR003 à proteína EPCAM. Em cada grupo de quatro barras, o aptâmero é da esquerda para a direita: Aptâmero 4, Conjunto 1 de CAR003, Conjunto 2 de CAR003, Conjunto 3 de CAR003. A Figura 201 ilustra a titulação de aptâmeros contra proteína recombinante EPCAM (5 µg inserido constante). A Figura 20J ilustra um Western blot com o aptâmero CAR003 versus proteína etiquetada com his EPCAM, BSA e HSA (5 µg cada). O gel foi F127 a 0,5% bloqueado e sondado com aproximadamente 50 µg de aptâmero biotinilado por CAR003, fração 3. A mancha foi visualizada com NeutrAvidin-HRP seguido por Substrato Quimioluminescente SuperSignal West Femto.

[00133] As Figuras 21A a 21J mostram a estrutura secundária prevista de CAR016 (SEQ ID NO. 230840) e variantes indicadas das mesmas.

[00134] A Figura 22 ilustra a afinidade de ligação de candidatos de aptâmero anti-PSMA CAR050 (SEQ ID NO. 230932) e CAR051 (SEQ ID NO. 230933) contra proteína PSMA conforme determinado por ensaio ELISA contra PSMA purificado recombinante.

[00135] As Figuras 23A a C ilustram a ligação de aptâmeros selecionados contra microesferas conjugadas a várias amostras inseridas. Os aptâmeros foram selecionados a partir de uma biblioteca de aptâmeros conforme ligação a microesferas conjugadas a microvesículas derivadas de câncer de mama. Os detalhes experimentais estão no Exemplo 20. Cada gráfico mostra os resultados obtidos com o aptâmero indicado acima do gráfico. O eixo geométrico indica o nível de ligação. Em cada grupo de amostras, a ligação de 9 candidatos de aptâmero purificados é mostrada. A amostra inserida é indicada no eixo geométrico X da esquerda para a direita conforme segue: 1) Exossomo de Câncer: ligação de aptâmero a microesferas conjugadas a microvesículas isoladas de amostras de plasma de pacientes com câncer de mama; 2) Não exossomo de Câncer: ligação de aptâmero a microesferas conjugadas a amostras de plasma de pacientes com câncer de mama após a remoção de microvesículas por ultracentrifugação; 3) Não exossomo de Câncer: ligação de aptâmero a microesferas conjugadas a microvesículas isoladas de amostras de plasma de pacientes normais (isto é, pacientes sem câncer de mama; 4) Não exossomo de Não câncer: ligação de aptâmero a microesferas conjugadas a amostras de plasma de pacientes com câncer de mama após a remoção de microvesículas por ultracentrifugação.

[00136] As Figuras 24A e 24B ilustram a detecção de microvesículas em amostras de plasma do paciente. As microvesículas das amostras de plasma foram incubadas com microesferas conjugadas com anticorpos para antígenos de microvesícula de interesse. As microvesículas capturadas por esfera foram detectadas com um aptâmero an-

ti-EpCAM biotinilado e estreptavidina-ficoeritrina (SAPE). O eixo geométrico Y mostra o sinal fluorescente de microvesículas capturadas por esfera. O eixo geométrico X mostra barras para plasma de pacientes com câncer de próstata (c1 a c4), afecção pré-malignaões de próstata benigna (b1 a b4) e um controle negativo de PBS. Diferentes condições experimentais são indicadas abaixo do eixo geométrico X. Após a incubação com as amostras de plasma, as esferas conjugadas a anticorpo foram bloqueadas com um agente de bloqueio padrão (StartingBlock Blocking Buffers, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, EUA), com o bloco padrão e concentração de 1x de um aptâmero de bloqueio da invenção (primariamente SEQ ID NO. 230938) ou com o bloco padrão e concentração de 0,5x de um aptâmero de bloqueio da invenção (primariamente SEQ ID NO. 230938). As Figuras 24A e 24B ilustram os resultados para dois aptâmeros de ligação de não antígeno, em que cada um serve como controle negativo. Os dois aptâmeros de ligação de não antígeno são: Neg 5 (Figura 24A): 5' TGCAAGCTGC TAATCAGCGA TGCTCTTTGG AGTTTTTT (Biotina) 3' (SEQ ID NO. 230936); Neg 9 (Figura 24B): 5' TTTCAAGGCA CTCGTGTTCC CGACATGAGT GTTTTTT (Biotina) 3' (SEQ ID NO. 230937).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00137] Os detalhes de uma ou mais modalidades da invenção são apresentados na descrição anexa abaixo. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos na presente invenção possam ser também usados na prática ou testagem da presente invenção, os métodos e materiais preferenciais são agora descritos. Outros recursos, objetivos e vantagens das invenções serão percebidos a partir da descrição. No relatório descritivo, as formas singulares incluem também o plural a não ser que o contexto dite claramente de outra forma. A não ser que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o

mesmo significado conforme comumente entendido por um versado na técnica a qual essa revelação pertence. No caso de conflito, o presente Relatório descritivo prevalecerá.

[00138] São revelados no presente documento composições e métodos que podem ser usados para avaliar um perfil de biomarcador, que pode incluir uma presença ou um nível de um ou mais biomarcadores. As composições e os métodos da invenção compreendem o uso de aptâmeros que ligam antígenos de superfície de microvesícula ou um fragmento funcional dos mesmos. Os antígenos tipicamente compreender proteínas ou polipeptídeos, mas podem ser qualquer componente exibido em uma superfície de microvesícula, incluindo lipídeos e/ou carboidratos. Em geral, os aptâmeros revelados são moléculas de ácido nucleico, incluindo DNA e RNA, e variações dos mesmos. os métodos revelados compreendem processos diagnósticos e técnicas que usam um ou mais aptâmeros da invenção, para determinar o nível ou a presença de antígenos de superfície de microvesícula relevantes ou um fragmento funcional dos mesmos. Alternativamente, um aptâmero da invenção pode também ser usado como um agente de ligação para capturar, isolar ou enriquecer uma célula, um fragmento de célula, uma vesícula ou qualquer outro fragmento ou complexo que compreenda os antígenos de superfície, ou fragmentos funcionais dos mesmos.

[00139] As composições e os métodos da invenção compreendem aptâmeros individuais que são identificados para uso na avaliação de um perfil de biomarcador. A invenção revela ainda composições e métodos de conjuntos de aptâmeros que podem ser usados para detectar um perfil de biomarcador em uma dada amostra.

[00140] Os aptâmeros e as sequências de aptâmero revelados nas composições e nos métodos da invenção podem ser identificados no presente documento na forma de DNA ou RNA. A não ser que especi-

ficado de outro modo, um versado na técnica perceberá que um aptâmero pode em geral ser sintetizado em qualquer forma de ácido nucleico e portar várias modificações químicas e permanecer dentro do escopo da invenção.

[00141] Adicionalmente, um aptâmero da invenção pode ser também usado para fornecer detecção ou imageamento *in vitro* ou *in vivo*, para fornecer qualquer leitura diagnóstica (por exemplo, diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico).

[00142] Separadamente, um aptâmero da invenção pode ser também usado para tratamento ou como um agente terapêutico para alvejar especificamente uma célula, um tecido ou um órgão.

APTÂMEROS

SELEX

[00143] Um método adequado para gerar um aptâmero é com o processo intitulado "Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial" ("SELEX") em geral descrito, por exemplo, no pedido de patente de número de série U.S. 07/536.428, depositado em 11 de junho de 1990, agora abandonado, a Patente nº U.S. 5.475.096 intitulada "Nucleic Acid Ligands" e a Patente nº U.S. 5.270.163 (consulte também o documento WO 91/19813) intitulada "Nucleic Acid Ligands". Cada ligante de ácido nucleico identificado com SELEX, isto é, cada aptâmero, é um ligante específico de um dado composto ou molécula alvo . O processo de SELEX é baseado na percepção única de que os ácidos nucleicos têm capacidade suficiente para formar uma variedade de estruturas bi e tridimencionais e versatilidade química suficiente disponível dentro de seus monômeros para atuar como ligantes (isto é, formar pares de ligação específicos) com virtualmente qualquer composto químico, seja monomérico ou polimérico. As moléculas de qualquer tamanho ou composição podem servir como alvos.

[00144] SELEX conta como um ponto de apoio mediante uma bibli-

oteca ou conjunto grande de oligonucleotídeos de filamento único que compreendem sequências randomizadas. Os oligonucleotídeos podem ser DNA, RNA ou híbridos de DNA/RNA modificados ou não modificados. Em alguns exemplos, o conjunto compreende oligonucleotídeos 100% aleatórios ou parcialmente aleatórios. Em outros exemplos, o conjunto compreende oligonucleotídeos aleatórios ou parcialmente aleatórios contendo pelo menos uma sequência fixa e/ou conservada incorporada dentro da sequência randomizada. Em outros exemplos, o conjunto compreende oligonucleotídeos aleatórios ou parcialmente aleatórios contendo pelo menos uma sequência fixa e/ou conservada em sua extremidade 5' e/ou 3' que pode compreender uma sequência compartilhada por todas as moléculas do conjunto de oligonucleotídeos. As sequências fixas são sequências, tais como sítios de hibridização para iniciadores de PCR, sequências promotoras para RNA polimerases (por exemplo, T3, T4, T7 e SP6), sítios de restrição ou sequências homopoliméricas, tais como traços de poli A ou poli T, núcleos catalíticos, sítios para ligação seletiva a colunas de afinidade e outras sequências para facilitar a clonagem e/ou o sequenciamento de um oligonucleotídeo de interesse. As sequências conservadas são sequências, além das sequências fixas previamente descritas, compartilhadas por diversos aptâmeros que se ligam ao mesmo alvo.

[00145] Os oligonucleotídeos do conjunto preferencialmente incluem uma porção de sequência randomizada assim como sequências fixas necessárias para amplificação eficaz. Tipicamente, os oligonucleotídeos do conjunto de partida contêm sequências de terminal 5' e 3' fixas que flanqueiam uma região interna de 30 a 50 nucleotídeos aleatórios. Os nucleotídeos randomizados podem ser produzidos de diversas formas, incluindo síntese química e seleção de tamanho a partir de ácidos nucleicos celulares aleatoriamente clivados. A variação de sequência em ácidos nucleicos de teste pode ser também in-

troduzida ou aumentada por mutagênese antes ou durante as iterações de seleção/amplificação.

[00146] A porção de sequência aleatória do oligonucleotídeo pode ser de qualquer comprimento e pode compreender ribonucleotídeos e/ou desoxirribonucleotídeos e pode incluir nucleotídeos modificados ou não naturais ou análogos de nucleotídeo. Consulte, por exemplo, a Patente nº U.S. 5.958.691 ; a Patente nº U.S. 5.660.985; a Patente nº U.S. 5.958.691; a Patente nº U.S. 5.698.987; a Patente nº U.S. 5.817.635; a Patente nº U.S. 5.672.695 e a Publicação PCT WO 92/07065. Os oligonucleotídeos aleatórios podem ser sintetizados a partir de nucleotídeos ligados por fosfodiéster com o uso de técnicas de síntese de oligonucleotídeo de fase sólida bem conhecidas no campo. Consulte, por exemplo, Froehler et al., Nucl. Acid Res. 14:5.399 a 5.467 (1986) e Froehler et al., Tet. Lett. 27:5.575 a 5.578 (1986). Os oligonucleotídeos aleatórios podem ser também sintetizados com o uso de métodos de fase de solução, tais como métodos de síntese de triéster. Consulte, por exemplo, Sood et al., Nucl. Acid Res. 4:2.557 (1977) e Hirose et al., Tet. Lett., 28:2.449 (1978). As sínteses típicas executadas em equipamento de síntese de DNA automatizada rendem 10^{14} a 10^{16} moléculas individuais, um número suficiente para a maioria dos experimentos de SELEX. As regiões grandes o suficientes de sequência aleatória no projeto de sequência aumentam a probabilidade de que cada molécula sintetizada represente provavelmente uma única sequência.

[00147] A biblioteca de partida de oligonucleotídeos pode ser gerada por síntese química automatizada em um sintetizador de DNA. Para sintetizar sequências randomizadas, misturas de todos os quatro nucleotídeos são adicionadas em cada etapa de adição de nucleotídeo durante o processo de síntese, permitindo a incorporação aleatória de nucleotídeos. Conforme determinado acima, em uma modalidade, os

oligonucleotídeos aleatórios compreendem sequências inteiramente aleatórias; no entanto, em outras modalidades, os oligonucleotídeos aleatórios compreendem estiramentos de sequências não aleatórias ou parcialmente aleatórias. As sequências parcialmente aleatórias podem ser criadas por adição dos quatro nucleotídeos em diferentes razões molares em cada etapa de adição.

[00148] A biblioteca de partida de oligonucleotídeos pode ser, por exemplo, RNA, DNA ou híbrido de RNA/DNA. Naqueles casos em que uma biblioteca de RNA deve ser usada como a biblioteca de partida, a mesma é tipicamente gerada por transcrição de uma biblioteca de DNA *in vitro* com o uso de T7 RNA polimerase ou T7 RNA polimerase modificada e purificada. A biblioteca é então misturada com o alvo sob condições favoráveis para ligação e submetida a interações em etapas de ligação, divisão e amplificação, com o uso do mesmo esquema de seleção geral, para atingir virtualmente qualquer critério desejado de afinidade de ligação e seletividade. Mais especificamente, a partida com uma mistura contendo o conjunto de partida de ácidos nucleicos, o método SELEX inclui as etapas de: (a) colocar a mistura em contato com o alvo sob condições favoráveis para ligação; (b) dividir os ácidos nucleicos não ligados daqueles ácidos nucleicos que se ligaram especificamente às moléculas alvo; (c) dissociar os complexos de ácido nucleico-alvo; (d) amplificar os ácidos nucleicos dissociados dos complexos de ácido nucleico-alvo para render uma mistura enriquecida com ligante de ácidos nucleicos; e (e) reiterar as etapas de ligação, divisão, dissociação e amplificação através de quantos ciclos desejados para render ligantes de ácido nucleico com alta afinidade e altamente específicos para a molécula alvo. Naqueles casos em que aptâmeros de RNA estão sendo selecionados, o método SELEX compreende, ainda, as etapas de: (i) realizar transcrição reversa dos ácidos nucleicos dissociados dos complexos de ácido nucleico-alvo antes da amplificação

na etapa (d); e (ii) transcrever os ácidos nucleicos amplificados da etapa (d) antes de reiniciar o processo.

[00149] Dentro de uma mistura de ácidos nucleicos contendo um número grande de sequências e estruturas possíveis, há uma faixa ampla de afinidades de ligação para um dado alvo. Uma mistura de ácido nucleico que compreende, por exemplo, um segmento randomizado com 20 nucleotídeos pode ter 4^{20} possibilidades de candidato. Aqueles que têm constantes de afinidade mais altas para o alvo têm maior probabilidade de ligar-se ao alvo. Após a divisão, dissociação e amplificação, uma segunda mistura de ácidos nucleicos é gerada, enriquecida para os candidatos de afinidade de ligação mais alta. Ciclos adicionais de seleção progressivamente favorecem ligantes melhores até a mistura de ácidos nucleicos resultante ser predominantemente composta por apenas uma ou algumas sequências. Essas podem ser então clonadas, sequenciadas e individualmente testadas por afinidade de ligação como ligantes puros ou aptâmeros.

[00150] Os ciclos de seleção e amplificação são repetidos até um objetivo desejado ser atingido. Na maioria dos casos gerais, a seleção/amplificação continua até nenhum aprimoramento significativo na resistência de ligação ser atingido na repetição do ciclo. O método é tipicamente usado para amostrar aproximadamente 10^{14} espécies de ácido nucleico diferentes, mas pode ser usado para amostrar tantas quanto cerca de 10^{18} espécies de ácido nucleico diferentes. Em geral, as moléculas de aptâmero de ácido nucleico são selecionadas em um procedimento de 5 a 20 ciclos. Em uma modalidade, a heterogeneidade é introduzida apenas nos estágios de seleção iniciais e não ocorre por todo o processo de replicação.

[00151] Em uma modalidade de SELEX, o processo de seleção é tão eficaz no isolamento de ligantes de ácido nucleico que se ligam mais fortemente ao alvo selecionado, que apenas um ciclo de seleção

e amplificação é exigido. Tal seleção eficaz pode ocorrer, por exemplo, em um processo do tipo cromatográfico em que a capacidade dos ácidos nucleicos de se associarem com alvos ligados em uma coluna opera de tal maneira que a coluna tem capacidade suficiente para permitir a separação e o isolamento dos ligantes de ácido nucleico de afinidade mais alta.

[00152] Em muitos casos, não é necessariamente desejável realizar as etapas iterativas de SELEX até um único ligante de ácido nucleico ser identificado. A solução de ligante de ácido nucleico alvo específica pode incluir uma família de estruturas ou motivos de ácido nucleico que têm diversas sequências conservadas e diversas sequências que podem ser substituídas ou adicionadas sem afetar significativamente a afinidade dos ligantes de ácido nucleico ao alvo. Finalizando-se o processo SELEX antes da conclusão, é possível determinar a sequência de diversos membros da família de solução de ligante de ácido nucleico. A invenção fornece a identificação de conjuntos de aptâmeros e usos dos mesmos que conjuntamente podem ser usados para caracterizar uma amostra de teste. Por exemplo, os conjuntos de aptâmeros podem ser identificados através dos ciclos de seleção positiva e negativa para identificar microvesícula indicativa de uma doença ou afecção. A invenção fornece, ainda, o uso de tais conjuntos de aptâmeros para detectar e/ou quantificar tais microvesículas em uma amostra, permitindo, desse modo, que um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico seja fornecido.

[00153] Uma variedade de estruturas primárias, secundárias e terciárias de ácido nucleico são conhecidas. As estruturas ou motivos que se mostraram mais comumente envolvidos em interações do tipo não Watson-Crick são referidas como laços de hairpina, saliências simétricas e assimétricas, peseudonós e combinações miríades dos mesmos. Quase todos os casos conhecidos de tais motivos sugerem

que os mesmos podem ser formados em uma sequência de ácidos nucleicos de não mais do que 30 nucleotídeos. Por essa razão, é normalmente preferencial que os procedimentos de SELEX com segmentos randomizados contíguos sejam iniciados com sequências de ácidos nucleicos contendo um segmento randomizado de entre cerca de 20 a cerca de 50 nucleotídeos e, em algumas modalidades, cerca de 30 a cerca de 40 nucleotídeos. Em um exemplo, a sequência 5'-fixa:aleatória:3'-fixa compreende uma sequência aleatória de cerca de 30 a cerca de 50 nucleotídeos.

[00154] O método SELEX de núcleo foi modificado para atingir diversos objetivos específicos. Por exemplo, a Patente nº U.S. 5.707.796 descreve o uso de SELEX em conjunto com eletroforese em gel para selecionar moléculas de ácido nucleico com características estruturais específicas, tal como DNA dobrado. A Patente nº U.S. 5.763.177 descreve métodos baseados em SELEX para selecionar ligantes de ácido nucleico contendo grupos fotorreativos que têm capacidade para ligação e/ou fotorreticulação e/ou fotoinativação de uma molécula alvo. A Patente nº U.S. 5.567.588; a Patente nº U.S. 5.861.254 descrevem métodos baseados em SELEX que atingem divisão altamente eficaz entre oligonucleotídeos que têm afinidade alta e baixa a uma molécula alvo. A Patente nº U.S. 5.496.938 descreve métodos para obter ligantes de ácido nucleico aprimorados após o processo de SELEX ter sido realizado. A Patente nº U.S. 5.705.337 descreve métodos para ligar covalentemente um ligante a seu alvo.

[00155] SELEX pode ser também usado para obter ligantes de ácido nucleico que se ligam a mais de um sítio na molécula alvo e para obter ligantes de ácido nucleico que incluem espécies de não ácido nucleico que se ligam a sítios específicos no alvo. SELEX fornece meios para isolar e identificar ligantes de ácido nucleico que se ligam a qualquer alvo visável, incluindo biomoléculas grandes e pequenas, tais

como proteínas de ligação de ácido nucleico e proteínas não conhecidas por ligar ácidos nucleicos como parte de sua função biológica assim como cofatores e outras moléculas pequenas. Por exemplo, a Patente nº U.S. 5.580.737 revela sequências de ácidos nucleicos identificadas através de SELEX que têm capacidade para ligação com alta afinidade à cafeína e o análogo proximamente relacionado, teofilina.

[00156] Contra-SELEX é um método para aprimorar a especificidade de ligantes de ácido nucleico a uma molécula alvo por eliminação de sequências de ligantes de ácido nucleico com reatividade cruzada a uma ou mais moléculas não alvo. O contra-SELEX é compreendido pelas etapas de: (a) preparar uma mistura candidata de ácidos nucleicos; (b) colocar a mistura candidata em contato com o alvo, em que os ácidos nucleicos que têm uma afinidade aumentada ao alvo em relação à mistura candidata podem ser divididos do remanescente da mistura candidata; (c) dividir os ácidos nucleicos com afinidade aumentada do remanescente da mistura candidata; (d) dissociar os ácidos nucleicos com afinidade aumentada do alvo; e) colocar os ácidos nucleicos com afinidade aumentada em contato com uma ou mais moléculas de não alvo, de modo que os ligantes de ácido nucleico com afinidade específica para a(s) molécula(s) não alvo sejam removidos; e (f) amplificar os ácidos nucleicos com afinidade específica apenas à molécula alvo para render uma mistura de ácidos nucleicos enriquecidos para sequências de ácidos nucleicos com uma afinidade e especificidade relativamente altas para ligação à molécula alvo. Conforme descrito acima para o SELEX, os ciclos de seleção e amplificação são repetidos conforme necessário até um objetivo desejado ser atingido.

[00157] Um problema potencial encontrado no uso de ácidos nucleicos como agentes terapêuticos e vacinas é que os oligonucleotídeos em sua forma de fosfodiéster podem ser rapidamente degradados nos fluidos corporais por enzimas intracelulares e extracelulares,

tais como endonucleases e exonucleases, antes do efeito desejado manifestar-se. O método SELEX assim abrange a identificação de ligantes de ácido nucleico com alta afinidade contendo nucleotídeos modificados que conferem características aprimoradas no ligante, tal como estabilidade in vivo aprimorada ou características de entrega aprimoradas. Os exemplos de tais modificações incluem substituições químicas nas posições de ribose e/ou fosfato e/ou base. Os ligantes de ácido nucleico identificados com SELEX contendo nucleotídeos modificados são descritos, por exemplo, na Patente nº U.S. 5.660.985, que descreve oligonucleotídeos contendo derivados de nucleotídeo quimicamente modificados na posição 2' de ribose, posição 5 de pirimidinas e posição 8 de purinas, a Patente nº U.S. 5.756.703 que descreve oligonucleotídeos que contêm várias pirimidinas modificadas em 2' e a Patente nº U.S. 5.580.737 que descreve ligantes de ácido nucleico altamente específicos que contêm um ou mais nucleotídeos modificados com substituintes 2'-amino (2'-NH_2), 2'-fluoro (2'-F) e/ou 2'-O-metila (2'-OMe).

[00158] As modificações dos ligantes de ácido nucleico contempladas nesta invenção incluem, porém, sem limitação, aquelas que fornecem outros grupos químicos que incorporam carga adicional, capacidade de polarização, hidrofobicidade, ligação de hidrogênio, interação eletrostática e fluxionalidade às bases do ligante de ácido nucleico ou ao ligante de ácido nucleico como um todo. As modificações para gerar populações de oligonucleotídeos que são resistentes às nucleases podem também incluir uma ou mais ligações entre nucleotídeos substitutas, açúcares alterados, bases alteradas ou combinações dos mesmos. Tais modificações incluem, porém, sem limitação, modificações na posição 2', modificações de pirimidina na posição 5, modificações de purina na posição 8, modificações em aminas exocíclicas, substituição de 4-tiouridina, substituição de 5-bromo ou 5-iodo-uracila; modifi-

cações de cadeia principal, modificações de fosforotioato ou alil fosfato, metilações e combinações de pareamento de bases incomuns, tais como as isobases isocitidina e isoguanosina. As modificações podem também incluir modificações em 3' e 5', tal como terminação.

[00159] Em uma modalidade, são fornecidos oligonucleotídeos em que o grupo P(O)O é substituído por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), $P(O)NR_2$ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO ou CH_2 ("formacetal") ou 3'-amina (--NH--CH_2--CH_2--), em que cada R ou R' é independentemente H ou alquila substituída ou não substituída. Os grupos de ligação podem ser ligados a nucleotídeos adjacentes através de uma ligação de --O--, --N-- ou --S--. Nem todas as ligações no oligonucleotídeo precisam ser idênticas. Conforme usado no presente documento, o termo fosforotioato abrange um ou mais átomos de oxigênio de não ponte em uma ligação de fosfosdiéster substituída por um ou mais átomos de enxofre.

[00160] Em modalidades adicionais, os oligonucleotídeos compreendem grupos de açúcar modificados, por exemplo, um ou mais dentre os grupos hidroxila é substituído por halogênio, grupos alifáticos ou funcionalizados como éteres ou aminas. Em uma modalidade, a posição 2' do resíduo de furanose é substituída por qualquer um dentre um grupo O-metila, O-alquila, O-alila, S-alquila, S-alila ou halo. Os métodos de síntese de açúcares modificados em 2' são descritos, por exemplo, em Sproat, et al., Nucl. Acid Res. 19:733 a 738 (1991); Cotten, et al, Nucl. Acid Res. 19:2.629 a 2.635 (1991); e Hobbs, et al, Biochemistry 12:5.138 a 5.145 (1973). Outras modificações são conhecidas por um versado na técnica. Tais modificações podem ser modificações de processo pré-SELEX ou modificações de processo pós-SELEX (modificação de ligantes não modificados previamente identificados) ou podem ser feitas por incorporação no processo de SELEX.

[00161] As modificações de processo pré-SELEX ou aquelas feitas

por incorporação no processo de SELEX rendem ligantes de ácido nucleico tanto com especificidade para seu alvo de SELEX como estabilidade aprimorada, por exemplo, estabilidade *in vivo*. As modificações de processo pós-SELEX feitas aos ligantes de ácido nucleico podem resultar em estabilidade aprimorada, por exemplo, estabilidade *in vivo* sem afetar adversamente a capacidade de ligação do ligante de ácido nucleico.

[00162] O método SELEX inclui combinar oligonucleotídeos selecionados com outros oligonucleotídeos selecionados e unidades funcionais de não oligonucleotídeo conforme descrito na Patente nº U.S. 5.637.459; na Patente nº U.S. 5.683.867. O método SELEX inclui, ainda, combinar ligantes de ácido nucleico selecionados com compostos de peso molecular alto lipofílicos ou não imunogênicos em um complexo diagnóstico ou terapêutico, conforme descrito, por exemplo, na Patente nº U.S. 6.011.020; na Patente nº U.S. 6.051.698 e na Publicação PCT nº WO 98/18480. Essas patentes e pedidos ensinam a combinação de um arranjo amplo de formatos e outras propriedades, com as propriedades de amplificação e replicação de oligonucleotídeos e com as propriedades desejáveis de outras moléculas.

[00163] A identificação de ligantes de ácido nucleico a peptídeos pequenos e flexíveis por meio d método SELEX foi também explicada. Os peptídeos pequenos têm estruturas flexíveis e usualmente existem em solução em um equilíbrio de múltiplos confôrmeros e, assim, pensou-se inicialmente que as afinidades de ligação pudessem ser limitadas pela entropia conformacional perdida mediante a ligação de um peptídeo flexível. No entanto, a viabilidade de identificar ligantes de ácido nucleico para peptídeos pequenos em solução foi demonstrada na Patente nº U.S. 5.648.214. Nessa patente, ligantes de ácido nucleico RNA com alta afinidade para a substância P, um peptídeo com 11 aminoácidos, forma identificados.

[00164] Os aptâmeros com especificidade e afinidade de ligação ao(s) alvo(s) da presente invenção podem ser selecionados pelo processo de SELEX N conforme descrito no presente documento. Como parte do processo de SELEX, as sequências selecionadas para ligação ao alvo são então opcionalmente minimizadas para determinar a sequência mínima que tem a afinidade de ligação desejada. As sequências selecionadas e/ou as sequências minimizadas são opcionalmente otimizadas realizando-se mutagênese aleatória ou direta da sequência para aumentar a afinidade de ligação ou alternativamente para determinar quais posições na sequência são essenciais para a atividade de ligação. Adicionalmente, as seleções podem ser realizadas com sequências que incorporam nucleotídeos modificados para estabilizar as moléculas de aptâmero contra degradação *in vivo*.

SELEX MODIFICADO EM 2'

[00165] A fim de que um aptâmero seja adequado para uso como um agente terapêutico, o mesmo é preferencialmente não dispendioso de sintetizar, seguro e estável *in vivo*. Os aptâmeros de RNA e DNA do tipo selvagem não são tipicamente estáveis *in vivo* devido a sua suscetibilidade à degradação por nucleases. A resistência à degradação por nuclease pode ser amplamente aumentada pela incorporação de grupos de modificação na posição 2'.

[00166] Grupos fluoro e amino têm sido incorporados com sucesso em conjuntos de oligonucleotídeo a partir dos quais os aptâmeros foram subsequentemente selecionados. No entanto, essas modificações aumentam amplamente o custo de síntese do aptâmero resultante e podem introduzir preocupações de segurança em alguns casos devido à possibilidade de que os nucleotídeos modificados poderiam ser reciclados no DNA hospedeiro por degradação dos oligonucleotídeos modificados e uso subsequente dos nucleotídeos como substratos para a síntese de DNA.

[00167] Os aptâmeros que contêm nucleotídeos de 2'-O-metila ("2'-OMe"), conforme fornecido no presente documento, pode superar muitas dessas desvantagens. Os oligonucleotídeos contendo nucleotídeos 2'-OMe são resistentes à nuclease e não dispendiosos para sintetizar. Embora os nucleotídeos de 2'-OMe sejam ubíquos em sistemas biológicos, polimerases naturais não aceitam NTPs 2'-OMe como substratos sob condições fisiológicas, portanto, não é preocupações de segurança em relação à reciclagem de nucleotídeos de 2'-OMe em DNA hospedeiro. O método SELEX usado para gerar aptâmeros modificados em 2' é descrito, por exemplo, no Pedido de Patente Provisório de número de série U.S. 60/430.761, depositado em 3 de dezembro de 2002, no Pedido de Patente Provisório de número de série U.S. 60/487.474 depositado em 15 de Junho de 2003, no Pedido de Patente Provisório de número de série U.S.60/517.039, depositado em 4 de novembro de 2003, no Pedido de Patente de número de série U.S.10/729.581, depositado em 3 de dezembro de 2003 e no pedido de patente de número de série U.S. 10/873.856, depositado em 21 de junho de 2004, intitulado "Method for *in vitro* Selection of 2' -O-methyl substituted Nucleic Acids nucleics", cada um dos quais é incorporado ao presente a título de referência em sua totalidade.

MÉTODOS

DETECÇÃO DE BIOMARCADOR E DIAGNÓSTICOS

[00168] Os aptâmeros da invenção podem ser usados em vários métodos para avaliar a presença ou o nível de biomarcadores em uma amostra biológica, por exemplo, entidades biológicas de interesse, tais como proteínas, ácidos nucleicos ou microvesículas. O aptâmero funciona como um agente de ligação para avaliar a presença ou o nível da molécula alvo cognata. Portanto, em várias modalidades da invenção direcionadas a diagnósticos, prognósticos ou teragnósticos, um ou mais aptâmeros da invenção são configurados em um ensaio baseado

em alvo de ligante, em que um ou mais aptâmeros da invenção são colocados em contato com uma amostra biológica selecionada, em que o um ou mais aptâmeros associam-se ou ligam-se a suas moléculas alvo. Os aptâmeros da invenção são usados para identificar bioassinaturas candidatas com base nas amostras biológicas avaliadas e nos biomarcadores detectados. Em modalidades adicionais, os próprios aptâmeros podem fornecer uma bioassinatura para uma afecção ou doença particular. Uma bioassinatura refere-se a um perfil de biomarcador de uma amostra biológica que compreende uma presença, um nível ou outra característica que pode ser avaliada (incluindo, sem limitação, uma sequência, uma mutação, uma reorganização, uma translocação, uma deleção, uma modificação epigenética, uma metilação, uma modificação pós-tradução, um alelo, uma atividade, parceiros de complexo, estabilidade, meia-vida e similares) de um ou mais biomarcadores de interesse. As bioassinaturas podem ser usadas para avaliar critérios de diagnóstico e/ou prognóstico, tal como presença de doença, estadiamento da doença, monitoramento da doença, estratificação da doença ou vigilância para detecção, metástase ou recorrência ou progressão da doença. Por exemplo, os métodos da invenção que usam aptâmeros contra antígeno de superfície de microvesícula são úteis para correlacionar uma bioassinatura que compreende antígenos de microvesícula a uma afecção ou uma doença selecionada. Uma bioassinatura pode ser também usada clinicamente na tomada de decisões em relação às modalidades de tratamento, incluindo intervenção terapêutica. Uma bioassinatura pode ser, ainda, usada clinicamente para tomar decisões de tratamento, incluindo a possibilidade de realizar cirurgia ou quais padrões de tratamento devem ser usados juntamente com a cirurgia (por exemplo, ou pré-cirúrgico ou pós-cirúrgico). Como um exemplo ilustrativo, uma bioassinatura de biomarcadores circulantes que indica uma forma agressiva de câncer pode

exigir um procedimento cirúrgico mais agressivo e/ou um regime terapêutico mais agressivo para tratar o paciente.

[00169] Uma bioassinatura pode ser usada em quaisquer métodos revelados no presente documento, por exemplo, para avaliar se um indivíduo sofre de uma doença, está em risco de desenvolver a doença ou para avaliar o estágio ou a progressão da doença. Por exemplo, uma bioassinatura pode ser usada para avaliar se um indivíduo tem câncer de próstata, câncer de cólon ou outro câncer, conforme descrito no presente documento. Além disso, uma bioassinatura pode ser usada para determinar um estágio de uma doença ou afecção, tal como câncer de cólon. O perfil de bioassinatura/biomarcador que compreende uma microvesícula pode incluir a avaliação de carga útil dentro da microvesícula. Por exemplo, um ou mais aptâmeros da invenção podem ser usados para capturar uma população de microvesículas, fornecendo, assim, a leitura de antígenos de microvesícula e então o teor de carga útil dentro das microvesículas capturadas pode ser avaliado, fornecendo, assim, leitura adicional de biomarcador do teor de carga útil.

[00170] Uma bioassinatura para caracterizar um fenótipo pode compreender qualquer número de critérios úteis. Conforme descrito mais abaixo, o termo "fenótipo", conforme usado no presente documento, pode significar qualquer traço ou característica que é atribuído a um perfil de bioassinatura / biomarcador. Um fenótipo pode ser detectado ou identificado em parte ou em todo com o uso das composições e/ou métodos da invenção. Em algumas modalidades, pelo menos um critério é usado para cada biomarcador. Em algumas modalidades, pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou pelo menos 100 critérios são usados. Por exemplo, para a caracterização de um câncer, diversos critérios diferentes podem ser usados quando o indivíduo é diagnosticado com um câncer: 1) se a

quantidade de microRNA em uma amostra de um indivíduo for mais alta que um valor de referência; 2) se a quantidade de um microRNA dentro de vesículas específicas de tipo celular (isto é, vesículas derivadas de um tecido ou órgão específico) for mais alta que um valor de referência; ou 3) se a quantidade de microRNA dentro de vesículas com um ou mais biomarcadores específicos de câncer for mais alta que um valor de referência. Regras similares podem ser aplicadas se a quantidade de microRNA for menor ou igual à referência. O método pode incluir, ainda, uma medida de controle de qualidade, de modo que os resultados sejam fornecidos para o indivíduo se as amostras atenderem a medida de controle de qualidade. Em algumas modalidades, se os critérios forem atendidos, mas o controle de qualidade for questionável, o indivíduo é reavaliado.

TERANÓSTICOS

[00171] Uma bioassinatura pode ser usada em diagnósticos relacionados à terapia para fornecer testes úteis para diagnosticar uma doença ou escolher o regime de tratamento correto, tal como fornecer um teragnóstico. O teragnóstico inclui testagem diagnóstica que fornece a capacidade de efetuar a terapia ou o tratamento de um estado de doença. A testagem diagnóstica fornece um teragnóstico de uma maneira similar ao diagnóstico ou a testagem diagnóstica fornece um diagnóstico ou prognóstico, respectivamente. Conforme usado no presente documento, o teragnóstico abrange qualquer forma desejada de testagem relacionada à terapia, incluindo medicina preditiva, medicina personalizada, medicina integrada, farmacodiagnóstico e parceria de Dx/Rx. Os testes relacionados à terapia podem ser usados para prever e avaliar a resposta de fármaco em indivíduos únicos, isto é, fornecer medicina personalizada. A previsão de uma resposta de fármaco pode determinar se um indivíduo é um provável respondedor ou um provável não respondedor a um agente terapêutico candidato, por exemplo,

antes de o indivíduo ter sido exposto ou tratado de outro modo com o tratamento. A avaliação de uma resposta de fármaco pode monitorar uma resposta a um fármaco, por exemplo, monitorar a melhora do indivíduo ou a falta da mesma ao longo do curso de tempo após iniciar o tratamento. Os testes relacionados à terapia são úteis para selecionar um indivíduo para o tratamento que tem probabilidade particular de se beneficiar do tratamento ou fornecer uma indicação precoce e objetiva da eficácia de tratamento em um indivíduo único. Portanto, uma bioassinatura, conforme revelada no presente documento, pode indicar que o tratamento deve ser alterado para selecionar um tratamento mais promissor, evitando, assim, o grande custo de atrasar o tratamento benéfico e evitando os custos financeiros e de mortalidade de administrar um fármaco(s) ineficaz(es).

[00172] As composições e os métodos da invenção podem ser usados para identificar ou detectar uma bioassinatura que está associada a doenças e distúrbios selecionados, que incluem, porém, sem limitação, doença cardiovascular, câncer, doenças infecciosas, sepse, doenças neurológicas, doenças relacionadas ao sistema nervoso central, doenças relacionadas endovasculares e doenças relacionadas autoimunes. O diagnóstico relacionado à terapia também auxilia na previsão de toxicidade de fármaco, resistência de fármaco ou resposta de fármaco. Os testes relacionados à terapia podem ser desenvolvidos em qualquer formato de testagem diagnóstica adequada, que incluem, porém, sem limitação, por exemplo, testes imunoistoquímicos, química clínica, imunoensaio, tecnologias baseadas em célula, testes de ácido nucleico ou métodos de imageamento corporal. Os testes relacionados à terapia podem incluir, ainda, porém, sem limitação, testagem que auxilia na determinação de terapia, testagem que monitora a toxicidade terapêutica ou resposta à testagem de terapia. Portanto, uma bioassinatura pode ser usada para prever ou monitorar uma resposta do

indivíduo a um tratamento. Uma bioassinatura pode ser determinada em diferentes pontos no tempo para um indivíduo após o início, remoção ou alteração de um tratamento particular.

[00173] Em algumas modalidades, as composições e os métodos da invenção fornecem uma determinação ou uma previsão quanto a se um indivíduo está respondente a um tratamento que é feita com base em uma alteração na quantidade de um ou mais componentes de uma bioassinatura (isto é, o microRNA, vesículas e/ou biomarcadores de interesse), uma quantidade de um ou mais componentes de uma bioassinatura particular ou a bioassinatura detectada para os componentes. Em outra modalidade, a afecção de um indivíduo é monitorada determinando-se uma bioassinatura em diferentes pontos no tempo. A progressão, regressão ou recorrência de uma afecção é determinada. A resposta à terapia pode ser também medida ao longo de um curso de tempo. Portanto, a invenção fornece um método para monitorar uma situação de uma doença ou outra afecção médica em um indivíduo que compreende isolar ou detectar uma bioassinatura de uma amostra biológica do indivíduo, detectar a quantidade geral dos componentes de uma bioassinatura particular ou detectar a bioassinatura de um ou mais componentes (tal como a presença, a ausência ou o nível de expressão de um biomarcador). As bioassinaturas são usadas para monitorar a situação da doença ou afecção.

[00174] Uma ou mais bioassinaturas inovadoras de uma vesícula podem ser também identificadas. Por exemplo, uma ou mais vesículas podem ser isoladas de um indivíduo que responde a um tratamento com fármaco ou regime de tratamento e comparadas a uma referência, tal como outro indivíduo que não responde ao tratamento com fármaco ou regime de tratamento. As diferenças entre as bioassinaturas podem ser determinadas e usadas para identificar outros indivíduos como respondedores ou não respondedores a um fármaco ou

regime de tratamento particular.

[00175] Em algumas modalidades, uma bioassinatura é usada para determinar se uma doença ou afecção particular é resistente a um fármaco, em cujo caso um médico não precisa gastar tempo valioso com tal tratamento com fármaco. Para obter validação precoce de uma escolha de fármaco ou regime de tratamento, uma bioassinatura é determinada para uma amostra obtida de um indivíduo. A bioassinatura é usada para avaliar se a doença do indivíduo particular tem o biomarcador associado à resistência de fármaco. Tal determinação permite que os médicos devotem tempo essencial assim como os recursos financeiros do paciente a tratamentos eficazes.

[00176] As bioassinaturas podem ser usadas no teragnóstico de um câncer, tal como na identificação de se um indivíduo que sofre de câncer é um provável respondedor ou não respondedor a um tratamento de câncer particular. Os métodos em questão podem ser usados para teragnosticar cânceres, incluindo aqueles listados no presente documento, por exemplo, na seção "Fenótipo" acima. Esses incluem, sem limitação, câncer de pulmão, câncer de pulmão de células pequenas, câncer de pulmão de células não pequenas (incluindo carcinoma de células pequenas (câncer de células em aveia), carcinoma pequenas células/grandes células associado e carcinoma de pequenas células combinado), câncer de cólon, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de fígado , câncer do pâncreas, câncer cerebral, câncer de rim, câncer de ovário, câncer de estômago, melanoma, câncer ósseo, câncer gástrico, câncer de mama, glioma, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma renal papilar, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, leucemia, linfoma, mieloma ou outros tumores sólidos.

[00177] Uma bioassinatura de biomarcadores circulantes, incluindo marcadores associados a um componente presente em uma amostra

biológica (por exemplo, célula, fragmentos de célula, vesícula extracelular derivada de célula), em uma amostra de um indivíduo que sofre de um câncer pode ser usada para selecionar um tratamento candidato para o indivíduo. A bioassinatura pode ser determinada de acordo com os métodos da invenção apresentada no presente documento. Em algumas modalidades, o tratamento candidato compreende um padrão de cuidado para o câncer. O tratamento pode ser um tratamento de câncer, tal como radiação, cirurgia, quimioterapia ou uma combinação dos mesmos. O tratamento de câncer pode ser um agente terapêutico, tais como agentes anticâncer e regimes quimioterápicos. As associações de fármaco adicionais e as regras que são usadas nas modalidades da invenção são encontradas no Pedido de Patente nº U.S. 12/658.770, depositado em 12 de fevereiro de 2010; Pedido de patente PCT Internacional PCT/US2010/000407, depositado em 11 de fevereiro de 2010; Pedido de patente PCT Internacional PCT/US2010/54366, depositado em 27 de outubro de 2010; e Pedido de Patente Provisório nº U.S. 61/427.788, depositado em 28 de dezembro de 2010; em que todos tais pedidos são incorporados a título de referência ao presente documento em sua totalidade. Consulte, por exemplo, "Table 4: Rules Summary for Treatment Selection" do documento PCT/US2010/54366.

DETECÇÃO DE BIOMARCADOR

[00178] As composições e os métodos da invenção podem ser usados para avaliar quaisquer biomarcadores úteis em uma amostra biológica para caracterizar um fenótipo associado à amostra. Tais biomarcadores incluem todos os tipos de entidades biológicas, tais como proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos, complexos de qualquer um dos mesmos e microvesículas. Várias moléculas associadas a uma superfície de microvesícula ou confinadas dentro da microvesícula (referida no presente documento como "carga útil") podem servir

como biomarcadores. As próprias microvesículas podem ser também usadas como biomarcadores.

[00179] Os aptâmeros da invenção podem ser usados para avaliar os níveis ou a presença de uma população de microvesículas. Consulte, por exemplo, as Figuras 15B e 15C. Os aptâmeros da invenção podem ser também usados para avaliar os níveis ou a presença de sua molécula alvo específica. Consulte, por exemplo, a Figura 15A. Adicionalmente, os aptâmeros da invenção são usados para capturar ou isolar um componente presente em uma amostra biológica que tem a molécula alvo do aptâmero presente. Por exemplo, se um dado antígeno de superfície de microvesícula estiver presente em uma célula, fragmento de célula ou vesícula extracelular derivada de célula. Um agente de ligação ao biomarcador, incluindo, sem limitação, um aptâmero fornecido pela invenção, pode ser usado para capturar ou isolar a célula, fragmento de célula ou vesículas extracelulares derivadas de célula. Consulte, por exemplo, as Figuras 1A e 1B, 1D e 1E. Tais entidades capturadas ou isoladas podem ser ainda caracterizadas para avaliar antígenos de superfície adicionais ou moléculas de "carga útil" internas presentes (isto é, moléculas de ácido nucleico, lipídeos, açúcares, polipeptídeos ou fragmentos funcionais dos mesmos ou quaisquer outros presentes no meio celular que podem ser usados como um biomarcador), em que um ou mais biomarcadores fornecem uma bioassinatura para avaliar um fenótipo desejado, tal como uma doença ou afecção. Consulte, por exemplo, a Figura 1F. Portanto, os aptâmeros da invenção são usados não apenas para avaliar um ou mais antígenos de superfície de microvesícula de interesse, mas também são usados para separar um componente presente em uma amostra biológica, em que os próprios componentes podem ser ainda avaliados para identificar uma bioassinatura candidata.

[00180] Os métodos da invenção podem compreender análise múl-

tipla de pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, 75 ou 100 biomarcadores diferentes. Por exemplo, um ensaio de uma população heterogênea de vesículas pode ser realizado com uma pluralidade de partículas que são identificadas de modo diferente. Pode haver pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, 75 ou 100 partículas identificadas de modo diferente. As partículas podem ser identificadas externamente, tal como com uma etiqueta, ou podem ser identificadas intrinsicamente. Cada partícula identificada de modo diferente pode ser acoplada a um agente de captura, tal como um agente de ligação, para uma vesícula, resultando na captura de uma vesícula. Os múltiplos agentes de captura podem ser selecionados para caracterizar um fenótipo de interesse, incluindo agentes de captura contra biomarcadores de vesícula gerais, biomarcadores específicos de célula de origem e biomarcadores de doença. Um ou mais biomarcadores da vesícula capturada podem ser então detectados por uma pluralidade de agentes de ligação. O agente de ligação pode ser diretamente identificado para facilitar a detecção. Alternativamente, o agente de ligação é identificado por um agente secundário. Por exemplo, o agente de ligação pode ser um anticorpo para um biomarcador na vesícula, em que o agente de ligação está ligado à biotina. Um agente secundário compreende estreptavidina ligada a um repórter e pode ser adicionado para detectar o biomarcador. Em algumas modalidades, a vesícula capturada é avaliada por pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, 75 ou 100 biomarcadores diferentes. Por exemplo, múltiplos detectores, isto é, detecção de múltiplos biomarcadores de uma vesícula capturada ou população de vesículas, podem aumentar o sinal obtido, a sensibilidade aumentada permitida, a especificidade ou ambos e o uso de quantidades menores de amostras. A detecção pode ser com mais de um biomarcador, incluindo, sem limitação, mais

de um marcador de vesícula geral, tal como na Tabela 3.

[00181] Um método baseado em imunoensaio (por exemplo, ensaio de sanduíche) pode ser usado para detectar um agente de ligação de uma vesícula. Um exemplo inclui ELISA. Um agente de ligação pode ser ligado a um poço. Por exemplo, um agente de ligação, tal como um aptâmero ou anticorpo para um antígeno de uma vesícula, pode ser ligado a um poço. Um biomarcador na vesícula capturada pode ser detectado com base nos métodos descritos no presente documento. A Figura 1A mostra um esquema ilustrativo para um tipo sanduiche de imunoensaio. O agente de captura pode ser contra um antígeno de vesícula de interesse, por exemplo, um biomarcador vesícula geral, um marcador de célula de origem ou um marcador de doença. Na figura, as vesículas capturadas são detectadas com o uso de agente de ligação identificado por fluorescência (agente de detecção) contra antígenos de vesícula de interesse. Múltiplos agentes de ligação e captura podem ser usados, por exemplo, em endereços distinguíveis em um arranjo ou diferentes poços de uma placa de imunoensaio. Os agentes de detecção e de ligação podem ser contra o mesmo antígeno que o agente de ligação e captura ou podem ser direcionados contra outros marcadores. O agente de ligação e captura pode ser qualquer agente de ligação útil, por exemplo, aptâmeros, anticorpos ou lecitinas ancorados e/ou os anticorpos detectores podem ser similarmente substituídos, por exemplo, com aptâmeros, anticorpos, lecitinas ou outras proteínas ou entidades de ligação detectáveis (por exemplo, identificados). Em uma modalidade, um ou mais agentes de captura para um biomarcador de vesícula geral, um marcador de célula de origem e/ou um marcador de doença são usados juntamente com os agentes de detecção contra o biomarcador de vesícula geral, tal como moléculas de tetraspanina, incluindo, sem limitação, um ou mais dentre CD9, CD63 e CD81, ou outros marcadores na Tabela 3 no presente docu-

mento. Os exemplos de antígeno de superfície de microvesículas são revelados no presente documento, por exemplo, nas Tabelas 3 ou 4, ou são conhecidos na técnica, e os exemplos úteis nos métodos e composições da invenção são revelados no Pedido de Patente Internacional de número de série PCT/US2011/031479, intitulado "Circulating Biomarckers for Disease" e depositado em 6 de abril de 2011.

[00182] A Figura 1D apresenta um esquema ilustrativo para analisar vesículas de acordo com os métodos da invenção. Os agentes de captura são usados para capturar vesículas, os detectores são usados para detectar as vesículas capturadas e o nível ou a presença das microvesículas capturadas e detectadas é usado para caracterizar um fenótipo. Os agentes de captura, os detectores e a caracterização de fenótipo podem ser qualquer um daqueles descritos no presente documento. Por exemplo, os agentes de captura incluem anticorpos ou aptâmeros ancorados a um substrato que reconhecem um antígeno de vesícula de interesse, os detectores incluem anticorpos ou aptâmeros identificados para um antígeno de vesícula de interesse e a caracterização de um fenótipo inclui um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico de uma doença. No esquema mostrado na Figura 1D i), uma população de vesículas é capturada com um ou mais agentes de captura contra biomarcadores de vesícula gerais 100. As vesículas capturadas são então identificadas com detectores contra biomarcadores de célula de origem 101 e/ou biomarcadores de doençaespecíficos 102. Se apenas detectores de célula de origem forem usados 101, a bioassinatura usada para caracterizar o fenótipo 103 pode incluir os marcadores de vesícula gerais 100 e os biomarcadores de célula de origem 101 Se apenas detectores de doença forem usados 102, a bioassinatura usada para caracterizar o fenótipo 103 pode incluir os marcadores de vesícula gerais 100 e os biomarcadores de doença 102. Alternativamente, detectores são usados para detectar tanto biomarcadores de célula

de origem 101 como biomarcadores de doença específicos 102. Nesse caso, a bioassinatura usada para caracteriza o fenótipo 103 pode incluir os marcadores de vesícula gerais 100, os biomarcadores de célula de origem 101 e os biomarcadores de doença 102. As combinações de biomarcadores são selecionadas para caracterizar o fenótipo de interesse e podem ser selecionadas dentre os biomarcadores e os fenótipos descritos no presente documento, por exemplo, nas Tabelas 3 ou 4.

[00183] No esquema mostrado na Figura 1D ii), uma população de vesículas é capturada com um ou mais agentes de captura contra biomarcadores de célula de origem 110 e/ou biomarcadores de doença 111. As vesículas capturadas são então detectadas com o uso de detectores contra biomarcadores de vesícula gerais 112. Se apenas os agentes de captura de célula de origem forem usados 110, a bioassinatura usada para caracterizar o fenótipo 113 pode incluir os biomarcadores de célula de origem 110 e os marcadores de vesícula gerais 112. Se apenas os agentes de captura biomarcador de doença forem usados 111, a bioassinatura usada para caracterizar o fenótipo 113 pode incluir os biomarcadores de doença 111 e os biomarcadores de vesícula gerais 112. Alternativamente, os agentes de captura para um ou mais biomarcadores de célula de origem 110 e um ou mais biomarcadores doença específicos 111 são usados para capturar vesículas. Nesse caso, a bioassinatura usada para caracterizar o fenótipo 113 pode incluir os biomarcadores de célula de origem 110, os biomarcadores de doença 111 e os marcadores de vesícula gerais 113. As combinações de biomarcadores são selecionadas para caracterizar o fenótipo de interesse e podem ser selecionadas dentre os biomarcadores e os fenótipos descritos no presente documento.

[00184] Os métodos da invenção compreendem a captura e a detecção de microvesículas de interesse com o uso de qualquer combi-

nação de biomarcadores úteis. Por exemplo, uma população de microvesículas pode ser capturada com o uso de um ou mais agentes de ligação para qualquer combinação desejada de marcadores de célula de origem, doença específicos ou de vesícula gerais. As microvesículas capturadas podem ser então detectadas com o uso de um ou mais agentes de ligação para qualquer combinação desejada de marcadores de célula de origem, doença específicos ou de vesícula gerais. A Figura 1E representa um fluxograma de tais configurações. Qualquer um ou mais dentre um biomarcador de célula de origem 140, biomarcadores de doença 141 e biomarcador de vesícula geral 142 é usado para capturar uma população de microvesículas. Portanto, qualquer um ou mais dentre um biomarcador de célula de origem 143, biomarcadores de doença 144 e biomarcador de vesícula geral 145 é usado para detectar a população de microvesículas capturadas. A bioassinatura de microvesículas capturadas e detectadas é então usada para caracterizar um fenótipo. As combinações de biomarcadores são selecionadas para caracterizar o fenótipo de interesse e podem ser selecionadas dentre os biomarcadores e os fenótipos descritos no presente documento.

[00185] Uma molécula de carga útil de microvesícula pode ser avaliada como um membro de um painel de bioassinaturas. Uma molécula de carga útil compreende qualquer uma das entidades biológicas contidas dentro de uma célula, um fragmento de célula ou uma membrana de vesícula. Essas entidades incluem, sem limitação, ácidos nucleicos, por exemplo, mRNA, microRNA ou fragmentos de DNA; proteína, por exemplo, proteínas associadas à membrana e solúveis; carboidratos; lipídeo; metabólitos; e várias moléculas pequenas, por exemplo, hormônios. A carga útil pode ser parte do meio celular que é encapsulado como uma vesícula é formada no ambiente celular. Em algumas modalidades da invenção, a carga útil é analisada adicionalmente à de-

tecção de antígenos de superfície de vesícula. As populações específicas de vesículas podem ser capturadas conforme descrito acima e então a carga útil nas vesículas capturadas pode ser usada para caracterizar um fenótipo. Por exemplo, as vesículas capturadas em um substrato podem ser, ainda, isoladas para avaliar a carga útil nas mesmas. Alternativamente, as vesículas em uma amostra são detectadas e classificadas sem captura. As vesículas assim detectadas podem ser, ainda, isoladas para avaliar a carga útil nas mesmas. Em uma modalidade, as populações de vesículas são classificadas por citometria de fluxo e a carga útil nas vesículas classificadas é analisada. No esquema mostrado na Figura 1F iii), uma população de vesículas é capturada e/ou detectada 120 com o uso de um ou mais de biomarcadores de célula de origem 120, biomarcadores de doença 121 e/ou marcadores de vesícula gerais 122. A carga útil das vesículas isoladas é avaliada 123. Uma bioassinatura detectada dentro da carga útil pode ser usada para caracterizar um fenótipo 124. Em um exemplo não limitante, uma vesícula população pode ser analisada em uma amostra de um paciente com o uso de anticorpos contra um ou mais antígenos de vesícula de interesse. Os anticorpos podem ser anticorpos de captura que são ancorados a um substrato para isolar uma população de vesículas desejada. Alternativamente, os anticorpos podem ser diretamente identificados e as vesículas identificadas isoladas por classificação com citometria de fluxo. A presença e o nível de microRNA ou mRNA extraído da população de vesículas isolada podem ser usados para detectar uma bioassinatura. A bioassinatura é então usada para diagnosticar, prognosticar ou teragnosticar o paciente.

[00186] Em outras modalidades, a carga útil de vesícula ou celular é analisada em uma população (por exemplo, células ou vesículas) sem primeiramente capturar ou detectar subpopulações de vesículas. Por exemplo, uma população de vesículas celulares ou extracelulares

pode ser em geral isolada de uma amostra com o uso de centrifugação, filtração, cromatografia ou outras técnicas conforme descritas no presente documento e conhecidas na técnica. A carga útil de tais componentes de amostra pode ser analisada, portanto, para detectar uma bioassinatura e caracterizar um fenótipo. No esquema mostrado na Figura 1F v), uma população de vesículas é isolada 130 e a carga útil das vesículas isoladas é avaliada 131. Uma bioassinatura detectada dentro da carga útil pode ser usada para caracterizar um fenótipo 132. Em um exemplo não limitante, uma vesícula população é isolada de uma amostra de plasma de um paciente com o uso de exclusão de tamanho e filtração de membrana. A presença e o nível de microRNA ou mRNA extraído da população de vesículas são usados para detectar uma bioassinatura. A bioassinatura é então usada para diagnosticar, prognosticar ou teragnosticar o paciente.

[00187] Os biomarcadores usados para detectar uma população de vesículas podem ser selecionados para detectar uma população de microvesículas de interesse, por exemplo, uma população de vesículas que fornece um diagnóstico ou teragnóstico de uma afecção ou doença selecionada, incluindo, porém, sem limitação, um câncer, uma afecção pré-maligna, uma doença inflamatória, uma doença imune, uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio cardiovascular, uma doença ou distúrbio neurológico, doença infecciosa ou dor. Consulte a Seção "Fenótipos" no presente documento para mais detalhes. Em uma modalidade, os biomarcadores são selecionados a partir do grupo que consiste em EpCam (molécula de adesão de célula epitelial), CD9 (molécula CD9 de tetraspanina), PCSA (antígeno específico de célula de próstata, consulte Rokhlin et ah, 5E10: um anticorpo monoclonal reativo em superfície próstata-específico. Cancer Lett. 1998 131: 129 a 36), CD63 (molécula CD63 de tetraspanina), CD81 (molécula CD81 de tetraspanina), PSMA (FOLH1, folato hidrolase (an-

tígeno de membrana próstata-específica) 1), B7H3 (molécula CD276), PSCA (antígeno de célula-tronco da próstata), ICAM (molécula de adesão intercelular), STEAP (STEAP1, seis antígenos epiteliais de transmembrana da próstata 1), KLK2 (peptidase 2 relacionada calicreína), SSX2 (sarcoma sinovial, X ponto de quebra 2), SSX4 (sarcoma sinovial, X ponto de quebra 4), PBP (proteína de ligação prostática), SPDEF (domínio apontado por SAM contando fator de transcrição ets), EGFR (receptor de fato de crescimento epidérmico) e uma combinação dos mesmos. Um ou mais desses marcadores podem compreender uma bioassinatura para afecção específica, tal como detectar um câncer, incluindo, sem limitação a carcinoma, um câncer de próstata, um câncer de mama, um câncer de pulmão, um câncer colorretal, um câncer de ovário, melanoma, um câncer de cérebro ou outro tipo de câncer conforme revelado no presente documento. Em uma modalidade, um agente de ligação para um ou mais desses marcadores é usado para capturar uma população de microvesículas e um aptâmero da invenção é usado para auxiliar na detecção das vesículas de captura conforme descrito no presente documento. Em outras modalidades, um aptâmero da invenção é usado para capturar uma população de microvesículas e um agente de ligação a um ou mais desses marcadores é usado para auxiliar na detecção das vesículas de captura conforme descrito no presente documento. Os agentes de ligação podem ser qualquer agente de ligação útil conforme revelado no presente documento ou conhecido na técnica, por exemplo, anticorpos ou aptâmeros.

[00188] Os métodos para caracterizar um fenótipo podem empregar uma combinação de técnicas para avaliar um componente ou população de componentes presentes em uma amostra biológica de interesse. Por exemplo, um aptâmero da invenção pode ser usado para avaliar uma única célula ou uma única vesícula extracelular ou uma popu-

lação de células ou uma população de vesículas. Uma amostra pode ser dividida em várias alíquotas, em que cada uma é analisada separadamente. Por exemplo, o teor de proteína de um ou mais alíquotas é determinado e o teor de microRNA de uma ou mais outras alíquotas é determinada. O conteúdo de proteína e o conteúdo de microRNA podem ser combinados para caracterizar um fenótipo. Em outra modalidade, um componente presente em uma amostra biológica de interesse é isolado e a carga útil na mesma é avaliada (por exemplo, capturar uma população de subpopulação de vesículas com o uso de um aptâmero da invenção e avaliar, adicionalmente, o ácido nucleico ou as proteínas presentes nas vesículas isoladas).

[00189] Em uma modalidade, uma população de vesículas com um dado marcador de superfície pode ser isolada com o uso de um agente de ligação a um marcador de superfície de microvesícula. Consulte, por exemplo, as Figuras 1A, 1B, 15A. O agente de ligação pode ser um aptâmero que foi identificado para alvejar o marcador de superfície de microvesícula com o uso dos métodos da invenção. As vesículas isoladas são avaliadas por biomarcadores adicionais, tal como teor de superfície ou carga útil, o que pode ser simultâneo à detecção do alvo aptâmero-específico ou a avaliação de biomarcadores adicionais pode ser anterior ou subsequente à detecção de alvo aptâmero-específico.

[00190] Uma bioassinatura pode ser detectada qualitativa ou quantitativamente por detecção de uma presença, um nível ou uma concentração de um biomarcador circulante, por exemplo, um microRNA, proteína, vesícula ou outro biomarcador, conforme revelado no presente documento. Esses componentes de bioassinatura podem ser detectados com o uso de diversas técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica. Por exemplo, um biomarcador pode ser detectado por análise de microarranjo, reação de cadeia de polimerase (PCR) (incluindo métodos baseados em PCR, tal como reação de cadeia de polimerase

em tempo real (RT-PCR), reação de cadeia de polimerase em tempo real quantitativa (Q-PCR/qPCR) e similares), hibridização com sondas alelo-específicas, detecção de mutação enzimática, reação de cadeia de ligação (LCR), ensaio de ligação de oligonucleotídeo (OLA), análise heteroduplex de citométrica de fluxo, clivagem química de incompatibilidades, espectrometria de massa, sequenciamento de ácido nucleico, polimorfismo por conformação de filamento único (SSCP), eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE), eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE), polimorfismos de fragmento de restrição, análise em série de expressão de gene (SAGE) ou combinações dos mesmos. Um biomarcador, tal como um ácido nucleico, pode ser amplificado antes da detecção. Um biomarcador pode ser também detectado por imunoensaio, imunoblot, imunoprecipitação, ensaio imunoabsorvente ligado por enzima (ELISA; EIA), radioimunoensaio (RIA), citometria de fluxo ou microscopia eletrônica (EM).

[00191] As bioassinaturas podem ser detectadas com o uso de aptâmeros da invenção que funcionam como ou agentes de captura ou agentes de detecção, conforme descrito no presente documento. Um agente de captura pode compreender um anticorpo, aptâmero ou outra entidade que reconhece um biomarcador e pode ser usado para capturar o biomarcador. Os biomarcadores que podem ser capturados incluem biomarcadores circulantes, por exemplo, uma proteína, ácido nucleico, lipídeo ou complexo biológico em solução em um fluido corporal. Similarmente, o agente de captura pode ser usado para capturar uma biomarcador. Um agente de detecção pode compreender um anticorpo ou outra entidade que reconhece um biomarcador e pode ser usado para detectar a vesícula de biomarcador ou que reconhece uma vesícula e é útil para detectar uma vesícula. Em algumas modalidades, o agente de detecção é identificado e a identificação é detectada, detectando, assim, o biomarcador ou a vesícula. O agente de detecção

pode ser um agente de ligação, por exemplo, um anticorpo ou aptâmero. Em outras modalidades, o agente de detecção compreende uma molécula pequena, tal como um agente de identificação de proteína de membrana. Consulte, por exemplo, os agentes de identificação de proteína de membrana revelados em Alroy et al., US. Publicação de Patente nº US 2005/0158708. Em uma modalidade, as vesículas são isoladas ou capturadas conforme descrito, no presente documento, e um ou mais agentes de identificação de proteína de membrana são usados para detectar as vesículas. Em muitos casos, o antígeno ou outra porção de vesícula que é reconhecida pelos agentes de captura e detecção são intercambiáveis.

[00192] Em uma modalidade não limitante, uma vesícula que tem um antígeno específico de célula de origem em sua superfície e um antígeno câncer-específico em sua superfície é capturada com o uso de um agente de ligação que é específico para um antígeno células-específico, por exemplo, por ancoragem do anticorpo ou aptâmero de captura a um substrato e então a vesícula é detectada com o uso de um agente de ligação para um antígeno doença-específico, por exemplo, por identificação do agente de ligação usado para detecção com um corante fluorescente e detecção da radiação fluorescente emitida pelo corante.

[00193] Será percebido por um versado na técnica que nos casos em que a molécula alvo para um agente de ligação (tal como um aptâmero da invenção) é informativa quanto à avaliação de uma afecção ou doença, o mesmo agente de ligação pode ser usado tanto para capturar um componente que compreende a molécula alvo (por exemplo, antígeno de superfície de microvesícula de interesse) como também ser modificado para compreender uma identificação detectável de modo a detectar a molécula alvo, por exemplo, agente$_1$ de ligação-antígeno-agente$_2$* de ligação, em que o * significa uma identificação

detectável; agente$_1$ de ligação e agente$_2$ de ligação podem ser o mesmo agente de ligação ou um agente de ligação diferente (por exemplo, o mesmo aptâmero ou aptâmero diferente). Adicionalmente, o agente$_1$ de ligação e o agente$_2$ de ligação podem ser selecionados dentre categorias inteiramente diferentes de agentes de ligação (por exemplo, anticorpo, aptâmero, anticorpo sintético, molécula de peptídeo-ácido nucleico ou qualquer molécula que é configurada para ligar-se especificamente ou associar-se a sua molécula alvo). Tais moléculas de ligação podem ser selecionadas somente com base na especificidade de ligação para uma molécula alvo.

[00194] As técnicas para detectar biomarcadores ou capturar componentes de amostra com o uso de um aptâmero da invenção incluem o uso de um substrato plano, tal como um arranjo (por exemplo, biochip ou microarranjo), com moléculas imobilizadas ao substrato como agentes de captura que facilitam a detecção de uma bioassinatura particular. O arranjo pode ser fornecido como parte de um kit para avaliar um ou mais biomarcadores. Os exemplos adicionais de agentes de ligação descritos acima e úteis nas composições e métodos da invenção são revelados no Pedido de Patente Internacional de número de série PCT/US2011/031479, intitulado "Circulating Biomarker for Disease" e depositado em 6 de abril 2011, cujo pedido é incorporado a título de referência em sua totalidade no presente documento. Os aptâmeros da invenção podem ser incluídos em um arranjo para detecção e diagnóstico de doenças, incluindo doenças pré-sintomáticas. Em algumas modalidades, um arranjo compreende um arranjo personalizado que compreende biomoléculas selecionadas para identificar especificamente biomarcadores de interesse. Os arranjos personalizados podem ser modificados para detectar biomarcadores que aumentam o desempenho estatístico, por exemplo, biomoléculas adicionais que identificam uma bioassinatura que leva a taxas de erro validadas por

cruzamento aprimoradas em modelos de previsão multivariados (por exemplo, regressão logística, análise discriminante ou modelos de árvore de regressão). Em algumas modalidades, arranjos personalizados são construídos para estudar a biologia de uma doença, afecção ou síndrome e bioassinaturas de perfil em estados fisiológicos definidos. Os marcadores para inclusão no arranjo personalizado são escolhidos com base nos critérios estatísticos, por exemplo, ter um nível desejado de significância estatística na diferenciação entre fenótipos ou estados fisiológicos. Em algumas modalidades, a significância padrão de valor p = 0,05 é escolhida para excluir ou incluir biomoléculas no microarranjo. Os valores p podem ser corrigidos para múltiplas comparações. Como um exemplo ilustrativo, os ácidos nucleicos extraídos das amostras de um indivíduo com ou sem uma doença podem ser hibridizados a um microarranjo de alta densidade que se liga a milhares de sequências de genes. Os ácidos nucleicos cujos níveis são significativamente diferentes entre as amostras com ou sem a doença podem ser selecionados como biomarcadores para distinguir amostras como tendo a doença ou não. O arranjo personalizado pode ser construído para detectar os biomarcadores selecionados. Em algumas modalidades, os arranjos personalizados compreendem microarranjos de baixa densidade, que se referem a arranjos com número mais baixo de agentes de ligação endereçáveis, por exemplo, dezenas ou centenas em vez de milhares. Os arranjos de baixa densidade podem ser formados em um substrato. Em algumas modalidades, arranjos de baixa densidade personalizáveis usam amplificação por PC em poços de placa, por exemplo, Ensaios de Expressão de Gene TaqMan® (Biossistemas Aplicados por Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA).

[00195] Um aptâmero da invenção ou outro agente de ligação útil pode ser ligado direta ou indiretamente a uma superfície ou substrato sólido. Consulte, por exemplo, as Figuras 1A e 1B, 14, 15A. Uma su-

perfície ou substrato sólido pode ser qualquer sólido fisicamente separável ao qual um agente de ligação pode ser direta ou indiretamente ligado, incluindo, porém, sem limitação, superfícies fornecidas por microarranjos e poços, partículas, tais como esferas, colunas, fibras ópticas, lenços, vidro e vidro modificado ou funcionalizado, quartzo, mica, membranas diazotizadas (papel ou náilon), poliformaldeído, celulose, acetato de celulose, papel, cerâmicas, metais, metaloides, materiais semicondutores, pontos quânticos, esferas revestidas ou partículas, outros materiais cromatográficos, partículas magnéticas; plásticos (incluindo acrílicos, poliestireno, copolímeros de estireno ou outros materiais, polipropieno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, material Teflon, etc.), polissacarídeos, náilon ou nitrocelulose, resinas, sílica ou materiais à base de sílica, incluindo silício e silício modificado, carbono, metais, vidros inorgânicos, plásticos, cerâmicas, polímeros condutores (incluindo polímeros, tal como polipirol e poliindol); superfície micro ou nanoestruturadas, tal como arranjos de revestimento de ácido nucleico, superfícies decoradas com nanotubo, nanofio ou nanoparticulado; ou superfícies porosas ou géis, tais como metacrilatos, acrilamidas, polímeros de açúcar, celulose, silicatos ou outros polímeros fibrosos ou com filamento. Adicionalmente, conforme conhecido na técnica, o substrato pode ser revestido com o uso de revestimentos passivos ou derivados quimicamente com qualquer número de materiais, incluindo, polímeros, tais como dextranos, acrilamidas, gelatinas ou agarose. Tais revestimentos podem facilitar o uso do arranjo com uma amostra biológica.

[00196] Conforme fornecido nos exemplos, abaixo, um aptâmero ou outro agente de ligação útil pode ser conjugado a uma entidade ou identificação detectável. As identificações apropriadas incluem, sem limitação, uma identificação magnética, uma porção fluorescente, uma enzima, uma sonda quimioluminescente, uma partícula metálica, uma

partícula coloidal não metálica, uma partícula de corante polimérico, uma molécula de pigmento, uma partícula de pigmento, uma espécie eletroquimicamente ativa, nanocristal semicondutor ou outras nanopartículas, incluindo, pontos quânticos ou partículas de ouro, fluoróforos, pontos quânticos ou identificações radioativas. As identificações proteicas incluem proteína fluorescente verde (GFP) e variantes das mesmas (por exemplo, proteína florescente ciano e proteína florescente amarela); proteínas luminescentes, tal como luciferase, conforme descrito abaixo. As identificações radioativas incluem, sem limitação, radioisótopos (radionuclídeos), tais como ^{3}H, ^{11}C, ^{14}C, ^{18}F, ^{32}P, ^{35}S, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{133}Xe, ^{177}Lu, ^{211}At ou ^{213}Bi. As identificações fluorescentes incluem, sem limitação, quelato de terra rara (por exemplo, quelato de európio), rodamina; tipos de fluoresceína, incluindo, sem limitação, FITC, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína; um tipo de rodamina, incluindo, sem limitação, TAMRA; dansila; Lissamina; cianinas; ficoeritrinas; Texas Red; Cy3, Cy5, dapoxila, NBD, Cascade Yellow, dansila, PyMPO, pireno, ácido 7-dietilaminocoumarin-3-carboxílico e outros derivados de coumarina, Marina Blue™, Pacific Blue™, Cascade Blue™, 2-antracenossulfonila, PyMPO, ácido 3,4,9,10-perileno-tetracarboxílico, 2,7-difluorofluoresceína (Oregon Green™ 488-X), 5-carboxifluoresceína, Texas Red™-X, Alexa Fluor 430, 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA), 6-carboxitetrametilrodamina (6-TAMRA), BODIPY FL, bimano e Alexa Fluor 350, 405, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700, e 750, e derivados dos mesmos, entre muitos outros. Consulte, por exemplo, "The Handbook— A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies", Décima Edição, disponível na internet em sondas (ponto) invitrogen (ponto) com/handbook. A identificação fluorescente pode ser um ou mais dentre FAM, dRHO, 5-FAM, 6FAM, dR6G, JOE, HEX, VIC, TET, dTAMRA,

TAMRA, NED, dROX, PET, BHQ, Gold540 e LIZ.

[00197] Com o uso de técnicas convencionais, um aptâmero pode ser direta ou indiretamente identificado, por exemplo, a identificação é ligada ao aptâmero através de biotina-estreptavidina (por exemplo, sintetizar um aptâmero biotinilado, que têm capacidade então para ligar uma molécula de estreptavidina que é a mesma conjugada a uma identificação detectável; o exemplo não limitante é estreptavidina, ficoeritrina conjugada (SAPE)). Os métodos para acoplamento químico com o uso de procedimentos com múltiplas etapas incluem biotinilação, acoplamento de trinitrofenol (TNP) ou digoxigenina com o uso, por exemplo, de ésteres de succinimida desses compostos. A biotinilação pode ser realizada, por exemplo, pelo uso de D-biotinil-N-hidróxi succinimida. Os grupos succinimida reagem eficazmente com os grupos amino em valores de pH acima de 7 e preferencialmente entre cerca de pH 8,0 e cerca de pH 8,5. Alternativamente, um aptâmero não é identificado, mas é depois colocado em contato com um segundo anticorpo que é identificado após o primeiro anticorpo ser ligado a um antígeno de interesse.

[00198] Várias identificações de substrato de enzima podem ser também usadas em conjunto com uma composição ou método da invenção. Tais identificações de substrato de enzima estão disponíveis comercialmente (por exemplo, Patente nº U.S. 4.275.149). A enzima catalisa em geral uma alteração química de um substrato cromogênico que pode ser medida com o uso de várias técnicas. Por exemplo, a enzima pode catalisar uma alteração de cor em um substrato, que pode ser medida por espectrofotômetro. Alternativamente, a enzima pode alterar a fluorescência ou a quimioluminescência do substrato. Os exemplos de identificações enzimáticas incluem luciferases (por exemplo, luciferase de vagalume e luciferase bacteriana; Patente nº 4.737.456), luciferina, 2,3-diidroftalazinedionas, malato desidrogenase,

urease, peroxidase, tal como peroxidase de raiz-forte (HRP), fosfatase alcalina (AP), β-galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacarídeo oxidases (por exemplo, glicose oxidase, galactose oxidase e glicose-6-dosfato desidrogenase), oxidases heterocíclicas (tais como, uricase e xantina oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase e similares. Os exemplos de combinações de substrato de enzima incluem, porém, sem limitação, peroxidase de raíz-forte (HRP) com hidrogênio peroxidase como um substrato, em que a hidrogênio peroxidase oxida um precursor de corante (por exemplo, ortofenileno diamina (OPD) ou cloridrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)); fosfatase alcalina (AP) com fosfato de para-nitrofenila como o substrato cromogênico; e β-D-galactosidase (β-D-Gal) com um substrato cromogênico (por exemplo, p-nitrofenil- β-D-galactosidase) ou substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil-β-D-galactosidase.

[00199] O(s) aptâmero(s) pode(m) ser ligado(s) a um substrato, tal como um substrato plano. Um arranjo plano em geral contém localizações endereçáveis (por exemplo, blocos, endereços ou microlocalizações) de biomoléculas em um formato plano. O tamanho do arranjo dependerá da composição e do uso final do arranjo. Os arranjos podem ser feitos contendo dentre 2 moléculas diferentes a muitos milhares. Em geral o arranjo compreende dois a tantas quanto 100.000 ou mais moléculas, dependendo do uso final do arranjo e do método de fabricação. Um microarranjo para uso com a invenção compreende pelo menos uma biomolécula que identifica ou captura um biomarcador presente em uma bioassinatura de interesse, por exemplo, um microRNA ou outra biomolécula ou vesícula que forma a bioassinatura. Em alguns arranjos, múltiplos substratos são usados, de composições diferentes ou idênticas. Dessa forma, os arranjos planos podem compreender uma pluralidade de substratos menores.

[00200] A presente invenção pode fazer uso de muitos tipos de ar-

ranjos para detectar um biomarcador, por exemplo, um biomarcador associado a uma bioassinatura de interesse. Arranjos ou microarranjos úteis incluem, sem limitação, microarranjos de DNA, tais como microarranjos cDNA, microarranjos de oligonucleotídeo e microarranjos de SNP, arranjos de microRNA, microarranjos de proteína, microarranjos de anticorpo, microarranjos de tecido, microarranjos celulares (também chamados de microarranjos de transfecção), microarranjos de composto químico e arranjos de carboidrato (glicoarrais). Esses arranjos são descritos em mais detalhes abaixo. Em algumas modalidades, os microareranjos compreendem biochips que fornecem arranjos imobilizados de alta densidade de moléculas de reconhecimento (por exemplo, aptâmeros ou anticorpos), em que a ligação de biomarcador é monitorada indiretamente (por exemplo, por meio de fluorescência).

[00201] Um arranjo ou microarranjo que pode ser usado para detectar um ou mais biomarcadores de uma bioassinatura e que compreende um ou mais aptâmeros pode ser produzido de acordo com os métodos descritos nas Patentes nº U.S. 6.329.209. 6.365.418; 6.406.921 ; 6.475.808; e 6.475.809, e no Pedido de Patente de número de série U.S. 10/884.269, cada um dos quais é incorporado ao presente a título de referência em sua totalidade. Os arranjos personalizados para detectar seleções específicas de conjuntos de biomarcadores descritos no presente documento podem ser produzidos com o uso dos métodos descritos nessas patentes. Os microarranjos comercialmente disponíveis podem ser também usados para executar os métodos da invenção, incluindo, sem limitação, aqueles da Affymetrix (Santa Clara, CA), Illumina (San Diego, CA), Agilent (Santa Clara, CA), Exiqon (Dinamarca) ou Invitrogen (Carlsbad, CA). Os arranjos personalizados e/ou comerciais incluem arranjos para proteínas de detecção, ácidos nucleicos e outras moléculas e entidades biológicas (por exemplo, células, vesículas, vírus) conforme descrito no presente documento.

[00202] Em algumas modalidades, múltiplas moléculas de captura são dispostas em um arranjo, por exemplo, proteínas, peptídeos ou moléculas de ácido nucleico adicionais. Em certas modalidades, as proteínas são imobilizadas com o uso de métodos e materiais que minimizam a desnaturação das proteínas, que minimizam alterações na atividade das proteínas ou que minimizam interações entre a proteína e a superfície em que as mesmas são imobilizadas. As moléculas de captura podem compreender um ou mais aptâmeros da invenção. Em uma modalidade, um arranjo é construído pela hibridização de um grupo de aptâmeros. O arranjo pode ser então usado para identificar membros do grupo que ligam uma amostra, facilitando, assim, a caracterização de um fenótipo. Consulte as Figuras 15B e 15C e revelação relacionada para exemplos adicionais.

[00203] As superfícies de arranjo úteis podem ser de qualquer formato, forma ou tamanho desejado. Os exemplos não limitantes de superfícies incluem chips, superfícies contínuas, superfícies curvadas, superfícies flexíveis, filmes, placas, folhas ou tubos. As superfícies podem ter áreas na faixa de aproximadamente um mícron quadrado a aproximadamente 500 cm^2. A área, o comprimento e a largura das superfícies podem ser variados de acordo com os requisitos do ensaio a ser realizado. As considerações podem incluir, por exemplo, facilidade de manuseio, limitações do(s) material(is) do(s) qual(is) a superfície é formada, requisitos de sistemas de detecção, requisitos de sistemas de deposição (por exemplo, arranjadores) ou similares.

[00204] Em certas modalidades, é desejável empregar um meio físico para separar grupos ou arranjos de ilhas de ligação ou biomoléculas imobilizadas: Tal separação física facilita a exposição de grupos ou arranjos diferentes a diferentes soluções de interesse. Portanto, em certas modalidades, os arranjos estão situados dentro de placas de micropoço que têm qualquer número de poços. Em tais modalidades,

os fundos dos poços podem servir como superfície para a formação de arranjos ou arranjos podem ser formados em outras superfícies e então plaqueados em poços. Em certas modalidades, tal como, os casos em que uma superfície sem poços é usada, ilhas de ligação podem ser formadas ou moléculas podem ser imobilizadas em uma superfície e uma gaxeta que tem furos dispostos espaçadamente de modo que correspondam às ilhas ou as biomoléculas podem ser plaqueadas na superfície. Tal gaxeta é preferencialmente hermética a líquido. Uma gaxeta pode ser colocada em uma superfície em qualquer tempo durante o processo de produção do arranjo e pode ser removida se a separação de grupos ou arranjos não for mais necessária.

[00205] Em algumas modalidades, as moléculas imobilizadas podem ligar-se a um ou mais biomarcadores ou vesículas presentes em uma amostra biológica que entra em contato com as moléculas imobilizadas. Em algumas modalidades, as moléculas imobilizadas modificam ou são modificadas por moléculas presentes na um ou mais vesículas que entram em contato com as moléculas imobilizadas. Colocar a amostra em contato tipicamente compreende sobrepor a amostra sobre o arranjo.

[00206] As modificações ou ligação de moléculas em solução ou imobilizadas em um arranjo podem ser detectadas com o uso de técnicas de detecção conhecidas no campo. Os exemplos de tais técnicas incluem técnicas imunológicas, tais como ensaios de ligação competitiva e ensaios de sanduiche; detecção de fluorescência com o uso de instrumentos, tais como varredores confocais, microscópios confocais ou técnicas e sistemas baseados em CCD, tais como fluorescência, polarização de fluorescência (FP), transferência de energia ressonante de fluorescência (FRET), fluorescência de reflexão interna total (TIRF), espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS); técnicas colorimétricas/espectrométricas; ressonância de plásmon de superfície, pe-

los quais as alterações em massa de materiais adsorvidos nas superfícies são medidas; técnicas que usam radioisótopos, incluindo ensaios de proximidade de cintilação e ligação de radioisótopo convencionais (SPA);espectrometria de massa, tal como espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI) e espectrometria de massa por tempo de voo (TOF) de MALDI; elipsometria, que é um método óptico para medir a espessura de películas de proteína; microbalança de cristal de quartzo (QCM), um método muito sensível para medir a massa de materiais que adsorvem às superfícies; microscópios de sonda de varredura, tal como microscópio de força atômica (AFM), microscópio de força de varredura (SFM) ou microscópio eletrônico de varredura (SEM); e técnicas tal como detecção eletroquímica, de impedância, acústica, de micro-ondas e de IR/Raman. Consulte, por exemplo, Mere I, et ah, "Miniaturized FRET assays and microfluidics: key components or ultra-high-throughput screening, " Drug Discovery Today 4(8):363 a 369 (1999) e as referências citadas no mesmo; Lakowicz J R, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2ª Edição, Plenum Press (1999), ou Jain KK: Integrative Omics, Pharmacoproteomics, and Human Body Fluids. In: Thongboonkerd V, ed., ed. Proteomics of Human Body Fluids: Principles, Methods and Applications. Volume 1: Totowa, N.J.: Humana Press, 2007, cada um dos quais é incorporado ao presente a título de referência em sua totalidade.

[00207] A tecnologia de microarranjo pode ser combinada com análise por espectrometria de massa (MS) e outras ferramentas. A interface de eletroaspersão para um espectrômetro de massa pode ser integrada com um capilar em um dispositivo de microfluidos. Por exemplo, um sistema comercialmente disponível contém repórteres eTag que são identificações fluorescentes com mobilidades eletroforéticas bem definidas e exclusivas; cada identificação é acoplada às sondas bioló-

gicas ou químicas por meio de ligações de clivagem. O endereço de mobilidade distinta de cada repórter eTag permite que misturas dessas etiquetas sejam rapidamente desintrincadas e quantificadas por eletroforese de capilar. Esse sistema permite análises concomitantes de expressão de gene, expressão de proteína função de proteína da mesma amostra Jain KK: Integrative Omics, Pharmacoproteomics, and Human Body Fluids. In: Thongboonkerd V, ed., ed. Proteomics of Human Body Fluids: Principles, Methods and Applications. Volume 1: Totowa, N.J.: Humana Press, 2007, cada um dos quais é incorporado ao presente a título de referência em sua totalidade.

[00208] Um biochip pode incluir componentes para um ensaio de microfluido ou nanofluido. Um dispositivo de microfluido pode ser usado para isolar ou analisar biomarcadores, tal como determinar uma bioassinatura. Os sistemas de microfluido permitem a miniaturização e compartimentação de um ou mais processos para isolar, capturar ou detectar uma vesícula, detectar um microRNA, detectar um biomarcador circulante, detectar uma bioassinatura e outros processos. Os dispositivos de microfluido podem usar um ou mais reagentes de detecção em pelo menos um aspecto do sistema e tal reagente de detecção pode ser usado para detectar um ou mais biomarcadores. Em uma modalidade, o dispositivo detecta um biomarcador em uma vesícula isolada ou ligada. Várias sondas, anticorpos, proteínas ou outros agentes de ligação podem ser usados para detectar um biomarcador dentro do sistema de microfluido. Os agentes de detecção podem ser imobilizados em diferentes compartimentos do dispositivo de microfluido ou ser inseridos em uma reação de hibridização ou detecção através de vários canais do dispositivo.

[00209] Uma vesícula em um dispositivo de microfluido pode ser lisada e seus conteúdos detectados com o dispositivo de microfluido, tal como proteínas ou ácidos nucleicos, por exemplo, DNA ou RNA, tal

como miRNA ou mRNA. O ácido nucleico pode ser amplificado antes da detecção ou diretamente detectado dentro do dispositivo de microfluido. Portanto, o sistema de microfluido pode ser também usado para multiplexar a detecção de vários biomarcadores. Em uma modalidade, as vesículas são capturadas dentro do dispositivo de microfluido, as vesículas capturadas são lisadas e uma bioassinatura de microRNA da carga útil da vesícula é determinada. A bioassinatura pode compreender, ainda, o agente de captura usado para capturar a vesícula.

[00210] As técnicas de nanofabricação inovadoras estão abrindo possibilidades para aplicações de biodetecção se apoiam a fabricação de arranjos de precisão e alta densidade, por exemplo, chips baseados em nucleotídeo e arranjos de proteína de outro modo conhecidos como nanoarranjos heterogêneos. Os nanofluidos permite uma redução adicional na quantidade de analito de fluido em um microchip para nível de nanolitro e os chips usados aqui são referidos como nanochips. Consulte, por exemplo, Unger M et al, Biotechniques 1999; 27(5): 1.008 a 14, Kartalov EP et al, Biotechniques 2006; 40(l):85 a 90, cada um dos quais é incorporado ao presente a título de referência em sua totalidade. Os nanochips comercialmente disponíveis fornecem ensaios simples de uma etapa, tais como ensaios de colesterol total, proteína total, glicose que podem ser executados por combinação de amostra e reagentes e mistura e monitoramento da reação. As abordagens analíticas livres de gel com base em cromatografia líquida (LC) e separações por nanoLC (Cutillas et al. Proteomics, 2005;5:101 a 112 e Cutillas et al, Mol Cell Proteomics 2005;4:1.038 a 1.051, cada um dos quais é incorporado ao presente a título de referência em sua totalidade) podem ser usadas em combinação com os nanochips.

[00211] Um arranjo adequado para identificar uma doença, afecção, síndrome ou estado psicológico pode ser incluído em um kit. Um kit pode incluir um aptâmero da invenção, incluindo, como exemplos não

limitantes, um ou mais reagentes úteis para preparar moléculas para imobilização nas ilhas ou áreas de ligação de um arranjo, reagentes úteis para detectar a ligação de uma vesícula a moléculas imobilizadas e instruções para uso.

[00212] É fornecido ainda no presente documento um dispositivo de detecção rápida que facilita a detecção de uma bioassinatura particular em uma amostra biológica. O dispositivo pode integrar a preparação de amostra biológica com reação de cadeia de polimerase (PCR) em um chip. O dispositivo pode facilitar a detecção de uma bioassinatura particular de uma vesícula em uma amostra biológica e um exemplo é fornecido conforme descrito em Pipper et al, Angewandte Chemie, 47(21), página 3.900 a 3.904 (2008), que é incorporado ao presente a título de referência em sua totalidade. Uma bioassinatura pode ser incorporada com o uso de sensores de sistema micro/nanoeletroquímico (MEMS/NEMS) e fluido oral para aplicações diagnósticas, conforme descrito em Li et ai, Adv Dent Res 18(1): 3 a 5 (2005), que é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00213] Adicionalmente a atuar como agentes de ligação para um alvo de interesse em um ensaio, certos aptâmeros da invenção, por exemplo, aptâmeros de ligação e/ou aptâmeros de bloqueio de grupo funcional, podem ser usados para intensificar o desempenho de várias técnicas de detecção de biomarcador reveladas no presente documento ou conhecidas na técnica. Conforme descrito mais abaixo, tais aptâmeros podem ser usados em um ensaio que faz uso de um substrato, em que os aptâmeros mitigam a ligação não específica ao substrato.

ENSAIOS DE PARTÍCULA

[00214] Como uma alternativa para arranjos planos, ensaios que usam partículas ou microesferas, tal como ensaios baseados em esfera, têm também capacidade para uso com um aptâmero da invenção.

Os agentes de ligação, tais como aptâmeros e anticorpos, são facilmente conjugados com esferas comercialmente disponíveis. Consulte, por exemplo, Srinivas et al. Anal. Chem. 21 de outubro de 2011, Aptamer functionalized Microgel Particles for Protein Detection; Consulte também, o artigo de análise sobre aptâmeros como agentes terapêuticos e diagnósticos, Brody e Gold, Rev. Mol. Biotech. 2000, 74:5 a 13.

[00215] Podem ser usados ensaios multiparamétricos ou outros ensaios detecção de rendimento que usam revestimentos de esfera com ligantes cognatos e moléculas repórter com atividades específicas consistentes com automação de alta sensibilidade. Em um sistema de ensaio baseado em esfera, um agente de ligação para um biomarcador ou vesícula, tal como um agente de captura (por exemplo, anticorpo de captura), pode ser imobilizado em uma microesfera endereçável. Cada agente de ligação para cada ensaio de ligação individual pode ser acoplado a um tipo distinto de microesfera (isto é, microesfera) e a reação de ensaio ocorre na superfície da microesfera, tal como retratado na Figura 1B. Um agente de ligação para uma vesícula pode ser um anticorpo de captura acoplado a uma esfera. Microesferas tingidas com intensidades discretas de fluorescência são carregadas separadamente com seu agente de ligação ou sondas de captura apropriados. Os diferentes conjuntos de esferas diferentes que portam diferentes agentes de ligação podem ser agrupados conforme necessário para gerar arranjos de esferas personalizados. Os arranjos de esferas são então incubados com a amostra em um único vaso de reação para realizar o ensaio. Em algumas modalidades da invenção, as microvesículas são diretamente conjugadas às esferas. Consulte, por exemplo, as Figuras 7A a 7D. As vesículas conjugadas a esferas podem ser usadas para enriquecer aptâmeros que se ligam às microvesículas. Consulte os Exemplos 28 a 33.

[00216] Os ensaios baseados em esfera podem ser também usa-

dos com um ou mais aptâmeros da invenção. Um substrato de esfera pode fornece ruma plataforma para ligar um ou mais agentes de ligação, incluindo aptâmero(s). Para multiplexação, múltiplos conjuntos de esferas diferentes (por exemplo, Illumina, Luminex) podem ter diferentes agentes de ligação (específicos para diferentes moléculas alvo). Por exemplo, uma esfera pode ser conjugada a um agente de ligação, por exemplo, um aptâmero da invenção, usado para detectar a presença (quantitativa ou qualitativamente) de um antígeno de interesse ou pode ser também usado para isolar um componente presente em uma amostra biológica selecionada (por exemplo, célula, fragmento de célula ou vesícula que compreende a molécula alvo a qual o aptâmero é configurado para ligação ou associação). Qualquer molécula de origem orgânica pode ser conjugada com sucesso a uma esfera de poliestireno através do uso de kits comercialmente disponíveis.

[00217] Um ou mais aptâmeros da invenção podem ser usados com qualquer substrato baseado em esfera, incluindo, porém, sem limitação, método de captura magnética, classificação de célula ativada por fluorescência (FACS) ou citometria a laser. Os métodos de captura magnética podem incluir, porém, sem limitação, o uso de microesferas de classificador de células ativado magneticamente (MACS) ou colunas magnéticas. Os exemplos de métodos baseados em esfera e partícula que podem ser modificados para usar um aptâmero da invenção incluem métodos e sistemas de esfera descritos nas Patentes nº U. S. 4.551.435, 4.795.698, 4.925.788, 5.108.933, 5.186.827, 5.200.084 ou 5.158.871; 7.399.632; 8.124.015; 8.008.019; 7.955.802; 7.445.844; 7.274.316; 6.773.812; 6.623.526; 6.599.331; 6.057.107; 5.736.330; Pedidos de Patente Internacionais nº PCT/US2012/42519; PCT/US 1993/04145.

CITOMETRIA DE FLUXO

[00218] O isolamento ou a detecção de biomarcadores circulantes,

por exemplo, antígenos de proteína, de uma amostra biológica, ou das células que compreendem biomarcador, fragmentos de célula ou vesículas pode também ser atingido com o uso de um aptâmero da invenção em um processo de citometria. Como um exemplo não limitante, os aptâmeros da invenção podem ser usados em um ensaio que compreende usar uma partícula, tal como esfera ou microesfera, A invenção fornece aptâmeros como agentes de ligação, que podem ser conjugados à partícula. A citometria de fluxo pode ser usada para classificar partículas microscópicas suspensas em uma corrente de fluido. Conforme as partículas passam através as mesmas podem ser seletivamente carregadas e em sua saída podem ser desviadas em trajetos separados de fluxo. É, portanto, possível separar populações de uma mistura original, tal como uma amostra biológica, com um alto grau de precisão e velocidade. A citometria de fluxo permite análise multiparamétrica simultânea das características físicas e/ou químicas de células únicas que fluem através de um aparelho de detecção óptica/eletrônica. Um feixe de luz, usualmente luz laser, de uma frequência única (cor) é direcionado a uma corrente de fluido hidrodinamicamente focada. Diversos detectores são visados no ponto em que a corrente passa através do feixe de luz; uma linha com o feixe de luz (Difusor direto u FSC) e diversas perpendiculares a mesma (Difusor lateral ou SSC) e um ou mais detectores fluorescentes.

[00219] Cada partícula suspensa que passa através do feixe difunde a luz de alguma forma e produtos químicos fluorescentes na partícula podem ser excitados em luz de emissão em uma frequência mais faixa que a fonte de luz. Essa combinação de luz difundida e fluorescente é capturada pelos detectores e por análise de oscilações em brilho em cada detector (um para cada pico de emissão fluorescente), é possível deduzir vários fatos sobre a estrutura química e física de cada partícula individual. FSC correlaciona-se ao tamanho da célula e SSC

depende da complexidade interna da partícula, tal como formato do núcleo, a quantidade e o tipo de grânulos citoplásmicos ou a rugosidade da membrana. Alguns citômetros de fluxo eliminaram a necessidade de fluorescência e usam apenas difusor de luz para medição.

[00220] Os citômetros de fluxo podem analisar diversos milhares de partículas a cada segundo em "tempo real" e podem separar ou isolar ativamente partículas que têm propriedades específicas. Os mesmos oferecem quantificação automatizada de alto rendimento e separação dos parâmetros definidos para um alto número de células púnicas durante cada sessão de análise. Os citômetros de fluxo podem ter múltiplos lasers e detectores de fluorescência, permitindo que múltiplas identificações sejam usadas para especificar mais precisamente uma população alvo por seu fenótipo. Portanto, um citômetro de fluxo, tal como um citômetro de fluxo multicolor, pode ser usado para detectar uma ou mais vesículas com múltiplas identificações e cores fluorescentes. Em algumas modalidades, o citômetro de fluxo pode também classificar ou isolar diferentes populações de vesículas, tal como por tamanho ou marcadores diferentes.

[00221] O citômetro de fluxo pode ter um ou mais lasers, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais lasers. Em algumas modalidades, o citômetro de fluxo pode detectar mais de uma cor ou identificação fluorescente, tal como pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 diferentes cores ou identificações fluorescentes. Por exemplo, o citômetro de fluxo pode ter pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 detectores de fluorescência.

[00222] Os exemplos de citômetros de fluxo comercialmente disponíveis que podem ser usados para detectar ou analisar uma ou mais vesículas, para classificar ou separar diferentes populações de vesículas, incluem, porém, sem limitação, MoFlo™ XDP Cell Sorter (Beck-

man Coulter, Brea, CA), MoFlo™ Legacy Cell Sorter (Beckman Coulter, Brea, CA), BD FACSAria™ Cell Sorter (BD Biosciences, San Jose, CA), BD™ LS II (BD Biosciences, San Jose, CA) e BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA). O uso de citômetros multicolor ou multifluor pode ser usado em análise multiplex de vesículas, conforme descrito adicionalmente abaixo. Em algumas modalidades, o citômetro de fluxo pode classificar e, assim, coletar ou classificar mais de uma população de vesículas com base uma ou mais características. Por exemplo, duas populações de vesículas diferem em tamanho, de modo que as vesículas dentro de cada população tenham uma faixa de tamanho similar e possam ser detectadas ou classificadas de modo diferente. Em outra modalidade, duas populações diferentes de vesículas são identificadas de modo diferente.

[00223] Os dados que resultam de citômetros de fluxo podem ser representados em gráfico em 1 dimensão para produzir histogramas ou vistos em duas dimensões como gráficos de pontos ou em 3 dimensões com software mais novo. As regiões nesses gráficos podem ser separadas sequencialmente por uma série de extrações de subconjunto que são denominadas portas. Existem protocolos de comutação específicos para propósitos diagnósticos e clínicos especialmente em relação à hematologia. Os gráficos são normalmente feitos em escalas logarítmicas. Devido ao fato de que os espectros diferentes de emissão do corante fluorescente sobrepõem-se, os sinais nos detectores têm que ser compensados eletronicamente assim como computacionalmente. Fluoróforos para identificar biomarcadores podem incluir aqueles descritos em Ormerod, Flow Cytometry 2ª edição, Springer-Verlag, New York (1999) e um Nida et ai, Gynecologic Oncology 2005 ;4 889 a 894 que é incorporado ao presente a título de referência. Em um ensaio multiplexado, incluindo, porém, sem limitação, um ensaio de citometria de fluxo, uma ou mais moléculas alvo diferentes podem

ser avaliadas. Em algumas modalidades, pelo menos uma das moléculas alvo é um biomarcador, por exemplo, um antígeno de superfície de microvesícula, avaliada com o uso de um aptâmero da invenção.

MICROFLUIDOS

[00224] Um ou mais aptâmeros da invenção podem ser conjugados a ou de outro modo dispostos em qualquer substrato plano ou em esfera útil. Em um aspecto da invenção, um ou mais aptâmeros da invenção são dispostos em um dispositivo de microfluido, facilitando, assim, a avaliação, a caracterização ou o isolamento de um componente de uma amostra biológica que compreende um antígeno de polipeptídeo de interesse ou um fragmento funcional do mesmo. Por exemplo, o agente circulante ou uma célula, fragmento de célula ou vesículas derivadas de célula que compreendem o antígeno podem ser avaliados com o uso de um ou mais aptâmeros da invenção (alternativamente em conjunto com agentes de ligação adicionais). Os dispositivos de microfluido, que podem ser referidos como sistemas "lab-on-a-chip", sistemas microeletromecânicos (bioMEMs) ou sistemas integrados de múltiplos componentes, podem ser usados para isolar e analisar uma vesícula. Tais sistemas miniaturizam e compartimentalizam processos que permite a ligação de vesículas, detecção de bioassinaturas e outros processos.

[00225] Um dispositivo de microfluido pode ser também usado para isolamento de uma vesícula através de diferencial de tamanho ou seleção de afinidade. Por exemplo, um dispositivo de microfluido pode usar um ou mais canais para isolar uma vesícula de uma amostra biológica com base no tamanho ou com o uso de um ou mais agentes de ligação para isolar uma vesícula de uma amostra biológica. Uma amostra biológica pode ser introduzida em um ou mais canais de microfluidos, que permite seletivamente a passagem de uma vesícula. A seleção pode ser baseada em uma propriedade da vesícula, tal como

o tamanho, o formato, a deformabilidade ou a bioassinatura da vesícula.

[00226] Em uma modalidade, uma população heterogênea de vesículas pode ser introduzida em um dispositivo de microfluido e uma ou mais populações homogêneas diferentes de vesículas podem ser obtidas. Por exemplo, diferentes canais podem ter diferentes seleções de tamanho ou agentes de ligação para selecionar diferentes populações de vesícula. Portanto, um dispositivo de microfluido pode isolar uma pluralidade de vesículas em que pelo menos um subconjunto da pluralidade de vesículas compreende uma bioassinatura diferente do outro subconjunto da pluralidade de vesículas. Por exemplo, o dispositivo de microfluido pode isolar pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 subconjuntos diferentes de vesículas, em que cada subconjunto de vesículas compreende uma bioassinatura diferente.

[00227] Em algumas modalidades, o dispositivo de microfluido pode compreender um ou mais canais que permitem enriquecimento ou seleção adicional de uma vesícula. Uma população de vesículas que foi enriquecida após a passagem através de um primeiro canal pode ser introduzida em um secundo canal, que permite que a passagem da vesícula ou população de vesículas desejada seja adicionalmente enriquecida, tal como através de um ou mais agentes de ligação presentes no segundo canal.

[00228] Ensaios baseados em arranjo e ensaios baseados em esfera podem ser usados com dispositivo de microfluido. Por exemplo, o agente de ligação pode ser acoplado a esferas e a reação de ligação entre as esferas e a vesícula pode ser realizada em um dispositivo de microfluido. A multiplexação pode ser também realizada com o uso de um dispositivo de microfluido. Diferentes compartimentos podem compreender diferentes agentes de ligação para diferentes populações de

vesículas, em que cada população é de uma população de vesícula específica de célula de origem. Em uma modalidade, cada população tem uma bioassinatura diferente. A reação de hibridização entre a microesfera e a vesícula pode ser realizada em um dispositivo de microfluido e a mistura de reação pode ser entregue a um dispositivo de detecção. O dispositivo de detecção, tal como um sistema de detecção com dois ou múltiplos lasers, podem ser parte do sistema de microfluido e pode usar um laser para identificar cada esfera ou microesfera por sua codificação de cor e outro laser pode detectar o sinal de hibridização associado a cada esfera.

[00229] Qualquer dispositivo de microfluido apropriado pode ser usado nos métodos da invenção. Os exemplos de dispositivos de microfluido que podem ser usados, ou adaptados para uso com vesículas, incluem, porém, sem limitação, aqueles descritos nas Patentes nº U.S. 7.591.936. 7.581.429, 7.579.136, 7.575.722, 7.568.399, 7.552.741, 7.544.506, 7.541.578, 7.518.726, 7.488.596, 7.485.214, 7.467.928, 7.452.713, 7.452.509, 7.449.096, 7.431.887. 7.422.725, 7.422.669, 7.419.822, 7.419.639, 7.413.709, 7.411.184, 7.402.229, 7.390.463, 7.381.471, 7.357.864, 7.351.592, 7.351.380, 7.338.637. 7.329.391, 7.323.140, 7.261.824, 7.258.837. 7.253.003, 7.238.324, 7.238.255, 7.233.865, 7.229.538, 7.201.881, 7.195.986, 7.189.581, 7.189.580, 7.189.368, 7.141.978, 7.138.062, 7.135.147. 7.125.711, 7.118.910, 7.118.661, 7.640.947. 7.666.361, 7.704.735; e o Pedido de Patente Internacional WO 2010/072410; em que tais patentes e pedidos são incorporados ao presente a título de referência em sua totalidade. Outro exemplo para uso com os métodos revelados no presente documento é descrito em Chen et al, "Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum vesicles, " Lab on a Chip, 8 de dezembro de 2009 DOI: 10.1039/b916199f.

[00230] Outros dispositivos de microfluido para uso com a invenção

incluem dispositivos que compreendem camadas elastoméricas, válvulas e bombas, incluindo, sem limitação, aqueles revelados nas Patentes nº U.S. 5.376.252, 6.408.878, 6.645.432, 6.719.868, 6.793.753, 6.899.137, 6.929.030, 7.040.338, 7.118.910, 7.144.616, 7.216.671, 7.250.128, 7.494.555, 7.501.245, 7.601.270, 7.691.333, 7.754.010, 7.837.946; nos Pedidos de Patente nº U.S. 2003/0061687, 2005/0084421, 2005/0112882, 2005/0129581, 2005/0145496, 2005/0201901, 2005/0214173, 2005/0252773, 2006/0006067; e Patentes nº EP 0527905 e 1065378; em que cada um de tais pedidos é incorporado ao presente a título de referência. Em alguns casos, muitos ou todos os dispositivos são compostos por material elastomérico. Certos dispositivos são projetados para conduzir reações de ciclagem térmica (por exemplo, PC) com dispositivos que incluem um ou mais válvulas elastoméricas para regular o fluxo de solução através do dispositivo. Os dispositivos podem compreender arranjos de sítios de reação, permitindo, assim, que uma pluralidade de reações seja realizada. Portanto, os dispositivos podem ser usados para avaliar os microRNAs circulantes de uma forma multiplex, incluindo microRNAs isolados de vesículas. Em uma modalidade, o dispositivo de microfluido compreende (a) uma primeira pluralidade de canais de fluxo formada em um substrato elastomérico; (b) uma segunda pluralidade de canais de fluxo formada no substrato elastomérico que cruza a primeira pluralidade de canais de fluxo para definir um arranjo de sítios de reação, em que cada sítio de reação está localizado em uma interseção de um dentre o primeiro e o segundo canais de fluxo; (c) uma pluralidade de válvulas de isolamento dispostas ao longo da primeira e da segunda pluralidade de canais de fluxo e espaçadas entre os sítios de reação que podem ser atuadas para isolar uma solução dentro de cada um dos sítios de reação das soluções em outros sítios de reação, em que as válvulas de isolamento compreendem um ou mais canais de contro-

le, em que cada um sobrepõe ou cruza um ou mais dos canais de fluxo; e (d) meios para atuar simultaneamente as válvulas para isolar os sítios de reação entre si. Várias modificações à estrutura básica do dispositivo estão abrangidas dentro do escopo da invenção. Micro RNAs podem ser detectados em cada um dos sítios de reação com o uso de métodos de PCR. Por exemplo, o método pode compreender as etapas de: (i) fornecer um dispositivo de microfluido, em que o dispositivo de microfluido compreende: um primeiro canal fluídico que tem uma primeira extremidade e uma segunda extremidade em comunicação de fluido entre si através do canal; a pluralidade de canais de fluxo, em que cada canal fluídico termina em uma parede terminal; em que cada canal fluídico ramifica-se a partir de e está em comunicação de fluido com o primeiro canal fluídico, em que um fluido aquoso que entra em um dos canais de fluxo a partir do primeiro canal fluídico pode fluir para fora do canal de fluido apenas através do primeiro canal fluídico; e uma entrada em comunicação de fluido com o primeiro canal fluídico, em que a entrada é para introduzir um fluido de amostra; em que cada canal de fluido está associado a uma válvula que, quando fechada, isola uma extremidade do canal de fluido do primeiro canal fluídico, assim um sítio de reação isolado é formado entre a válvula e a parede terminal; um canal de controle; em que cada válvula é uma membrana desviável que é desviada para o canal de fluido associado à válvula quando uma força de atuação é aplicada ao canal de controle, fechando, assim, a válvula; e em que, quando a força de atuação é aplicada ao canal de controle, uma válvula em cada um dos canais de fluxo é fechada, de modo a produzir o sítio de reação isolado em cada canal de fluido; (ii) introduzir o fluido de amostra na entrada, em que o fluido de amostra preenche os canais de fluxo; (iii) atuar a válvula para separar o fluido de amostra nas porções separadas dentro do canais de fluxo; (iv) amplificar o ácido nucleico no fluido de amostra; (v) anali-

sar as porções do fluido de amostra para determinar se a amplificação produziu a reação. O fluido de amostra pode conter um alvo de ácido nucleico amplificável, por exemplo, um microRNA, e as condições podem ser condições de reação de cadeia de polimerase (PCR), de modo que a reação resulte em um produto de PCR ser formado.

[00231] O dispositivo de microfluido pode ter um ou mais agentes de ligação ligados a uma superfície em um canal ou presentes em um canal. Por exemplo, o microcanal pode ter um ou mais agentes de captura, tal como um agente de captura para um ou mais antígenos de microvesícula gerais na Tabela 3 ou um antígeno relacionado à célula de origem ou câncer na Tabela 4, incluindo, sem limitação, EpCam, CD9, PCSA, CD63, CD81, PSMA, B7H3, PSCA, ICAM, STEAP, KLK2, SSX2, SSX4, PBP, SPDEF e EGFR. O agente de captura pode ser um aptâmero selecionado pelos métodos da invenção. A superfície do canal pode ser também colocada em contato com um aptâmero de bloqueio da invenção. Em uma modalidade, uma superfície de microcanal é tratada com avidina e um agente de captura, tal como um anticorpo, que é biotinilado pode ser injetado no canal para ligar a avidina. Em outras modalidades, os agentes de captura estão presentes em câmaras ou outros componentes de um dispositivo de microfluido. Os agentes de captura podem ser também ligados às esferas que podem ser manipuladas para mover-se através dos canais microfluídicos. Em uma modalidade, os agentes de captura são ligados às esferas magnéticas. As esferas podem ser manipuladas com o uso de ímãs.

[00232] Uma amostra biológica pode ser fluída para o dispositivo de microfluido, ou um microcanal, em taxas tais como pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 µl por minuto, tal como entre cerca de 1 a 50, 5 a 40, 5 a 30, 3 a 20 ou 5 a 15 µl por minuto. Uma ou mais vesículas podem ser capturadas e diretamente detectadas no dispositivo de micro-

fluido. Alternativamente, a vesícula capturada pode ser liberada e sair do dispositivo fluídico antes da análise. Em outra modalidade, uma ou mais vesículas capturadas são lisadas no microcanal e o lisado pode ser analisado, por exemplo, para exame da carga útil dentro da vesícula. O tampão de lise pode ser fluído através do canal e lisar as vesículas capturadas. Por exemplo, o tampão de lise pode ser fluído para o dispositivo ou o microcanal em taxas tais como pelo menos cerca de a, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, ou 50 µl por minuto, tal como entre cerca de 1 a 50, 5 a 40, 10 a 30, 5 a 30 ou 10 a 35 µl por minuto. O lisado pode ser coletado e analisado, tal como se realizando RT-PC, PCR, espectrometria de massa, Western blotting ou outros ensaios, para detectar um ou mais biomarcadores da vesícula.

FENÓTIPOS

[00233] São revelados no presente documento produtos e processos para caracterizar um fenótipo com o uso dos métodos e composições da invenção. O termo "fenótipo", conforme usado no presente documento, pode significar qualquer traço ou característica que seja atribuído a um perfil de biomarcador que é identificado com o uso em parte ou em todo das composições e/ou métodos da invenção. Por exemplo, um fenótipo pode ser uma determinação diagnóstica, prognóstica ou teragnóstica com base em um perfil de biomarcador caracterizado para uma amostra obtida de um indivíduo. Um fenótipo pode ser qualquer característica ou traço observável de, tal como uma doença ou afecção, um estágio de uma doença ou afecção, suscetibilidade a uma doença ou afecção, prognóstico de uma doença ou afecção, um estado fisiológico ou resposta/resposta potencial a agentes terapêuticos. Um fenótipo pode resultar de uma constituição genética do indivíduo assim como da influência de fatores ambientais e as interações entre os dois, assim como de modificações epigenéticas às se-

quências de ácidos nucleicos.

[00234] Um fenótipo em um indivíduo pode ser caracterizado pela obtenção de uma amostra biológica de um indivíduo e análise da amostra com o uso das composições e/ou métodos da invenção. Por exemplo, caracterizar um fenótipo para um sujeito ou indivíduo pode incluir detectar uma doença ou afecção (incluindo detecção de estágio precoce pré-assintomático), determinar um prognóstico, diagnóstico ou teragnóstico de uma doença ou afecção ou determinar o estágio ou progressão de uma doença ou afecção. Caracterizar um fenótipo pode incluir identificar tratamentos apropriados ou eficácia de tratamento para doenças, afecções, estágios de doença ou estágios de afecção, previsões e análise de probabilidade de progressão de doença, particularmente recorrência de doença, propagação metastático ou reincidência da doença. Um fenótipo pode ser também um tipo ou subtipo clinicamente distinto de uma afecção ou doença, tal como câncer ou tumor. A determinação de fenótipo pode ser também uma determinação de uma condição fisiológica ou uma avaliação de sofrimento do órgão ou rejeição do órgão, tal como após transplante. As composições e métodos descritos no presente documento permite a avaliação de um indivíduo em uma base individual, o que pode fornecer benefícios de decisões mais eficazes e econômicas no tratamento.

[00235] Em um aspecto, a invenção refere-se à análise de biomarcadores, tais como microvesículas para fornecer um diagnóstico, prognóstico e/ou teragnóstico de uma doença ou afecção. O teragnóstico inclui testagem diagnóstica que fornece a capacidade de efetuar a terapia ou o tratamento de uma doença ou estado de doença. A testagem diagnóstica fornece um teragnóstico de uma maneira similar ao diagnóstico ou a testagem diagnóstica fornece um diagnóstico ou prognóstico, respectivamente. Conforme usado no presente documento, o teragnóstico abrange qualquer forma desejada de testagem rela-

cionada à terapia, incluindo medicina preditiva, medicina personalizada, medicina integrada, farmacodiagnóstico e parceria de Dx/Rx. Os testes relacionados à terapia podem ser usados para prever e avaliar a resposta de fármaco em indivíduos únicos, isto é, fornecer medicina personalizada. A previsão de uma resposta de fármaco pode determinar se um indivíduo é um provável respondedor ou um provável não respondedor a um agente terapêutico candidato, por exemplo, antes de o indivíduo ter sido exposto ou tratado de outro modo com o tratamento. A avaliação de uma resposta de fármaco pode monitorar uma resposta a um fármaco, por exemplo, monitorar a melhora do indivíduo ou a falta da mesma ao longo do curso de tempo após iniciar o tratamento. Os testes relacionados à terapia são úteis para selecionar um indivíduo para o tratamento que tem probabilidade particular de se beneficiar do tratamento ou fornecer uma indicação precoce e objetiva da eficácia de tratamento em um indivíduo único. Portanto, a análise que usa as composições e métodos da invenção pode indicar que o tratamento deve ser alterado para selecionar um tratamento mais promissor, evitando, assim, o grande custo de atrasar o tratamento benéfico e evitando os custos financeiros e de mortalidade de administrar um fármaco(s) ineficaz(es).

[00236] Portanto, as composições e métodos da invenção podem ajudar a prever se um indivíduo tem probabilidade de responder a um tratamento para uma doença ou distúrbio. Caracterizar um fenótipo inclui prever a situação de respondedor / não respondedor do indivíduo, em que um respondedor responde a um tratamento para uma doença e um não respondedor não responde ao tratamento. Biomarcadores tais como microvesículas podem ser analisados nos indivíduos e comparados contra aqueles de indivíduos anteriores que mostraram responder ou não a um tratamento. Se o perfil de biomarcador no indivíduo alinhar-se mais proximamente àquele de indivíduos anteriores

que mostraram responder ao tratamento, o indivíduo pode ser caracterizado, ou previsto, com um respondedor ao tratamento. Similarmente, se o perfil de biomarcador no indivíduo alinhar-se mais proximamente àquele de indivíduos anteriores que não responderam ao tratamento, o indivíduo pode ser caracterizado, ou previsto, com um não respondedor ao tratamento. O tratamento pode ser para qualquer doença, distúrbio ou outra afecção apropriada, incluindo, sem limitação, aqueles revelados no presente documento.

[00237] Em algumas modalidades, o fenótipo compreende uma doença ou afecção, tal como aquelas listadas na Tabela 1. Por exemplo, o fenótipo pode compreender detectar a presença a probabilidade de desenvolvimento de um tumor, neoplasma ou câncer, ou caracterizar o tumor, neoplasma ou câncer (por exemplo, estágio, grau, agressividade, probabilidade de metástase ou recorrência, etc.). Os cânceres que podem ser detectados ou avaliados pelos métodos ou composições descritos no presente documento incluem, porém, sem limitação, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer de cólon, pólipo hiperplástico, adenoma, câncer colorretal, displasia de alto grau, displasia de baixo grau, hiperplasia prostática, câncer de próstata, melanoma, câncer pancreático, câncer cerebral (tal como glioblastoma), malignidade hematológica, carcinoma hepatocelular, câncer cervical, câncer endometrial, câncer de cabeça pescoço, câncer de esôfago, tumor de estroma gastrointestinal (GIST), carcinoma de célula renal (RCC) ou câncer gástrico. O câncer colorretal pode ser CRC Dukes B ou Dukes C-D. A malignidade hematológica pode ser Leucemia linfocítica Crônica de Célula B, Linfoma de células B-DLBCL, B-Cell Linfoma de células B-DLBCL-do tipo centro germinal, Linfoma de células B-DLBCL-do tipo células B ativadas e linfoma de Burkitt.

[00238] O fenótipo pode ser uma afecção pré-maligna, tal como queratose actínica, gastrite atrófica, leucoplasia, eritroplasia, Granulo-

matose Linfomatoide, pré-leucemia, fibrose, displasia cervical, displasia cervical uterina, xeroderma pigmentoso, Esôfago de Barrett, pólipo colorretal, ou outro crescimento anormal ou lesão de tecido que tenha probabilidade de desenvolver-se em um tumor maligno. Infecções virais transformativas, tais como HIV e HPV, também apresentam fenótipos que podem ser avaliados de acordo com a invenção.

[00239] Um câncer caracterizado pelos métodos da invenção pode compreender, sem limitação, um carcinoma, um sarcoma, um linfoma ou leucemia, um tumor de célula germinativa, um blastoma ou outros cânceres. Os carcinomas incluem, sem limitação neoplasmas epiteliais, tumores de células escamosas de carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais de neoplasmas de célula basal, papilomas transitórios e carcinomas de células, adenomas e adenocarcinomas (glândulas), adenoma, adenocarcinoma, linite plástica insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, vipoma, colangiocarcinoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma cístico da adenoide, tumor carcinoide de apêndice, prolactinoma, oncocitoma, adenoma de célula de Hurthle, carcinoma de célula renal, tumor de Grawitz, múltiplos adenomas endócrinos, adenoma endometrioide, neoplasmas de apêndice cutâneo e adnexal, neoplasmas mucoepidermoides, neoplasmas císticas, mucinosas e serosas, cistadenoma, pseudomixoma peritoneal, neoplasias dutais, lobulares e medulares, neoplasmas de células acinar, neoplasmas epiteliais complexas, tumor de Warthin, timoma, neoplasmas gonadais especializadas, tumor de estroma de cordão sexual, tecoma, tumor de células granulosas, arrenoblastoma, tumor de células de Sertoli Leydig, tumores glômicos, paraganglioma, feocromocitoma, tumor glômico e melanomas nevos, nevo melanocítico, melanoma maligno, melanoma, melanoma nodular, nevo displásico, melanoma maligno, melanoma de propagação superficial e melanoma acrolentiginoso maligno. O sarcoma inclui, sem limitação, tumor de Askin, botrioides,

condrossarcoma, sarcoma de Ewing, hemangioendotelioma maligno, schwanoma maligno, osteossarcoma, sarcomas de tecidos moles, incluindo: sarcoma de partes moles alveolares, angiossarcoma, cistossarcoma filoide, dermato fibrossarcoma, tumor desmoide, tumor de células redondas pequenas desmoplásticas, sarcoma epitelioide, condrossarcoma extraesquelético, osteossarcoma extraesquelético, fibrossarcoma, hemangiopericitoma, hemangiossarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiossarcoma, lipossarcoma, linfangiossarcoma, linfossarcoma, histiocitoma fibroso maligno, neurofibrossarcoma, rabdomiossarcoma e sarcoma sinovial. Linfoma e leucemia incluem, sem limitação, leucemia linfocítica crónica / linfoma linfoide pequena, leucemia pró-linfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico (tal como macroglobulinemia de Waldenstrom), linfoma da zona marginal esplénica, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, doenças de deposição de imunoglobulinas monoclonais, doenças de cadeia pesada, linfoma de células B de zona marginal extranodal, também chamado de linfoma MALT, linfoma de células B de zona marginal notal (nmzl), linfoma folicular, linfoma de células do manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células B grandes no mediastino (timo), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma primário, linfoma de Burkitt / leucemia, leucemia pró-linfocítica de células T, leucemia linfocítica granular de células T grandes, leucemia de células NK agressiva, leucemia / linfoma de células T em adulto , linfoma extranodal de células NK / T, tipo nasal, linfoma de células T do tipo enteropatia, linfoma de células T hepatoesplênica, linfoma de células NK blásticas, micose fungoide / síndrome de Sézary, distúrbios linfoproliferativos de células T positivo para CD30 cutâneo primário, linfoma anaplásico de células grandes cutâneo primário, papulose linfomatoide, linfoma de células T angioimunoblástico, linfoma de células T periférico, linfoma anaplásico de células grandes não especificado, linfomas de Hodgkin clássico

(esclerose nodular, celularidade mista, rico em linfócitos, depletado ou não depletado de linfócitos), linfoma de Hodgkin predominante em linfócitos nodulares. Os tumores de células germinativas incluem, sem limitação, germinoma, disgerminoma, seminoma, tumor de células germinativas não germinomatosos, carcinoma embrionário, tumor seio endodérmico, coriocarcinoma, teratoma, poliembrioma e gonadoblastoma. Blastoma inclui, sem limitação, nefroblastoma, meduloblastoma e retinoblastoma. Outros tipos de câncer incluem, sem limitação, carcinoma labial, carcinoma da laringe, carcinoma de hipofaringe, carcinoma de língua, carcinoma da glândula salivar, carcinoma gástrico, adenocarcinoma, câncer de tireoide (carcinoma de tireoide papilar e medular), carcinoma renal, carcinoma de parênquima renal, carcinoma de colo do útero, carcinoma de corpo uterino, carcinoma do endométrio, carcinoma do cório, carcinoma testicular, carcinoma urinário, melanoma, tumores cerebrais, tais como glioblastoma, astrocitoma, meningioma, meduloblastoma e tumores neuroectodérmicos periféricos, carcinoma da vesícula biliar, carcinoma brônquico, mieloma múltiplo, basalioma, teratoma, retinoblastoma, melanoma coroide, seminoma, rabdomiossarcoma, craniofaringeoma, osteossarcoma, condrossarcoma, miossarcoma, lipossarcoma, fibrossarcoma, sarcoma de Ewing e plasmocitoma.

[00240] Em uma modalidade adicional, o câncer sob análise pode ser um câncer de pulmão, incluindo câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de pulmão de células pequenas (incluindo carcinoma de células pequenas (câncer de célula em aveia), carcinoma de células pequenas / células grandes associado e carcinoma de células pequenas combinado), câncer de cólon, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de fígado, câncer de pâncreas, câncer de cérebro, câncer de rim, câncer de ovário, câncer de estômago, câncer de pele, câncer ósseo, câncer gástrico, câncer de mama, câncer de pâncreas,

glioma, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma renal papilar, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, leucemia, linfoma, mieloma ou um tumor sólido.

[00241] Nas modalidades, o câncer compreende uma leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cânceres relacionados à AIDS; linfomas relacionados à AIDS; câncer anal; câncer do apêndice; astrocitomas; tumor teratoide/rabdoide atípico; carcinoma basocelular; câncer de bexiga; glioma do tronco cerebral; tumor cerebral (incluindo glioma do tronco cerebral, sistema nervoso central, tumor teratoide/rabdoide atípico, tumores embrionários do sistema nervoso central, astrocitomas, craniofaringioma, ependimoblastoma, ependimoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais e pineoblastoma); câncer de mama; tumores brônquicos; Linfoma de Burkitt; câncer de sítio primário desconhecido; tumor carcinoide; carcinoma de sítio primário desconhecido; tumor teratoide/rabdoide atípico do sistema nervoso central; tumores embrionários do sistema nervoso central; câncer do colo do útero; cânceres da infância; cordoma; leucemia linfocítica crónica; leucemia mieloide crónica; doenças reumáticas crônicas; câncer de cólon; câncer colorretal; craniofaringioma; linfoma cutâneo de células T; tumores de células da ilhota do pâncreas endócrino; câncer de endométrio; ependimoblastoma; ependimoma; câncer de esôfago; estesioneuroblastoma; Sarcoma de Ewing; tumor de células germinativas extracraniana; tumor de células germinativas extragonadal; câncer do duto biliar extra-hepática; câncer de vesícula biliar; câncer gástrico (estômago); tumor carcinoide gastrointestinal; tumor de células do estroma gastrointestinal; tumor do estroma gastrointestinal (GIST); tumor trofoblástico gestacional; glioma; tricoleucemia; câncer de cabeça e pescoço; câncer de coração; Linfoma de Hodgkin; hipofaringe; melanoma

intraocular; tumores de células das ilhotas; Sarcoma de Kaposi; câncer de rim; células de Langerhans; câncer de laringe; câncer de lábio; câncer de fígado; câncer ósseo fibroistiocitoma maligno; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; carcinoma de células de Merkel; carcinoma de células da pele de Merkel; mesotelioma; câncer de pescoço metastático espinocelular com primário oculto; câncer de boca; múltiplas síndromes de neoplasia endócrina; mieloma múltiplo; neoplasma de células plasmáticas/mieloma múltiplo; micose fungoide; síndromes mielodisplásicas; neoplasmas mieloproliferativos; câncer da cavidade nasal; câncer de nasofaringe; neuroblastoma; Linfoma não Hodgkin; câncer não melanoma da pele; câncer de pulmão de células não pequenas; câncer bucal; câncer de cavidade oral; câncer de orofaringe; osteossarcoma; outros tumores do cérebro e da medula espinhal; câncer de ovário; câncer epitelial do ovário; tumor de células germinativas do ovário; tumor de ovário com baixo potencial de malignidade; câncer de pâncreas; papilomatose; câncer de seios paranasais; câncer de paratireoide; câncer pélvico; câncer de pênis; câncer da faringe; tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária; pineoblastoma; tumor da hipófise; neoplasma de células plasmáticas/mieloma múltiplo; blastoma pleuropulmonar; linfoma primário do sistema nervoso central (SNC); câncer de fígado hepatocelular primário; câncer da próstata; câncer retal; câncer renal; câncer de células renais (rim); câncer de células renais; câncer do trato respiratório; retinoblastoma; rabdomiossarcoma; câncer da glândula salivar; síndrome de Sézary; câncer de pulmão de células pequenas; câncer de intestino delgado; sarcoma dos tecidos moles; carcinoma de células escamosas; câncer escamoso de pescoço; câncer de estômago (gástrico); tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais; Linfoma de células T; câncer de testículo; câncer de garganta; carcinoma do timo; timoma; câncer de tireoide; câncer de células de transição; câncer de

células transicionais da pelve renal e ureter; tumor trofoblástico; câncer de ureter; câncer uretral; câncer uterino; sarcoma uterino; câncer vaginal; câncer vulvar; macroglobulinemia de Waldenstrom; ou tumor de Wilm. Os métodos da invenção podem ser usados para caracterizar esses e outros cânceres. Assim, a caracterização de um fenótipo pode ser fornecer um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico de um dos cânceres revelados no presente documento.

[00242] Em algumas modalidades, o câncer compreende uma leucemia mieloide aguda (LMA), carcinoma da mama, colangiocarcinoma, adenocarcinoma colorretal, adenocarcinoma do ducto biliar extra-hepático, doença maligna do trato genital feminino, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma gastroesofágico, tumores estromais gastrointestinais (GIST), glioblastoma, carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, leucemia, carcinoma hepatocelular do fígado, glioma de baixo grau, carcinoma bronquioloalveolar do pulmão (BAC), câncer pulmonar de células não pequenas do pulmão (NSCLC), câncer pulmonar de células pequenas (CPPC), linfoma, câncer do trato genital masculino, tumor maligno fibroso solitário da pleura (MSFT), melanoma, mieloma múltiplo, tumor neuroendócrino, linfoma de células B grandes difusas nodais, câncer não epitelial do ovário (não EOC), carcinoma epitelial da superfície do ovário, adenocarcinoma pancreático, carcinoma da pituitária, oligodendroglioma, adenocarcinoma da próstata, carcinoma peritoneal retroperitoneal ou sarcoma peritoneal ou retroperitoneal, tumor maligno do intestino delgado, tumor de tecido mole, carcinoma do timo, carcinoma da tiroide ou melanoma uveal. Os métodos da invenção podem ser usados para caracterizar esses e outros cânceres. Portanto, a caracterização de um fenótipo pode ser fornecer um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico de um dos cânceres revelados no presente documento.

[00243] O fenótipo pode ser também uma doença inflamatória, do-

ença imune ou doença autoimune. Por exemplo, a doença pode ser doença inflamatória do intestino (IBD), doença de Crohn (CD), colite ulcerativa (UC), inflamações pélvica, vasculite, psoríase, diabetes, hepatite autoimune, esclerose múltipla, Miastenia Grave, diabetes Tipo I, artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), tireoidite de Hashimoto, doença de Grave, Doença de espondilite anquilosante de Sjogren, síndrome CREST, escleroderma, doença reumática, rejeição de órgão, colangite esclerosante primária ou sepse.

[00244] O fenótipo pode também compreender uma doença cardiovascular, tal como aterosclerose, falha congestiva do coração, placa vulnerável, acidente vascular cerebral ou isquemia. A doença ou afecção cardiovascular pode ser pressão sanguínea alta, estenose, oclusão de vaso ou um evento trombótico.

[00245] O fenótipo pode também compreender uma doença neurológica, tal como Esclerose Múltipla (MS), Doença de Parkinson (PD), Doença de Alzheimer (AD), esquizofrenia, distúrbio bipolar, depressão, autismo, Doença de Príon, Doença de Pick, demência, Doença de Huntington (HD), síndrome de Down, doença cerebrovascular, encefalite de Rasmussen, meningite viral, lúpus eritematoso sistêmico neuropsiquiátrico (NPSLE), esclerose lateral amiotrófica, doença de Creutzfeldt-Jacob, doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker, encefalopatia espongiforme transmissível, lesão de reperfusão isquêmica (por exemplo, acidente vascular cerebral), trauma cerebral, infecção microbiana ou síndrome da fatiga crônica. O fenótipo pode ser também uma afecção tal como fibromialgia, dor neuropática crônica ou dor neuropática periférica.

[00246] O fenótipo pode também compreende uma doença infecciosa, tal como infecção por bactéria, vírus ou levedura. Por exemplo, a doença ou afecção pode ser Doença de Whipple, Doença de Príon, cirrose, Staphylococcus aureus resistente à meticilina, HIV, hepatite,

sífilis, meningite, malária, tuberculose ou gripe. Proteínas virais, tais como partículas do tipo HCV ou HIV, podem ser avaliadas em uma vesícula, para caracterizar uma afecção viral.

[00247] O fenótipo pode também compreender uma afecção perinatal ou relacionada à gravidez (por exemplo, pré-eclâmpsia ou parto prematuro), doença ou afecção metabólica, tal como uma doença ou afecção metabólica associada ao metabolismo do ferro. Por exemplo, hepcidina pode ser avaliada em uma vesícula para caracterizar uma deficiência de ferro. A doença ou afecção metabólica pode ser também diabetes, inflamação ou uma afecção perinatal.

[00248] As composições e métodos da invenção podem ser usados para caracterizar essas e outras doenças que podem ser avaliadas por meio de biomarcadores. Portanto, a caracterização de um fenótipo pode ser fornecer um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico de uma das doenças ou distúrbios revelados no presente documento.

INDIVÍDUO

[00249] Um ou mais fenótipos de um indivíduo podem ser determinados por análise de uma ou mais vesículas, tais como vesículas, em uma amostra biológica obtida do indivíduo. Um indivíduo ou paciente pode incluir, porém, sem limitação, mamíferos, tais como bovino, ave, canino, equino, felino, ovino, porcino ou animais primatas (incluindo primatas humanos e não humanos). Um indivíduo pode também incluir um mamífero de importância devido ao fato de estar em risco de extinção, tal como um tigre siberiano; ou importância econômica, tal como um animal criado em uma fazenda para consumo por humanos, ou um animal de importância social para os humanos, tal como um animal mantido como um animal de estimação ou em um zoológico. Os exemplos de tais animais incluem, porém, sem limitação, carnívoros, tais como gatos e cães; suínos, incluindo porcos, porcos de engorda e javalis; ruminantes ou ungulados, tais como gado, bois, ovelhas, gira-

fas, cabras, bisões, camelos e cavalos. Estão também incluídos pássaros que estão em risco de extinção ou que são mantidos em zoológicos, assim como aves e, mais particularmente, aves domesticadas, isto é, aves tais como perus e galinhas, patos, gansos e galinhas d'angola. Estão também incluídos suínos e cavalos domesticados (incluindo cavalos de corrida). Adicionalmente, quaisquer espécies de animal ligadas a atividades comerciais estão também incluídas, tais como aqueles animais ligados à agricultura e aquicultura e outras atividades em que monitoramento de doença, diagnóstico e seleção de terapia são práticas rotineiras na criação para produtividade econômica e/ou segurança da cadeia alimentar.

[00250] O indivíduo pode ter uma doença ou afecção preexistente, tal como câncer. Alternativamente, o indivíduo pode não ter qualquer afecção preexistente. O indivíduo pode ser também não responsivo a um tratamento existente ou anterior, tal como um tratamento para câncer.

AMOSTRAS

[00251] Uma amostra usada e/ou avaliada por meio das composições e métodos da invenção inclui qualquer amostra biológica relevante que pode ser usada para avaliação de biomarcador, incluindo, sem limitação, seções de tecidos, tal como biópsia ou tecido removido durante procedimentos cirúrgicos ou outros, fluidos corporais, amostras de autopsia, seções congeladas tiradas para propósitos histológicos e culturas de células. Tais amostras incluem sangue e frações ou produtos de sangue (por exemplo, soro, camada de células brancas, plasma, plaquetas, células vermelhas sanguíneas e similares), esputo, efusão maligna, tecido de células da bochecha, células cultivadas (por exemplo, culturas primárias, explantes e células transformadas), fezes, urina, outros fluidos biológicos ou corporais (por exemplo, fluido prostático, fluido gástrico, fluido intestinal, fluido renal, fluido pulmonar, flui-

do cerebrospinal e similares), etc. A amostra podem compreender matéria biológica que é um bloco fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE) e congelada fresca, fixado em formalina e embebido em parafina, ou está dentro de um fixador de formalina + conservante de RNA. Mais de uma amostra de mais de um tipo pode ser usada para cada paciente.

[00252] A amostra usada nos métodos descritos no presente documento pode ser uma amostra fixada em formalina e embebida em parafina (FFPE). A amostra FFPE pode ser um ou mais dentre tecido fixado, lâminas não manchadas, coágulo ou núcleo de medula óssea, biópsia por agulha grossa, fluidos malignos e aspiração por agulha fina (FNA). Em uma modalidade, o tecido fixado compreende um tumor que contem bloco fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE) de uma cirurgia ou biópsia. Em outra modalidade, as lâminas sem manha compreendem lâminas sem macha, carregadas e não cozidas de um bloco de parafina. Em outra modalidade, o coágulo ou núcleo de membrana óssea compreende um núcleo descalcificado. Um núcleo e/ou coágulo fixado em formalina pode ser embebido em parafina. Em ainda outra modalidade, a biópsia por agulha grossa compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais, por exemplo, 3 a 4, amostras de biópsia embebidas em parafina. Uma biópsia com agulha de calibre 18 pode ser usada. O fluido maligno pode compreender um volume suficiente de fluido pleural/ascítico para produzir um pélete de célula de 5 x 5 x 2 mm. O fluido pode ser fixado em formalina em um bloco de parafina. Em uma modalidade, a biópsia por agulha grossa compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais, por exemplo, 4 a 6, aspirações embebidas em parafina.

[00253] Uma amostra pode ser processada de acordo com as técnicas entendidas por aqueles na técnica. Uma amostra pode ser, sem limitação, células ou tecidos frescos, congelados ou fixados. Em algu-

mas modalidades, uma amostra compreende tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE), tecido fresco ou tecido fresco congelado (FF). Uma amostra pode compreender células cultivadas, incluindo linhagens celulares primárias ou imortalizadas derivadas de uma amostra do indivíduo. Uma amostra pode também referir-se a um extrato de uma amostra de um indivíduo. Por exemplo, uma amostra pode compreender DNA, RNA ou proteína extraída de um tecido ou um fluido corporal. Muitas técnicas e kits comerciais estão disponíveis para tais propósitos. A amostra fresca do indivíduo pode ser tratada com um agente para preservar o RNA antes de processamento adiciona, por exemplo, lise e extração de células. As amostras podem incluir amostras congeladas coletadas para outros propósitos. As amostras podem estar associadas a informações relevantes, tal como idade, gênero e sintomas clínicos presentes no indivíduo; fonte da amostra; e métodos de coleta e armazenamento da amostra. Uma amostra é tipicamente obtida de um indivíduo.

[00254] Uma biópsia compreende o processo de remoção de uma amostra de tecido para avaliação diagnóstica ou prognóstica e para o próprio espécime de tecido. Qualquer técnica de biópsia conhecida na técnica pode ser aplicada aos métodos de perfilagem molecular da presente invenção. A técnica de biópsia aplicada pode depender do tipo de tecido a ser avaliado (por exemplo, cólon, próstata, rim, bexiga, nodo linfático, fígado, medula óssea, célula sanguínea, mama, etc.), do tamanho e do tipo do tumor (por exemplo, sólido ou suspenso, sangue ou ascites), entre outros fatores. As técnicas de biópsia representativas incluem, porém, sem limitação, biópsia de excisão, biópsia de incisão, biópsia com agulha, biópsia cirúrgica e biópsia da medula óssea. Uma "biópsia de excisão" refere-se à remoção de uma massa tumoral inteira com uma margem pequena de tecido normal que circunda a mesma. Uma "biópsia de incisão" refere-se à remoção de uma

fatia de tecido que inclui um diâmetro em corte transversal do tumor. A perfilagem molecular pode usar uma "biópsia por agulha grossa" da massa tumoral ou uma "biópsia por aspiração com agulha fina" que em geral obtém uma suspensão de células de dentro da massa tumoral. As técnicas de biópsia são discutidas, por exemplo, em Harrison's Principles of Internal Medicine, asper, et al., eds., 16ª edição, 2005, Capítulo 70 e toda a Parte V.

[00255] As técnicas de biologia molecular padrão conhecidas no campo e não especificamente descritas são em geral seguidas como em Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) e como em Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley e Sons, Baltimore, Md. (1989) e como em Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, New York (1988) e como em Watson et al., Recombinant DNA, Scientific American Books, New York e em Birren et al (eds) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Volumes 1 a 4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) e a metodologia conforme apresentada nas Patentes nº U.S. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531 ; 5.192.659 e 5.272.057 e incorporadas ao presente a título de referência. A reação de cadeia de polimerase (PCR) pode ser executada em geral como em PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

[00256] A amostra biológica avaliada com o uso das composições e dos métodos da invenção podem ser qualquer fluido corporal ou biológico, incluindo, porém, sem limitação, sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoalveolar, sêmen (incluindo fluido prostático), fluido de Cowper ou fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural,

fluido peritoneal, fluido de malignidade, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreção vaginal, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares,outros fluidos de lavagem, células, cultura de células ou um sobrenadante de cultura de células. Uma amostra biológica pode também incluir cavidade de blastocele, sangue de cordão umbilical ou circulação materna que pode ser de origem fetal ou materna. A amostra biológica pode ser também uma cultura de células, amostra ou biópsia de tecido da qual vesículas e outros biomarcadores podem ser obtidos. Por exemplo, as células de interesse podem ser cultivadas e as vesículas isoladas da cultura. Em várias modalidades, os biomarcadores, ou mais particularmente as bioassinaturas, revelados no presente documento podem ser avaliados diretamente de tais amostras biológicas (por exemplo, identificação da presença ou níveis de ácido nucleico ou biomarcadores polipeptídicos ou fragmentos funcionais dos mesmos) com o uso de vários métodos, tal como extração de moléculas de ácido nucleico do sangue, plasma, soro ou qualquer uma das amostras biológicas anteriores, uso de arranjos de proteínas ou anticorpos para identificar biomarcador(s) polipeptídico(s) (ou fragmento funcional), assim como outros arranjos, sequenciamento, PC e técnicas proteômicas conhecidas no campo para identificação e avaliação de moléculas de ácido nucleico e polipeptídeo. Adicionalmente, um ou mais componentes presentes em tais amostras podem ser primeiramente isolados ou enriquecidos e adicionalmente processados para avaliar a presença ou os níveis de biomarcadores selecionados, para avaliar uma dada bioassinatura (por exemplo, microvesículas isoladas antes da perfilagem por biomarcadores de proteína e/ou ácido nucleico).

[00257] A Tabela 1 apresenta uma listagem não limitante de doenças, afecções ou estados biológicos e amostras biológicas correspon-

dentes que podem ser usadas para análise de acordo com os métodos da invenção.

TABELA 1: EXEMPLOS DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS FOR VÁRIAS DOENÇAS, AFECÇÕES OU ESTADOS BIOLÓGICOS

Doença, Afecção ou Estado Biológico Ilustrativo	Amostras Biológicas Ilustrativas
Cânceres/neoplasmas que afetam os seguintes tipos de tecido/sistemas corporais: mama, pulmão, ovário, cólon, reto, próstata, pâncreas, cérebro, osso, tecido conjuntivo, glândulas, pele, linfa, sistema nervoso, endócrino, células germinativas, geniturinário, hematológico / sangue, medula óssea, músculo, olho, esofágico, tecido adiposo, tireoide, pituitária, medula espinhal, duto biliar, coração, vesícula biliar, bexiga, testículos, cervical, endometrial, renal, ovário, digestivo / gastrointestinal, estômago, cabeça e pescoço, fígado, leucemia, doenças respiratórias / torácicas, cânceres de primário desconhecido (CUP)	Tumor, sangue, soro, plasma, fluido cerebroespinhal (CSF), urina, esputo, ascite, fluido sinovial, sêmen, aspirações de mamilo, saliva, fluido de lavagem broncoalveolar, lágrimas, lavagens orofarígeas, fezes, fluidos peritoneais, efusão pleural, suor, lágrimas, humor aquoso, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fezes aquosas, fluido amniótico, leite materno, suco pancreático, cerume, fluido de Cowper ou fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, fluido intersticial, menstruação, muco, pus, sebo, lubrificação vaginal, vômito
Distúrbios neurodegenerativos/neurológicos: doença de Parkinson, doença de Alzheimer e esclerose múltipla, Esquizofrenia e transtorno bipolar, distúrbios de espasticidade, epilepsia	Sangue, soro, plasma, CSF, urina
Doença Cardiovascular : aterosclerose, cardiomiopatia, endocardite, placas vulneráveis	Sangue, soro, plasma, CSF, urina
Acidente vascular cerebral: Isquemia, hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidea, ataques isquêmicos transitórios **(TIA)**	Sangue, soro, plasma, CSF, urina
Distúrbios de dor: dor neuropática periférica e dor neuropática crônica e fibromialgia	Sangue, soro, plasma, CSF, urina
Doença autoimune: doenças sistêmicas e localizadas, doença reumática, Lúpus, síndrome de Sjogren	Sangue, soro, plasma, CSF, urina, fluido sinovial
Anomalias do sistema digestivo: esôfago de Barrett, síndrome do intestino irritável, colite ulcerativa, doença de Crohn, Diverticulose e Diverticulite, doença celíaca	Sangue, soro, plasma, CSF, urina
Distúrbios endócrinos: diabetes mellitus, várias formas de Tireoidite, distúrbios adrenais, distúrbios da pituitária	Sangue, soro, plasma, CSF, urina
Doenças e distúrbios da pele: psoríase	Sangue, soro, plasma, CSF, urina, fluido sinovial, lágrimas
Distúrbios urológicos: hipertrofia prostática benigna (BPH), doença do rim policístico,	Sangue, soro, plasma, urina

Doença, Afecção ou Estado Biológico Ilustrativo	Amostras Biológicas Ilustrativas
cistite intersticial	
Doença/lesão hepática: Cirrose, hepatotoxicidade induzida (devido à exposição a fontes químicas naturais ou sintéticas)	Sangue, soro, plasma, urina
Doença/lesão renal: afecções agudas, subagudas, crônicas, lesão de podócito, glomerulosclerose segmental focal	Sangue, soro, plasma, urina
Endometriose	Sangue, soro, plasma, urina, fluidos vaginais
Osteoporose	Sangue, soro, plasma, urina, fluido sinovial
Pancreatite	Sangue, soro, plasma, urina, suco pancreático
Asma	Sangue, soro, plasma, urina, esputo, fluido de lavagem broncoalveolar
Alergia	Sangue, soro, plasma, urina, esputo, fluido de lavagem broncoalveolar
Doenças relacionadas a príon	Sangue, soro, plasma, CSF, urina
Infecções virais: HIV/AIDS	Sangue, soro, plasma, urina
Sepse	Sangue, soro, plasma, urina, lágrimas, lavagem nasal
Transplante/rejeição de órgão	Sangue, soro, plasma, urina, vários fluidos de lavagem
Afecções de diferenciação: adenoma versus pólipo hiperplásico, síndrome do intestino irritável (IBS) versus normal, estágios de classificação de Dukes A, B, C e / ou D de câncer do cólon, adenoma com hiperplasia de baixo grau versus hiperplasia de alto grau, adenoma versus normal, câncer colorretal versus normal, IBS versus. colite ulcerosa (UC) versus doença de Crohn (CD) ,	Sangue, soro, plasma, urina, esputo, fezes, fluido de lavagem colônica
Estados fisiológicos, afecções ou doenças afiliadas relacionadas à gravidez risco genético, resultados adversos da gravidez	Soro materno, plasma, fluido amniótico, sangue do cordão umbilical

[00258] Os métodos da invenção podem ser usados para caracterizar um fenótipo com o uso de uma amostra de sangue ou derivado de sangue. Os derivados de sangue incluem plasma e soro. O plasma sanguíneo é o componente líquido de sangue inteiro e forma aproximadamente 55% do volume total de sangue. O mesmo é composto primariamente de água com pequenas quantidades de minerais, sais, íons, nutrientes e proteínas em solução. No sangue inteiro, células vermelhas sanguíneas, leucócitos e plaquetas estão suspensos dentro

do plasma. O soro sanguíneo refere-se a plasma sanguíneo sem fibrinogênio ou outros fatores de coagulação (isto é, sangue inteiro menos tanto as células como os fatores de coagulação).

[00259] A amostra biológica pode ser obtida através de uma terceira parte, tal como uma parte que não realiza a análise dos biomarcadores, seja avaliação direta de uma amostra biológica ou por perfilagem de uma ou mais vesículas obtidas da amostra biológica. Por exemplo, a amostra pode ser obtida através de um clínico, médico ou outro gerenciador de cuidados com saúde de um indivíduo do qual a amostra é derivada. Alternativamente, a amostra biológica pode ser obtida pela mesma parte que analisa a vesícula. Adicionalmente, as amostras biológicas que estão sendo avaliadas são arquivadas (por exemplo, congeladas) ou de outro modo armazenadas em condições sob conservante.

[00260] Além disso, uma amostra biológica pode compreender uma vesícula ou fragmento de membrana de célula que é derivado de uma célula de origem e disponível extracelularmente em um fluido biológico ou meio extracelular do indivíduo.

[00261] Os métodos da invenção podem incluir avaliar uma ou mais vesículas, incluindo avaliar populações de vesículas. Uma vesícula, conforme usada no presente documento, é uma vesícula de membrana que é vertida de células. As vesículas ou vesículas de membrana incluem, sem limitação: microvesículas circulantes (cMVs), microvesícula, exossomo, nanovesícula, dexossomo, bolha, bolhoso, prostassomo, artigo microp, vesícula intralumenal, fragmento de membrana, vesícula endossômica intralumenal, vesícula do tipo endossômica, veículo de exocitose, vesícula de endossomo, vesícula endossômica, corpo apoptótico, corpo multivesicular, vesícula secretória, vesícula de fosfolipídeo, vesícula lipossômica, argossomo, texassomo, secressomo, tolerossomo, melanossomo, oncossomo ou veículo exocitosado.

Além disso, embora vesículas possam ser produzidas por diferentes processos celulares, os métodos da invenção não são limitados ou dependentes de qualquer um mecanismo, desde que tais vesículas estão presentes em uma amostra biológica e podem ser caracterizadas pelos métodos revelados no presente documento. A não ser que especificado de outro modo, os métodos que fazem uso de uma espécie de vesícula podem ser aplicados a outros tipos de vesículas. As vesículas compreendem estruturas esféricas com uma bicamada de lipídeo similar às membranas celulares que circundam um compartimento interno que pode conter componentes solúveis, algumas vezes referidos como a carga útil. Em algumas modalidades, os métodos da invenção fazem uso de exossomos, que são vesículas pequenas secretadas de cerca de 40 a 100 nm de diâmetro. Para uma análise de vesículas de membrana, incluindo tipos e caracterizações, consulte Thery et al., Nat Rev Immunol. Agosto de 2009;9(8):581 a 93. Algumas propriedades de diferentes tipos de vesículas incluem aquelas na Tabela 2:

TABELA 2: PROPRIEDADES DE VESÍCULA

Característica	**Exossomos**	**Microvesículas**	**Ectossomos**	**Partículas de membrana**	**Vesículas do tipo exossomo**	**Vesículas apoptóticas**
Tamanho	50 a 100 nm	100 a 1.000 nm	50 a 200 nm	50 a 80 nm	20 a 50 nm	50 a 500 nm
Densidade em sacarose	1,13 a 1,19 g/ml			1,04 a 1,07 g/ml	1,1 g/ml	1,16 a 1,28 g/ml
Aparência EM	Formato de copo	Formato irregular, denso em elétron	Estruturas redondas bilamelares	Redondo	Formato irregular	Heterogêneo
Sedimentação	100.000 g	10.000 g	160.000 e 200.000 g	100.000 e 200.000 g	175.000 g	1.200 g, 10.000 g, 100.000 g
Composição de lipídeo	Enriquecido em colesterol, esfingomielina e ceramida; contém	exposição de PPS	Enriquecido em colesterol e diacilglicerol; exposição de PPS		Sem grandes quantidades de lipídeo	

Característica	Exossomos	Microvesículas	Ectossomos	Partículas de membrana	Vesículas do tipo exossomo	Vesículas apoptóticas
	grandes quantidades de lipídeo; exposição de PPS					
Marcadores de proteína principais	Tetraespaninas (por exemplo, CD63, CD9), Alix, TSG101	Integrinas, selectinas e ligante CD40	CR1 e enzimas proteolíticas; sem CD63	CD133; sem CD63	TNFRI	Histonas
Origem intracelular	Compartimentos internos (endossomos)	Membrana plasmática	Membrana plasmática	Membrana plasmática		

Abreviações: fosfatidilserina (PPS); microscópio elétrico (EM)

[00262] As vesículas incluem partículas ligadas à membrana vertida, ou "micropartículas", que são derivadas ou da membrana plasmática ou de uma membrana interna. As vesículas podem ser liberadas no ambiente extracelular de células. As células que liberam vesículas incluem, sem limitação, células que se originam do, ou são derivadas do, ectoderma, endoderma ou mesoderma. As células podem ter variações ou alterações genéticas, ambientais e/ou quaisquer outras subjacentes. Por exemplo, a célula podem ser células tumorais. Uma vesícula pode refletir quaisquer alterações na célula fonte e, assim, refletir alterações nas células de origem, por exemplo, células que têm várias mutações genéticas. Em um mecanismo, uma vesícula é gerada intracelularmente quando um segmento da membrana celular invagina e é por fim exocitosado (consulte, por exemplo, Keller et ah, Immunol. Lett. 107 (2): 102 a 8 (2006)). As vesículas também incluem estruturas derivadas de célula ligadas por uma membrana de bicamada de lipídeo que surge tanto da separação por evaginação herniada (formação de bolha) e vedação de porções da membrana plasmática como da exportação de qualquer estrutura vesicular ligada por membrana intracelular contendo várias proteínas associadas à membrana de origem

tumoral, incluindo moléculas ligadas à superfície derivadas da circulação do hospedeiro que se ligam seletivamente às proteínas derivadas de tumor juntamente com moléculas contidas no lúmen da vesícula, incluindo, porém, sem limitação, microRNAs derivados de tumor ou proteínas intracelulares. Bolhas e formação de bolhas são, ainda, descritos em Charras et ah, Nature Reviews Molecular and Cell Biology, Volume 9, Nº 11, páginas 730 a 736 (2008). Uma vesícula vertida em circulação ou fluidos corporais de células tumorais pode ser referida como uma "vesícula derivada de tumor circulante". Quando tal vesícula é um exossomo, a mesma pode ser referida como um exossomo derivado de tumor circulante (CTE). Em alguns casos, uma vesícula pode ser derivada de uma célula de origem específica. CTE, como com uma vesícula específica de célula de origem, tipicamente tem um ou mais biomarcadores exclusivos que permitem o isolamento do CTE ou vesícula específica de célula de origem, por exemplo, de um fluido corporal e, algumas vezes, de uma maneira específica. Por exemplo, marcadores específicos de tecido ou célula são usados para identificar a célula de origem. Os exemplos de tais marcadores específicos de tecido ou célula são revelados no presente documento e podem ser, ainda, acessados no Banco de Dados de Regulação e Expressão de Gene Tecido-Específico (TiGER), disponível em bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/; Liu et al. (2008) TiGER: Um banco de dados para regulação e expressão de gene tecido-específico. BMC Bioinformatics. 9:271; TissueDistributionDBs, disponível em genome.dkfz-heidelberg.de/menu/tissue_db/index.html.

[00263] Uma vesícula pode ter um diâmetro maior do que cerca de 10 nm, 20 nm ou 30 nm. Uma vesícula pode ter um diâmetro maior do que cerca de 40 nm, 50 nm, 100 nm, 200 nm, 500 nm, 1.000 nm, 1.500 nm, 2.000 nm ou maior do que 10.000 nm. Uma vesícula pode ter um diâmetro de cerca de 20 a 2.000 nm, cerca de 20 a 1.500 nm,

cerca de 30 a 1.000 nm, cerca de 30 a 800 nm, cerca de 30 a 200 nm ou cerca de 30 a 100 nm. Em algumas modalidades, a vesícula tem um diâmetro menor do que 10.000 nm, 2.000 nm, 1.500 nm, 1.000 nm, 800 nm, 500 nm, 200 nm, 100 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, 20 nm ou menor do que 10 nm. Conforme usado no presente documento, o termo "cerca de" em referência a um valor numérico significa que variações de 10% acima ou abaixo do valor numérico estão dentro da faixa atribuída ao valor especificado. Os tamanhos típicos para vários tipos de vesículas são mostrados na Tabela 2. As vesículas podem ser avaliadas para medir o diâmetro de uma única vesícula ou qualquer número de vesículas. Por exemplo, a faixa de diâmetros de uma população de vesículas ou um diâmetro médio de uma população de vesículas pode ser determinada. O diâmetro da vesícula pode ser avaliado com o uso de métodos conhecidos na técnica, por exemplo, tecnologias de imageamento, tal como microscópio eletrônico. Em uma modalidade, um diâmetro de uma ou mais vesículas é determinado com o uso de detecção de partícula óptica. Consulte, por exemplo, a Patente nº U.S. 7.751.053, intitulada "Optical Detection and Analysis of Particles" e emitida em 6 de julho de 2010; e a Patente nº U.S. 7.399.600, intitulada "Optical Detection and Analysis of Particles" e emitida em 15 de julho de 2010.

[00264] Em algumas modalidades, os métodos da invenção compreendem avaliar vesículas diretamente, tal como em uma amostra biológica sem isolamento, purificação ou concentração anterior da amostra biológica. Por exemplo, a própria quantidade de vesículas na amostra pode fornecer uma bioassinatura que fornece uma determinação diagnóstica, prognóstica ou teragnóstica. Alternativamente, a vesícula na amostra pode ser isolada, capturada, purificada ou concentrada a partir de uma amostra antes da análise. Conforme citado, o isolamento, a captura ou a purificação, conforme usado no presente do-

cumento, compreende isolamento parcial, captura parcial ou purificação parcial além de outros componentes na amostra. O isolamento de vesícula pode ser realizado com o uso de várias técnicas, conforme descrito no presente documento, por exemplo, cromatografia, filtração, centrifugação, citometria de fluxo, captura por afinidade (por exemplo, to a superfície plana ou esfera) e/ou com o uso de microfluidos. As Figuras 15B e 15C apresentam uma visão geral de um método da invenção para avaliar microvesículas com o uso de um conjunto de aptâmeros.

[00265] As vesículas, tais como exossomos, podem ser avaliadas para fornecer uma caracterização fenotípica por comparação de características da vesícula a uma referência. Em algumas modalidades, os antígenos de superfície em uma vesícula são avaliados. Os antígenos de superfície podem fornecer uma indicação da origem anatômica e/ou celular das vesículas e outras informações fenotípicas, por exemplo, situação do tumor. Por exemplo, nos casos em que as vesículas encontradas em uma amostra do paciente, por exemplo, um fluido corporal, tal como sangue, soro ou plasma, são avaliadas por antígenos de superfície indicativos de origem colorretal e da presença de câncer. Os antígenos de superfície podem compreender qualquer entidade biológica informativa que possa ser detectada na superfície de membrana de vesícula, incluindo, sem limitação, proteínas de superfície, lipídeos, carboidratos e outros componentes de membrana. Por exemplo, a detecção positiva de vesículas derivadas de cólon que expressam antígenos de tumor pode indicar que o paciente tem câncer colorretal. Como tais, os métodos da invenção podem ser usados para caracterizar qualquer doença ou afecção associada a uma origem anatômica ou celular, por avaliação, por exemplo, biomarcadores doença-específicos e célula-específicos de uma ou mais vesículas obtidas de um indivíduo.

[00266] Em outra modalidade, os métodos da invenção compreendem avaliar uma ou mais cargas úteis de vesícula para fornecer uma caracterização fenotípica. A carga útil com uma vesícula compreende qualquer entidade biológica informativa que pode ser detectada como encapsulada dentro da vesícula, incluindo, sem limitação, proteínas e ácidos nucleicos, por exemplo, DNA genômico ou cDNA, mRNA, ou fragmentos funcionais dos mesmos, assim como microRNAs (miRs). Adicionalmente, os métodos da invenção são direcionados à detecção de antígenos de superfície de vesícula (adicionalmente ou exclusivo à carga útil de vesícula) para fornecer uma caracterização fenotípica. Por exemplo, as vesículas podem ser caracterizadas com o uso de agentes de ligação (por exemplo, anticorpos ou aptâmeros) que são específicos para antígenos de superfície de vesícula e as vesículas ligadas podem ser ainda avaliadas para identificar um ou mais componentes de carga útil revelados no presente documento. Conforme descrito no presente documento, os níveis de vesículas com antígenos de superfície de interesse ou com carga útil de interesse podem ser comparados a uma referência para caracterizar um fenótipo. Por exemplo, a superexpressão em uma amostra de antígenos de superfície relacionados a câncer ou carga útil de vesícula, por exemplo, um mRNA ou microRNA associado a tumor, em comparação a uma referência, pode indicar a presença de câncer na amostra. Os biomarcadores avaliados podem estar presentes ou ausentes, aumentados ou reduzidos com base na seleção da amostra alvo desejada e comparação da amostra alvo à amostra de referência desejada. Os exemplos não limitantes de amostras alvo incluem: doente; tratada/não tratada; diferentes pontos no tempo, tal como em um estudo longitudinal; e exemplos não limitantes de amostra de referência: não doente; normal; pontos no tempo diferentes; e sensível ou resistente a tratamento(s) candidato(s).

BIOMARCADORES

[00267] Conforme descrito, no presente documento, os métodos e as composições da invenção podem ser usados em ensaios para detectar a presença ou o nível de um ou mais biomarcadores de interesse. O biomarcador pode ser qualquer biomarcador útil revelado no presente documento ou conhecido por aqueles versados na técnica. Em uma modalidade, o biomarcador compreende uma proteína ou polipeptídeo. Conforme usados no presente documento, "proteína", "polipeptídeo" e "peptídeo" são usados de modo intercambiável a não ser que determinado de outro modo. O biomarcador pode ser um ácido nucleico, incluindo DNA, RNA, e várias subespécies de qualquer um dos mesmos conforme revelado no presente documento ou conhecido na técnica. O biomarcador pode compreender um lipídeo. O biomarcador pode compreender um carboidrato. O biomarcador pode ser também um complexo, por exemplo, um complexo que compreende proteína, ácidos nucleicos, lipídeos e/ou carboidratos. Em algumas modalidades, o biomarcador compreende uma microvesícula. Em uma modalidade, a invenção fornece um método em que um conjunto de aptâmeros é usado para avaliar a presença e/ou o nível de uma população de microvesículas de interesse sem saber o antígeno de microvesícula exato alvejado por cada membro do conjunto. Consulte, por exemplo, as Figuras 15B e C. Em outros casos, os biomarcadores associados às microvesículas são avaliados de acordo com os métodos da invenção. Consulte, por exemplo, as Figuras 1A a 1F; a Figura 15A.

[00268] Uma bioassinatura que compreende mais de um biomarcador pode compreender um tipo de biomarcador ou múltiplos tipos de biomarcadores. Como um exemplo não limitante, uma bioassinatura pode compreender múltiplas proteínas, múltiplos ácidos nucleicos, múltiplos lipídeos, múltiplos carboidratos, múltiplos complexos de biomarcador, múltiplas microvesículas ou uma combinação de qualquer um dos mesmos. Por exemplo, a bioassinatura pode compreender

uma ou mais microvesícula, uma ou mais proteínas e um ou mais micro RNAs, em que a uma ou mais proteínas e/ou um ou mais micro RNAs estão opcionalmente em associação com a microvesícula como um antígeno de superfície e/ou carga útil, conforme apropriado.

[00269] Em algumas modalidades, as vesículas são detectadas com o uso de antígenos de superfície de vesícula. Um antígeno de superfície de vesícula comumente expresso pode ser referido como uma "proteína de manutenção", ou biomarcador de vesícula geral. O biomarcador pode ser CD63, CD9, CD81, CD82, CD37, CD53, Rab-5b, Anexina V ou MFG-E8. Tetraspaninas, uma família de proteínas de membrana com quatro domínios de transmembrana, podem ser usadas como biomarcadores de vesícula gerais. As tetraspaninas incluem CD151, CD53, CD37, CD82, CD81, CD9 e CD63. Há mais de 30 tetraspaninas identificadas em mamíferos, incluindo a TSPAN1 (TSP-1), TSPAN2 (TSP-2), TSPAN3 (TSP-3), TSPAN4 (TSP-4, NAG-2), TSPAN5 (TSP-5), TSPAN6 (TSP-6), TSPAN7 (CD231, TALLA-1, A15), TSPAN8 (CO-029), TSPAN9 (NET-5), TSPAN10 (Oculospanina), TSPAN11 (similar a CD151), TSPAN12 (NET-2), TSPAN13 (NET-6), TSPAN14, TSPAN15 (NET-7), TSPAN16 (TM4-B), TSPAN17, TSPAN18, TSPAN19, TSPAN20 (UP1b, UP 1B), TSPAN21 (UP1a, UP1A), TSPAN22 (RDS, PRPH2), TSPAN23 (ROM1), TSPAN24 (CD151), TSPAN25 (CD53), TSPAN26 (CD37), TSPAN27 (CD82), TSPAN28 (CD81), TSPAN29 (CD9), TSPAN30 (CD63), TSPAN31 (SAS), TSPAN32 (TSSC6), TSPAN33 e TSPAN34. Outros marcadores de vesícula comumente observados incluem aqueles listados na Tabela 3. Uma ou mais dessas proteínas podem ser biomarcadores úteis para a caracterização de um fenótipo com o isso dos métodos e composições em questão.

TABELA 3: PROTEÍNAS OBSERVADAS EM VESÍCULAS DE MÚLTIPLOS TIPOS DE CÉLULAS

Classe	Proteína
Apresentação de antígeno	MHC classe I, MHC classe II, Integrinas, Alfa 4 beta 1, Alfa M beta 2, Beta 2
Família de imunoglobulina	ICAM1/CD54, P-seleção
peptidases de superfície de célula	Dipeptidilpeptidase IV/CD26, Aminopeptidase n/CD13
Tetraspaninas	CD151, CD53, CD37, CD82, CD81, CD9 e CD63
Proteínas de choque térmico	Hsp70, Hsp84/90
Proteínas citoesqueléticas	Actina, Proteínas de ligação de actina, Tubulina
Transporte e fusão de membrana	Anexina I, Anexina II, Anexina IV, Anexina V, Anexina VI, RAB7/RAP1B/RADGDI
Transdução de sinal	Gi2alfa/14-3-3, CBL/LCK
Proteínas de membrana abundantes	CD63, GAPDH, CD9, CD81, ANXA2, ENO1, SDCBP, MSN, MFGE8, EZR, GK, ANXA1, LAMP2, DPP4, TSG101, HSPA1A, GDI2, CLTC, LAMP1, Cd86, ANPEP, TFRC, SLC3A2, RDX, RAP1B, RAB5C, RAB5B, MYH9, ICAM1, FN1, RAB11B, PIGR, LGALS3, ITGB1, EHD1, CLIC1, ATP1A1, ARF1, RAP1A, P4HB, MUC1, KRT10, HLA-A, FLOT1, CD59, Clorf58, BASP1, TACSTD1, STOM
Outras proteínas de transmembrana	Caderinas: CDH1, CDH2, CDH12, CDH3, Deomogleína, DSG1, DSG2, DSG3, DSG4, Desmocolina, DSC1, DSG2, DSG3, Protocaderinas, PCDH1, PCDH10, PCDH11x, PCDH11y, PCDH12, FAT, FAT2, FAT4, PCDH15, PCDH17, PCDH18, PCDH19; PCDH2O; PCDH7, PCDH8, PCDH9, PCDHAL PCDHA10, PCDHA11, PCDHAI2, PCDHA13, PCDHA2, PCDHA3, PCDHA4, PCDHA5, PCDHA6, PCDHA7, PCDHA8, PCDHA9, PCDHAC1, PCDHAC2, PCDHB1, PCDHB10, PCDHB11, PCDHB12, PCDHB13, PCDHB14, PCDHB15, PCDHB16, PCDHB17, PCDHB18, PCDHB2, PCDHB3, PCDHB4, PCDHB5, PCDHB6, PCDHB7, PCDHB8, PCDHB9, PCDHGA1, PCDHGA10, PCDHGA11, PCDHGAI2, PCDHGA2; PCDHGA3, PCDHGA4, PCDHGA5, PCDHGA6, PCDHGA7, PCDHGA8, PCDHGA9, PCDHGB1, PCDHGB2, PCDHGB3, PCDHGB4, PCDHGB5, PCDHGB6, PCDHGB7, PCDHGC3, PCDHGC4, PCDHGC5, CDH9 (caderina 9, tipo 2 (T1-caderina)), CDH10 (caderina 10, tipo 2 (T2-caderina)), CDH5 (VEcaderina (endotelial vascular)), CDH6 (K-caderina (rim)), CDH7 (caderina 7, tipo 2), CDH8 (caderina 8, tipo 2), CDH11 (OB-caderina (osteoblasto)), CDH13 (T-caderina - H-caderina (coração)), CDH15 (M-caderina (miotúbulo)), CDH16 (KSP-caderina), CDH17 (LI caderina (fígado-intestino)), CDH18 (caderina 18, tipo 2), CDH19 (caderina 19, tipo 2), CDH2O (caderina 20, tipo 2), CDH23 (caderina 23, (epitélio neurossensorial)), CDH10, CDH11, CDH13, CDH15, CDH16, CDH17, CDH18, CDH19, CDH2O, CDH22, CDH23, CDH24, CDH26, CDH28, CDH4, CDH5, CDH6, CDH7, CDH8, CDH9, CELSR1, CELSR2, CELSR3, CLSTN1, CLSTN2, CLSTN3, DCHS1, DCHS2, LOC389118, PCLKC, RESDA1, RET

[00270] Qualquer um dos tipos de biomarcadores descritos no pre-

sente documento pode ser usado e/ou avaliado por meio dos métodos e composições em questão. Os biomarcadores exemplificativos incluem, sem limitação, aqueles na Tabela 4. Os marcadores podem ser detectados como proteína ou como mRNA, que pode estar circulando livremente ou em um complexo com outras moléculas biológicas. Conforme apropriado, os marcadores na Tabela 4 podem ser também usados para captura e/ou detecção de vesículas para caracterizar fenótipos conforme revelado no presente documento. Em alguns casos, múltiplas capturas e/ou detectores são usados para intensificar a caracterização. Consulte, por exemplo, as Figuras 1C e 1E. Os marcadores podem ser detectores como antígenos de superfície de vesícula e/ou carga útil de vesícula. A "Classe Ilustrativa" indica indicações para as quais os marcadores são marcadores conhecidos. Aqueles versados na técnica perceberão que os marcadores podem ser também usados em definições alternativas em certos casos. Por exemplo, um marcador que pode ser usado para caracterizar um tipo de doença pode ser também usado para caracterizar outra doença conforme apropriado. Considera-se um exemplo não limitante de um marcador de tumor que pode ser usado como um biomarcador para tumores de várias linhagens. Os biomarcador referidos na Tabela 4 são aqueles comumente usados na técnica. Gene aliases e descrições podem ser encontradas com o uso de uma variedade de bancos de dados online, incluindo GeneCards® (www.genecards.org), HUGO Gene Nomenclature (www.genenames.org), Entrez Gene (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query. fcgi?db=gene), UniProt B/Swiss-Prot (www.uniprot.org), UniProtKB/TrEMBL (www.uniprot.org), OMIM (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM), GeneLoc (genecards.weizmann.ac.il/geneloc/) e Ensembl (www.ensembl.org). Em geral, os símbolos dos nomes de genes abaixo correspondem àqueles aprovados pelo HUGO e os nomes de proteínas são aqueles reco-

mendados pelo UniProtKB/Swiss-Prot. As alternativas comuns são também fornecidas. Em alguns casos, os biomarcadores são referidos pelos números de referência Ensembl, que são da forma "ENSG" seguida por um número, por exemplo, ENSG00000005893, que corresponde a LAMP2. Na Tabela 4, apenas para fins de brevidade, "E." É algumas vezes usado para representar "ENSG00000". Por exemplo, "E.005893" representa "ENSG00000005893". Em que um nome de proteína indica um precursor, a proteína madura está também implicada. Por todo o pedido, os símbolos de gene e proteína podem ser usados de modo intercambiável e o significado pode ser derivado do contexto, conforme necessário.

TABELA 4: BIOMARCADORES ILUSTRATIVOS

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Alvos associados a fármaco e marcadores prognósticos	ABCC1, ABCG2, ACE2, ADA, ADH1C, ADH4, AGT, AR, AREG, ASNS, BCL2, BCRP, BDCA1, beta III tubulina, BIRC5, B-RAF, BRCA1, BRCA2, CA2, caveolina, CD20, CD25, CD33, CD52, CDA, CDKN2A, CDKN1A, CDKN1B, CDK2, CDW52, CES2, CK 14, CK 17, CK 5/6, c-KIT, c-Met, c-Myc, COX-2, Cyclin D1, DCK, DHFR, DNMT1. DNMT3A, DNMT3B, E-Caderina, ECGF1, EGFR, fusão de EML4-ALK, EPHA2, Epiregilina, ER, ERBR2, ERCC1, ERCC3, EREG, ESR1, FLT1, receptor de folato, OLR1, FOLR2, FSHB, FSHPRH1, FSHR, FYN, GART, GNA11, GNAQ, GNRH1, GNRHR1, GSTP1, HCK, HDAC1, hENT-1, Her2/Neu, HGF, HIF1A, HIG1, HSP90, HSP90AA1, HSPCA, IGF-1R, IGFRBP, IGFRBP3, IGFRBP4, IGFRBP5, IL13RA1, IL2RA, KDR, Ki67, KIT, K-RAS, LCK, LTB, Beta Receptor de Linfotoxina, LYN, MET, MGMT, MLH1, MMR, MRP1, MS4A1, MSH2, MSH5, Myc, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NRAS, ODC1, OGFR, p16, p21, p27, p53, p95, PARP-1, PDGFC, PDGFR, PDGFRA, PDGFRB, PGP, PGR, PI3K, POLA, POLA1, PPARG, PPARGC1, PR, PTEN, PTGS2, PTPN12, RAF1, RARA, ROS1, RRM1, RRM2, RRM2B, RXRB, RXRG, SIK2, SPARC, SRC, SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4, SSTR5, Survivina, TK1, TLE3, TNF, TOP1, TOP2A, TOP2B, TS, TUBB3, TXN, TXNRD1, TYMS, VDR, VEGF, VEGFA, VEGFC, VHL, YES1, ZAP70
Alvos associados a fármaco e marcadores prognósticos	ABL1, STK11, FGFR2, ERBB4, SMARCB1, CDKN2A, CTNNB1, FGFR1, FLT3, NOTCH1, NPM1, SRC, SMAD4, FBXW7, PTEN, TP53, AKT1, ALK, APC, CDH1, C-Met, HRAS, IDH1, JAK2, MPL, PDGFRA, SMO, VHL, ATM, CSF1R, FGFR3, GNAS, ERBB2, HNF1A, JAK3, KDR, MLH1, PTPN11, RB1, RET, c-Kit, EGFR, PIK3CA, NRAS, GNA11, GNAQ, KRAS, BRAF
Alvos associados a fármaco e marcadores prognósticos	ALK, AR, BRAF, cKIT, cMET, EGFR, ER, ERCC1, GNA11, HER2, IDH1, KRAS, MGMT,, metilação de promotor MGMT, NRAS, PDGFRA, Pgp, PIK3CA, PR, PTEN, ROS1, RRM1, SPARC, TLE3, TOP2A, TOPO1, TS, TUBB3, VHL
Alvos associados a fármaco e marcadores prognósticos	AR, cMET, EGFR, ER, HER2, MGMT, Pgp, PR, PTEN, RRM1, SPARC, TLE3, TOPO1, TOP2A. TS, TUBB3, ALK, cMET, HER2, ROS1, TOP2A, BRAF, IDH2, metilação de MGMT, ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2 (HER2), ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, JAK2, JAK3, KDR (VEGFR2), KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1. SMO. STK11. TP53. VHL
Eficácia do ácido 5-aminossalicíclico (5-ASA)	μ-protocaderina, KLF4, CEBPα

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Marcadores associados ao tratamento de câncer	AR, AREG (Anfiregulina), BRAF, BRCA1, cKIT, cMET, EGFR, EGFR com T790M, EML4-ALK, ER, ERBB3, ERBB4, ERCC1, EREG, GNA11, GNAQ, hENT-1, Her2, inserto de Her2 Exon 20, IGF1R, Ki67, KRAS, MGMT, metilação de MGMT, MSH2, MSI, NRAS, PGP (MDR1), PIK3CA, PR, PTEN, ROS1, translocação de ROS1, RRM1, SPARC, TLE3, TOPO1, TOPO2A, TS, TUBB3, VEGFR2
Marcadores associados ao tratamento de câncer	AR, AREG, BRAF, BRCA1, cKIT, cMET, EGFR, EGFR com T790M, EML4-ALK, ER, ERBB3, ERBB4, ERCC1, EREG, GNA11, GNAQ, Her2, inserto de Her2 Exon 20, GFR1, Ki67, KRAS, MGMT-Me, MSH2, MSI, NRAS, PGP (MDR-1), PIK3CA, PR, PTEN, translocação de ROS1, RRM1, SPARC, TLE3, TOPO1, TOPO2A, TS, TUBB3, VEGFR2
Marcadores associados ao tratamento de câncer de cólon	AREG, BRAF, EGFR, EML4-ALK, ERCC1, EREG, KRAS, MSI, NRAS, PIK3CA, PTEN, TS, VEGFR2
Marcadores associados ao tratamento de câncer de cólon	AREG, BRAF, EGFR, EML4-ALK, ERCC1, EREG, KRAS, MSI, NRAS, PIK3CA, PTEN, TS, VEGFR2
Marcadores associados ao tratamento de melanoma	BRAF, cKIT, ERBB3, ERBB4, ERCC1, GNA11, GNAQ, MGMT, metilação de MGMT, NRAS, PIK3CA, TUBB3, VEGFR2
Marcadores associados ao tratamento de melanoma	BRAF, cKIT, ERBB3, ERBB4, ERCC1, GNA11, GNAQ, MGMT-Me, NRAS, PIK3CA, TUBB3, VEGFR2
Marcadores associados ao tratamento de câncer de ovário	BRCA1, cMET, EML4-ALK, ER, ERBB3, ERCC1, hENT-1, HER2, IGF1R, PGP(MDR1), PIK3CA, PR, PTEN, RRM1, TLE3, TOPO1, TOPO2A, TS
Marcadores associados ao tratamento de câncer de ovário	BRCA1, cMET, EML4-ALK (translocação), ER, ERBB3, ERCC1, HER2, PIK3CA, PR, PTEN, RRM1, TLE3, TS
Marcadores associados ao tratamento de câncer de mama	BRAF, BRCA1, EGFR, EGFR T790M, EML4-ALK, ER, ERBB3, ERCC1, HER2, Ki67, PGP (MDR1), PIK3CA, PR, PTEN, ROS1, translocação de ROS1, RRM1, TLE3, TOPO1, TOPO2A, TS
Marcadores associados ao tratamento de câncer de mama	BRAF, BRCA1, EGFR w/T790M, EML4-ALK, ER, ERBB3, ERCC1, HER2, Ki67, KRAS, PIK3CA, PR, PTEN, translocação de ROS1, RRM1, TLE3, TOPO1, TOPO2A, TS
Marcadores associados ao tratamento de câncer NSCLC	BRAF, BRCA1, cMET, EGFR, EGFR com T790M, EML4-ALK, ERCC1, inserto de Her2 Exon 20, KRAS, MSH2, PIK3CA, PTEN, ROS1 (trans), RRM1, TLE3, TS, VEGFR2
Marcadores associados ao tratamento de câncer NSCLC	BRAF, cMET, EGFR, EGFR com T790M, EML4-ALK, ERCC1, inserto de Her2 Exon 20, KRAS, MSH2, PIK3CA, PTEN, translocação de ROS1, RRM1, TLE3, TS

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Com mutação em cânceres	AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, c-Kit, C-Met, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, JAK2, JAK3, KDR, KRAS, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, VHL
Com mutação em cânceres	ALK, BRAF, BRCA1, BRCA2, EGFR, ERRB2, GNA11, GNAQ, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RET, SRC, TP53
Com mutação em cânceres	AKT1, HRAS, GNAS, MEK1, MEK2, ERK1, ERK2, ERBB3, CDKN2A, PDGFRB, IFG1R, FGFR1, FGFR2, FGFR3, ERBB4, SMO, DDR2, GRB1, PTCH, SHH, PD1, UGT1A1, BIM, ESR1, MLL, AR, CDK4, SMAD4
Com mutação em cânceres	ABL, APC, ATM, CDH1, CSFR1, CTNNB1, FBXW7, FLT3, HNF1A, JAK2, JAK3, KDR, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, PTPN11, RB1, SMARCB1, STK11, VHL
Com mutação em cânceres	ABL1, AKT1, AKT2, AKT3, ALK, APC, AR, ARAF, ARFRP1, ARID1A, ARID2, ASXL1, ATM, ATR, ATRX, AURKA, AURKB, AXL, BAP1, BARD1, BCL2, BCL2L2, BCL6, BCOR, BCORL1, BLM, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BTK, CARD11, CBFB, CBL, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD79A, CD79B, CDC73, CDH1, CDK12, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CEBPA, CHEK1, CHEK2, CIC, CREBBP, CRKL, CRLF2, CSF1R, CTCF, CTNNA1, CTNNB1, DAXX, DDR2, DNMT3A, DOT1L, EGFR, EMSY (C11orf30), EP300, EPHA3, EPHA5, EPHB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERG, ESR1, EZH2, FAM123B (WTX), FAM46C, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FBXW7, FGF10, FGF14, FGF19, FGF23, FGF3, FGF4, FGF6, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT1, FLT3, FLT4, FOXL2, GATA1, GATA2, GATA3, GID4 (C17orf39), GNA11, GNA13, GNAQ, GNAS, GPR124, GRIN2A, GSK3B, HGF, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1R, IKBKE, IKZF1, IL7R, INHBA, IRF4, IRS2, JAK1, JAK2, JAK3, JUN, KAT6A (MYST3), KDM5A, KDM5C, KDM6A, KDR, KEAP1, KIT, KLHL6, KRAS, LRP1B, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAP3K1, MCL1, MDM2, MDM4, MED12, MEF2B, MEN1, MET, MITF, MLH1, MLL, MLL2, MPL, MRE11A, MSH2, MSH6, MTOR, MUTYH, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, NF1, NF2, NFE2L2, NFKBIA, NKX2-1, NOTCH1, NOTCH2, NPM1, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, NUP93, PAK3, PALB2, PAX5, PBRM1, PDGFRA, PDGFRB, PDK1, PIK3CA, PIK3CG, PIK3R1, PIK3R2, PPP2R1A, PRDM1, PRKAR1A, PRKDC, PTCH1, PTEN, PTPN11, RAD50, RAD51, RAF1, RARA, RB1, RET, RICTOR, RNF43, RPTOR, RUNX1, SETD2, SF3B1, SMAD2, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMO, SOCS1, SOX10, SOX2, SPEN, SPOP, SRC, STAG2, STAT4, STK11, SUFU, TET2, TGFBR2, TNFAIP3, TNFRSF14, TOP1, TP53, TSC1, TSC2, TSHR, VHL, WISP3, WT1, XPO1, ZNF217, ZNF703
Rearranjo de gene em câncer	ALK, BCR, BCL2, BRAF, EGFR, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EWSR1, MLL, MYC, NTRK1, PDGFRA, RAF1, RARA, RET, ROS1, TMPRSS2
Relacionado a câncer	ABL1, ACE2, ADA, ADH1C, ADH4, AGT, AKT1, AKT2, AKT3, ALK, APC, AR, ARAF, AREG, ARFRP1, ARID1A, ARID2, ASNS, ASXL1, ATM, ATR, ATRX, AURKA, AURKB, AXL, BAP1, BARD1, BCL2, BCL2L2, BCL6, BCOR, BCORL1, BCR, BIRC5 (survivina), BLM, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BTK, CA2, CARD11, CAV, CBFB, CBL, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD33, CD52 (CDW52), CD79A, CD79B, CDC73, CDH1, CDK12, CDK2, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CEBPA, CES2, CHEK1, CHEK2, CIC, CREBBP, CRKL, CRLF2, CSF1R, CTCF, CTNNA1, CTNNB1, DAXX, DCK, DDR2, DHFR, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DOT1L, EGFR, EMSY (C11orf30) , EP300, EPHA2, EPHA3, EPHA5, EPHB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERBR2 (typo?), ERCC3, EREG, ERG, ESR1, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6 EWSR1, EZH2, FAM123B (WTX), FAM46C, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FBXW7, FGF10, FGF14, FGF19, FGF23, FGF3, FGF4, FGF6, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT1, FLT3, FLT4, FOLR1, FOLR2, FOXL2, FSHB, FSHPRH1, FSHR, GART, GATA1, GATA2, GATA3, GID4 (C17orf39), GNA11, GNA13,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	GNAQ, GNAS, GNRH1, GNRHR1, GPR124, GRIN2A, GSK3B, GSTP1, HDAC1, HGF, HIG1, HNF1A, HRAS, HSPCA (HSP90), IDH1, IDH2, IGF1R, IKBKE, IKZF1, IL13RA1, IL2, IL2RA (CD25), IL7R, INHBA, IRF4, IRS2, JAK1, JAK2, JAK3, JUN, KAT6A (MYST3), KDM5A, KDM5C, KDM6A, KDR (VEGFR2), KEAP1, KIT, KLHL6, KRAS, LCK, LRP1B, LTB, LTBR, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAP3K1, MAPK, MCL1, MDM2, MDM4, MED12, MEF2B, MEN1, MET, MGMT, MITF, MLH1, MLL, MLL2, MPL, MRE11A, MS4A1 (CD20), MSH2, MSH6, MTAP, MTOR, MUTYH, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, NF1, NF2, NFE2L2, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NGF, NKX2-1, NOTCH1, NOTCH2, NPM1, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, NUP93, ODC1, OGFR, PAK3, PALB2, PAX5, PBRM1, PDGFC, PDGFRA, PDGFRB, PDK1, PGP, PGR (PR), PIK3CA, PIK3CG, PIK3R1, PIK3R2, POLA, PPARG, PPARGC1, PPP2R1A, PRDM1, PRKAR1A, PRKDC, PTCH1, PTEN, PTPN11, RAD50, RAD51, RAF1, RARA, RB1, RET, RICTOR, RNF43, ROS1, RPTOR, RRM1, RRM2, RRM2B, RUNX1, RXR, RXRB, RXRG, SETD2, SF3B1, SMAD2, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1 , SMO, SOCS1, SOX10, SOX2, SPARC, SPEN, SPOP, SRC, SST, SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4, SSTR5, STAG2, STAT4, STK11, SUFU , TET2, TGFBR2, TK1, TLE3, TMPRSS2, TNF, TNFAIP3, TNFRSF14, TOP1, TOP2, TOP2A, TOP2B, TP53, TS, TSC1, TSC2, TSHR, TUBB3, TXN, TYMP, VDR, VEGF (VEGFA), VEGFC, VHL, WISP3, WT1, XDH, XPO1, YES1, ZAP70, ZNF217, ZNF703
Citoadesões	citoesina-1 (CYTH1), citoesina-2 (CYTH2; ARNO), citoesina-3 (CYTH3; Grp1; ARNO3), citoesina-4 (CYTH4)
Câncer/Angio	Erb 2, Erb 3, Erb 4, UNC93a, B7H3, MUC1, MUC2, MUC16, MUC17, 5T4, RAGE, VEGF A, VEGFR2, FLT1, DLL4, Epcam
Tecido (Mama)	BIG H3, GCDFP-15, PR(B), GPR 30, CYFRA 21, BRCA 1, BRCA 2, ESR 1, ESR2
Tecido (Próstata)	PSMA, PCSA, PSCA, PSA, TMPRSS2
Inflamação/Imune	MFG-E8, IFNAR, CD40, CD80, MICB, HLA-DRb, IL-17-Ra
Marcadores de vesícula comuns	HSPA8, CD63, Actb, GAPDH, CD9, CD81, ANXA2, HSP90AA1, ENO1, YWHAZ, PDCD6IP, CFL1, SDCBP, PKN2, MSN, MFGE8, EZR, YWHAG, PGK1, EEF1A1, PPIA, GLC1F, GK, ANXA6, ANXA1, ALDOA, ACTG1, TPI1, LAMP2, HSP90AB1, DPP4, YWHAB, TSG101, PFN1, LDHB, HSPA1B, HSPA1A, GSTP1, GNAI2, GDI2, CLTC, ANXA5, YWHAQ, TUBA1A, THBS1, PRDX1, LDHA, LAMP1, CLU, CD86
Marcadores de vesícula comuns	CD63, GAPDH, CD9, CD81, ANXA2, ENO1, SDCBP, MSN, MFGE8, EZR, GK, ANXA1, LAMP2, DPP4, TSG101, HSPA1A, GDI2, CLTC, LAMP1, CD86, ANPEP, TFRC, SLC3A2, RDX, RAP1B, RAB5C, RAB5B, MYH9, ICAM1, FN1, RAB11B, PIGR, LGALS3, ITGB1, EHD1, CLIC1, ATP1A1, ARF1, RAP1A, P4HB, MUC1, KRT10, HLA-A, FLOT1, CD59, C1orf58, BASP1, TACSTD1, STOM
Marcadores de vesícula comuns	MHC classe I, MHC classe II, Integrinas, Alfa 4 beta 1, Alfa M beta 2, Beta 2, ICAM1/CD54, P-seleção, Dipeptidilpeptidade IV/CD26, Aminopeptidase n/CD13, CD151, CD53, CD37, CD82, CD81, CD9, CD63, Hsp70, Hsp84/90 Actina, Proteínas de ligação de actina, Tubulina, Anexina II, Anexina IV, Anexina V, Anexina VI, RAB7/RAP1B/RADGDI, Gi2alfa/14-3-3, CBL/LCK, CD63, GAPDH, CD9, CD81, ANXA2, ENO1, SDCBP, MSN, MFGE8, EZR, GK, ANXA1, LAMP2, DPP4, TSG101, HSPA1A, GDI2, CLTC, LAMP1, Cd86, ANPEP, TFRC, SLC3A2, RDX, RAP1B, RAB5C, RAB5B, MYH9, ICAM1, FN1, RAB11B, PIGR, LGALS3, ITGB1, EHD1, CLIC1, ATP1A1, ARF1, RAP1A, P4HB, MUC1, KRT10, HLA-A, FLOT1, CD59, C1orf58, BASP1, TACSTD1, STOM
Marcadores de vesícula	A33, a33 n15, AFP, ALA, ALIX, ALP, Anexina V, APC, ASCA, ASPH (246-260), ASPH (666-680), ASPH (A-10), ASPH (D01P), ASPH (D03), ASPH (G-20), ASPH (H-300), AURKA, AURKB, B7H3, B7H4, BCA-225, BCNP, BDNF, BRCA, CA125 (MUC16), CA-19-9, C-Bir, CD1.1, CD10, CD174 (Lewis y), CD24, CD44, CD46, CD59 (MEM-43), CD63, CD66e CEA, CD73, CD81, CD9, CDA, CDAC1 1a2, CEA, C-Erb2, C-erbB2, CRMP-2, CRP, CXCL12, CYFRA21-1, DLL4, DR3, EGFR, Epcam, EphA2, EphA2 (H-77), ER, ErbB4, EZH2, FASL, FRT, FRT c.f23, GDF15, GPCR, GPR30, Gro-alfa, HAP, HBD 1, HBD2, HER 3 (ErbB3), HSP, HSP70, hVEGFR2, iC3b, IL 6 Unc, IL-1B, IL6 Unc, IL6R, IL8, IL-8, INSIG-2, KLK2, L1CAM, LAMN, LDH, MACC-1, MAPK4, MART-1, MCP-1, M-CSF, MFG-E8, MIC1, MIF, MIS RII, MMG, MMP26, MMP7, MMP9, MS4A1, MUC1, MUC1 seq1, MUC1 seq11A, MUC17, MUC2, Ncam, NGAL, NPGP/NPFF2, OPG, OPN, p53, p53, PA2G4, PBP, PCSA, PDGFRB, PGP9.5, PIM1, PR (B), PRL, PSA, PSMA, PSME3, PTEN, R5-CD9 Tubo 1, Reg IV, RUNX2, SCRN1, seprase, SERPINB3, SPARC,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Marcadores de vesícula	NSE, TRIM29, CD63, CD151, ASPH, LAMP2, TSPAN1, SNAIL, CD45, CKS1, NSE, FSHR, OPN, FTH1, PGP9, ANNEXIN 1, SPD, CD81, EPCAM, PTH1R, CEA, CYTO 7, CCL2, SPA, KRAS, TWIST1, AURKB, MMP9, P27, MMP1, HLA, HIF, CEACAM, CENPH, BTUB, INTG b4, EGFR, NACC1, CYTO 18, NAP2, CYTO 19, ANNEXIN V, TGM2, ERB2, BRCA1, B7H3, SFTPC, PNT, NCAM, MS4A1, P53, INGA3, MUC2, SPA, OPN, CD63, CD9, MUC1, UNCR3, PAN ADH, HCG, TIMP, PSMA, GPCR, RACK1, PSCA, VEGF, BMP2, CD81, CRP, PRO GRP, B7H3, MUC1, M2PK, CD9, PCSA, PSMA
Marcadores de vesícula	TFF3, MS4A1, EphA2, GAL3, EGFR, N-gal, PCSA, CD63, MUC1, TGM2, CD81, DR3, MACC-1, TrKB, CD24, TIMP-1, A33, CD66 CEA, PRL, MMP9, MMP7, TMEM211, SCRN1, TROP2, TWEAK, CDACC1, UNC93A, APC, C-Erb, CD10, BDNF, FRT, GPR30, P53, SPR, OPN, MUC2, GRO-1, tsg 101, GDF15
Marcadores de vesícula	CD9, Erb2, Erb4, CD81, Erb3, MUC16, CD63, DLL4, HLA-Drpe, B7H3, IFNAR, 5T4, PCSA, MICB, PSMA, MFG-E8, Muc1, PSA, Muc2, Unc93a, VEGFR2, EpCAM, VEGF A, TMPRSS2, RAGE, PSCA, CD40, Muc17, IL-17-RA, CD80
Hiperplasia de próstata benigna (BPH)	BCMA, CEACAM-1, HVEM, IL-1 R4, IL-10 Rb, Trappin-2, p53, hsa-miR-329, hsa-miR-30a, hsa-miR-335, hsa-miR-152, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-200a, hsa-miR-145, hsa-miR-29a, hsa-miR-106b, hsa-miR-595, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-99a, hsa-miR-20b, hsa-miR-373, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-29b, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-663, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-15a, hsa-miR-888, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-365, hsa-miR-10b, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-181a, hsa-miR-19a, hsa-miR-125b, hsa-miR-760, hsa-miR-7a, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-7c, hsa-miR-1979, hsa-miR-103
Câncer de próstata metastático	hsa-miR-100, hsa-miR-1236, hsa-miR-1296, hsa-miR-141, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-17*, hsa-miR-181a, hsa-miR-200b, hsa-miR-20a*, hsa-miR-23a*, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-452, hsa-miR-572, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-577, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-937, miR-10a, miR-134, miR-141, miR-200b, miR-30a, miR-32, miR-375, miR-495, miR-564, miR-570, miR-574-3p, miR-885-3p
Câncer de próstata metastático	hsa-miR-200b, hsa-miR-375, hsa-miR-141, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-181a, hsa-miR-574-3p
Câncer de próstata	hsa-miR-574-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-432, hsa-miR-326, hsa-miR-2110, hsa-miR-181a-2*, hsa-miR-107, hsa-miR-301a, hsa-miR-484, hsa-miR-625*
Câncer de próstata metastático	hsa-miR-582-3p, hsa-miR-20a*, hsa-miR-375, hsa-miR-200b, hsa-miR-379, hsa-miR-572, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-577, hsa-miR-23a*, hsa-miR-1236, hsa-miR-609, hsa-miR-17*, hsa-miR-130b, hsa-miR-619, hsa-miR-624*, hsa-miR-198
Câncer de próstata metastático	FOX01A, SOX9, CLNS1A, PTGDS, XPO1, LETMD1, RAD23B, ABCC3, APC, CHES1, EDNRA, FRZB, HSPG2, Fusão de TMPRSS2_ETV1
Câncer de próstata	hsa-let-7b, hsa-miR-107, hsa-miR-1205, hsa-miR-1270, hsa-miR-130b, hsa-miR-141, hsa-miR-143, hsa-miR-148b*, hsa-miR-150, hsa-miR-154*, hsa-miR-181a*, hsa-miR-181a-2*, hsa-miR-18a*, hsa-miR-19b-1*, hsa-miR-204, hsa-miR-2110, hsa-miR-215, hsa-miR-217, hsa-miR-219-2-3p, hsa-miR-23b*, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-301a, hsa-miR-301a, hsa-miR-326, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-365*, hsa-miR-373*, hsa-miR-424, hsa-miR-424*, hsa-miR-432, hsa-miR-450a, hsa-miR-451, hsa-miR-484, hsa-miR-497, hsa-miR-517*, hsa-miR-517a, hsa-miR-518f, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-595, hsa-miR-617, hsa-miR-625*, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-629, hsa-miR-634, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-93, hsa-miR-96
Câncer de próstata	CD9, PSMA, PCSA, CD63, CD81, B7H3, IL 6, OPG-13, IL6R, PA2G4, EZH2, RUNX2, SERPINB3, EpCam
Câncer de próstata	A33, a33 n15, AFP, ALA, ALIX, ALP, Anexina V, APC, ASCA, ASPH (246-260), ASPH (666-680), ASPH (A-10), ASPH (D01P), ASPH (D03), ASPH (G-20), ASPH (H-300), AURKA, AURKB, B7H3, B7H4, BCA-225, BCNP, BDNF, BRCA, CA125 (MUC16), CA-19-9, C-Bir, CD1.1, CD10, CD174 (Lewis y), CD24, CD44, CD46, CD59 (MEM-43), CD63, CD66e CEA, CD73, CD81, CD9, CDA, CDAC1 1a2, CEA, C-Erb2, C-erbB2, CRMP-2, CRP, CXCL12, CYFRA21-1, DLL4, DR3, EGFR, Epcam, EphA2, EphA2 (H-77), ER, ErbB4, EZH2, FASL, FRT, FRT c.f23, GDF15, GPCR, GPR30, Gro-alfa, HAP, HBD 1, HBD2, HER 3 (ErbB3), HSP, HSP70, hVEGFR2, iC3b, IL 6 Unc, IL-1B, IL6 Unc, IL6R, IL8, IL-8, INSIG-2, KLK2, L1CAM, LAMN, LDH, MACC-1, MAPK4, MART-1, MCP-1, M-CSF, MFG-E8, MIC1, MIF, MIS RII, MMG, MMP26, MMP7, MMP9, MS4A1, MUC1, MUC1 seq1, MUC1 seq11A, MUC17, MUC2, Ncam, NGAL, NPGP/NPFF2, OPG, OPN, p53, p53, PA2G4, PBP, PCSA, PDGFRB, PGP9.5, PIM1, PR (B), PRL, PSA, PSMA, PSME3, PTEN, R5-CD9 Tubo 1, Reg IV, RUNX2, SCRN1, seprase, SERPINB3, SPARC, SPB, SPDEF, SRVN, STAT 3, STEAP1, TF (FL-295), TFF3, TGM2, TIMP-1, TIMP1, TIMP2, TMEM211, TMPRSS2, TNF-alfa, Trail-R2, Trail-R4, TrKB, TROP2, Tsg 101, TWEAK, UNC93A, VEGF A, YPSMA-1

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Marcadores de vesícula de câncer de próstata	5T4, ACTG1, ADAM10, ADAM15, ALDOA, ANXA2, ANXA6, APOA1, ATP1A1, BASP1, C1orf58, C20orf114, C8B, CAPZA1, CAV1, CD151, CD2AP, CD59, CD9, CD9, CFL1, CFP, CHMP4B, CLTC, COTL1, CTNND1, CTSB, CTSZ, CYCS, DPP4, EEF1A1, EHD1, ENO1, F11R, F2, F5, FAM125A, FNBP1L, FOLH1, GAPDH, GLB1, GPX3, HIST1H1C, HIST1H2AB, HSP90AB1, HSPA1B, HSPA8, IGSF8, ITGB1, ITIH3, JUP, LDHA, LDHB, LUM, LYZ, MFGE8, MGAM, MMP9, MYH2, MYL6B, NME1, NME2, PABPC1, PABPC4, PACSIN2, PCBP2, PDCD6IP, PRDX2, PSA, PSMA, PSMA1, PSMA2, PSMA4, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB2, PSMB3, PSMB4, PSMB5, PSMB6, PSMB8, PTGFRN, RPS27A, SDCBP, SERINC5, SH3GL1, SLC3A2, SMPDL3B, SNX9, TACSTD1, TCN2, THBS1, TPI1, TSG101, TUBB, VDAC2, VPS37B, YWHAG, YWHAQ, YWHAZ
Marcadores de vesícula de câncer de próstata	FLNA, DCRN, HER 3 (ErbB3), VCAN, CD9, GAL3, CDADC1, GM-CSF, EGFR, RANK, CSA, PSMA, IgY de galinha, B7H3, PCSA, CD63, CD3, MUC1, TGM2, CD81, S100-A4, MFG-E8, Integrina, NK-2R(C-21), PSA, CD24, TIMP-1, IL6 Unc, PBP, PIM1, CA-19-9, Trail-R4, MMP9, PRL, EphA2, TWEAK, NY-ESO-1, Mamaglobina, UNC93A, A33, AURKB, CD41, XAGE-1, SPDEF, AMACR, seprase/FAP, NGAL, CXCL12, FRT, CD66e CEA, SIM2 (C-15), C-Bir, STEAP, PSIP1/LEDGF, MUC17, hVEGFR2, ERG, MUC2, ADAM10, ASPH (A-10), CA125, Gro-alfa, Tsg 101, SSX2, Trail-R4
Marcadores de vesícula de câncer de próstata	NT5E (CD73), A33, ABL2, ADAM10, AFP, ALA, ALIX, ALPL, AMACR, Apo J/CLU, ASCA, ASPH (A-10), ASPH (D01P), AURKB, B7H3, B7H4, BCNP, BDNF, CA125 (MUC16), CA-19-9, C-Bir (Flangelina), CD10, CD151, CD24, CD3, CD41, CD44, CD46, CD59(MEM-43), CD63, CD66e CEA, CD81, CD9, CDA, CDADC1, C-erbB2, CRMP-2, CRP, CSA, CXCL12, CXCR3, CYFRA21-1, DCRN, DDX-1, DLL4, EGFR, EpCAM, EphA2, ERG, EZH2, FASL, FLNA, FRT, GAL3, GATA2, GM-CSF, Gro-alfa, HAP, HER3 (ErbB3), HSP70, HSPB1, hVEGFR2, iC3b, IL-1B, IL6 R, IL6 Unc, IL7 R alfa/CD127, IL8, INSIG-2, Integrina, KLK2, Identificação, LAMN, Mamaglobina, M-CSF, MFG-E8, MIF, MIS RII, MMP7, MMP9, MS4A1, MUC1, MUC17, MUC2, Ncam, NDUFB7, NGAL, NK-2R(C-21), NY-ESO-1, p53, PBP, PCSA, PDGFRB, PIM1, PRL, PSA, PSIP1/LEDGF, PSMA, RAGE, RANK, Reg IV, RUNX2, S100-A4, seprase/FAP, SERPINB3, SIM2 (C-15), SPARC, SPC, SPDEF, SPP1, SSX2, SSX4, STEAP, STEAP4, TFF3, TGM2, TIMP-1, TMEM211, Trail-R2, Trail-R4, TrKB (poly), Trop2, Tsg 101, TWEAK, UNC93A, VCAN, VEGF A, wnt-5a(C-16), XAGE, XAGE-1
Membrana de vesícula de próstata	ADAM 9, ADAM10, AGR2, ALDOA, ALIX, ANXA1, ANXA2, ANXA4, ARF6, ATP1A3, B7H3, BCHE, BCL2L14 (Bcl G), BCNP1, BDKRB2, BDNFCAV1-Caveolina1, receptor 2 de CC quimiocina, CD192), CCR5 (receptor 5 de CC quimiocina), CCT2 (TCP1-beta), CD10, CD151, CD166/ALCAM, CD24, CD283/TLR3, CD41, CD46, CD49d (Integrina alfa 4, ITGA4), CD63, CD81, CD9, CD90/THY1, CDH1, CDH2, CDKN1A inibidor de quinase dependente de ciclina CDKN1A (p21), CGA gene (codificação para a subunidade alfa de hormônios de glicoproteína), CLDN3-Claudina3, COX2 (PTGS2), CSE1L (Susceptibilidade à Apoptose Celular), CXCR3, Cetoqueratina 18, Eag1 (KCNH1), EDIL3 (del-1), EDNRB - Receptor Edotelial Tipo B, EGFR, EpoR, EZH2 (intensificador de Homólogo 2 de Zeste), EZR, FABP5, Farnesiltransferase/geranilgeranil difosfato sintase 1 (GGPS1), Ácido graxo sintase (FASN), FTL (leve e pesado), GAL3, GDF15-Fator de Diferenciação de Crescimento 15, GloI, GM-CSF, GSTP1, H3F3A, HGF (fator de crescimento de hepatócito), hK2 / Kif2a, HSP90AA1, HSPA1A / HSP70-1, HSPB1, IGFBP-2, IGFBP-3, IL1 alfa, IL-6, IQGAP1, ITGAL (cadeia L de integrina alfa), Ki67, KLK1, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, Lamp-2, LDH-A, LGALS3BP, LGALS8, MMP 1, MMP 2, MMP 25, MMP 3, MMP10, MMP-14/MT1-MMP, MMP7, MTA1nAnS, Nav1.7, NKX3-1, Notch1, NRP1 / CD304, PAP (ACPP), PGP, PhIP, PIP3 / BPNT1, PKM2, PKP1 (placofilina1), PKP3 (placofilina3), cromogranina A plasmática (CgA), PRDX2, Proteína secretória da próstata (PSP94)/β-Microseminoproteína (MSP) / IGBF, PSAP, PSMA, PSMA1, PTENPTPN13/PTPL1, RPL19, seprase/FAPSET, SLC3A2 / CD98, SRVN, STEAP1, Sindecano / CD138, TGFB, TGM2, TIMP-1TLR4 (CD284), TLR9 (CD289), TMPRSS1 / hepsina, TMPRSS2, TNFR1, TNFα, Receptor de transferrina/CD71/TRFR, Trop2 (TACSTD2), TWEAK uPA (ativador de plasminogênio de uroquinase) degrada a matriz extracelular, uPAR (receptor de uPA) / CD87, VEGFR1, VEGFR2
Vesícula de próstata	ADAM 34, ADAM 9, AGR2, ALDOA, ANXA1, ANXA 11, ANXA4, ANXA 7, ANXA2,
Marcadores	ARF6, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, BCHE, BCL2L14 (Bel G), BDKRB2, CA215, CAV1-Caveolina1, CCR2 (receptor 2 de CC quimiocina, CD192), CCR5 (receptor 5 de CC quimiocina), CCT2 (TCP1-beta), CD166/ALCAM, CD49b (Integrina alfa 2, ITGA4), CD90/THY1, CDH1, CDH2, inibidor de quinase dependente de ciclina CDKN1A (p21), Gene CGA (codificação para a subunidade alfa de hormônios de glicoproteína), CHMP4N, CLDN3- Claudina3, CLSTN1 (Calsinterina 1), COX2 (PTGS2), CSE1L (Susceptibilidade à Apoptose Celular), Cetoqueratina 18, Eag1

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	(KCNH1) (membrana plasmática-K+-canal ligado por voltagem), EDIL3 (del-1), EDNRB- Receptor endotelial Tipo B, Endoglina/CD105, ENOX2 – Trocador 2 de dissulfeto tiol Ecto-NOX, Antígeno 2 de câncer de próstata precoce EPCA-2, EpoR, EZH2 (intensificador de Homólogo 2 de Zeste), EZR, FABP5, Farnesiltransferase/geranilgeranil difosfato sintase 1 (GGPS1), Ácido graxo sintase (FASN, proteína de membrana plasmática), FTL (leve e pesado), GDF15-fator de diferenciação de crescimento 15, Glo1 GSTP1, H3F3A, HGF (fator de crescimento de hepatócito), hK2 (KLK2), HSP90AA1, HPA1A / HSP70-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IL1 alfa, IL-6. IQGAP1, ITGAL (cadeia L de integrina alfa), Ki67, KLK1, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, Lamp-2, LDH-A, LGALS3BP, LGALS8, MFAP5, MMP 1, MMP 2, MMP 24, MMP 25, MMP 3, MMP10, MMP-14/MT1-MMP, MTA1, nAnS, Nav1.7, NCAM2 - molécula 2 de adesão de célula neural, NGEP/D-TMPP/IPCA-5/ANO7, NKX3-1, Notch1, NRP1 / CD304, PGP, PAP (ACPP), PCA3 – antígeno 3 de câncer de próstata, Pdia3/ERp57. PhIP, Foafatidiletanolamina (PE), PIP3, PKP1 (placofilina 1), PKP3 (placofilina 3), Cromogranina A plasmática (CgA), PRDX2, Proteína secretória da próstata (PSP94) / β-Microseminoproteína (MSP) / IGBF, PSAP, PSMA1, PTEN, PTGFRN, PTPN13/PTPL1, PKM2, RPL19, SCA-1 / ATXN1, SERINC5/TPO1, SET, SLC3A2 / CD98, STEAP1, STEAP-3, SRVN, Sindecano / CD138, TGFB, Antígeno específico de polipeptídeo de tecido TPS, TLR4 (CD284), TLR9 (CD289), TMPRSS1 / hepsina, TMPRSS2, TNFR1, TNFα, CD283/TLR3, Receptor de transferrina/CD71/TRFR, Upa (ativador de plasminogênio de uroquinase) degrada a matriz extracelular, uPAt (receptor de uPA)/ CD87, VEGFR1, VEGFR2
Tratamento de câncer de próstata	hsa-miR-1974, hsa-miR-27b, hsa-miR-103, hsa-miR-146a, hsa-miR-22, hsa-miR-382, hsa-miR-23a, hsa-miR-376c, hsa-miR-335, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-221, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-21, hsa-miR-16
Câncer de próstata	let-7d, miR-148a, miR-195, miR-25, miR-26b, miR-329, miR-376c, miR-574-3p, miR-888, miR-9, miR1204, miR-16-2*, miR-497, miR-588, miR-614, miR-765, miR92b*, miR-938, let-7f-2*, miR-300, miR-523, miR-525-5p, miR-1182, miR-1244, miR-520d-3p, miR-379, let-7b, miR-125a-3p, miR-1296, miR-134, miR-149, miR-150, miR-187, miR-32, miR-324-3p, miR-324-5p, miR-342-3p, miR-378, miR-378*, miR-384, miR-451, miR-455-3p, miR-485-3p, miR-487a, miR-490-3p, miR-502-5p, miR-548a-5p, miR-550, miR-562, miR-593, miR-593*, miR-595, miR-602, miR-603, miR-654-5p, miR-877*, miR-886-5p, miR-125a-5p, miR-140-3p, miR-192, miR-196a, miR-2110, miR-212, miR-222, miR-224*, miR-30b*, miR-499-3p, miR-505*
Próstata (PCSA+eMVs)	miR-182, miR-663, miR-155, mirR-125a-5p, miR-548a-5p, miR-628-5p, miR-517*, miR-450a, miR-920, hsa-miR-619, miR-1913, miR-224*, miR-502-5p, miR-888, miR-376a, miR-542-5p, miR-30b*, miR-1179
Câncer de próstata	miR-183-96-182 cluster (miRs-183, 96 e 182), transportador de íons metálicos, tais como hZIP1, SLC39A1, SLC39A2, SLC39A3, SLC39A4, SLC39A5, SLC39A6, SLC39A7, SLC39A8, SLC39A9, SLC39A10, SLC39A11, SLC39A12, SLC39A13, SLC39A14
Câncer de próstata	RAD23B, FBP1, TNFRSF1A, CCNG2, NOTCH3, ETV1, BID, SIM2, LETMD1, ANXA1, miR-519d, miR-647
Câncer de próstata	RAD23B, FBP1, TNFRSF1A, NOTCH3, ETV1, BID, SIM2, ANXA1, BCL2
Câncer de próstata	ANPEP, ABL1, PSCA, EFNA1, HSPB1, INMT, TRIP13
Câncer de próstata	E2F3, c-met, pRB, EZH2, e-cad, CAXII, CAIX, HIF-1α, Jagged, PIM-1, hepisina, RECK, Clusterina, MMP9, MTSP-1, MMP24, MMP15, IGFBP-2, IGFBP-3, E2F4, caveolina, EF-1A, Calicreína 2, Calicreína 3, PSGR
Câncer de próstata	A2ML1, BAX, C10orf47, C1orf162, CSDA, EIFC3, ETFB, GABARAPL2, GUK1, GZMH, HIST1H3B, HLA-A, HSP90AA1, NRGN, PRDX5, PTMA, RABAC1, RABAGAP1L, RPL22, SAP18, SEPW1, SOX1
Câncer de próstata	NY-ESO-1, SSX-2, SSX-4, XAGE-lb, AMACR, autoantígeno p90, LEDGF

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Câncer de próstata	A33, ABL2, ADAM10, AFP, ALA, ALIX, ALPL, ApoJ/CLU, ASCA, ASPH(A-10), ASPH(D01P), AURKB, B7H3, B7H3, B7H4, BCNP, BDNF, CA125(MUC16), CA-19-9, C-Bir, CD10, CD151, CD24, CD41, CD44, CD46, CD59(MEM-43), CD63, CD63, CD66eCEA, CD81, CD81, CD9, CD9, CDA, CDADC1, CRMP-2, CRP, CXCL12, CXCR3, CYFRA21-1, DDX-1, DLL4, DLL4, EGFR, Epcam, EphA2, ErbB2, ERG, EZH2, FASL, FLNA, FRT, GAL3, GATA2, GM-CSF, Gro-alfa, HAP, HER3(ErbB3), HSP70, HSPB1, hVEGFR2, iC3b, IL-1B, IL6R, IL6Unc, IL7Ralfa/CD127, IL8, INSIG-2, Integrina, KLK2, LAMN, Mamaglobina, M-CSF, MFG-E8, MIF, MISRII, MMP7, MMP9, MUC1, Muc1, MUC17, MUC2, Ncam, NDUFB7, NGAL, NK-2R(C-21), NT5E (CD73), p53, PBP, PCSA, PCSA, PDGFRB, PIM1, PRL, PSA, PSA, PSMA, PSMA, RAGE, RANK, RegIV, RUNX2, S100-A4, seprase/FAP, SERPINB3, SIM2(C-15), SPARC, SPC, SPDEF, SPP1, STEAP, STEAP4, TFF3, TGM2, TIMP-1, TMEM211, Trail-R2, Trail-R4, TrKB(poly), Trop2, Tsg101, TWEAK, UNC93A, VEGFA, wnt-5a(C-16)
Vesículas de próstata	CD9, CD63, CD81, PCSA, MUC2, MFG-E8
Câncer de próstata	miR-148a, miR-329, miR-9, miR-378*, miR-25, miR-614, miR-518c*, miR-378, miR-765, let-7f-2*, miR-574-3p, miR-497, miR-32, miR-379, miR-520g, miR-542-5p, miR-342-3p, miR-1206, miR-663, miR-222
Câncer de próstata	hsa-miR-877*, hsa-miR-593, hsa-miR-595, hsa-miR-300, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-329, hsa-miR-550, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-603, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-938, hsa-miR-149, hsa-miR-150, hsa-miR-1296, hsa-miR-384, hsa-miR-487a, hsa-miRPlus-C1089, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-525-5p
Câncer de próstata	hsa-miR-451, hsa-miR-223, hsa-miR-593*, hsa-miR-1974, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-19b, hsa-miR-320b, hsa-miR-92a, hsa-miR-21, hsa-miR-675*, hsa-miR-16, hsa-miR-876-5p, hsa-miR-144, hsa-miR-126, hsa-miR-137, hsa-miR-1913, hsa-miR-29b-1*, hsa-miR-15a, hsa-miR-93, hsa-miR-1266
Doença inflamatória	miR-588, miR-1258, miR-16-2*, miR-938, miR-526b, miR-92b*, let-7d, miR-378*, miR-124, miR-376c, miR-26b, miR-1204, miR-574-3p, miR-195, miR-499-3p, miR-2110, miR-888
Câncer de próstata	A33, ADAM10, AMACR, ASPH (A-10), AURKB, B7H3, CA125, CA-19-9, C-Bir, CD24, CD3, CD41, CD63, CD66e CEA, CD81, CD9, CDADC1, CSA, CXCL12, DCRN, EGFR, EphA2, ERG, FLNA, FRT, GAL3, GM-CSF, Gro-alfa, HER 3 (ErbB3), hVEGFR2, IL6 Unc, Integrina, Mamaglobina, MFG-E8, MMP9, MUC1, MUC17, MUC2, NGAL, NK-2R(C-21), NY-ESO-1, PBP, PCSA, PIM1, PRL, PSA, PSIP1/LEDGF, PSMA, RANK, S100-A4, seprase/FAP, SIM2 (C-15), SPDEF, SSX2, STEAP, TGM2, TIMP-1, Trail-R4, Tsg 101, TWEAK, UNC93A, VCAN, XAGE-1
Câncer de próstata	A33, ADAM10, ALIX, AMACR, ASCA, ASPH (A-10), AURKB, B7H3, BCNP, CA125, CA-19-9, C-Bir (Flagelina), CD24, CD3, CD41, CD63, CD66e CEA, CD81, CD9, CDADC1, CRP, CSA, CXCL12, CYFRA21-1, DCRN, EGFR, EpCAM, EphA2, ERG, FLNA, GAL3, GATA2, GM-CSF, Gro-alfa, HER3 (ErbB3), HSP70, hVEGFR2, iC3b, IL-1B, IL6 Unc, IL8, Integrina, KLK2, Mamaglobina, MFG-E8, MMP7, MMP9, MS4A1, MUC1, MUC17, MUC2, NGAL, NK-2R(C-21), NY-ESO-1, p53, PBP, PCSA, PIM1, PRL, PSA, PSMA, RANK, RUNX2, S100-A4, seprase/FAP, SERPINB3, SIM2 (C-15), SPC, SPDEF, SSX2, SSX4, STEAP, TGM2, TIMP-1, TRAIL R2, Trail-R4, Tsg 101, TWEAK, VCAN, VEGF A, XAGE
Vesículas de próstata	EpCam, CD81, PCSA, MUC2, MFG-E8
Vesículas de próstata	CD9, CD63, CD81, MMP7, EpCAM
Câncer de próstata	let-7d, miR-148a, miR-195, miR-25, miR-26b, miR-329, miR-376c, miR-574-3p, miR-888, miR-9, miR1204, miR-16-2*, miR-497, miR-588, miR-614, miR-765, miR92b*, miR-938, let-7f-2*, miR-300, miR-523, miR-525-5p, miR-1182, miR-1244, miR-520d-3p, miR-379, let-7b, miR-125a-3p, miR-1296, miR-134, miR-149, miR-150, miR-187, miR-32, miR-324-3p, miR-324-5p, miR-342-3p, miR-378, miR-378*, miR-384, miR-451, miR-455-3p, miR-485-3p, miR-487a, miR-490-3p, miR-502-5p, miR-548a-5p, miR-550, miR-562, miR-593, miR-593*, miR-595, miR-602, miR-603, miR-654-5p, miR-877*, miR-886-5p, miR-125a-5p, miR-140-3p, miR-192, miR-196a, miR-2110, miR-212, miR-222, miR-224*, miR-30b*, miR-499-3p, miR-505*
Câncer de próstata	STAT3, EZH2, p53, MACC1, SPDEF, RUNX2, YB-1, AURKA, AURKB

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Câncer de próstata (Identificadores ENSG de Ensembl)	E.001036, E.001497, E.001561, E.002330, E.003402, E.003756, E.004838, E.005471, E.005882, E.005893, E.006210, E.006453, E.006625, E.006695, E.006756, E.007264, E.007952, E.008118, E.008196, E.009694, E.009830, E.010244, E.010256, E.010278, E.010539, E.010810, E.011052, E.011114, E.011143, E.011304, E.011451, E.012061, E.012779, E.014216, E.014257, E.015133, E.015171, E.015479, E.015676, E.016402, E.018189, E.018699, E.020922, E.022976, E.023909, E.026508, E.026559, E.029363, E.029725, E.030582, E.033030, E.035141, E.036257, E.036448, E.038002, E.039068, E.039560, E.041353, E.044115, E.047410, E.047597, E.048544, E.048828, E.049239, E.049246, E.049883, E.051596, E.051620, E.052795, E.053108, E.054118, E.054938, E.056097, E.057252, E.057608, E.058729, E.059122, E.059378, E.059691, E.060339, E.060688, E.061794, E.061918, E.062485, E.063241, E.063244, E.064201, E.064489, E.064655, E.064886, E.065054, E.065057, E.065308, E.065427, E.065457, E.065485, E.065526, E.065548, E.065978, E.066455, E.066557, E.067248, E.067369, E.067704, E.068724, E.068885, E.069535, E.069712, E.069849, E.069869, E.069956, E.070501, E.070785, E.070814, E.071246, E.071626, E.071859, E.072042, E.072071, E.072110, E.072506, E.073050, E.073350, E.073584, E.073756, E.074047, E.074071, E.074964, E.075131, E.075239, E.075624, E.075651, E.075711, E.075856, E.075886, E.076043, E.076248, E.076554, E.076864, E.077097, E.077147, E.077312, E.077514, E.077522, E.078269, E.078295, E.078808, E.078902, E.079246, E.079313, E.079785, E.080572, E.080823, E.081087, E.081138, E.081181, E.081721, E.081842, E.082212, E.082258, E.082556, E.083093, E.083720, E.084234, E.084463, E.085224, E.085733, E.086062, E.086205, E.086717, E.087087, E.087301, E.088888, E.088899, E.088930, E.088992, E.089048, E.089127, E.089154, E.089177, E.089248, E.089280, E.089902, E.090013, E.090060, E.090565, E.090612, E.090615, E.090674, E.090861, E.090889, E.091140, E.091483, E.091542, E.091732, E.092020, E.092199, E.092421, E.092621, E.092820, E.092871, E.092978, E.093010, E.094755, E.095139, E.095380, E.095485, E.095627, E.096060, E.096384, E.099331, E.099715, E.099783, E.099785, E.099800, E.099821, E.099899, E.099917, E.099956, E.100023, E.100056, E.100065, E.100084, E.100142, E.100191, E.100216, E.100242, E.100271, E.100284, E.100299, E.100311, E.100348, E.100359, E.100393, E.100399, E.100401, E.100412, E.100442, E.100575, E.100577, E.100583, E.100601, E.100603, E.100612, E.100632, E.100714, E.100739, E.100796, E.100802, E.100815, E.100823, E.100836, E.100883, E.101057, E.101126, E.101152, E.101222, E.101246, E.101265, E.101365, E.101439, E.101557, E.101639, E.101654, E.101811, E.101812, E.101901, E.102030, E.102054, E.102103, E.102158, E.102174, E.102241, E.102290, E.102316, E.102362, E.102384, E.102710, E.102780, E.102904, E.103035, E.103067, E.103175, E.103194, E.103449, E.103479, E.103591, E.103599, E.103855, E.103978, E.104064, E.104067, E.104131, E.104164, E.104177, E.104228, E.104331, E.104365, E.104419, E.104442, E.104611, E.104626, E.104723, E.104760, E.104805, E.104812, E.104823, E.104824, E.105127, E.105220, E.105221, E.105281, E.105379, E.105402, E.105404, E.105409, E.105419, E.105428, E.105486, E.105514, E.105518, E.105618, E.105705, E.105723, E.105939, E.105948, E.106049, E.106078, E.106128, E.106153, E.106346, E.106392, E.106554, E.106565, E.106603, E.106633, E.107104, E.107164, E.107404, E.107485, E.107551, E.107581, E.107623, E.107798, E.107816, E.107833, E.107890, E.107897, E.107968, E.108296, E.108312, E.108375, E.108387, E.108405, E.108417, E.108465, E.108561, E.108582, E.108639, E.108641, E.108848, E.108883, E.108953, E.109062, E.109184, E.109572, E.109625, E.109758, E.109790, E.109814, E.109846, E.109956, E.110063, E.110066, E.110104, E.110107, E.110321, E.110328, E.110921, E.110955, E.111057, E.111218, E.111261, E.111335, E.111540, E.111605, E.111647, E.111785, E.111790, E.111801, E.111907, E.112039, E.112081, E.112096, E.112110, E.112144, E.112232, E.112234, E.112473, E.112578, E.112584, E.112715, E.112941, E.113013, E.113163, E.113282, E.113368, E.113441, E.113448, E.113522, E.113580, E.113645, E.113719, E.113739, E.113790, E.114054, E.114127, E.114302, E.114331, E.114388, E.114491, E.114861, E.114867, E.115053, E.115221, E.115234, E.115239, E.115241, E.115257, E.115339, E.115540, E.115541, E.115561, E.115604, E.115648, E.115738, E.115758, E.116044, E.116096, E.116127, E.116254, E.116288, E.116455, E.116478, E.116604, E.116649, E.116726, E.116754, E.116833, E.117298, E.117308, E.117335, E.117362, E.117411, E.117425, E.117448, E.117480, E.117592, E.117593, E.117614, E.117676, E.117713, E.117748, E.117751, E.117877, E.118181, E.118197, E.118260, E.118292, E.118513, E.118523, E.118640, E.118898, E.119121, E.119138, E.119318, E.119321, E.119335, E.119383, E.119421, E.119636, E.119681, E.119711, E.119820, E.119888, E.119906, E.120159, E.120328, E.120337, E.120370, E.120656, E.120733, E.120837, E.120868, E.120915, E.120948, E.121022, E.121057, E.121068, E.121104, E.121390, E.121671, E.121690, E.121749, E.121774, E.121879, E.121892, E.121903, E.121940, E.121957, E.122025, E.122033, E.122126, E.122507, E.122566, E.122705, E.122733, E.122870, E.122884, E.122952, E.123066, E.123080, E.123143, E.123154, E.123178, E.123416, E.123427, E.123595, E.123901, E.123908, E.123983, E.123992, E.124143, E.124164, E.124181, E.124193, E.124216, E.124232, E.124529, E.124562, E.124570, E.124693, E.124749, E.124767, E.124788, E.124795, E.124831, E.124942, E.125246, E.125257, E.125304, E.125352,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	E.125375, E.125445, E.125492, E.125676, E.125753, E.125798, E.125844, E.125868, E.125901, E.125944, E.125995, E.126062, E.126267, E.126653, E.126773, E.126777, E.126814, E.126858, E.126883, E.126934, E.126945, E.126952, E.127022, E.127328, E.127329, E.127399, E.127415, E.127554, E.127616, E.127720, E.127824, E.127884, E.127914, E.127946, E.127948, E.128050, E.128311, E.128342, E.128609, E.128626, E.128683, E.128708, E.128881, E.129315, E.129351, E.129355, E.129514, E.129636, E.129657, E.129757, E.129810, E.129990, E.130175, E.130177, E.130193, E.130255, E.130299, E.130305, E.130338, E.130340, E.130402, E.130413, E.130612, E.130713, E.130764, E.130770, E.130810, E.130826, E.130935, E.131351, E.131467, E.131473, E.131771, E.131773, E.132002, E.132275, E.132323, E.132382, E.132475, E.132481, E.132589, E.132646, E.132716, E.132881, E.133313, E.133315, E.133687, E.133835, E.133863, E.133874, E.133961, E.134077, E.134138, E.134207, E.134248, E.134308, E.134444, E.134452, E.134548, E.134684, E.134759, E.134809, E.134851, E.134955, E.135052, E.135297, E.135298, E.135387, E.135390, E.135476, E.135486, E.135525, E.135597, E.135679, E.135740, E.135829, E.135842, E.135870, E.135900, E.135914, E.135926, E.135940, E.135999, E.136044, E.136068, E.136152, E.136169, E.136280, E.136371, E.136383, E.136450, E.136521, E.136527, E.136574, E.136710, E.136750, E.136807, E.136874, E.136875, E.136930, E.136933, E.136935, E.137055, E.137124, E.137312, E.137409, E.137497, E.137513, E.137558, E.137601, E.137727, E.137776, E.137806, E.137814, E.137815, E.137948, E.137955, E.138028, E.138031, E.138041, E.138050, E.138061, E.138069, E.138073, E.138095, E.138160, E.138294, E.138347, E.138363, E.138385, E.138587, E.138594, E.138621, E.138674, E.138756, E.138757, E.138760, E.138772, E.138796, E.139211, E.139405, E.139428, E.139517, E.139613, E.139626, E.139684, E.139697, E.139874, E.140263, E.140265, E.140326, E.140350, E.140374, E.140382, E.140451, E.140481, E.140497, E.140632, E.140678, E.140694, E.140743, E.140932, E.141002, E.141012, E.141258, E.141378, E.141425, E.141429, E.141522, E.141543, E.141639, E.141744, E.141873, E.141994, E.142025, E.142208, E.142515, E.142606, E.142698, E.142765, E.142864, E.142875, E.143013, E.143294, E.143321, E.143353, E.143374, E.143375, E.143390, E.143578, E.143614, E.143621, E.143633, E.143771, E.143797, E.143816, E.143889, E.143924, E.143933, E.143947, E.144136, E.144224, E.144306, E.144381, E.144410, E.144485, E.144566, E.144671, E.144741, E.144935, E.145020, E.145632, E.145741, E.145833, E.145888, E.145907, E.145908, E.145919, E.145990, E.146067, E.146070, E.146281, E.146433, E.146457, E.146535, E.146701, E.146856, E.146966, E.147044, E.147127, E.147130, E.147133, E.147140, E.147231, E.147257, E.147403, E.147475, E.147548, E.147697, E.147724, E.148158, E.148396, E.148488, E.148672, E.148737, E.148835, E.149182, E.149218, E.149311, E.149480, E.149548, E.149646, E.150051, E.150593, E.150961, E.150991, E.151092, E.151093, E.151247, E.151304, E.151491, E.151690, E.151715, E.151726, E.151779, E.151806, E.152086, E.152207, E.152234, E.152291, E.152359, E.152377, E.152409, E.152422, E.152582, E.152763, E.152818, E.152942, E.153113, E.153140, E.153391, E.153904, E.153936, E.154099, E.154127, E.154380, E.154639, E.154723, E.154781, E.154832, E.154864, E.154889, E.154957, E.155368, E.155380, E.155508, E.155660, E.155714, E.155959, E.155980, E.156006, E.156194, E.156282, E.156304, E.156467, E.156515, E.156603, E.156650, E.156735, E.156976, E.157064, E.157103, E.157502, E.157510, E.157538, E.157551, E.157637, E.157764, E.157827, E.157992, E.158042, E.158290, E.158321, E.158485, E.158545, E.158604, E.158669, E.158715, E.158747, E.158813, E.158863, E.158901, E.158941, E.158987, E.159147, E.159184, E.159348, E.159363, E.159387, E.159423, E.159658, E.159692, E.159761, E.159921, E.160049, E.160226, E.160285, E.160294, E.160633, E.160685, E.160691, E.160789, E.160862, E.160867, E.160948, E.160972, E.161202, E.161267, E.161649, E.161692, E.161714, E.161813, E.161939, E.162069, E.162298, E.162385, E.162437, E.162490, E.162613, E.162641, E.162694, E.162910, E.162975, E.163041, E.163064, E.163110, E.163257, E.163468, E.163492, E.163530, E.163576, E.163629, E.163644, E.163749, E.163755, E.163781, E.163825, E.163913, E.163923, E.163930, E.163932, E.164045, E.164051, E.164053, E.164163, E.164244, E.164270, E.164300, E.164309, E.164442, E.164488, E.164520, E.164597, E.164749, E.164754, E.164828, E.164916, E.164919, E.164924, E.165084, E.165119, E.165138, E.165215, E.165259, E.165264, E.165280, E.165359, E.165410, E.165496, E.165637, E.165646, E.165661, E.165688, E.165695, E.165699, E.165792, E.165807, E.165813, E.165898, E.165923, E.165934, E.166263, E.166266, E.166329, E.166337, E.166341, E.166484, E.166526, E.166596, E.166598,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	E.166710, E.166747, E.166833, E.166860, E.166946, E.166971, E.167004, E.167085, E.167110, E.167113, E.167258, E.167513, E.167552, E.167553, E.167604, E.167635, E.167642, E.167658, E.167699, E.167744, E.167751, E.167766, E.167772, E.167799, E.167815, E.167969, E.167978, E.167987, E.167996, E.168014, E.168036, E.168066, E.168071, E.168148, E.168298, E.168393, E.168575, E.168653, E.168746, E.168763, E.168769, E.168803, E.168916, E.169087, E.169093, E.169122, E.169189, E.169213, E.169242, E.169410, E.169418, E.169562, E.169592, E.169612, E.169710, E.169763, E.169789, E.169807, E.169826, E.169957, E.170017, E.170027, E.170037, E.170088, E.170144, E.170275, E.170310, E.170315, E.170348, E.170374, E.170381, E.170396, E.170421, E.170430, E.170445, E.170549, E.170632, E.170703, E.170743, E.170837, E.170854, E.170906, E.170927, E.170954, E.170959, E.171121, E.171155, E.171180, E.171202, E.171262, E.171302, E.171345, E.171428, E.171488, E.171490, E.171492, E.171540, E.171643, E.171680, E.171723, E.171793, E.171861, E.171953, E.172115, E.172283, E.172345, E.172346, E.172466, E.172590, E.172594, E.172653, E.172717, E.172725, E.172733, E.172831, E.172867, E.172893, E.172939, E.173039, E.173230, E.173366, E.173473, E.173540, E.173585, E.173599, E.173714, E.173726, E.173805, E.173809, E.173826, E.173889, E.173898, E.173905, E.174021, E.174100, E.174332, E.174842, E.174996, E.175063, E.175110, E.175166, E.175175, E.175182, E.175198, E.175203, E.175216, E.175220, E.175334, E.175416, E.175602, E.175866, E.175946, E.176102, E.176105, E.176155, E.176171, E.176371, E.176515, E.176900, E.176971, E.176978, E.176994, E.177156, E.177239, E.177354, E.177409, E.177425, E.177459, E.177542, E.177548, E.177565, E.177595, E.177628, E.177674, E.177679, E.177694, E.177697, E.177731, E.177752, E.177951, E.178026, E.178078, E.178104, E.178163, E.178175, E.178187, E.178234, E.178381, E.178473, E.178741, E.178828, E.178950, E.179091, E.179115, E.179119, E.179348, E.179388, E.179776, E.179796, E.179869, E.179912, E.179981, E.180035, E.180198, E.180287, E.180318, E.180667, E.180869, E.180979, E.180998, E.181072, E.181163, E.181222, E.181234, E.181513, E.181523, E.181610, E.181773, E.181873, E.181885, E.181924, E.182013, E.182054, E.182217, E.182271, E.182318, E.182319, E.182512, E.182732, E.182795, E.182872, E.182890, E.182944, E.183048, E.183092, E.183098, E.183128, E.183207, E.183292, E.183431, E.183520, E.183684, E.183723, E.183785, E.183831, E.183856, E.184007, E.184047, E.184113, E.184156, E.184254, E.184363, E.184378, E.184470, E.184481, E.184508, E.184634, E.184661, E.184697, E.184708, E.184735, E.184840, E.184916, E.185043, E.185049, E.185122, E.185219, E.185359, E.185499, E.185554, E.185591, E.185619, E.185736, E.185860, E.185896, E.185945, E.185972, E.186198, E.186205, E.186376, E.186472, E.186575, E.186591, E.186660, E.186814, E.186834, E.186868, E.186889, E.187097, E.187323, E.187492, E.187634, E.187764, E.187792, E.187823, E.187837, E.187840, E.188021, E.188171, E.188186, E.188739, E.188771, E.188846, E.189060, E.189091, E.189143, E.189144, E.189221, E.189283, E.196236, E.196419, E.196436, E.196497, E.196504, E.196526, E.196591, E.196700, E.196743, E.196796, E.196812, E.196872, E.196975, E.196993, E.197081, E.197157, E.197217, E.197223, E.197299, E.197323, E.197353, E.197451, E.197479, E.197746, E.197779, E.197813, E.197837, E.197857, E.197872, E.197969, E.197976, E.198001, E.198033, E.198040, E.198087, E.198131, E.198156, E.198168, E.198205, E.198216, E.198231, E.198265, E.198366, E.198431, E.198455, E.198563, E.198586, E.198589, E.198712, E.198721, E.198732, E.198783, E.198793, E.198804, E.198807, E.198824, E.198841, E.198951, E.203301, E.203795, E.203813, E.203837, E.203879, E.203908, E.204231, E.204316, E.204389, E.204406, E.204560, E.204574
Marcadores de próstata (identificadores ENSG de Ensembl)	E.005893 (LAMP2), E.006756 (ARSD), E.010539 (ZNF200), E.014257 (ACPP), E.015133 (CCDC88C), E.018699 (TTC27), E.044115 (CTNNA1), E.048828 (FAM120A), E.051620 (HEBP2), E.056097 (ZFR), E.060339 (CCAR1), E.063241 (ISOC2), E.064489 (MEF2BNB-MEF2B), E.064886 (CHI3L2), E.066455 (GOLGA5), E.069535 (MAOB), E.072042 (RDH11), E.072071 (LPHN1), E.074047 (GLI2), E.076248 (UNG), E.076554 (TPD52), E.077147 (TM9SF3), E.077312 (SNRPA), E.081842 (PCDHA6), E.086717 (PPEF1), E.088888 (MAVS), E.088930 (XRN2), E.089902 (RCOR1), E.090612 (ZNF268), E.092199 (HNRNPC), E.095380 (NANS), E.099783 (HNRNPM), E.100191 (SLC5A4), E.100216 (TOMM22), E.100242 (SUN2), E.100284 (TOM1), E.100401 (RANGAP1), E.100412 (ACO2), E.100836 (PABPN1), E.102054 (RBBP7), E.102103 (PQBP1), E.103599 (IQCH), E.103978 (TMEM87A), E.104177 (MYEF2), E.104228 (TRIM35), E.105428 (ZNRF4), E.105518 (TMEM205), E.106603 (C7orf44; COA1), E.108405 (P2RX1), E.111057

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	(KRT18), E.111218 (PRMT8), E.112081 (SRSF3), E.112144 (ICK), E.113013 (HSPA9), E.113368 (LMNB1), E.115221 (ITGB6), E.116096 (SPR), E.116754 (SRSF11), E.118197 (DDX59), E.118898 (PPL), E.119121 (TRPM6), E.119711 (ALDH6A1), E.120656 (TAF12), E.121671 (CRY2), E.121774 (KHDRBS1), E.122126 (OCRL), E.122566 (HNRNPA2B1), E.123901 (GPR83), E.124562 (SNRPC), E.124788 (ATXN1), E.124795 (DEK), E.125246 (CLYBL), E.126883 (NUP214), E.127616 (SMARCA4), E.127884 (ECHS1), E.128050 (PAICS), E.129351 (ILF3), E.129757 (CDKN1C), E.130338 (TULP4), E.130612 (CYP2G1P), E.131351 (HAUS8), E.131467 (PSME3), E.133315 (MACROD1), E.134452 (FBXO18), E.134851 (TMEM165), E.135940 (COX5B), E.136169 (SETDB2), E.136807 (CDK9), E.137727 (ARHGAP20), E.138031 (ADCY3), E.138050 (THUMPD2), E.138069 (RAB1A), E.138594 (TMOD3), E.138760 (SCARB2), E.138796 (HADH), E.139613 (SMARCC2), E.139684 (ESD), E.140263 (SORD), E.140350 (ANP32A), E.140632 (GLYR1), E.142765 (SYTL1), E.143621 (ILF2), E.143933 (CALM2), E.144410 (CPO), E.147127 (RAB41), E.151304 (SRFBP1), E.151806 (GUF1), E.152207 (CYSLTR2), E.152234 (ATP5A1), E.152291 (TGOLN2), E.154723 (ATP5J), E.156467 (UQCRB), E.159387 (IRX6), E.159761 (C16orf86), E.161813 (LARP4), E.162613 (FUBP1), E.162694 (EXTL2), E.165264 (NDUFB6), E.167113 (COQ4), E.167513 (CDT1), E.167772 (ANGPTL4), E.167978 (SRRM2), E.168916 (ZNF608), E.169763 (PRYP3), E.169789 (PRY), E.169807 (PRY2), E.170017 (ALCAM), E.170144 (HNRNPA3), E.170310 (STX8), E.170954 (ZNF415), E.170959 (DCDC5), E.171302 (CANT1), E.171643 (S100Z), E.172283 (PRYP4), E.172590 (MRPL52), E.172867 (KRT2), E.173366 (TLR9), E.173599 (PC), E.177595 (PIDD), E.178473 (UCN3), E.179981 (TSHZ1), E.181163 (NPM1), E.182319 (Tirosina-proteina quinase SgK223), E.182795 (C1orf116), E.182944 (EWSR1), E.183092 (BEGAIN), E.183098 (GPC6), E.184254 (ALDH1A3), E.185619 (PCGF3), E.186889 (TMEM17), E.187837 (HIST1H1C), E.188771 (C11orf34), E.189060 (H1F0), E.196419 (XRCC6), E.196436 (NPIPL2), E.196504 (PRPF40A), E.196796, E.196993, E.197451 (HNRNPAB), E.197746 (PSAP), E.198131 (ZNF544), E.198156, E.198732 (SMOC1), E.198793 (MTOR), E.039068 (CDH1), E.173230 (GOLGB1), E.124193 (SRSF6), E.140497 (SCAMP2), E.168393 (DTYMK), E.184708 (EIF4ENIF1), E.124164 (VAPB), E.125753 (VASP), E.118260 (CREB1), E.135052 (GOLM1), E.010244 (ZNF207), E.010278 (CD9), E.047597 (XK), E.049246 (PER3), E.069849 (ATP1B3), E.072506 (HSD17B10), E.081138 (CDH7), E.099785 (MARCH2), E.104331 (IMPAD1), E.104812 (GYS1), E.120868 (APAF1), E.123908 (EIF2C2), E.125492 (BARHL1), E.127328 (RAB3IP), E.127329 (PTPRB), E.129514 (FOXA1), E.129657 (SEC14L1), E.129990 (SYT5), E.132881 (RSG1), E.136521 (NDUFB5), E.138347 (MYPN), E.141429 (GALNT1), E.144566 (RAB5A), E.151715 (TMEM45B), E.152582 (SPEF2), E.154957 (ZNF18), E.162385 (MAGOH), E.165410 (CFL2), E.168298 (HIST1H1E), E.169418 (NPR1), E.178187 (ZNF454), E.178741 (COX5A), E.179115 (FARSA), E.182732 (RGS6), E.183431 (SF3A3), E.185049 (WHSC2), E.196236 (XPNPEP3), E.197217 (ENTPD4), E.197813, E.203301, E.116833 (NR5A2), E.121057 (AKAP1), E.005471 (ABCB4), E.071859 (FAM50A), E.084234 (APLP2), E.101222 (SPEF1), E.103175 (WFDC1), E.103449 (SALL1), E.104805 (NUCB1), E.105514 (RAB3D), E.107816 (LZTS2), E.108375 (RNF43), E.109790 (KLHL5), E.112039 (FANCE), E.112715 (VEGFA), E.121690 (DEPDC7), E.125352 (RNF113A), E.134548 (C12orf39), E.136152 (COG3), E.143816 (WNT9A), E.147130 (ZMYM3), E.148396 (SEC16A), E.151092 (NGLY1), E.151779 (NBAS), E.155508 (CNOT8), E.163755 (HPS3), E.166526 (ZNF3), E.172733 (PURG), E.176371 (ZSCAN2), E.177674 (AGTRAP), E.181773 (GPR3), E.183048 (SLC25A10; MRPL12 SLC25A10), E.186376 (ZNF75D), E.187323 (DCC), E.198712 (MT-CO2), E.203908 (C6orf221; KHDC3L), E.001497 (LAS1L), E.009694 (ODZ1), E.080572 (CXorf41; PIH1D3), E.083093 (PALB2), E.089048 (ESF1), E.100065 (CARD10), E.100739 (BDKRB1), E.102904 (TSNAXIP1), E.104824 (HNRNPL), E.107404 (DVL1), E.110066 (SUV420H1), E.120328 (PCDHB12), E.121903 (ZSCAN20), E.122025 (FLT3), E.136930 (PSMB7), E.142025 (DMRTC2), E.144136 (SLC20A1), E.146535 (GNA12), E.147140 (NONO), E.153391 (INO80C), E.164919 (COX6C), E.171540 (OTP), E.177951 (BET1L), E.179796 (LRRC3B), E.197479 (PCDHB11), E.198804 (MT-CO1), E.086205 (FOLH1), E.100632 (ERH), E.100796 (SMEK1), E.104760 (FGL1), E.114302 (PRKAR2A), E.130299 (GTPBP3), E.133961 (NUMB), E.144485 (HES6), E.167085 (PHB), E.167635 (ZNF146), E.177239 (MAN1B1), E.184481 (FOXO4), E.188171 (ZNF626), E.189221 (MAOA), E.157637 (SLC38A10), E.100883 (SRP54), E.105618 (PRPF31), E.119421 (NDUFA8), E.170837 (GPR27), E.168148 (HIST3H3), E.135525 (MAP7), E.174996 (KLC2), E.018189 (RUFY3), E.183520

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	(UTP11L), E.173905 (GOLIM4), E.165280 (VCP), E.022976 (ZNF839), E.059691 (PET112), E.063244 (U2AF2), E.075651 (PLD1), E.089177 (KIF16B), E.089280 (FUS), E.094755 (GABRP), E.096060 (FKBP5), E.100023 (PPIL2), E.100359 (SGSM3), E.100612 (DHRS7), E.104131 (EIF3J), E.104419 (NDRG1), E.105409 (ATP1A3), E.107623 (GDF10), E.111335 (OAS2), E.113522 (RAD50), E.115053 (NCL), E.120837 (NFYB), E.122733 (KIAA1045), E.123178 (SPRYD7), E.124181 (PLCG1), E.126858 (RHOT1), E.128609 (NDUFA5), E.128683 (GAD1), E.130255 (RPL36), E.133874 (RNF122), E.135387 (CAPRIN1), E.135999 (EPC2), E.136383 (ALPK3), E.139405 (C12orf52), E.141012 (GALNS), E.143924 (EML4), E.144671 (SLC22A14), E.145741 (BTF3), E.145907 (G3BP1), E.149311 (ATM), E.153113 (CAST), E.157538 (DSCR3), E.157992 (KRTCAP3), E.158901 (WFDC8), E.165259 (HDX), E.169410 (PTPN9), E.170421 (KRT8), E.171155 (C1GALT1C1), E.172831 (CES2), E.173726 (TOMM20), E.176515, E.177565 (TBL1XR1), E.177628 (GBA), E.179091 (CYC1), E.189091 (SF3B3), E.197299 (BLM), E.197872 (FAM49A), E.198205 (ZXDA), E.198455 (ZXDB), E.082212 (ME2), E.109956 (B3GAT1), E.169710 (FASN), E.011304 (PTBP1), E.057252 (SOAT1), E.059378 (PARP12), E.082258 (CCNT2), E.087301 (TXNDC16), E.100575 (TIMM9), E.101152 (DNAJC5), E.101812 (H2BFM), E.102384 (CENPI), E.108641 (B9D1), E.119138 (KLF9), E.119820 (YIPF4), E.125995 (ROMO1), E.132323 (ILKAP), E.134809 (TIMM10), E.134955 (SLC37A2), E.135476 (ESPL1), E.136527 (TRA2B), E.137776 (SLTM), E.139211 (AMIGO2), E.139428 (MMAB), E.139874 (SSTR1), E.143321 (HDGF), E.164244 (PRRC1), E.164270 (HTR4), E.165119 (HNRNPK), E.165637 (VDAC2), E.165661 (QSOX2), E.167258 (CDK12), E.167815 (PRDX2), E.168014 (C2CD3), E.168653 (NDUFS5), E.168769 (TET2), E.169242 (EFNA1), E.175334 (BANF1), E.175416 (CLTB), E.177156 (TALDO1), E.180035 (ZNF48), E.186591 (UBE2H), E.187097 (ENTPD5), E.188739 (RBM34), E.196497 (IPO4), E.197323 (TRIM33), E.197857 (ZNF44), E.197976 (AKAP17A), E.064201 (TSPAN32), E.088992 (TESC), E.092421 (SEMA6A), E.100601 (ALKBH1), E.101557 (USP14), E.103035 (PSMD7), E.106128 (GHRHR), E.115541 (HSPE1), E.121390 (PSPC1), E.124216 (SNAI1), E.130713 (EXOSC2), E.132002 (DNAJB1), E.139697 (SBNO1), E.140481 (CCDC33), E.143013 (LMO4), E.145020 (AMT), E.145990 (GFOD1), E.146070 (PLA2G7), E.164924 (YWHAZ), E.165807 (PPP1R36), E.167751 (KLK2), E.169213 (RAB3B), E.170906 (NDUFA3), E.172725 (CORO1B), E.174332 (GLIS1), E.181924 (CHCHD8), E.183128 (CALHM3), E.204560 (DHX16), E.204574 (ABCF1), E.146701 (MDH2), E.198366 (HIST1H3A), E.081181 (ARG2), E.185896 (LAMP1), E.077514 (POLD3), E.099800 (TIMM13), E.100299 (ARSA), E.105419 (MEIS3), E.108417 (KRT37), E.113739 (STC2), E.125868 (DSTN), E.145908 (ZNF300), E.168575 (SLC20A2), E.182271 (TMIGD1), E.197223 (C1D), E.186834 (HEXIM1), E.001561 (ENPP4), E.011451 (WIZ), E.053108 (FSTL4), E.064655 (EYA2), E.065308 (TRAM2), E.075131 (TIPIN), E.081087 (OSTM1), E.092020 (PPP2R3C), E.096384 (HSP90AB1), E.100348 (TXN2), E.100577 (GSTZ1), E.100802 (C14orf93), E.101365 (IDH3B), E.101654 (RNMT), E.103067 (ESRP2), E.104064 (GABPB1), E.104823 (ECH1), E.106565 (TMEM176B), E.108561 (C1QBP), E.115257 (PCSK4), E.116127 (ALMS1), E.117411 (B4GALT2), E.119335 (SET), E.120337 (TNFSF18), E.122033 (MTIF3), E.122507 (BBS9), E.122870 (BICC1), E.130177 (CDC16), E.130193 (C8orf55; THEM6), E.130413 (STK33), E.130770 (ATPIF1), E.133687 (TMTC1), E.136874 (STX17), E.137409 (MTCH1), E.139626 (ITGB7), E.141744 (PNMT), E.145888 (GLRA1), E.146067 (FAM193B), E.146433 (TMEM181), E.149480 (MTA2), E.152377 (SPOCK1), E.152763 (WDR78), E.156976 (EIF4A2), E.157827 (FMNL2), E.158485 (CD1B), E.158863 (FAM160B2), E.161202 (DVL3), E.161714 (PLCD3), E.163064 (EN1), E.163468 (CCT3), E.164309 (CMYA5), E.164916 (FOXK1), E.165215 (CLDN3), E.167658 (EEF2), E.170549 (IRX1), E.171680 (PLEKHG5), E.178234 (GALNT11), E.179869 (ABCA13), E.179912 (R3HDM2), E.180869 (C1orf180), E.180979 (LRRC57), E.182872 (RBM10), E.183207 (RUVBL2), E.184113 (CLDN5), E.185972 (CCIN), E.189144 (ZNF573), E.197353 (LYPD2), E.197779 (ZNF81), E.198807 (PAX9), E.100442 (FKBP3), E.111790 (FGFR1OP2), E.136044 (APPL2), E.061794 (MRPS35), E.065427 (KARS), E.068885 (IFT80), E.104164 (PLDN; BLOC1S6), E.105127 (AKAP8), E.123066 (MED13L), E.124831 (LRRFIP1), E.125304 (TM9SF2), E.126934 (MAP2K2), E.130305 (NSUN5), E.135298 (BAI3), E.135900 (MRPL44), E.136371 (MTHFS), E.136574 (GATA4), E.140326 (CDAN1), E.141378 (PTRH2), E.141543 (EIF4A3), E.150961 (SEC24D), E.155368 (DBI), E.161649 (CD300LG), E.161692 (DBF4B), E.162437 (RAVER2), E.163257 (DCAF16), E.163576 (EFHB), E.163781 (TOPBP1), E.163913 (IFT122), E.164597 (COG5), E.165359 (DDX26B), E.165646 (SLC18A2), E.169592

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	(INO80E), E.169957 (ZNF768), E.171492 (LRRC8D), E.171793 (CTPS; CTPS1), E.171953 (ATPAF2), E.175182 (FAM131A), E.177354 (C10orf71), E.181610 (MRPS23), E.181873 (IBA57), E.187792 (ZNF70), E.187823 (ZCCHC16), E.196872 (C2orf55; KIAA1211L), E.198168 (SVIP), E.160633 (SAFB), E.177697 (CD151), E.181072 (CHRM2), E.012779 (ALOX5), E.065054 (SLC9A3R2), E.074071 (MRPS34), E.100815 (TRIP11), E.102030 (NAA10), E.106153 (CHCHD2), E.126814 (TRMT5), E.126952 (NXF5), E.136450 (SRSF1), E.136710 (CCDC115), E.137124 (ALDH1B1), E.143353 (LYPLAL1), E.162490 (C1orf187; DRAXIN), E.167799 (NUDT8), E.171490 (RSL1D1), E.173826 (KCNH6), E.173898 (SPTBN2), E.176900 (OR51T1), E.181513 (ACBD4), E.185554 (NXF2), E.185945 (NXF2B), E.108848 (LUC7L3), E.029363 (BCLAF1), E.038002 (AGA), E.108312 (UBTF), E.166341 (DCHS1), E.054118 (THRAP3), E.135679 (MDM2), E.166860 (ZBTB39), E.183684 (THOC4; ALYREF), E.004838 (ZMYND10), E.007264 (MATK), E.020922 (MRE11A), E.041353 (RAB27B), E.052795 (FNIP2), E.075711 (DLG1), E.087087 (SRRT), E.090060 (PAPOLA), E.095139 (ARCN1), E.099715 (PCDH11Y), E.100271 (TTLL1), E.101057 (MYBL2), E.101265 (RASSF2), E.101901 (ALG13), E.102290 (PCDH11X), E.103194 (USP10), E.106554 (CHCHD3), E.107833 (NPM3), E.110063 (DCPS), E.111540 (RAB5B), E.113448 (PDE4D), E.115339 (GALNT3), E.116254 (CHD5), E.117425 (PTCH2), E.117614 (SYF2), E.118181 (RPS25), E.118292 (C1orf54), E.119318 (RAD23B), E.121022 (COPS5), E.121104 (FAM117A), E.123427 (METTL21B), E.125676 (THOC2), E.132275 (RRP8), E.137513 (NARS2), E.138028 (CGREF1), E.139517 (LNX2), E.143614 (GATAD2B), E.143889 (HNRPLL), E.145833 (DDX46), E.147403 (RPL10), E.148158 (SNX30), E.151690 (MFSD6), E.153904 (DDAH1), E.154781 (C3orf19), E.156650 (KAT6B), E.158669 (AGPAT6), E.159363 (ATP13A2), E.163530 (DPPA2), E.164749 (HNF4G), E.165496 (RPL10L), E.165688 (PMPCA), E.165792 (METTL17), E.166598 (HSP90B1), E.168036 (CTNNB1), E.168746 (C20orf62), E.170381 (SEMA3E), E.171180 (OR2M4), E.171202 (TMEM126A), E.172594 (SMPDL3A), E.172653 (C17orf66), E.173540 (GMPPB), E.173585 (CCR9), E.173809 (TDRD12), E.175166 (PSMD2), E.177694 (NAALADL2), E.178026 (FAM211B; C22orf36), E.184363 (PKP3), E.187634 (SAMD11), E.203837 (PNLIPRP3), E.169122 (FAM110B), E.197969 (VPS13A), E.136068 (FLNB), E.075856 (SART3), E.081721 (DUSP12), E.102158 (MAGT1), E.102174 (PHEX), E.102316 (MAGED2), E.104723 (TUSC3), E.105939 (ZC3HAV1), E.108883 (EFTUD2), E.110328 (GALNTL4), E.111785 (RIC8B), E.113163 (COL4A3BP), E.115604 (IL18R1), E.117362 (APH1A), E.117480 (FAAH), E.124767 (GLO1), E.126267 (COX6B1), E.130175 (PRKCSH), E.135926 (TMBIM1), E.138674 (SEC31A), E.140451 (PIF1), E.143797 (MBOAT2), E.149646 (C20orf152), E.157064 (NMNAT2), E.160294 (MCM3AP), E.165084 (C8orf34), E.166946 (CCNDBP1), E.170348 (TMED10), E.170703 (TTLL6), E.175198 (PCCA), E.180287 (PLD5), E.183292 (MIR5096), E.187492 (CDHR4), E.188846 (RPL14), E.015479 (MATR3), E.100823 (APEX1), E.090615 (GOLGA3), E.086062 (B4GALT1), E.138385 (SSB), E.140265 (ZSCAN29), E.140932 (CMTM2), E.167969 (ECI1), E.135486 (HNRNPA1), E.137497 (NUMA1), E.181523 (SGSH), E.099956 (SMARCB1), E.049883 (PTCD2), E.082556 (OPRK1), E.090674 (MCOLN1), E.107164 (FUBP3), E.108582 (CPD), E.109758 (HGFAC), E.111605 (CPSF6), E.115239 (ASB3), E.121892 (PDS5A), E.125844 (RRBP1), E.130826 (DKC1), E.132481 (TRIM47), E.135390 (ATP5G2), E.136875 (PRPF4), E.138621 (PPCDC), E.145632 (PLK2), E.150051 (MKX), E.153140 (CETN3), E.154127 (UBASH3B), E.156194 (PPEF2), E.163825 (RTP3), E.164053 (ATRIP), E.164442 (CITED2), E.168066 (SF1), E.170430 (MGMT), E.175602 (CCDC85B), E.177752 (YIPF7), E.182512 (GLRX5), E.188186 (C7orf59), E.198721 (ECI2), E.204389 (HSPA1A), E.010256 (UQCRC1), E.076043 (REXO2), E.102362 (SYTL4), E.161939 (C17orf49), E.173039 (RELA), E.014216 (CAPN1), E.054938 (CHRDL2), E.065526 (SPEN), E.070501 (POLB), E.078808 (SDF4), E.083720 (OXCT1), E.100084 (HIRA), E.101246 (ARFRP1), E.102241 (HTATSF1), E.103591 (AAGAB), E.104626 (ERI1), E.105221 (AKT2), E.105402 (NAPA), E.105705 (SUGP1), E.106346 (USP42), E.108639 (SYNGR2), E.110107 (PRPF19), E.112473 (SLC39A7), E.113282 (CLINT1), E.115234 (SNX17), E.115561 (CHMP3), E.119906 (FAM178A), E.120733 (KDM3B), E.125375 (ATP5S), E.125798 (FOXA2), E.127415 (IDUA), E.129810 (SGOL1), E.132382 (MYBBP1A), E.133313 (CNDP2), E.134077 (THUMPD3), E.134248 (HBXIP), E.135597 (REPS1), E.137814 (HAUS2), E.138041 (SMEK2), E.140382 (HMG20A), E.143578 (CREB3L4), E.144224 (UBXN4), E.144306 (SCRN3), E.144741 (SLC25A26), E.145919 (BOD1), E.146281 (PM20D2), E.152359 (POC5), E.152409 (JMY), E.154889 (MPPE1), E.157551 (KCNJ15), E.157764

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	(BRAF), E.158987 (RAPGEF6), E.162069 (CCDC64B), E.162910 (MRPL55), E.163749 (CCDC158), E.164045 (CDC25A), E.164300 (SERINC5), E.165898 (ISCA2), E.167987 (VPS37C), E.168763 (CNNM3), E.170374 (SP7), E.171488 (LRRC8C), E.178381 (ZFAND2A), E.180998 (GPR137C), E.182318 (ZSCAN22), E.198040 (ZNF84), E.198216 (CACNA1E), E.198265 (HELZ), E.198586 (TLK1), E.203795 (FAM24A), E.204231 (RXRB), E.123992 (DNPEP), E.184634 (MED12), E.181885 (CLDN7), E.186660 (ZFP91), E.126777 (KTN1), E.080823 (MOK), E.101811 (CSTF2), E.124570 (SERPINB6), E.148835 (TAF5), E.158715 (SLC45A3), E.110955 (ATP5B), E.127022 (CANX), E.142208 (AKT1), E.128881 (TTBK2), E.147231 (CXorf57), E.006210 (CX3CL1), E.009830 (POMT2), E.011114 (BTBD7), E.065057 (NTHL1), E.068724 (TTC7A), E.073584 (SMARCE1), E.079785 (DDX1), E.084463 (WBP11), E.091140 (DLD), E.099821 (POLRMT), E.101126 (ADNP), E.104442 (ARMC1), E.105486 (LIG1), E.110921 (MVK), E.113441 (LNPEP), E.115758 (ODC1), E.116726 (PRAMEF12), E.119681 (LTBP2), E.136933 (RABEPK), E.137815 (RTF1), E.138095 (LRPPRC), E.138294 (MSMB), E.141873 (SLC39A3), E.142698 (C1orf94), E.143390 (RFX5), E.148488 (ST8SIA6), E.148737 (TCF7L2), E.151491 (EPS8), E.152422 (XRCC4), E.154832 (CXXC1), E.158321 (AUTS2), E.159147 (DONSON), E.160285 (LSS), E.160862 (AZGP1), E.160948 (VPS28), E.160972 (PPP1R16A), E.165934 (CPSF2), E.167604 (NFKBID), E.167766 (ZNF83), E.168803 (ADAL), E.169612 (FAM103A1), E.171262 (FAM98B), E.172893 (DHCR7), E.173889 (PHC3), E.176971 (FIBIN), E.177548 (RABEP2), E.179119 (SPTY2D1), E.184378 (ACTRT3), E.184508 (HDDC3), E.185043 (CIB1), E.186814 (ZSCAN30), E.186868 (MAPT), E.196812 (ZSCAN16), E.198563 (DDX39B), E.124529 (HIST1H4B), E.141002 (TCF25), E.174100 (MRPL45), E.109814 (UGDH), E.138756 (BMP2K), E.065457 (ADAT1), E.105948 (TTC26), E.109184 (DCUN1D4), E.125257 (ABCC4), E.126062 (TMEM115), E.142515 (KLK3), E.144381 (HSPD1), E.166710 (B2M), E.198824 (CHAMP1), E.078902 (TOLLIP), E.099331 (MYO9B), E.102710 (FAM48A), E.107485 (GATA3), E.120948 (TARDBP), E.187764 (SEMA4D), E.103855 (CD276), E.117751 (PPP1R8), E.173714 (WFIKKN2), E.172115 (CYCS), E.005882 (PDK2), E.007952 (NOX1), E.008118 (CAMK1G), E.012061 (ERCC1), E.015171 (ZMYND11), E.036257 (CUL3), E.057608 (GDI2), E.058729 (RIOK2), E.071246 (VASH1), E.073050 (XRCC1), E.073350 (LLGL2), E.079246 (XRCC5), E.085733 (CTTN), E.091542 (ALKBH5), E.091732 (ZC3HC1), E.092621 (PHGDH), E.099899 (TRMT2A), E.099917 (MED15), E.101439 (CST3), E.103479 (RBL2), E.104611 (SH2D4A), E.105281 (SLC1A5), E.106392 (C1GALT1), E.107104 (KANK1), E.107798 (LIPA), E.108296 (CWC25), E.109572 (CLCN3), E.112110 (MRPL18), E.113790 (EHHADH), E.115648 (MLPH), E.117308 (GALE), E.117335 (CD46), E.118513 (MYB), E.118640 (VAMP8), E.119321 (FKBP15), E.122705 (CLTA), E.123983 (ACSL3), E.124232 (RBPJL), E.125901 (MRPS26), E.127399 (LRRC61), E.127554 (GFER), E.128708 (HAT1), E.129355 (CDKN2D), E.130340 (SNX9), E.130935 (NOL11), E.131771 (PPP1R1B), E.133863 (TEX15), E.134207 (SYT6), E.136935 (GOLGA1), E.141425 (RPRD1A), E.143374 (TARS2), E.143771 (CNIH4), E.146966 (DENND2A), E.148672 (GLUD1), E.150593 (PDCD4), E.153936 (HS2ST1), E.154099 (DNAAF1), E.156006 (NAT2), E.156282 (CLDN17), E.158545 (ZC3H18), E.158604 (TMED4), E.158813 (EDA), E.159184 (HOXB13), E.161267 (BDH1), E.163492 (CCDC141), E.163629 (PTPN13), E.164163 (ABCE1), E.164520 (RAET1E), E.165138 (ANKS6), E.165923 (AGBL2), E.166484 (MAPK7), E.166747 (AP1G1), E.166971 (AKTIP), E.167744 (NTF4), E.168071 (CCDC88B), E.169087 (HSPBAP1), E.170396 (ZNF804A), E.170445 (HARS), E.170632 (ARMC10), E.170743 (SYT9), E.171428 (NAT1), E.172346 (CSDC2), E.173805 (HAP1), E.175175 (PPM1E), E.175203 (DCTN2), E.177542 (SLC25A22), E.177679 (SRRM3), E.178828 (RNF186), E.182013 (PNMAL1), E.182054 (IDH2), E.182890 (GLUD2), E.184156 (KCNQ3), E.184697 (CLDN6), E.184735 (DDX53), E.184840 (TMED9), E.185219 (ZNF445), E.186198 (SLC51B), E.186205 (MOSC1; MARC1), E.189143 (CLDN4), E.196700 (ZNF512B), E.196743 (GM2A), E.198087 (CD2AP), E.198951 (NAGA), E.204406 (MBD5), E.002330 (BAD), E.105404 (RABAC1), E.114127 (XRN1), E.117713 (ARID1A), E.123143 (PKN1), E.130764 (LRRC47), E.131773 (KHDRBS3), E.137806 (NDUFAF1), E.142864 (SERBP1), E.158747 (NBL1), E.175063 (UBE2C), E.178104 (PDE4DIP), E.186472 (PCLO), E.069956 (MAPK6), E.112941 (PAPD7), E.116604 (MEF2D), E.142875 (PRKACB), E.147133 (TAF1), E.157510 (AFAP1L1), E.006625 (GGCT), E.155980 (KIF5A), E.134444 (KIAA1468), E.107968 (MAP3K8), E.117592 (PRDX6), E.123154 (WDR83), E.135297 (MTO1), E.135829 (DHX9), E.149548 (CCDC15), E.152086 (TUBA3E), E.167553 (TUBA1C),

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	E.169826 (CSGALNACT2), E.171121 (KCNMB3), E.198033 (TUBA3C), E.147724 (FAM135B), E.170854 (MINA), E.006695 (COX10), E.067369 (TP53BP1), E.089248 (ERP29), E.112096 (SOD2), E.138073 (PREB), E.146856 (AGBL3), E.159423 (ALDH4A1), E.171345 (KRT19), E.172345 (STARD5), E.111647 (UHRF1BP1L), E.117877 (CD3EAP), E.155714 (PDZD9), E.156603 (MED19), E.075886 (TUBA3D), E.167699 (GLOD4), E.121749 (TBC1D15), E.090861 (AARS), E.093010 (COMT), E.117676 (RPS6KA1), E.157502 (MUM1L1), E.159921 (GNE), E.169562 (GJB1), E.179776 (CDH5), E.071626 (DAZAP1), E.085224 (ATRX), E.116478 (HDAC1), E.117298 (ECE1), E.176171 (BNIP3), E.177425 (PAWR), E.179348 (GATA2), E.187840 (EIF4EBP1), E.033030 (ZCCHC8), E.049239 (H6PD), E.060688 (SNRNP40), E.075239 (ACAT1), E.095627 (TDRD1), E.109625 (CPZ), E.113719 (ERGIC1), E.126773 (C14orf135; PCNXL4), E.149218 (ENDOD1), E.162975 (KCNF1), E.183785 (TUBA8), E.198589 (LRBA), E.105379 (ETFB), E.011052 (NME2), E.011143 (MKS1), E.048544 (MRPS10), E.062485 (CS), E.114054 (PCCB), E.138587 (MNS1), E.155959 (VBP1), E.181222 (POLR2A), E.183723 (CMTM4), E.184661 (CDCA2), E.204316 (MRPL38), E.140694 (PARN), E.035141 (FAM136A), E.095485 (CWF19L1), E.115540 (MOB4), E.123595 (RAB9A), E.140678 (ITGAX), E.141258 (SGSM2), E.158941 (KIAA1967), E.169189 (NSMCE1), E.198431 (TXNRD1), E.016402 (IL20RA), E.112234 (FBXL4), E.125445 (MRPS7), E.128342 (LIF), E.164051 (CCDC51), E.175866 (BAIAP2), E.102780 (DGKH), E.203813 (HIST1H3H), E.198231 (DDX42), E.030582 (GRN), E.106049 (HIBADH), E.130810 (PPAN), E.132475 (H3F3B), E.158290 (CUL4B), E.166266 (CUL5), E.026559 (KCNG1), E.059122 (FLYWCH1), E.107897 (ACBD5), E.121068 (TBX2), E.125944 (HNRNPR), E.134308 (YWHAQ), E.137558 (PI15), E.137601 (NEK1), E.147548 (WHSC1L1), E.149182 (ARFGAP2), E.159658 (KIAA0494), E.165699 (TSC1), E.170927 (PKHD1), E.186575 (NF2), E.188021 (UBQLN2), E.167552 (TUBA1A), E.003756 (RBM5), E.134138 (MEIS2), E.008196 (TFAP2B), E.079313 (REXO1), E.089127 (OAS1), E.106078 (COBL), E.113645 (WWC1), E.116288 (PARK7), E.121940 (CLCC1), E.136280 (CCM2), E.141639 (MAPK4), E.147475 (ERLIN2), E.155660 (PDIA4), E.162298 (SYVN1), E.176978 (DPP7), E.176994 (SMCR8), E.178175 (ZNF366), E.196591 (HDAC2), E.127824 (TUBA4A), E.163932 (PRKCD), E.143375 (CGN), E.076864 (RAP1GAP), E.138772 (ANXA3), E.163041 (H3F3A), E.165813 (C10orf118), E.166337 (TAF10), E.178078 (STAP2), E.184007 (PTP4A2), E.167004 (PDIA3), E.039560 (RAI14), E.119636 (C14orf45), E.140374 (ETFA), E.143633 (C1orf131), E.144935 (TRPC1), E.156735 (BAG4), E.159348 (CYB5R1), E.170275 (CRTAP), E.172717 (FAM71D), E.172939 (OXSR1), E.176105 (YES1), E.078295 (ADCY2), E.119888 (EPCAM), E.141522 (ARHGDIA), E.184047 (DIABLO), E.109062 (SLC9A3R1), E.170037 (CNTROB), E.066557 (LRRC40), E.074964 (ARHGEF10L), E.078269 (SYNJ2), E.090013 (BLVRB), E.100142 (POLR2F), E.100399 (CHADL), E.104365 (IKBKB), E.111261 (MANSC1), E.111907 (TPD52L1), E.112578 (BYSL), E.121957 (GPSM2), E.122884 (P4HA1), E.124693 (HIST1H3B), E.126653 (NSRP1), E.130402 (ACTN4), E.138757 (G3BP2), E.150991 (UBC), E.164828 (SUN1), E.175216 (CKAP5), E.176155 (CCDC57), E.177459 (C8orf47), E.183856 (IQGAP3), E.185122 (HSF1), E.122952 (ZWINT), E.151093 (OXSM), E.067704 (IARS2), E.088899 (ProSAP-proteina de interação 1), E.091483 (FH), E.114388 (NPRL2), E.114861(FOXP1), E.135914 (HTR2B), E.197837 (HIST4H4), E.127720 (C12orf26; METTL25), E.123416 (TUBA1B), E.047410 (TPR), E.117748 (RPA2), E.133835 (HSD17B4), E.067248 (DHX29), E.121879 (PIK3CA), E.132589 (FLOT2), E.136750 (GAD2), E.160789 (LMNA), E.166329, E.170088 (TMEM192), E.175946 (KLHL38), E.178163 (ZNF518B), E.182217 (HIST2H4B), E.184470 (TXNRD2), E.110321 (EIF4G2), E.171861 (RNMTL1), E.065978 (YBX1), E.115738 (ID2), E.143294 (PRCC), E.158042 (MRPL17), E.169093 (ASMTL), E.090565 (RAB11FIP3), E.185591 (SP1), E.156304 (SCAF4), E.092978 (GPATCH2), E.100056 (DGCR14), E.100583 (SAMD15), E.105723 (GSK3A), E.107551 (RASSF4), E.107581 (EIF3A), E.107890 (ANKRD26), E.110104 (CCDC86), E.112584 (FAM120B), E.113580 (NR3C1), E.114491 (UMPS), E.137312 (FLOT1), E.137955 (RABGGTB), E.141994 (DUS3L), E.147044 (CASK), E.152818 (UTRN), E.180667 (YOD1), E.184916 (JAG2), E.196526 (AFAP1), E.198783 (ZNF830), E.108465 (CDK5RAP3), E.156515 (HK1), E.036448 (MYOM2), E.061918 (GUCY1B3), E.070785 (EIF2B3), E.116044 (NFE2L2), E.128311 (TST), E.131473 (ACLY), E.132716 (DCAF8), E.138363 (ATIC), E.166596 (WDR16), E.170027 (YWHAG), E.174021 (GNG5), E.203879 (GDI1), E.160049 (DFFA), E.010810 (FYN), E.051596 (THOC3), E.006453 (BAI1-associated protein 2-like 1), E.126945 (HNRNPH2), E.165695 (AK8), E.069869 (NEDD4), E.111801 (BTN3A3),

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	E.112232 (KHDRBS2), E.128626 (MRPS12), E.129636 (ITFG1), E.137948 (BRDT), E.147257 (GPC3), E.155380 (SLC16A1), E.159692 (CTBP1), E.166833 (NAV2), E.172466 (ZNF24), E.175110 (MRPS22), E.176102 (CSTF3), E.179388 (EGR3), E.185359 (HGS), E.198001 (IRAK4), E.100603 (SNW1), E.162641 (AKNAD1), E.069712 (KIAA1107), E.073756 (PTGS2), E.077522 (ACTN2), E.101639 (CEP192), E.106633 (GCK), E.115241 (PPM1G), E.116649 (SRM), E.120370 (GORAB), E.124143 (ARHGAP40), E.127948 (POR), E.129315 (CCNT1), E.132646 (PCNA), E.135740 (SLC9A5), E.151726 (ACSL1), E.154380 (ENAH), E.157103 (SLC6A1), E.163930 (BAP1), E.164488 (DACT2), E.164754 (RAD21), E.175220 (ARHGAP1), E.180318 (ALX1), E.181234 (TMEM132C), E.197081 (IGF2R), E.092871 (RFFL), E.163644 (PPM1K), E.171723 (GPHN), E.108953 (YWHAE), E.072110 (ACTN1), E.077097 (TOP2B), E.090889 (KIF4A), E.114331 (ACAP2), E.114867 (EIF4G1), E.117593 (DARS2), E.118523 (CTGF), E.120915 (EPHX2), E.134759 (ELP2), E.138061 (CYP1B1), E.140743 (CDR2), E.151247 (EIF4E), E.152942 (RAD17), E.160685 (ZBTB7B), E.163923 (RPL39L), E.167642 (SPINT2), E.167996 (FTH1), E.185736 (ADARB2), E.198841 (KTI12), E.185860 (C1orf110), E.160226 (C21orf2), E.070814 (TCOF1), E.124749 (COL21A1), E.154639 (CXADR), E.065485 (PDIA5), E.023909 (GCLM), E.100714 (MTHFD1), E.108387 (SEPT4), E.160867 (FGFR4), E.134684 (YARS), E.123080 (CDKN2C), E.065548 (ZC3H15), E.116455 (WDR77), E.117448 (AKR1A1), E.100393 (EP300), E.138160 (KIF11), E.166263 (STXBP4), E.173473 (SMARCC1), E.124942 (AHNAK), E.174842 (GLMN), E.180198 (RCC1), E.185499 (MUC1), E.143947 (RPS27A), E.170315 (UBB), E.003402 (CFLAR), E.137055 (PLAA), E.142606 (MMEL1), E.147697 (GSDMC), E.163110 (PDLIM5), E.135842 (FAM129A), E.160691 (SHC1), E.197157 (SND1), E.029725 (RABEP1), E.127946 (HIP1), E.001036 (FUCA2), E.109846 (CRYAB), E.183831 (ANKRD45), E.189283 (FHIT), E.092820 (EZR), E.104067 (TJP1), E.120159 (C9orf82; CAAP1), E.154864 (PIEZO2), E.196975 (ANXA4), E.105220 (GPI), E.127914 (AKAP9), E.135870 (RC3H1), E.026508 (CD44), E.089154 (GCN1L1), E.100311 (PDGFB), E.119383 (PPP2R4), E.075624 (ACTB), E.177409 (SAMD9L), E.177731 (FLII), E.015676 (NUDCD3), E.146457 (WTAP), E.178950 (GAK), E.167110 (GOLGA2)
Vesícula de próstata	LAMP2, ACPP, CTNNA1, HEBP2, ISOC2, HNRNPC, HNRNPM, TOMM22, TOM1, ACO2, KRT18, HSPA9, LMNB1, SPR, PPL, ALDH6A1, HNRNPA2B1, ATXN1, SMARCA4, ECHS1, PAICS, ILF3, PSME3, COX5B, RAB1A, SCARB2, HADH, ESD, SORD, ILF2, CALM2, ATP5A1, TGOLN2, ANGPTL4, ALCAM, KRT2, PC, NPM1, C1orf116, GPC6, ALDH1A3, HIST1H1C, XRCC6, HNRNPAB, PSAP, CDH1, SCAMP2, VASP, CD9, ATP1B3, HSD17B10, APAF1, EIF2C2, RAB5A, CFL2, FARSA, XPNPEP3, ENTPD4, APLP2, NUCB1, RAB3D, VEGFA, HPS3, TSNAXIP1, HNRNPL, PSMB7, GNA12, NONO, FOLH1, PRKAR2A, PHB, HIST3H3, MAP7, VCP, U2AF2, FUS, FKBP5, NDRG1, ATP1A3, NCL, RPL36, KRT8, C1GALT1C1, FASN, PTBP1, TXNDC16, DNAJC5, SLC37A2, HNRNPK, VDAC2, PRDX2, TALDO1, USP14, PSMD7, HSPE1, DNAJB1, YWHAZ, RAB3B, CORO1B, MDH2, HIST1H3A, LAMP1, STC2, DSTN, SLC20A2, ENPP4, WIZ, HSP90AB1, IDH3B, ECH1, C1QBP, SET, TNFSF18, ITGB7, SPOCK1, EIF4A2, CCT3, CLDN3, EEF2, LRRC57, RUVBL2, CLDN5, APPL2, TM9SF2, EIF4A3, DBI, DBF4B, SVIP, CD151, ALOX5, SLC9A3R2, RAB27B, DLG1, ARCN1, CHCHD3, RAB5B, RPS25, RPL10, DDAH1, HSP90B1, CTNNB1, PSMD2, PKP3, FLNB, EFTUD2, GLO1, PRKCSH, TMBIM1, SEC31A, TMED10, RPL14, MATR3, APEX1, B4GALT1, HNRNPA1, CPD, HSPA1A, CAPN1, CHRDL2, SPEN, SDF4, NAPA, SYNGR2, CHMP3, CNDP2, CCDC64B, SERINC5, VPS37C, DNPEP, CLDN7, KTN1, SERPINB6, ATP5B, CANX, AKT1, TTBK2, DDX1, DLD, LNPEP, LTBP2, LRPPRC, EPS8, AZGP1, VPS28, DHCR7, CIB1, DDX39B, HIST1H4B, UGDH, HSPD1, B2M, TOLLIP, CD276, CYCS, CUL3, GDI2, LLGL2, XRCC5, CTTN, PHGDH, CST3, RBL2, SLC1A5, CD46, VAMP8, CLTA, ACSL3, MRPS26, SNX9, GLUD1, TMED4, PTPN13, AP1G1, SYT9, DCTN2, IDH2, GLUD2, TMED9, CLDN4, GM2A, CD2AP, MBD5, SERBP1, NBL1, PRKACB, GGCT, PRDX6, DHX9, TUBA3E, TUBA1C, TUBA3C, ERP29, SOD2, KRT19, TUBA3D, AARS, COMT, MUM1L1, CDH5, ECE1, ACAT1, ENDOD1, TUBA8, ETFB, NME2, CS, VBP1, RAB9A, TXNRD1, LIF, BAIAP2, HIST1H3H, GRN, HIBADH, H3F3B, CUL4B, HNRNPR, YWHAQ, PKHD1, TUBA1A, PARK7, ERLIN2, PDIA4, TUBA4A, PRKCD, ANXA3, H3F3A, PTP4A2, PDIA3, ETFA, CYB5R1, CRTAP, OXSR1, YES1, EPCAM, ARHGDIA, DIABLO, SLC9A3R1, BLVRB, P4HA1, HIST1H3B, ACTN4, UBC, FH, HIST4H4, TUBA1B, HSD17B4, PIK3CA, FLOT2, LMNA, TMEM192, HIST2H4B, YBX1, EIF3A, FLOT1, UTRN, HK1, ACLY, ATIC, YWHAG, GNG5, GDI1, HNRNPH2, NEDD4, BTN3A3, SLC16A1, HGS, ACTN2, SRM, PCNA, ACSL1, RAD21, ARHGAP1, IGF2R, YWHAE, ACTN1, EIF4G1, EPHX2, EIF4E, FTH1, CXADR, MTHFD1, AKR1A1, STXBP4, AHNAK, MUC1, RPS27A, UBB, PDLIM5, FAM129A, SND1, FUCA2, CRYAB, EZR, TJP1, ANXA4, GPI, AKAP9, CD44, GCN1L1, ACTB, FLII, NUDCD3

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Vesícula de câncer de próstata	EGFR, GLUD2, ANXA3, APLP2, BclG, Cofilina 2 /cfL2, DCTN-50 / DCTN2, DDAH1, ESD, FARSLA, GITRL, PRKCSH, SLC20A2, Sinaptogirina 2 /SYNGR2, TM9SF2, Calnexin, TOMM22, NDRG1, RPL10, RPL14, USP14, VDAC2, LLGL2, CD63, CD81, uPAR / CD87, ADAM 9, BDKRB2, CCR5, CCT2 (TCP1-beta), PSMA, PSMA1, HSPB1, VAMP8, Rab1A, B4GALT1, Aspartil Aminopeptidase /Dnpep, ATPase Na+/K+ beta 3/ATP1B3, BDNF, ATPB, beta 2 microglobulina, Camodulina 2 /CALM2, CD9, XRCC5 / Ku80, SMARCA4, TOM1, Citrocromo C, Hsp10 / HSPE1, COX2 / PTGS2, Claudin 4 /CLDN4, Citoqueratina 8, Cortactina/CTTN, DBF4B /DRF1, ECH1, ECHS1, GOLPH2, ETS1, DIP13B /appl2, EZH2 / KMT6, GSTP1, hK2 / Kif2a, IQGAP1, KLK13, Lamp-2, GM2A, Hsp40/DNAJB1, HADH/HADHSC, Hsp90B, Nucleofosmina, p130 /RBL2, PHGDH, RAB3B, ANXA1, PSMD7, PTBP1, Rab5a, SCARB2, Estaniocalcina 2 /STC2, TGN46 /TGOLN2, TSNAXIP1, ANXA2, CD46, KLK14, IL1 alfa, hnRNP C1 + C2, hnRNP A1, hnRNP A2B1, Claudina 5, CORO1B, Integrina beta 7, CD41, CD49d, CDH2, COX5b, IDH2, ME1, PhIP, ALDOA, EDNRB/EDN3, MTA1, NKX3-1, TMPRSS2, CD10, CD24, CDH1, ADAM10, B7H3, CD276, CHRDL2, SPOCK1, VEGFA, BCHE, CD151, CD166/ALCAM, CSE1L, GPC6, CXCR3, GAL3, GDF15, IGFBP-2, HGF, KLK12, ITGAL, KLK7, KLK9, MMP 2, MMP 25, MMP10, TNFRI, Notch1, PAP - o mesmo de ACPP PTPN13/PTPL1, seprase/FAP, TNFR1, TWEAK, VEGFR2, E-caderina, Hsp60, CLDN3- Claudina 3 KLK6, KLK8, EDIL3 (del-1), APE1, MMP 1, MMP3, nAnS, PSP94 / MSP / IGBF, PSAP, RPL19, SET, TGFB, TGM2, TIMP-1, TNFRII, MDH2, PKP1, Cistatina C, Trop2 / TACSTD2, CCR2 / CD192, hnRNP M1-M4, CDKN1A, CGA, Citoqueratina 18, EpoR, GGPS1, FTL (leve e pesado), GM-CSF, HSP90AA1, IDH3B, MKI67/Ki67, LTBP2, KLK1, KLK4, KLK5, LDH-A, Nav1.7/SCN9A, NRP1 / CD304, PIP3 / BPNT1, PKP3, CgA, PRDX2, SRVN, ATPase Na+/K + alfa 3/ATP1A3, SLC3A2 / CD98, U2AF2, TLR4 (CD284), TMPRSS1, TNFα, uPA, GloI, ALIX, PKM2, FABP5, CAV1, TLR9 / CD289, ANXA4, PLEKHC1/ Quindlina -2, CD71 / TRFR, MBD5, SPEN/ RBM15, LGALS8, SLC9A3R2, ENTPD4, ANGPTL4, p97 / VCP, TBX5, PTEN, Proibitina, LSP1, HOXB13, DDX1, AKT1, ARF6, EZR, H3F3A, CIB1, Ku70 (XRCC6), KLK11, TMBIM6, SYT9, APAF1, CLDN7, MATR3, CD90/THY1, Tollip, NOTCH4, 14-3-3 zeta/beta, ATP5A1, DLG1, GRP94, FKBP5/FKBP51, LAMP1, LGALS3BP, GDI2, HSPA1A, NCL, KLK15, Citoqueratina básica, EDN-3, AGR2, KLK10, BRG1, FUS, Histona H4, hnRNP L, Catetina Alfa 1, hnRNP K (F45)*, MMP7*, DBI*, beta catenina, CTH, CTNND2, Ataxina 1, Proteassomo 20S beta 7, ADE2, EZH2, GSTP1, Lamina B1, Subunidade Delta de Coatomer, ERAB. Mortalina, PKM2, IGFBP-3, CTNND1 / delta 1-catenina / p120-catenina, PKA R2, NONO, Sorbitol Desidrogenase, Aconitase 2, VASP, Lipoamida Desidrogenase, AP1G1, GOLPH2, ALDH6A1, AZGP1, Ago2, CNDP2, Nucleobindina-1, SerpinB6, RUVBL2, Proteassomo 19S 10B, SH3PX1, SPR, Destrina, MDM4, FLNB, FASN, PSME
Vesículas de câncer de próstata	14-3-3 zeta/beta, Aconitase 2, ADAM 9, ADAM10, ADE2, AFM, Ago2, AGR2, AKT1, ALDH1A3, ALDH6A1, ALDOA, ALIX, ANGPTL4, ANXA1, ANXA2, ANXA3, ANXA3, ANXA4, AP1G1, APAF1, APE1, APLP2, APLP2, ARF6, Aspartil Aminopeptidase / Dnpep, Ataxina 1, ATP5A1, ATPase Na+/K+ alfa 3 /ATP1A3, ATPase Na+/K+ beta 3/ATP1B3, ATPase Na+/K+ beta 3/ATP1B3, ATPB, AZGP1, B4GALT1, B7H3, BCHE, BclG, BDKRB2, BDNF, BDNF, beta 2 Microglobulina, beta catenina, BRG1, CALM2, Calmodulina 2 /CALM2, Calnexina, Calpaína 1, Caltenina Alfa 1, CAV1, CCR2 / CD192, CCR5, CCT2 (TCP1-beta), CD10, CD151, CD166/ALCAM, CD24, CD276, CD41, CD46, CD49d, CD63, CD71 / TRFR, CD81, CD9, CD9, CD90/THY1, CDH1, CDH2, CDKN1A, CGA, CgA, CHRDL2, CIB1, CIB1, Claudina 4/CLDN4, Claudina 5, CLDN3, CLDN3-Claudina 3, CLDN4, CLDN7, CNDP2, Subunidade Delta de Coatomer, Cofilina 2/cgL2, CORO1B, Cortactina/ CTNN, COX2 / PTGS2, COX5b, CSE1L, CTH, CTNND1 / delta 1-catenina / p120-catenina, CTNND2, CXCR3, CYCS, Cistatina C, Citocromo C, Citoqueratina 18, Citoqueratina 8, Citoqueratina básica, DBF4B /DRF1, DBI*, DCTN-50 / DCTN2, DDAH1, DDAH1, DDX1, Destrina, DIP13B /appl2, DIP13B /appl2, DLG1, Dnpep, E-Cderina, ECH1, ECHS1, ECHS1, EDIL3 (del-1), EDN-3, EDNRB/EDN3, EGFR, EIF4A3, ENTPD4, EpoR, EpoR, ERAB, ESD, ESD, ETS1, ETS1, ETS-2, EZH2, EZH2 / KMT6, EZR, FABP5, FARSLA, FASN, FKBP5/FKBP51, FLNB, FTL (leve e pesado), FUS, GAL3, gama catenina, GDF15, GDI2, GGPS1, GGPS1, GITRL, GloI, GLUD2, GM2A, GM-CSF,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	GOLM1/GOLPH2 Mab; clone 3B10, GOLPH2, GOLPH2, GPC6, GRP94, GSTP1, GSTP1, H3F3A, HADH/HADHSC, HGF, HIST1H3A, Histona H4, hK2 / Kif2a, hnRNP A1, hnRNP A2B1, hnRNP C1 + C2, hnRNP K (F45)*, hnRNP L, hnRNP M1-M4, HOXB13, Hsp10 / HSPE1, Hsp40/DNAJB1, Hsp60, HSP90AA1, Hsp90B, HSPA1A, HSPB1, IDH2, IDH3B, IDH3B, IGFBP-2, IGFBP-3, IgG1, IgG2A, IgG2B, IL1 alfa, IL1 alfa, Integrina beta 7, IQGAP1, ITGAL, KLHL12/C3IP1, KLK1, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK9, Ku70 (XRCC6), Lamina B1, LAMP1, Lamp-2, LDH-A, LGALS3BP, LGALS8, Lipoamida Desidrogenase, LLGL2, LSP1, LSP1, LTBP2, MATR3, MBD5, MDH2, MDM4, ME1, MKI67/Ki67, MMP 1, MMP 2, MMP 25, MMP10, MMP-14/MT1-MMP, MMP3, MMP7*, Mortalina, MTA1, nAnS, nAnS, Nav1.7/SCN9A, NCL, NDRG1, NKX3-1, NONO, Notch1, NOTCH4, NRP1 / CD304, Nucleobindina-1,Nucleofosmina, p130/RBL2, p97/VCP, PAP-o mesmo que ACPP,PHGDH PhIP, PIP3/BPNT1, PKAR2, PKM2,PKM2,PKP1,PKP3, PLEKHC1/Quindilina-2, PRDX2, PRKCSH,Proibitina, Proteassomo19S 10B, Proteassomo 20S beta 7,PSAP,PSMA,PSMA1, PSMA1, PSMD7, PSMD7, PSME3, PSP94 / MSP / IGBF, PTBP1, PTEN, PTPN13/PTPL1, Rab1A, RAB3B, Rab5a, Rad51b, RPL10, RPL10, RPL14, RPL14, RPL19, RUVBL2, SCARB2, seprase/FAP, SerpinB6, SET, SH3PX1, SLC20A2, SLC3A2 / CD98, SLC9A3R2, SMARCA4, Sorbitol Desidrogenase, SPEN/ RBM15, SPOCK1, SPR, SRVN,Estaniocalcina 2 /STC2, STEAP1,Sinaptogirina 2/SYNGR2, Sindecano,SYNGR2, SYT9, TAF1B / GRHL1, TBX5, TGFB, TGM2, TGN46 /TGOLN2, TIMP-1, TLR3, TLR4 (CD284), TLR9 / CD289, TM9SF2, TMBIM6, TMPRSS1, TMPRSS2, TNFR1, TNFRI, TNFRII, TNFSF18 / GITRL, TNFα, TNFα, Tollip, TOM1, TOMM22, Trop2 / TACSTD2, TSNAXIP1, TWEAK, U2AF2, uPA, uPAR / CD87, USP14, USP14, VAMP8, VASP, VDAC2, VEGFA, VEGFR1/FLT1, VEGFR2, VPS28, XRCC5 / Ku80, XRCC5 / Ku80
Vesículas de próstata/ Vesículas gerais	EpCAM/TROP-1, HSA, Fibrinogênio, GAPDH, Colesterol Oxidase, MMP7, Fator D de Complemento/Adipsina, E-caderina, Anticorpo Transferrina, eNOS, IgM, CD9, Apolipoproteína B (Apo B), Ep-CAM, TBG, Calequerina 3, IgA, Anexina V, IgG, Piruvato Carboxilase, tripsina, AFP, TNF RI/TNFRSF1A, Aptâmero CAR023, Aptâmero CAR024, Aptâmero CAR025, Aptâmero CAR026
Complexos de Ribonucleoproteína &vesículas	GW182, Ago2, miR-let-7a, miR-16, miR-22, miR-148a, miR-451, miR-92a, CD9, CD63, CD81
Vesículas de câncer de próstata	PCSA, Muc2, Adam10
Vesículas de câncer de próstata	Fosfatase Alcalina (AP), CD63, MyoD1, Enolase Neorônio Específica, MAP1B, CNPase, Proibitina, CD45RO, Proteína de Choque Térmico 27, Colágeno II, Laminina B1/b1, Gail, CDw75, bc1-XL, Laminina-s, Ferritina, CD21, Fator de Ribosilação de ADP (ARF-6)
Vesículas de câncer de próstata	CD56/NCAM-1, Proteína de Choque Térmico 27/hsp27, CD45RO, MAP1B, MyoD1, CD45/T200/LCA, CD3zeta, Laminina-s, bcl-XL, Rad18, Gail, Timidilato Sintase, Fosfatase Alcalina (AP), CD63, MMP-16 / MT3-MMP, Ciclina C, Enolase Neurônio Específica, SIRPa1, Laminina B1/b1, Amiloide Beta (APP), SODD (Silenciador de Domínio de Morte), CDC37, Gab-1, E2F-2, CD6, Mastócito Quimase, Gama Glutamilcisteína Sintetase (GCS)
Vesículas de câncer de próstata	EpCAM, MMP7, PCSA, BCNP, ADAM10, KLK2, SPDEF, CD81, MFGE8, IL-8
Vesículas de câncer de próstata	EpCAM, KLK2, PBP, SPDEF, SSX2, SSX4
Vesículas de câncer de próstata	ADAM-10, BCNP, CD9, EGFR, EpCam, IL1B, KLK2, MMP7, p53, PBP, PCSA, SERPINB3, SPDEF, SSX2, SSX4
Membros de trajetória de receptor de androgênio (AR) em cMVs	GTF2F1, CTNNB1, PTEN, APPL1, GAPDH, CDC37, PNRC1, AES, UXT, RAN, PA2G4, JUN, BAG1, UBE2I, HDAC1, COX5B, NCOR2, STUB1, HIPK3, PXN, NCOA4

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Membros de trajetória de EGFR1 em cMVs	RALBP1, SH3BGRL, RBBP7, REPS1, SNRPD2, CEBPB, APPL1, MAP3K3, EEF1A1, GRB2, RAC1, SNCA, MAP2K3, CEBPA, CDC42, SH3KBP1, CBL, PTPN6, YWHAB, FOXO1, JAK1, KRT8, RALGDS, SMAD2, VAV1, NDUFA13, PRKCB1, MYC, JUN, RFXANK, HDAC1, HIST3H3, PEBP1, PXN, TNIP1, PKN2
Membros de trajetória de TNF-alfa em cMVs	BCL3, SMARCE1, RPS11, CDC37, RPL6, RPL8, PAPOLA, PSMC1, CASP3, AKT2, MAP3K7IP2, POLR2L, TRADD, SMARCA4, HIST3H3, GNB2L1, PSMD1, PEBP1, HSPB1, TNIP1, RPS13, ZFAND5, YWHAQ, COMMD1, COPS3, POLR1D, SMARCC2, MAP3K3, BIRC3, UBE2D2, HDAC2, CASP8, MCM7, PSMD7, YWHAG, NFKBIA, CAST, YWHAB, G3BP2, PSMD13, FBL, RELB, YWHAZ, SKP1, UBE2D3, PDCD2, HSP90AA1, HDAC1, KPNA2, RPL30, GTF2I, PFDN2
Câncer colorretal	CD9, EGFR, NGAL, CD81, STEAP, CD24, A33, CD66E, EPHA2, Ferritina, GPR30, GPR110, MMP9, OPN, p53, TMEM211, TROP2, TGM2, TIMP, EGFR, DR3, UNC93A, MUC17, EpCAM, MUC1, MUC2, TSG101, CF63, B7H3
Câncer colorretal	DR3, STEAP, epha2, TMEM211, unc93A, A33, CD24, NGAL, EpCam, MUC17, TROP2, TFTS
Câncer colorretal	A33, AFP, ALIX, ALX4, ANCA, APC, ASCA, AURKA, AURKB, B7H3, BANK1, BCNP, BDNF, CA-19-9, CCSA-2, CCSA-3&4, CD10, CD24, CD44, CD63, CD66 CEA, CD66e CEA, CD81, CD9, CDA, C-Erb2, CRMP-2, CRP, CRTN, CXCL12, CYFRA21-1, DcR3, DLL4, DR3, EGFR, Epcam, EphA2, FASL, FRT, GAL3, GDF15, GPCR (GPR110), GPR30, GRO-1, HBD 1, HBD2, HNP1-3, IL-1B, IL8, IMP3, L1CAM, LAMN, MACC-1, MGC20553, MCP-1, M-CSF, MIC1, MIF, MMP7, MMP9, MS4A1, MUC1, MUC17, MUC2, Ncam, NGAL, NNMT, OPN, p53, PCSA, PDGFRB, PRL, PSMA, PSME3, Reg IV, SCRN1, Sept-9, SPARC, SPON2, SPR, SRVN, TFF3, TGM2, TIMP-1, TMEM211, TNF-alpha, TPA, TPS, Trail-R2, Trail-R4, TrKB, TROP2, Tsg 101, TWEAK, UNC93A, VEGFA
Câncer colorretal	miR 92, miR 21, miR 9, miR 491
Câncer colorretal	miR-127-3p, miR-92a, miR-486-3p, miR-378
Câncer colorretal	TMEM211, MUC1, CD24 and/or GPR110 (GPCR 110)
Câncer colorretal	hsa-miR-376c, hsa-miR-215, hsa-miR-652, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-1296, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-190, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-202, hsa-miR-195
Marcadores de vesícula de câncer colorretal	A26C1A, A26C1B, A2M, ACAA2, ACE, ACOT7, ACP1, ACTA1, ACTA2, ACTB, ACTBL2, ACTBL3, ACTC1, ACTG1, ACTG2, ACTN1, ACTN2, ACTN4, ACTR3, ADAM10, ADSL, AGR2, AGR3, AGRN, AHCY, AHNAK, AKR1B10, ALB, ALDH16A1, ALDH1A1, ALDOA, ANXA1, ANXA11, ANXA2, ANXA2P2, ANXA4, ANXA5, ANXA6, AP2A1, AP2A2, APOA1, ARF1, ARF3, ARF4, ARF5, ARF6, ARHGDIA, ARPC3, ARPC5L, ARRDC1, ARVCF, ASCC3L1, ASNS, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1B1, ATP4A, ATP5A1, ATP5B, ATP5I, ATP5L, ATP5O, ATP6AP2, B2M, BAIAP2, BAIAP2L1, BRI3BP, BSG, BUB3, C1orf58, C5orf32, CAD, CALM1, CALM2, CALM3, CAND1, CANX, CAPZA1, CBR1, CBR3, CCT2, CCT3, CCT4, CCT5, CCT6A, CCT7, CCT8, CD44, CD46, CD55, CD59, CD63, CD81, CD82, CD9, CDC42, CDH1, CDH17, CEACAM5, CFL1, CFL2, CHMP1A, CHMP2A, CHMP4B, CKB, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC1, CLIC4, CLSTN1, CLTC, CLTCL1, CLU, COL12A1, COPB1, COPB2, CORO1C, COX4I1, COX5B, CRYZ, CSPG4, CSRP1, CST3, CTNNA1, CTNNB1, CTNND1, CTTN, CYFIP1, DCD, DERA, DIP2A, DIP2B, DIP2C, DMBT1, DPEP1, DPP4, DYNC1H1, EDIL3, EEF1A1, EEF1A2, EEF1AL3, EEF1G, EEF2, EFNB1, EGFR, EHD1, EHD4, EIF3EIP, EIF3I, EIF4A1, EIF4A2, ENO1, ENO2, ENO3, EPHA2, EPHA5, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPPK1, ESD, EZR, F11R, F5, F7, FAM125A, FAM125B, FAM129B, FASLG, FASN, FAT, FCGBP, FER1L3, FKBP1A, FLNA, FLNB, FLOT1, FLOT2, G6PD, GAPDH, GARS, GCN1L1, GDI2, GK, GMDS, GNA13, GNAI2, GNAI3, GNAS, GNB1, GNB2, GNB2L1, GNB3, GNB4, GNG12, GOLGA7, GPA33, GPI, GPRC5A, GSN, GSTP1, H2AFJ, HADHA, hCG_1757335, HEPH, HIST1H2AB, HIST1H2AE, HIST1H2AJ, HIST1H2AK, HIST1H4A, HIST1H4B, HIST1H4C, HIST1H4D, HIST1H4E, HIST1H4F, HIST1H4H, HIST1H4I, HIST1H4J, HIST1H4K, HIST1H4L, HIST2H2AC, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST3H2A, HIST4H4, HLA-A, HLA-A29.1, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-H, HNRNPA2B1, HNRNPH2, HPCAL1, HRAS, HSD17B4, HSP90AA1, HSP90AA2, HSP90AA4P, HSP90AB1, HSP90AB2P, HSP90AB3P, HSP90B1, HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPA2, HSPA4, HSPA5, HSPA6, HSPA7, HSPA8, HSPA9, HSPD1, HSPE1, HSPG2, HYOU1, IDH1, IFITM1, IFITM2, IFITM3, IGH@, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHG4, IGHM, IGHV4-31, IGK@, IGKC, IGKV1-5, IGKV2-24, IGKV3-20, IGSF3, IGSF8, IQGAP1, IQGAP2, ITGA2, ITGA3, ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGB4, JUP, KIAA0174, KIAA1199, KPNB1, KRAS, KRT1, KRT10, KRT13, KRT14, KRT15,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT2, KRT20, KRT24, KRT25, KRT27, KRT28, KRT3, KRT4, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT75, KRT76, KRT77, KRT79, KRT8, KRT9, LAMA5, LAMP1, LDHA, LDHB, LFNG, LGALS3, LGALS3BP, LGALS4, LIMA1, LIN7A, LIN7C, LOC100128936, LOC100130553, LOC100133382, LOC100133739, LOC284889, LOC388524, LOC388720, LOC442497, LOC653269, LRP4, LRPPRC, LRSAM1, LSR, LYZ, MAN1A1, MAP4K4, MARCKS, MARCKSL1, METRNL, MFGE8, MICA, MIF, MINK1, MITD1, MMP7, MOBKL1A, MSN, MTCH2, MUC13, MYADM, MYH10, MYH11, MYH14, MYH9, MYL6, MYL6B, MYO1C, MYO1D, NARS, NCALD, NCSTN, NEDD4, NEDD4L, NME1, NME2, NOTCH1, NQO1, NRAS, P4HB, PCBP1, PCNA, PCSK9, PDCD6, PDCD6IP, PDIA3, PDXK, PEBP1, PFN1, PGK1, PHB, PHB2, PKM2, PLEC1, PLEKHB2, PLSCR3, PLXNA1, PLXNB2, PPIA, PPIB, PPP2R1A, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX5, PRDX6, PRKAR2A, PRKDC, PRSS23, PSMA2, PSMC6, PSMD11, PSMD3, PSME3, PTGFRN, PTPRF, PYGB, QPCT, QSOX1, RAB10, RAB11A, RAB11B, RAB13, RAB14, RAB15, RAB1A, RAB1B, RAB2A, RAB33B, RAB35, RAB43, RAB4B, RAB5A, RAB5B, RAB5C, RAB6A, RAB6B, RAB7A, RAB8A, RAB8B, RAC1, RAC3, RALA, RALB, RAN, RANP1, RAP1A, RAP1B, RAP2A, RAP2B, RAP2C, RDX, REG4, RHOA, RHOC, RHOG, ROCK2, RP11-631M21.2, RPL10A, RPL12, RPL6, RPL8, RPLP0, RPLP0-like, RPLP1, RPLP2, RPN1, RPS13, RPS14, RPS15A, RPS16, RPS18, RPS20, RPS21, RPS27A, RPS3, RPS4X, RPS4Y1, RPS4Y2, RPS7, RPS8, RPSA, RPSAP15, RRAS, RRAS2, RUVBL1, RUVBL2, S100A10, S100A11, S100A14, S100A16, S100A6, S100P, SDC1, SDC4, SDCBP, SDCBP2, SERINC1, SERINC5, SERPINA1, SERPINF1, SETD4, SFN, SLC12A2, SLC12A7, SLC16A1, SLC1A5, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, SLC29A1, SLC2A1, SLC3A2, SLC44A1, SLC7A5, SLC9A3R1, SMPDL3B, SNAP23, SND1, SOD1, SORT1, SPTAN1, SPTBN1, SSBP1, SSR4, TACSTD1, TAGLN2, TBCA, TCEB1, TCP1, TF, TFRC, THBS1, TJP2, TKT, TMED2, TNFSF10, TNIK, TNKS1BP1, TNPO3, TOLLIP, TOMM22, TPI1, TPM1, TRAP1, TSG101, TSPAN1, TSPAN14, TSPAN15, TSPAN6, TSPAN8, TSTA3, TTYH3, TUBA1A, TUBA1B, TUBA1C, TUBA3C, TUBA3D, TUBA3E, TUBA4A, TUBA4B, TUBA8, TUBB, TUBB2A, TUBB2B, TUBB2C, TUBB3, TUBB4, TUBB4Q, TUBB6, TUFM, TXN, UBA1, UBA52, UBB, UBC, UBE2N, UBE2V2, UGDH, UQCRC2, VAMP1, VAMP3, VAMP8, VCP, VIL1, VPS25, VPS28, VPS35, VPS36, VPS37B, VPS37C, WDR1, YWHAB, YWHAE, YWHAG, YWHAH, YWHAQ, YWHAZ
Câncer colorretal	hsa-miR-16, hsa-miR-25, hsa-miR-125b, hsa-miR-451, hsa-miR-200c, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-658, hsa-miR-370, hsa-miR-1296, hsa-miR-636, hsa-miR-502-5p
Câncer de mama	miR-21, miR-155, miR-206, miR-122a, miR-210, miR-21, miR-155, miR-206, miR-122a, miR-210, let-7, miR-10b, miR-125a, miR-125b, miR-145, miR-143, miR-145, miR-1b
Câncer de mama	GAS5
Câncer de mama	ER, PR, HER2, MUC1, EGFR, KRAS, B-Raf, CYP2D6, hsp70, MART-1, TRP, HER2, hsp70, MART-1, TRP, HER2, ER, PR, b-tubulina Classe III, VEGFA, ETV6-NTRK3, BCA-225, hsp70, MART1, ER, VEGFA, b-tubulina Classe III, HER2/neu (por exemplo, para câncer de mama Her2+), GPR30, isoforma ErbB4 (JM), MPR8, MISIIR, CD9, EphA2, EGFR, B7H3, PSM, PCSA, CD63, STEAP, CD81, ICAM1, A33, DR3, CD66e, MFG-E8, TROP-2, Mamaglobina, Hepsina, NPGP/NPFF2, PSCA, 5T4, NGAL, EpCAM, receptor-1 de neuroquinina (NK-1 ou NK-1R), NK-2, Pai-1, CD45, CD10, HER2/ERBB2, AGTR1, NPY1R, MUC1, ESA, CD133, GPR30, BCA225, CD24, CA15.3 (MUC1 secretado), CA27.29 (MUC1 secretado), NMDAR1, NMDAR2, MAGEA, CTAG1B, NY-ESO-1, SPB, SPC, NSE, PGP9.5, receptor de progesterona (PR) ou sua isoforma (PR(A) ou PR(B)), P2RX7, NDUFB7, NSE, GAL3, osteopontina, CHI3L1, IC3b, mesotelina, SPA, AQP5, GPCR, hCEA-CAM, PTP IA-2, CABYR, TMEM211, ADAM28, UNC93A, MUC17, MUC2, IL10R-beta, BCMA, HVEM/TNFRSF14, Trapina-2, Elafina, ST2/IL1 R4, TNFRF14, CEACAM1, TPA1, LAMP, WF, WH1000, PECAM, BSA, TNFR
Câncer de mama	CD9, MIS Rii, ER, CD63, MUC1, HER3, STAT3, VEGFA, BCA, CA125, CD24, EPCAM, ERB B4
Câncer de mama	CD10, NPGP/NPFF2, HER2/ERBB2, AGTR1, NPY1R, receptor-1 de neuroquinina (NK-1- ou NK-1R), NK-2, MUC1, ESA, CD133, GPR30, BCA225, CD24, CA15.3 (MUC1 secretado), CA27.29 (MUC1 secretado), NMDAR1, NMDAR2, MAGEA, CTAG1B, NY-ESO-1
Câncer de mama	SPB, SPC, NSE, PGP9.5, CD9, P2RX7, NDUFB7, NSE, GAL3, osteopontina, CHI3L1, EGFR, B7H3, IC3b, MUC1, mesotelina, SPA, PCSA, CD63, STEAP, AQP5, CD81, DR3, PSM, GPCR, EphA2, hCEA-CAM, PTP IA-2, CABYR, TMEM211, ADAM28, UNC93A, A33, CD24, CD10, NGAL, EpCam, MUC17, TROP-2, MUC2, IL10R-beta, BCMA, HVEM/TNFRSF14, Trapina-2 Elafina, ST2/IL1 R4, TNFRF14, CEACAM1, TPA1, LAMP, WF, WH1000, PECAM, BSA, TNFR
Câncer de mama	BRCA, MUC-1, MUC 16, CD24, ErbB4, ErbB2 (HER2), ErbB3, HSP70, Mamaglobina, PR, PR(B), VEGFA

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Câncer de mama	CD9, HSP70, Gal3, MIS, EGFR, ER, ICB3, CD63, B7H4, MUC1, DLL4, CD81, ERB3, VEGF, BCA225, BRCA, CA125, CD174, CD24, ERB2, NGAL, GPR30, CYFRA21, CD31, cMET, MUC2, ERBB4
Câncer de mama	CD9, EphA2, EGFR, B7H3, PSMA, PCSA, CD63, STEAP, CD81, STEAP1, ICAM1 (CD54), PSMA, A33, DR3, CD66e, MFG-8e, TMEM211, TROP-2, EGFR, Mamaglobina, Hepsina, NPGP/NPFF2, PSCA, 5T4, NGAL, NK-2, EpCam, NK-1R, PSMA, 5T4, PAI-1, CD45
Câncer de mama	PGP9.5, CD9, HSP70, gal3-b2c10, EGFR, iC3b, PSMA, PCSA, CD63, MUC1, DLL4, CD81, B7-H3, HER 3 (ErbB3), MART-1, PSA, VEGF A, TIMP-1, GPCR GPR110, EphA2, MMP9, mmp7, TMEM211, UNC93a, BRCA, CA125 (MUC16), Mamaglobina, CD174, (Lewis y), CD66e CEA, CD24 c.sn3, C-erbB2, CD10, NGAL, epcam, CEA (Antígeno carcinoembriônico), GPR30, CYFRA21-1, OPN, MUC17, hVEGFR2, MUC2, NCAM, ASPH, ErbB4, SPB, SPC, CD9, MS4A1, EphA2, MIS RII, HER2 (ErbB2), ER, PR (B), MRP8, CD63, B7H4, TGM2, CD81, DR3, STAT 3, MACC-1, TrKB, IL 6 Unc, OPG - 13, IL6R, EZH2, SCRN1, TWEAK, SERPINB3, CDAC1, BCA-225, DR3, A33, NPGP/NPFF2, TIMP1, BDNF, FRT, cadeia pesada de Ferritina, seprase, p53, LDH, HSP, ost, p53, CXCL12, HAP, CRP, Gro-alfa, Tsg 101, GDF15
Câncer de mama	CD9, HSP70, Gal3, MIS (RII), EGFR, ER, ICB3, CD63, B7H4, MUC1, CD81, ERB3, MART1, STAT3, VEGF, BCA225, BRCA, CA125, CD174, CD24, ERB2, NGAL, GPR30, CYFRA21, CD31, cMET, MUC2, ERB4, TMEM211
Câncer de mama	5T4 (trofoblasto), ADAM10, AGER/RAGE, APC, APP (β-amiloide), ASPH (A-10), B7H3 (CD276), BACE1, BAI3, BRCA1, BDNF, BIRC2, C1GALT1, CA125 (MUC16), Calmodulina 1, CCL2 (MCP-1), CD9, CD10, CD127 (IL7R), CD174, CD24, CD44, CD63, CD81, CEA, CRMP-2, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CYFRA 21, derlina 1, DLL4, DPP6, E-CAD, EpCaM, EphA2 (H-77), ER(1) ESR1 α, ER(2) ESR2 β, Erb B4, Erbb2, erb3 (Erb-B3), PA2G4, FRT (FLT1), Gal3, GPR30 (ER1 G-acoplado), HAP1, HER3, HSP-27, HSP70, IC3b, IL8, insig, placoblobina de junção, Queratina 15, KRAS, Mamaglobina, MART1, MCT2, MFGE8, MMP9, MRP8, Muc1, MUC17, MUC2, NCAM, NG2 (CSPG4), Ngal, NHE-3, NT5E (CD73), ODC1, OPG, OPN, p53, PARK7, PCSA, PGP9.5 (PARK5), PR(B), PSA, PSMA, RAGE, STXBP4, Survivina, TFF3 (secretado), TIMP1, TIMP2, TMEM211, TRAF4 (estruturação), TRAIL-R2 (receptor 5 de morte), TrkB, Tsg 101, UNC93a, VEGF A, VEGFR2, YB-1, VEGFR1, GCDPF-15 (PIP), BigH3 (proteína induzida por TGFb1), 5HT2B (receptor 2B de serotonina), BRCA2, BACE 1, CDH1-caderina
Câncer de mama	AK5.2, ATP6V1B1, CRABP1
Câncer de mama	DST.3, GATA3, KRT81
Câncer de mama	AK5.2, ATP6V1B1, CRABP1, DST.3, ELF5, GATA3, KRT81, LALBA, OXTR, RASL10A, SERHL, TFAP2A.1, TFAP2A.3, TFAP2C, VTCN1
Câncer de mama	TRAP; Carcinoma de Célula Renal; Filamina; 14.3.3, Pan, Probitina; c-fos; Ang-2; GSTmu; Ang-1; FHIT; Rad51; Inibina alfa; Caderina-P; 14.3.3 gama; p181NK4c; P504S; XRCC2; Caspase 5; Proteína de Ligação de CREB; Receptor de Estrogênio; IL17; Claudina 2; Queratina 8; GAPDH; CD1; Queratina; LMW; Gama Glutamilcisteína SIntetase (GCS)/Glutamato-cisteína Ligase; a-B-Cristalina; Pax-5; MMP-19; APC; IL-3; Queratina 8 (Ser73 fosfo-específica); TGF-beta 2; ITK; Oct-2/; DJ-1; B7-H2; Marcador de Célula de Plasma; Rad18; Estriol; Chk1; Receptor de Prolactina; Receptor de Laminina; Histona H1;. CD45RO; Receptor de GnRH; IP10/CRG2; Actina, Músculo Específico; S100; Distrofina; Tubulina-a; CD3zeta; CD37; a Receptor 1 de GABA; MMP-7 (Matrilisina); Heregulina; Caspase 3; CD56/NCAM-1/ Gastrina 1; SREBP-1 (Proteína 1 de Ligação de Elemento Regulador de Esterol); MLH1; PGP9,5; Antígeno Relacionado a Fator VIII; Fator de Ribosilação de ADP (ARF-6); MHC II (HLA-DR) Ia; Survivina; CD23; G-CSF; CD2; Calretinina; Enolase Neurônio Específica; CD165; Calponina; CD95 / Fas; Urocortina; Proteína de Choque Térmico 27/hsp27; Topo II beta; Receptor de Insulina; Queratina 5/8; sm; Actina; Músculo Esquelético; CA19-9; GluR1; GRIP1; CD79a mb-1; TdT; HRP; CD94; CCK-8; Timidina Fosforilase; CD57; Fosfatase Alcalina (AP); CD59 / MACIF / MIRL / Protectina; GLUT-1; alfa-1-antitripsina; Presenilina; Mucina 3 (MUC3); pS2; 14-3-3 beta; MMP-13 (Colagenase-3); Fli-1; mGluR5; Mastócito Quimase; Laminina B1/b1; Neurofilamento (160kDa); CNPase; Peptídeo Amilina; Gai1; CD6; alfa-1-antiquimotripsina; E2F-2; MyoD1

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Carcinoma dutal *in situ* (DCIS)	Laminina B1/b1; E2F-2, TdT; Apolipoproteína D; Granulócito, Fosfatase alcalina (AP); Proteína de choque térmico 27/hsp27; CD95 / Faz; pS2; Estriol, GLUT-1; Fibronectina; CD6; CCK-8; sm; Antígeno relacionado a fator VIII; CD45/TS200/LCA; antígeno específico epitelial; Macrófago; CD10; MyoD1; Gail; bcl-XL; hPL; Caspase 3; Actina, múscul esquelético; IP10/CRG2; Receptor de GnRH; p35nck5a; Fator de ribosilação de ADP (ARF-6); Cdk4; alfa-1-antitripsina; IL17; Enolase neurônio específica; CD56/NCAM-1; receptor de prolactina; Cdk7; CD79a mb-1; Colágeno IV; CD94; Marcador mieloide específico; Queratina 10; Pax-5; IgM (cadeia m-pesada); CD45RO; CA19-9; Mucina 2; Glucagon; Mastócito quimase; MLH1; CD1; CNPase, Parquina; MHC II (HLA-DR) Ia; B7-H2; Chk1; Cadeia leve lambda; MHC II (HLA-DP e DR); Miogenina; MMP-7 (Matrilisina); Topo II beta; CD53; Queratina 19; Rad1 8; Ret Oncoproteína; MHC II (HLA-DR) ; proteína de ligação de E3 (ARM1); Receptor de progesterona; Queratina 8; IgG; IgA; Tubulina; Substrato 1 de Receptor de insulina; Queratina 15; DR3; IL-3; Queratina 10/13; Ciclina D3; MHC I (HLA25 e HLA-Aw32); Calmodulina; Neurofilamento (160 kDa)
Carcinoma dutal *in situ* (DCIS) v. outro câncer de mama	Macrófago; Fibronectina; Granulócito; Queratina 19; Ciclina D3; CD45/T200/LCA; EGFR; Trombospondina; CD81/TAPA-1; Ruv C; Plasminogênio; Colágeno IV; Laminina B1/b1; CD10; TdT; Filamina; bcl-XL; 14.3.3 gama; 14.3.3, pan; p170; Apolipoproteína D; CD71 / Receptor de transferrina; FHIT
Câncer de mama	5HT2B, 5T4 (trofoblasto), ACO2, ACSL3, ACTN4, ADAM10, AGR2, AGR3, ALCAM, ALDH6A1, ANGPTL4, ANO9, AP1G1, APC, APEX1, APLP2, APP (_-amiloide), ARCN1, ARHGAP35, ARL3, ASAH1, ASPH (A-10), ATP1B1, ATP1B3, ATP5I, ATP5O, ATXN1, B7H3, BACE1, BAI3, BAIAP2, BCA-200, BDNF, BigH3, BIRC2, BLVRB, BRCA, BST2, C1GALT1, C1GALT1C1, C20orf3, CA125, CACYBP, Calmodulina, CAPN1, CAPNS1, CCDC64B, CCL2 (MCP-1), CCT3, CD10(BD), CD127 (IL7R), CD174, CD24, CD44, CD80, CD86, CDH1, CDH5, CEA, CFL2, CHCHD3, CHMP3, CHRDL2, CIB1, CKAP4, COPA, COX5B, CRABP2, CRIP1, CRISPLD1, CRMP-2, CRTAP, CTLA4, CUL3, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CYB5B, CYB5R1, CYCS, CYFRA 21, DBI, DDX23, DDX39B, derlina 1, DHCR7, DHX9, DLD, DLL4, DNAJB1, DPP6, DSTN, eCaderina, EEF1D, EEF2, EFTUD2, EIF4A2, EIF4A3, EpCaM, EphA2, ER(1) ESR1 _, ER(2) ESR2 _, Erb B4, Erb2, erb3 (Erb-B3?), ERLIN2, ESD, FARSA, FASN, FEN1, FKBP5, FLNB, FOXP3, FUS, Gal3, GCDPF-15, GCNT2, GNA12, GNG5, GNPTG, GPC6, GPD2, GPER (GPR30), GSPT1, H3F3B, H3F3C, HADH, HAP1, HER3, HIST1H1C, HIST1H2AB, HIST1H3A, HIST1H3C, HIST1H3D, HIST1H3E, HIST1H3F, HIST1H3G, HIST1H3H, HIST1H3I, HIST1H3J, HIST2H2BF, HIST2H3A, HIST2H3C, HIST2H3D, HIST3H3, HMGB1, HNRNPA2B1, HNRNPAB, HNRNPC, HNRNPD, HNRNPH2, HNRNPK, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, HPS3, HSP-27, HSP70, HSP90B1, HSPA1A, HSPA2, HSPA9, HSPE1, IC3b, IDE, IDH3B, IDO1, IFI30, IL1RL2, IL7, IL8, ILF2, ILF3, IQCG, ISOC2, IST1, ITGA7, ITGB7, placoblobina de junção, Queratina 15, KRAS, KRT19, KRT2, KRT7, KRT8, KRT9, KTN1, LAMP1, LMNA, LMNB1, LNPEP, LRPPRC, LRRC57, Mamaglobina, MAN1A1, MAN1A2, MART1, MATR3, MBD5, MCT2, MDH2, MFGE8, MFGE8, MGP, MMP9, MRP8, MUC1, MUC17, MUC2, MYO5B, MYOF, NAPA, NCAM, NCL, NG2 (CSPG4), Ngal, NHE-3, NME2, NONO, NPM1, NQO1, NT5E (CD73), ODC1, OPG, OPN (SC), OS9, p53, PACSIN3, PAICS, PARK7, PARVA, PC, PCNA, PCSA, PD-1, PD-L1, PD-L2, PGP9.5, PHB, PHB2, PIK3C2B, PKP3, PPL, PR(B)?, PRDX2, PRKCB, PRKCD, PRKDC, PSA, PSAP, PSMA, PSMB7, PSMD2, PSME3, PYCARD, RAB1A, RAB3D, RAB7A, RAGE, RBL2, RNPEP, RPL14, RPL27, RPL36, RPS25, RPS4X, RPS4Y1, RPS4Y2, RUVBL2, SET, SHMT2, SLAIN1, SLC39A14, SLC9A3R2, SMARCA4, SNRPD2, SNRPD3, SNX33, SNX9, SPEN, SPR, SQSTM1, SSBP1, ST3GAL1, STXBP4, SUB1, SUCLG2, Survivina, SYT9, TFF3 (secretado), TGOLN2, THBS1, TIMP1, TIMP2, TMED10, TMED4, TMED9, TMEM211, TOM1, TRAF4 (estruturação), TRAIL-R2, TRAP1, TrkB, Tsg 101, TXNDC16, U2AF2, UEVLD, UFC1, UNC93a, USP14, VASP, VCP, VDAC1, VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, VPS37C, WIZ, XRCC5, XRCC6, YB-1, YWHAZ
Câncer de pulmão	Pgrmc1 (componente 1 de membrana de receptor de progesterona)/receptor sigma-2, STEAP, EZH2
Câncer de pulmão	Proibitina, CD23, Paptídeo Amilina, HRP, Rad51, Pax-5, Oct-3/, GLUT-1, PSCA, Trombospontina, FHIT, a-B-Cristalina, Lewis A, Fator de crescimento endotelial vacular (VEGF), Homólogo 4 de fator de hepatócito, Flt-4, GluR6/7, Proteína 4 de resposta à apoptose de próstata, GluR1, Fli-1, Urocontina, S100A4, 13-3-3 beta, P504S, HDAC1, PGP9.5, DJ-1, COX2, MMP-19, Actina, músculo esquelético, Claudina 3,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	Caderina P, Colágeno IX, p27Kip1, Catepsina D, CD30 (marcador de cleúla de Reed-Sternberg), Ubiquitina, FSH-b, TrxR2, CCK-8, Ciclina C, CD138, TGF-beta 2, Hormônio adrenocorticotrópico, PPAR-gama, Bcl-6, GLUT-3, IGF-I, mRANKL, Faz-ligante, Filamina, Calretinna, O ct-1, Hormônio da paratireoide, Claudina 5, Claudina 4, Raf-1 (fosfo-específico), CDC14A Fosfatase, Mitocôndria, APC, Gastrina 1, Ku (p80), Gail, XPA, Proteína de ligação de maltose, melanoma (gp100), Fosfotirosina, Amiloide A, CXCR4 / Fisina, Fator 3B nuclear hepático, Caspase 1, HPV 16-E7, Cones de crescimento axonal, Lck, Ornitina descarboxilase, Gama glutamilcisteína sintetase (GCS)/glutamato-cisteína ligase, ERCC1, Calmodulina, Caspase 7 (Mch 3), CD137 (41BB), óxido nítrico sintase, cérebro (bNOS), E2F-2, IL-10R, L-Plastina, CD18, Vimentina, CD50/ICAM-3, Superóxido Dismutase, Adenovírus Tipo 5 E1A, PHAS-I, Receptor de progesterona (fosfo-específico) – Serina 294, MHC II (HLA-DQ), XPG, ER Ca+2 ATPase 1, Laminina-s, proteína de ligação de E3 (ARM1), CD45RO, CD1, Cdk2, MMP-10 (Estromilisina 2), sm, Proteína B de tensoativo (Pro), Apolipoproteína D, CD46, Queratina 8 (Ser73 fosfo-específica), PCNA, PLAP, CD20, Syk, LH, Queratina 19, Fator de ribosilação de ADP (ARF-6), Int-2 Oncoproteína, Luciferase, AIF (fator de indução de apoptose), Grb2, bcl-X, CD16, Pacilina, MHC II (HLA-DP e DR), Célula B, p21WAF1, MHC II (HLA-DR), Tirosinase, E2F-1, Pds1, Calponina, Notch, CD26/DPP IV, Antígeno T grande SV40, Ku (p70/p80), Perforina, XPF, SIM Ag (SIMA-4D3), Cdk1/p34cdc2, enolase neurônio específica, b-2-Microglobulina, DNA Polimerase Beta, Receptor de hormônio da tireoide, Humano, Fosfatase alcalina (AP), Marcador de célula de plasma, Proteína de choque térmico 70/hsp70, TRP75 / gp75, SRF (fator de resposta de soro), Laminina B1/b1, Mastócito quimase, Caldesmon, CEA / CD66e, CD24, Receptor X retinoide (hRXR), CD45/T200/LCA, Vírus da raiva, Citocromo c, DR3, bcl-CL, Fascina, CD71 / Receptor de transferrina
Câncer de pulmão	miR-497
Câncer de pulmão	Pgrmc1
Câncer de ovário	CA-125, CA 19-9, proteína c-reativa, CD95 (também chamado Fas, antígeno Fas, receptor Fas, FasR, TNFRSF6, APT1 ou APO-1), FAP-1, miR-200 microRNAs, EGFR, EGFRvIII, apolipoproteína AI, apolipoproteína CIII, mioglobina, tenascina C, MSH6, claudina 3, claudina 4, caveolina 1, fator de coagulação III, CD9, CD36, CD37, CD53, CD81, CD136, CD147, Hsp70, Hsp90, Rab13, Desmocolina 1, EMP-2, CK7, CK20, GCDF15, CD82, Rab-5b, Anexina V, MFG-E8, HLA-DR, MiR-200 microRNAs (miR-200a, miR-200b, miR-200c), miR-141, miR-429, JNK, Jun
Câncer de próstata v normal	AQP2, BMP5, C16orf86, CXCL13, DST, ERCC1, GNAO1, KLHL5, MAP4K1, NELL2, PENK, PGF, POU3F1, PRSS21, SCML1, SEMG1, SMARCD3, SNAI2, TAF1C, TNNT3
Câncer de próstata v Câncer de mama	ADRB2, ARG2, C22orf32, CYorf14, EIF1AY, FEV, KLK2, KLK4, LRRC26, MAOA, NLGN4Y, PNPLA7, PVRL3, SIM2, SLC30A4, SLC45A3, STX19, TRIM36, TRPM8
Câncer de próstata v Câncer colorretal	ADRB2, BAIAP2L2, C19orf33, CDX1, CEACAM6, EEF1A2, ERN2, FAM110B, FOXA2, KLK2, KLK4, LOC389816, LRRC26, MIPOL1, SLC45A3, SPDEF, TRIM31, TRIM36, ZNF613
Câncer de próstata v Câncer de pulmão	ASTN2, CAB39L, CRIP1, FAM110B, FEV, GSTP1, KLK2, KLK4, LOC389816, LRRC26, MUC1, PNPLA7, SIM2, SLC45A3, SPDEF, TRIM36, TRPV6, ZNF613
Câncer de próstata	miRs-26a+b, miR-15, miR-16, miR-195, miR-497, miR-424, miR-206, miR-342-5p, miR-186, miR-1271, miR-600, miR-216b, miR-519 family, miR-203
Integrinas	ITGA1 (CD49a, VLA1), ITGA2 (CD49b, VLA2), ITGA3 (CD49c, VLA3), ITGA4 (CD49d, VLA4), ITGA5 (CD49e, VLA5), ITGA6 (CD49f, VLA6), ITGA7 (FLJ25220), ITGA8, ITGA9 (RLC), ITGA10, ITGA11 (HsT18964), ITGAD (CD11D, FLJ39841), ITGAE (CD103, HUMINAE), ITGAL (CD11a, LFA1A), ITGAM (CD11b, MAC-1), ITGAV (CD51, VNRA, MSK8), ITGAW, ITGAX (CD11c), ITGB1 (CD29, FNRB, MSK12, MDF20), ITGB2 (CD18, LFA-1, MAC-1, MFI7), ITGB3 (CD61, GP3A, GPIIIa), ITGB4 (CD104), ITGB5 (FLJ26658), ITGB6, ITGB7, ITGB8

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Glicoproteína	GpIa-IIa, GpIIb-IIIa, GpIIIb, GpIb, GpIX
Fatores de transcrição	STAT3, EZH2, p53, MACC1, SPDEF, RUNX2, YB-1
Quinases	AURKA, AURKB
Marcadores de doença	6Cquina, Adiponectina, Hormônio Adrenocorticotrópico, Proteína relacionada a Agouti, Aldose redutase, Alfa-1-Antiquimotripsina, Alfa-1-Antitripsina, Alfa-1-Microglobulina, Alfa-2-Macroglobulina, Alfa-Fetoproteína, Anfiregulina, Angiogenina, Angioproteína-2, Enzima de conversão de angiotensina, Angiotensinogênio, Anexina A1, Apolipoproteína A-I, Apolipoproteína A-II, Apolipoproteína A-IV, Apolipoproteína B, Apolipoproteína C-I, Apolipoproteína C-II, Apolipoproteína C-III, Apolipoproteína D, Apolipoproteína E, Apolipoproteína H, Apolipoproteína (a), Tirosina quinase de receptor de AXL, Fator de ativação de célula B, Quimioatraente de linfócito B, proteína 2 do tipo Bcl-2, Beta-2-Microglobulina, Betacelulina, Proteína 6 morfogenética óssea, fator neutrotrófico derivado do cérebro, Calbindina, Calcitonina, Antígeno 125 de câncer, Antígeno 15-3 de câncer, Antígeno 19-9 de câncer, Antígeno 72-4 de câncer, Antígeno carcinoembriônico, Catepsina D, antígeno CD 40, ligante CD40, tipo antígeno CD5, Fibronectina celular, Quimiocina CC-4, Cromogranina-A, Fator neurotrófico ciliar, Clusterina, Colágeno IV, Complemento C3, Fator de complemento H, Fator de crescimento de tecido conjuntivo, Cortisol, C-Peptídeo, Proteína C-reativa, Creatina quinase-MB, Cistatina-C, Endoglina, Endostatina, Endotelina-1, EN-RAGE, Eotaxina-1, Eotaxina-2, Eotaxina-3, fator de crescimento epidérmico, Epiregulina, molécula de adesão de célula epitelial, Proteína 78 de ativação de neutrófilo derivado de epitélio, Eritropoietina, E-Selectina, Ezrina, Fator VII, ligante Fas, Receptor FASLG, Proteína de ligação de ácido graxo (adipócito), Proteína de ligação de ácido graxo (coração), Proteína de ligação de ácido graxo (fígado), Ferritina, Fetuína-A, Fibrinogênio, Fator 4 de crescimento de fibroblasto, Fator de crescimento de fibroblasto básico, Fibulina-1C, Hormônio de estimulação de folículo, Galectina-3, Gelsolina, Glucagon, Peptídeo 1 do tipo Glucagon, Glicose-6-fosfato Isomerase, subunidade reguladora de Glutamato-Cisteína ligase, Glutationa S-transferase alfa, Glutationa S-transferase Um 1, Fator de estimulação de colônia de granulócitos, fator de estimulação de colônia de macrófagos de granulócito, Hormônio de crescimento, proteína alfa regulada por crescimento, haptoglobina, HE4, Proteína de choque térmico 60, fator de crescimento do tipo EGF de ligação de heparina, fator de crescimento de hepatócito, receptor de fator de crescimento de hepatócito, Hepsina, Gonadotropina beta coriônica humana, Receptor 2 de fator de crescimento epidérmico humano, Imunoglobulina A, Imunoglobulina E, Imunoglobulina M, Insulina, Fator I de crescimento do tipo insulina, Proteína 1 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 2 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 3 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 4 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 5 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 6 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Molécula 1 de adesão intercelular, Interferon gama, Proteína 10 induzida por interferon gama, Quimioatraente alfa de célula T induzível por interferon, Interleucina-1 alfa, Interleucina-1 beta, Antagonista de receptor de interleucina-1, Interleucina-2, Receptor alfa de Interleucina-2, Interleucina-3, Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-6, Receptor de Interleucina-6, subunidade beta de receptor de Interleucina-6, Interleucina-7, Interleucina-8, Interleucina-10, Interleucina-11, Subunidade p40 de Interleucina-12, , Subunidade p70 de Interleucina-12, Interleucina-13, Interleucina-15, Interleucina-16, Interleucina-25, Calicreína 5, Calicreína 7, Molécula 1 de lesão renal, Lactoilglutationa liase, Peptídeo associado à latência de fator beta de crescimento por transformação, Receptor 1 de LDL oxidado do tipo lecitina, Leptina, Hormônio luteinizante, Linfotactina, Fator 1 de estimulação de colônia de macrófagos, Proteína 1 alfa inflamatória de macrófago, Proteína 1 beta inflamatória de macrófago, Proteína 3 alfa inflamatória de macrófago, Proteína 3 beta inflamatória de macrófago, Fator inibidor de migração de macrófago, Quimiocina derivada de macrófago, Proteína de estimulação de macrófago, Lipoproteína de baixa densidade modificada por malondialdeído, Maspina, Metaloproteinase-1 de matriz, Metaloproteinase-2 de matriz, Metaloproteinase-3 de matriz, Metaloproteinase-7 de matriz, Metaloproteinase-9 de matriz, Metaloproteinase-9 de matriz Metaloproteinase-10 de matriz, Mesotelina, proteína A relacionada à cadeia de MHC classe I, Proteína 1 quimiotática de monócito, Proteína 2 quimiotática de monócito, Proteína 3 quimiotática de monócito, Proteína 4 quimiotática de monócito, Monoquina induzida por gama interferon,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	Fator 1 inibidor de progenitor mieloide, Mieloperoxidase, Mioglobina, Fator beta de crescimento de nervo, Molécula de adesão de célula neuronal, Enolase neurônio específica, Neuropilina-1, Lipocalina associado a neurófilo gelatinase, NT-proBNP, nucleotídeo difosfato quinase B, Osteopontina, Osteoprotegerina, Prolipeptídeo pancreático, Pepsinogênio I, Peptídeo YY, Peroxiredoxina 4, Fosfoserina aminotransferase, Fator de crescimento de placenta, Inibidor 1 de ativador de plasminogênio, Fator BB de crescimento derivado de plaqueta, Proteína A de plasma associada á gravidez, Progesterona, Proinsulina (inc. total ou intacto), Prolactina, Prostasina, Antígeno próstata-específico (inc. PSA livre), Ácido prostático fosfatase, Proteína S100-A4, Proteína S100-A6, Quimiocina regulada por ativação e pulmonar, Receptor para produtos finais de glicosilação avançada, Receptor tirosina-proteína quinase erbB-3, Resistina, proteína B de ligação de cálcio S100, Secretina, Serotransferrina, P-Componente de amiloide de soro, Transminase oxaloacética glutâmica de soro, Globulina de ligação de hormônio sexual, Sortilina, Antígeno 1 de carcinoma de célula escamosa, Fator de célula-tronco, Fator 1 derivado de célula do estroma, Superóxido dismutase 1 (solúvel), Proteína I-309 secretada por linfócito T, Glicoproteína urinapria de Tamm-Horsfall, Proteína célula T-específica RANTES, Tenascina C, Testosterona, Tetranectina, Trombomodulina, Trombopoietina, Trombospondina-1, Tiroglobulina, Hormônio de estimulação da tireoide, Globulina de ligação de tiroxina, fator de tecido, Inibidor de tecido de Metaloproteinases 1, ativador de plasminogênio do tipo tecido, Receptor 3 de ligante de indução de apoptose relacionada a TNF, Fator alfa de crescimento por transformação, Fator beta 3 de crescimento por transformação, Transtiretina, Fator 3 de trefoila, Fator alfa de necrose de tumor, Fator beta de necrose de tumor, Receptor 1 de fator de necrose de tumor, Receptor 2 de fator de necrose de tumor, Tirosina quinase com domínios 2 de homologia de Ig e EGF, Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase, Receptor de ativador de plasminogênio do tipo uroquinase, Molécula 1 de adesão de célula vascular, Fator de crescimento endotelial vascular, Fator B de crescimento endotelial vascular, Fator C de crescimento endotelial vascular, Fator D de crescimento endotelial vascular, Receptor 1 de Fator de crescimento endotelial vascular, Receptor 2 de Fator de crescimento endotelial vascular, Receptor 3 de Fator de crescimento endotelial vascular, Proteína S dependente de vitamina K, Vitronectina, Fator d von Willebrand, YKL-40
Marcadores de doença	Adiponectina, Hormônio adrenocorticotrópico, Proteína relacionada a Agouti, Alfa-1-antiquimotripsina, Alfa-1-antitripsina, Alfa-1-microglobulina, Alfa-2-macroglobulina, Alfa-fetoproteína, Anfiregulina, Angiopoietina-2, Enzima de conversão de Angiotensina, Angiotensinogênio, Apolipoproteína A-I, Apolipoproteína A-II, Apolipoproteína A-III, Apolipoproteína B, Apolipoproteína C-I, Apolipoproteína C-III, Apolipoproteína D, Apolipoproteína E, Apolipoproteína H, Apolipoproteína(a), Tirosina quinase de receptor de AXL, Quimioatraente de linfócito B, Beta-2-Microglobulina, Betacelulina, Proteína 6 morfogenética óssea, fator neutrotrófico derivado do cérebro, Calbindina, Calcitonina, Antígeno 125 de câncer, Antígeno 15-3 de câncer, Antígeno 19-9 de câncer, Antígeno 72-4 de câncer, Antígeno carcinoembriônico, Catepsina D, antígeno CD 40, ligante CD40, tipo antígeno CD5, Fibronectina celular, Quimiocina CC-4, Cromogranina-A, Fator neurotrófico ciliar, Clusterina, Complemento C3, Fator H de complemento, Fator de crescimento de tecido conjuntivo, C-peptídeo, Proteína C-reativo, Creatina quinase-MB, Cistatina-C, Endotelina-1, EN-RAGE, Eotaxina-1, Eotaxina-3, Fator de crescimento epidérmico, Epiregulina, Proteína 78 de ativação de neutrófilo derivado de epitélio, Eritropoietina, E-Selectina, Fator VII, Ligante Fas, Receptor FASLG, Proteína de ligação de ácido graxo (coração), Ferritina, Fetuina-A, Fibrinogênio, Fator 4 de crescimento de fibroblasto, Fator de crescimento de fibroblasto básico, Hormônio de estimulação de folículo, Glucagon, peptídeo 1 do tipo Glucagon, Glutationa S-transferase alfa, Fator de estimulação de colônia de granulócitos, Fator de estimulação de colônia de macrófagos de granulócito, Hormônio de crescimento, proteína alfa regulada por crescimento, Haptoglobina, Proteína de choque térmico 60, Fator de crescimento do tipo EGF de ligação de heparina, Fator de crescimento de hepatócito, Imunoglobulina A, Imunoglobulina E, Imunoglobulina M, Insulina, Fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 2 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Molécula 1 de adesão intracelular, Interferon gama, Proteína 10 induzida por interferon, Interleucina-1 alfa, Interleucina-1 beta, Agonista de receptor de interleucina-1, Interleucina-2, Interleucina-3, Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-6, Receptor de Interleucina-6, Interleucina-7, Interleucina-8, Interleucina-10, Interleucina-11, Subunidade p40 de Interleucina-12, Subunidade p70 de Interleucina-12, Interleucina-13, Interleucina-15, Interleucina-16, Interleucina-25, Molécula 1 de lesão renal, Recep-

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	tor de LDL oxidado do tipo lecitina, Leptina, Hormônio luteinizante, Linfotactina, Fator 1 de estimulação de colônia de macrófagos, Proteína 1 alfa inflamatória de macrófago, Proteína 1 beta inflamatória de macrófago, Proteína 3 alfa inflamatória de macrófago, Fator inibido de migração de macrófago, Quimiocina derivada de macrófago, Lipoproteína de baixa densidade modificada por molondialdeído, Metaloproteinase-1 de matriz, Metaloproteinase-2 de matriz, Metaloproteinase-3 de matriz, Metaloproteinase-7 de matriz, Metaloproteinase-9 de matriz, Metaloproteinase-9 de matriz, Metaloproteinase-10 de matriz, Proteína 1 quimiotática de monócito, Proteína 2 quimiotática de monócito, Proteína 3 quimiotática de monócito, Proteína 4 quimiotática de monócito, Monoquina induzida por gama interferon, Fator 1 inibidor de progenitor de mieloide, Mieloperoxidase, Mioglobina, Fator beta de crescimento de nervo, Molécula de adesão de célula neuronal, Lipocalina associada à neutrófilo gelatinase, NT-proBNP, Osteopontina, Polipeptídeo pancreática, Peptídeo YY, Fator de crescimento de placenta, Inibidor 1 de ativador de plasminogênio, Fator BB de crescimento derivado de plaqueta, Proteína A de plasma associada á gravidez, progesterona, Proinsulina (inc, intacta ou total), Prolactina, Antígeno próstata-específico (inc. PSA livre), Ácido prostático fosfatase, Quimiocina regulada por ativação e pulmonar, Receptor para produtos finais de glicosilação avançada, Resistina, proteína B de ligação de cálcio S100, Secretina, Serotransferrina, P-Componente de amiloide de soro, Transminase oxaloacética glutâmica de soro, Globulina de ligação de hormônio sexual, Sortilina, Antígeno 1 de carcinoma de célula escamosa, Fator de célula-tronco, Fator 1 derivado de célula do estroma, Superóxido dismutase 1 (solúvel), Proteína I-309 secretada por linfócito T, Glicoproteína urinária de Tamm-Horsfall, Proteína célula T-específica RANTES, Tenascina C, Testosterona, Trombomodulina, Trombopoietina, Trombospondina-1, Hormônio de estimulação da tireoide, Globulina de ligação de tiroxina, fator de tecido, Inibidor de tecido de Metaloproteinases 1, Receptor 3 de ligante de indução de apoptose relacionada a TNF, Fator alfa de crescimento por transformação, Fator beta 3 de crescimento por transformação, Transtiretina, Fator 3 de trefoila, Fator alfa de necrose de tumor, Fator beta de necrose de tumor, Receptor 2 de fator de necrose de tumor, Molécula 1 de adesão de célula vascular, Fator de crescimento endotelial vascular, Proteína S dependente de vitamina K, Vitronectina, Fator de von Willebrand
Oncologia	6Cquina, Aldose Redutase, Alfa-Fetoproteína, Anfiregulina, Angiogenina, Anexina A1, Fator de ativação de célula B, Quimioatraente de linfócito B, Proteína 2 do tipo bcl-2, Betacelulina, Antígeno 125 de câncer, Antígeno 19-9 de câncer, Antígeno 72-4 de câncer, Antígeno carcinoembriônico, Catepsina D, Fibronectina celular, Colágeno IV, Endogolina, Endostatina, Eotaxina-2, Fator de crescimento epidérmico, Epiregulina, Molécula de adesão de célula epitelial, Ezrina, Proteína de ligação de ácido graxo (adipótico), Proteína de ligação de ácido graxo (fígado), Fator básico de crescimento de fibroblasto, Fibulina-1C, Gelectina-3, Gelsolina, Glicose-6-fosfato isomerase, Subunidade reguladora de glutamato-cisteína ligase, Glutationa S-transferase Mu 1, HE4, Fator de crescimento do tipo EGF de ligação de heparina, Fator de crescimento de hepatócito, Receptor de Fator de crescimento de hepatócito, Hepsina, Gonadotropina beta coriônica humana, Receptor 2 de fator de crescimento epidérmico humano, Proteína 1 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 2 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 3 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 4 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 5 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 6 de ligação de fator de crescimento do tipo insulina, Proteína 10 induzida por interferon gama, quimiatraente alfa de célula T induzível por interferon, Receptor alfa de interleucina-2, Interleucina-6, Subunidade beta de receptor de Interleucina-6, Calicreína 5, Calicreína 7, Lactoil-glutationa liase, Peptídeo associado à latência de fator beta de crescimento por transformação, Leptina, Proteína 3 beta inflamatória de macrófago, Fator inibidor de migração de macrófago, Proteína de estimulação de macrófago, Maspina, Metaloproteinase-2 de matriz, Mesotelina, Proteína A relacionada à cadeia de MHC classe I, Proteína 1 quimiotática de monócito, Monoquina induzida por interferon gama, Enolase neurônio específica, Neuropilina-1, Lipocalina associada a Neutrófilo Gelatinase, Nucleosídeo difosfato quinase B, Osteopontina, Osteoprotegerina, Pepsinogênio I, Peroxiredoxina-4, Fosfoserina aminotransferase, fator de crescimento de placenta, Fator BB de crescimento derivado de plaqueta, Prostasina, Proteína S100-A4, Proteína S100-A6, Receptor tirosina-proteína quinase erbB-3, Antígeno 1 de carcinoma de células escamosas, Fator 1 derivado de célula do estroma, Tenascina C, Tetranectina, Tiroglobulina, Ativador de plasminogênio do tipo tecido, Fator alfa de crescimento por transformação. Receptor I de fator de necrose de tumor, Tirosina quinase com Ig e domínios 2 de

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	homologia de EGF, Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase, receptor de Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase, Fator de crescimento endotelial vascular, Fator B de crescimento endotelial vascular, Fator C de crescimento endotelial vascular, Fator D de crescimento endotelial vascular, Receptor 1 de Fator de crescimento endotelial vascular, Receptor 2 de Fator de crescimento endotelial vascular, Receptor 3 de Fator de crescimento endotelial vascular, YKL-40
Doença	Adiponectina, Alfa-1-antitripsina, Alfa-2-macroglobulina, Alfa-Fetoproteína, Apolipoproteína A-I, Apolipoproteína C-III, Apolipoproteína H, Apolipoproteína(a), Beta-2-microglobulina, Fator neutrotrófico derivado do cérebro, Calcitonina, Antígeno 125 de câncer, Antígeno 19-9 de câncer, Antígeno carcinoembriônico, antígeno CD 40, Ligante CD40, Complemento C3, Proteína C-reativa, Creatina quinase-MB, Endotelina-1, EN-RAGE, Eotaxina-1, Fator de crescimento epidérmico, Proteína 78 de ativação de neutrófilo derivado de epitélio, Eritropoietina, Fator VII, Proteína de ligação de ácido (coração), Ferritina, Fibrinogênio, Fator básico de crescimento de fibroblasto, Fator de estimulação de colônia de granulócitos, Fator de estimulação de colônia de macrófagos de granulócito, Hormônio de crescimento, Haptoglobina, Imunoglobulina A, Imunoglobulina E, Imunoglobulina M, Insulina, Fator I de crescimento do tipo insulina, Molécula 1 de adesão intercelular, Interferon gama, Interleucina-1 alfa, Interleucina-1 beta, Antagonista de receptor de Interleucina-1, Interleucina-2, Interleucina-3, Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-6, Interleucina-7, Interleucina-8, Interleucina-10, Subunidade p40 de Interleucina-12, Subunidade p70 de Interleucina-12, Interleucina-13, Interleucina-15, Interleucina-16, Leptina, Proteína-1 alfa inflamatória de macrófago, Proteína-1 beta inflamatória de macrófago, Quimiocina derivada de macrófago, Metaloproteinase-2 de matriz, Metaloproteinase-3 de matriz, Metaloproteinase-9 de matriz, Proteína 1 queiotática de monócito, Mieloperoxidase, Mioglobiona, Inibidor 1 de ativador de plasminogênio, Proteína A de plasma associada à gravidez, Antígeno próstata específico (inc. PSA livre), Ácido prostática fosfatase, P-componente de amiloide de soro, Transminase glutâmica oxaloacética de soro, Globulina de ligação de hormônio sexual, Fator de célula-tronco, Proteína célula T-específica RANTES, Trombopoietina, Hormônio de estimulação da tireoide, Globulina de ligação de tiroxina, Fator de tecido, Inibidor de tecido de Metaloproteinases 1, Fator alfa de necrose de tumor, Fator beta de necrose de tumor, Receptor 2 de fator de necrose de tumor, Molécula 1 de adesão de célula vascular, Fator de crescimento endotelial vascular, Fator de von Willebrand
Neurológico	Alfa-1-antitripsina, Apolipoproteína A-I, Apolipoproteína A-II, Apolipoproteína B, Apolipoproteína C-I, Apolipoproteína H, Beta-2-Microglobulina, Betacelulina, Fator neurotrófico derivado do cérebro, Calbindina, Antígeno 125 de câncer, Antígeno carcinoembriônico, CD5 similar a antígeno, Complemento C3, Fator de crescimento de tecido conjuntivo, Cortisol, Endotelina-1, Receptor de fator de crescimento epidérmico, Ferritina, Fetuina-A, Hormônio de estimulação de folículo, Haptoglobina, Imunoglobulina A, Imunoglobulina M, Molécula 1 de adesão intercelular, Receptor de Interleucina-6, Interleucina-7, Interleucina-10, Interleucina-11, Interleucina-17, Molécula 1 de lesão renal, Hormônio luteinizante, Quimiocina derivada de macrófago, Fator inibidor de migração de macrófago, Proteína 1 alfa inflamatória de macrófago, Metaloproteinase-2 de matriz, Proteína 2 quimiotática de monócito, Peptídeo YY, Prolactina, Ácido prostático fosfatase, Serotransferrina, Componente-P de amiloide de soro, Sorilina, Testosterona, Trombopoietina, Hormônio de estimulação da tireoide, Inibidor de tecido de Metaloproteinase 1, Receptor 3 de ligante de indução de apoptose relacionada a TNF, Receptor 2 de fator de necrose de tumor, Fator de crescimento endotelial vascular, Vitronectina
Cardiovascular	Adiponectina, Apolipoproteína A-I, Apolipoproteína B, Apolipoproteína C-III, Apolipoproteína D, Apolipoproteína E, Apolipoproteína H, Apolipoproteína(a), Clustereina, Proteína C-reativa, Cistatina C, EN-RAGE, E-seletina, proteína de ligação de ácido graxo (coração), Ferritina, Fibrinogênio, Haptoglobina, Imunoglobulina M, Molécula 1 de adesão intercelular, Interleucina-6, Interleucina-8, Receptor de LDL oxidado similar a lecitina, Leptina, Proteína 1 alfa inflamatória de macrófago, Proteína 1 beta inflamatória de macrófago, Lipoproteína de baixa densidade modificada por malondialdeído, Metaloproteinase-1 de matriz, Metaloproteinase-10 de matriz, Metaloproteinase-2 de matriz, Metaloproteinase-3 de matriz, Metaloproteinase-7 de matriz, Metaloproteinase-9 de matriz, Proteína 1 quimiotática de monócito, Mieloperoxidase, Mioglobina, NT-proBNP, Osteopontina, Inibidor 1 de ativador de plasminogênio, P-selectina, Receptor para produtos finais de glicosilação avançada, P-componente de amiloide de soro,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	Globulina de ligação de hormônio sexual, Proteína célula T-específica RANTES, Trombomodulina, Globulina de ligação de tiroxina, Inibidor de tecido de metaloproteinases 1, Fator alfa de necrose de tumor, Receptor 2 de fator de necrose de tumor, Molécula-1 de adesão de célula vascular, Fator de crescimento endotelial vascular, Proteína de ligação de vitamina D, Fator de von Willebrand
Inflamatório	Alfa-1-antitripsina, Alfa-2-macroglobulina, Beta-2-microglobulina, Fator netrotrófico derivado do cérebro, Complemento C3, Proteína C-reativa, Eotaxina-1, Fator VII, Ferritina, Fibrinogênio, Fator de estimulação de colônia de macrófagos de granulócito, Haptoglobina, Molécula de adesão intercelular, Interferon gama, Interleucina-1 alfa, Interleucina-1 beta, antagonista de receptor de interleucina-1, Interleucina-2, Interleucina-3, Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-6, Interleucina-7, Interleucina-8, Interleucina-10, Subunidade p40 de Interleucina-12, Subunidade p70 de Interleucina-12, Interleucina-15, Interleucina-17, Interleucina-23, Proteína-1 alfa inflamatória de macrófago, Proteína-1 beta inflamatória de macrófago, Metaloproteinase-2 de matriz, Metaloproteinase-3 de matriz, Metaloproteinase-9 de matriz, Proteína 1 quimiotática de monócito, Fator de célula-tronco, Proteína célula T-específica RANTES, Inibidor de tecido de Metaloproteinases 1, Fator alfa de necrose de tumor, Fator beta de necrose de tumor, Receptor 2 de fator de necrose de tumor, Molécula-1 de adesão de célula vascular, Fator de crescimento endotelial vascular, Proteína de ligação de vitamina D, Fator de von Willebrand
Metabólico	Adiponectina, Hormônio adrenocorticotrópico, Enzima de conversão de angiotensina, Angiotensinogênio, Complemento C3 alfa des arg, Cortisol, Hormônio de estimulação de folículo, Galanina, Glucagon, Peptídeo 1 do tipo Glucagon, Insulina, Fator I de crescimento do tipo insulina, Leptina, Hormônio luteinizante, Polipeptídeo pancreático, Peptídeo YY, Progesterona, Prolactina, Resistina, Secretina, Testosterona
Rim	Alfa-1-Microglobulina, Beta-2-Microglobulina, Calbindina, Clusterina, Fator de crescimento de tecido conjuntivo, Creatinina, Cistatina C, Glutationa S-Transferase alfa, Molécula 1 de lesão renal, Microalbumina, Lipocalina associada a Neutrófilo Gelatinase, Osteopontina, Glicoproteína urinária de Tamm-Horsfall, Inibidor de tecido de metaloproteinases 1, Fator 3 de trefoila, Fator de crescimento endotelial vascular
Citocinas	Fator de estimulação de colônia de macrófagos de granulócito, Interferon gama, Interleucina-2, Interleucina-3, Interleucina-4, Interleucina-5, Interleucina-6, Interleucina-7, Interleucina-8, Interleucina-10, Proteína-1 alfa inflamatória de macrófago, Proteína-1 beta inflamatória de macrófago, Metaloproteinase-2 de matriz, Proteína 1 quimiotática de monócito, Fator alfa de necrose de tumor, Fator beta de necrose de tumor, Fator neutrotrófico derivado do cérebro, Eotaxina-1, Molécula 1 de adesão intercelular, Interleucina-1 alfa, Interleucina-1 beta, Antagonista de receptor de Interleucina-1, Subunidade p40 de Interleucina-12, Subunidade p70 de Interleucina-12, Interleucina-15, Interleucina-17, Interleucina-23, Metaloproteinase-3 de matriz, Fator de célula-tronco, Fator de crescimento endotelial vascular
Proteína	14.3.3 gama, 14.3.3 (Pan), 14-3-3 beta, 6-Histidina, a-B-Cristalina, Acinus, Actina beta, Actina (Músculo específica), Actina (Pan), Actina (músculo esquelético), Receptor de activina tipo II, Adenovírus, Fibra de Adenovírus, Adenovírus tipo 2 E1A, Adenovírus tipo 5 E1A, Fator de ribosilação de ADP (ARF-6), Hormônio Adrenocortcotrófico, AIF (Fator de indução de apoptose), Fosfatase alcalina (AP), Alfa Fetoproteína (AFP), Alfa Lactalbumina, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, Anfiregulina, Peptídeo amiluna, Amiloide A, Precursor de proteína de amiloide A4, Amiloide B (APP), Receptor de androgênio, Ang-1, Ang-2, APC, APC11, APC2, Apolipoproteína D, A-Raf, ARC, Ask1 / MAPKKK5, ATM, Cones de crescimento axonal, b Galactosidade, b-2-Microglobulina, B7-H2, BAG-1, Bak, Célula B, Proteína de ligante de célula B (BLNK), Bc110 / CIPER / CLAP / mE10, bcl-2a, Bcl-6, bcl-X, bcl-XL, Bim (BOD), Biotina, Bonzo / STRL33 / TYMSTR, Albumina de soro bovino, BRCA2 (aa 1323-1346), BrdU, Bromodesoxiuridina (BrdU), CA125, CA19-9, c-Abl, Caderina (Pan), Caderina-E, Caderina-P, Calcitonina, Bomba de cálcio ATPase, Caldesmon, Calmodulina, Calponina, Calretinina, Caseína, Caspase 1, Caspase 2, Caspase 3, Caspase 5, Caspase 6 (Mch 2), Caspase 7 (Mch 3), Caspase 8 (FLICE), Caspase 9, Catenina alfa, Catenina beta, Catenina gama, Catepsina D, CCK-8, CD1, CD10, CD100/Semaforina de leucócito, CD105, CD106 / VCAM, CD115/c-fms/CSF-1R/M-CSFR, CD137 (4-1BB), CD138, CD14, CD15, CD155/PVR (receptor de vírus pólio), CD16, CD165, CD18, CD1a, CD1b, CD2, CD20, CD21, CD23, CD231, CD24, CD25/Receptor a de

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	IL-2, CD26/DPP IV, CD29, CD30 (Marcador de célula de Reed-Sternberg), CD32/Receptor II de Fcg), CD35/CR1, CD36GPIIIb/GPIV, CD3zeta, CD4, CD40, CD42b, CD43, CD45/T200/LCA, CD45RB, CD45RO, CD46, CD5, CD50/ICAM-3, CD53, CD54/ICAM-1, CD56/NCAM-1, CD57, CD59 / MACIF / MIRL / Protectina, CD6, CD61 / Glicoproteína IIA de plaqueta, CD63, CD68, CD71 / Receptor de transferrina, CD79a mb-1, CD79b, CD8, CD81/TAPA-1, CD84, CD9, CD94, CD95 / Fas, CD98, CDC14A Fosfatase, CDC25C, CDC34, CDC37, CDC47, CDC6, cdh1, Cdk1/p34cdc2, Cdk2, Cdk3, Cdk4, Cdk5, Cdk7, Cdk8, CDw17, CDw60, CDw75, CDw78, CEA / CD66e, c-erbB-2/HER-2/neu Ab-1 (21N), c-erbB-2/HER-4, c-fos, Chk1, Ganodrotropina coriônica beta (hCG-beta), Cromogranina A, CIDE-A, CIDE-B, CITED1, c-jun, Clatrina, claudina 11, Claudina 2, Claudina 3, Claudina 4, Claudina 5, CLAUDINA 7, Claudina-1, CNPase, Colágeno II, Colágeno IV, Colágeno IX, Colágeno VII, Conexina 43, COX2, CREB, Proteína de ligação de CREB, Cryptococcus neofarmans, c-Src, Culina 1 (CUL-1), Culina 2 (CUL-2), Culina 3 (CUL-3), CXCR4 / Fusina, Ciclina B1, Ciclina C, Ciclina D1, Ciclina D3, Ciclina E, Ciclina E2, Regulador de transmembrana de fibrose cística, Citocromo c, D4-GDI, Daxx, DcR1, DcR2 / TRAIL-R4 / TRUNDD, Desmina, DFF40 (Fator 40 de fragmentação de DNA)/CAD, DFF45 / ICAD, Dj-1, DNA ligase I, DNA polimerase beta, DNA polimerase gama, DNA primase (p49), DNA primase (p58), DNA-PKcs, DP-2, DR3, DR5, Disferlina, Distrofina, E2F-1, E2F-2, E2F-3, E2F-4, E2F-5, proteína de ligação de E3 (ARM1), EGFR, EMA/CA15-3/MUC-1, Endostatina, Antígeno de membrana epitelial (EMA/CA15-3/MUC-1), Antígeno epitelial específico, ER beta, ER Ca+2 ATPase2, ERCC1, Erk1, ERK2, Estradiol, Estriol, Receptor de estrogênio, Exol, Ezrina/p81/80K/Citovilina, F.VIII/VWF, Antígeno relacionado a fator VIII, FADD (proteína contendo domínio de morte associado a FAS), Fascina, Ligante Fas, Ferritina, FGF-1, FGF-2, FHIT, Fibrilina-1, Fibronectina, Filagrina, Filamina, FITC, Fli-1, FLIP, Flk-1 / KDR / VEGFR2, Flt-1 / VEGFR1, Flt-4, Fra2, FSH, FSH-b, Fyn, Ga0, Gab-1, a Receptor 1 de GABA, GAD65, Gai1, Gama Glutamila Transferase (gGT), Gama Glutamilcisteína Sintetase(GCS)/Glutamato-cisteína ligase, GAPDH, Gastrina 1, GCDFP-15, G-CSF, GFAP, Glicentina, Glucagon, Proteína 94 regulada por glicose, GluR 2/3, GluR 1, GluR4, GluR6/7, GLUT-1, GLUT-3, Glicogênio Sintase Quinase 3b (GSK3b), Glicoforina A, GM-CSF, Receptor de GnRH, Complexo de Golgi, Granulócito, Granzima B, Grb2, Proteína verde fluorescente (GFP), GRIP1, Hormônio de crescimento (hGH), GSK-3, GST, GSTmu, H.Pylori, HDAC1, HDJ/DNAJ, Fator 1 de choque térmico, Fator 2 de choque térmico, Proteína de choque térmico 27/hsp27, Proteína de choque térmico 60/hsp60, Proteína de choque térmico 70/hsp70, Proteína de choque térmico 75/hsp75, Proteína de choque térmico 90a/hsp86, Proteína de choque térmico 90b/hsp84, Helicobacter pylori, Heparano Sulfato Proteoglicano, Fator 3B nucler hepático, Hepatócito, Homólogo 4 de fator de hepatócito, Fator de crescimento de hepatócito, Heregulina, HIF-1a, Histona H1, hPL, HPV16, HPV16-E7, HRP, Simportador sódico-iodo humano (hNIS), I-FLICE / CASPER, IFN gama, Ig, IGF-1R, IGF-I, IgG, IgM (cadeia m-pesada), I=Kappa-B quinase b (IKKb), IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-10, IL-10R, IL-17, IL-2, IL-3, IL-30, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, Inibina alfa, Insulina, receptor de insulina, Substrato 1 de receptor de insulina, Oncoporteína Int-2, Integrina beta5, Interferon-a(II), Interferon-g, Involucrina, IP10/CRG2, Marcador de proliferação IPO-38, IRAK, ITK, Quinase de ativação de JNK (JKK1), Cadeia leve kappa, Queratina 10, Queratina 10/13, Queratina 14, Queratina 15, Queratina 16, Queratina 18, Queratina 19, Queratina 20, Queratina 5/6/18, Queratina 5/8, Queratina 8, Queratina 8 (Ser73 fosfo-específica), Queratina 8/18, Queratina (LMW), Queratina (Multi), Queratina (Pan), Ki67, Ku (p70/p80), Ku (p80), Molécula de adesão de célula L1, Cadeia leve lambda, Laminina B1/b1, Laminina B2/g1, Receptor de laminina, Laminina-s, Lck, Lck (p561ck), Leucotrieno (C4, D4, E4), LewisA, LewisB, LH, L-Plastina, LRP / MVP, Luciferase, Macrófago, MADD, MAGE-1, Proteína de ligação de maltose, MAP1B, MAP2a,b, MART-1/Melan-A, Mastócitos Quimase, Mcl-1, MCM2, MCM5, MDM2, Acetato de medroxiprogesterona (MPA), Mek1, Mek2, Mek6, Mekk-1, Melanoma (gp100), mGluR1, mGluR5, MGMT, MHC I (HLA25 e HLA-Aw32), MHC I (HLA-A), MHC I (HLA-A, B,C), MHC I (HLA-B), MHC II (HLA-DP e DR), MHC II (HLA-DP), MHC II (HLA-DQ), MHC II (HLA-DR) Ia, Microftalmia, Proteína de membrana de glóbulo da gordura do leite, Mitocôndria, MLH1, MMP-1 (Colagenase-1), MMP-10 (Estromilisina-2), MMP-11 (Estromilisina-2), MMP-13 (Colagenase-3), MMP-1 4 / MT1-MMP, MMP-15 / MT2-MMP, MMP-16 / MT3-MMP, MMP-19, MMP-2 (Colagenase IV 72 kDa), MMP-23, MMP-7 (Matrilisina), MMP-9 (Colage-

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	nase IV 92 kDa), Moesina, mRANKL, Muc-1, Mucina 2, Mucina 3 (MUC3), Mucina 5AC, MyD88, Mielina / Oligodendrócito, Marcador mieloide-específico, Mieloperoxidase, MyoD1, Miogenina, Mioglobina, Cadeia pesada de músculo liso de miosina, Nck, Controle negativo para IgG1 de camundongo, Controle negativo para IgG2a de camundongo, Controle negativo para IgG3 de camundongo, Controle negativo para IgM de camundongo, Controle negativo para IgG de coelho, Neurofilamento, Neurofilamento (160 kDa), Neurofilamento (200 kDa), Neurofilamento (68 kDa), Enolase neurônio específica, Neutrófilo elastase, NF kappa b / p50, NF kappa b / p65 (Rel A), Receptor de NGF (p75NGFR), Óxido nítrico sintase cerebral (bNOS), Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), nm23, NOS-i, NOS-u, Notch, Nucleofosmina (NPM), NuMA, O ct-1, Oct-2/, Oct-3/, Ornitina Descarboxilase, Osteopontina, p130, p130cas, p14ARF, p15INK4b, p16INK4a, p170, p170 / MDR-1, p18INK4c, p19ARF, p19Skp1, p21WAF1, p27Kip1, p300 / CBP, p35nck5a, P504S, p53, p57Kip2 Ab-7, p63 (Membro da famínia p53), p73, p73a, p73a/b, p95VAV, Hormônio da paratireoide, Receptor tipo 1 de Hormônio da paratireoide, Parquina, PARP, PARP (Poli ADP-Ribose Polimerase), Pax-5, Paxilina, PCNA, PCTAIRE2, PDGF, PDGFR alfa, PDGFR beta, Pds1, Perforina, PGP9.5, PHAS-II, Fosfo-Ser/Thr/Tyr, Fosfotirosina, PLAP, Marcador de célula do plasma, Plasminogênio, PLC gama 1, PMP-22, Pneumocystis jiroveci, PPAR-gama, PR3 (Proteinase 3), Presenilina, Progesterona, Receptor de progesterona, Receptor de progesterona (fosfo-específico) – Serina 190, Receptor de progesterona (fosfo-específico) – Serina 294, Proibitina, Prolactina, Receptor de prolactina, Proteína 4 de resposta de apoptose de próstata, Ácido fosfatase próstata-específica, Antígeno próstata-específico, pS2, PSCA, Vírus da raiva, RAD1, Rad51, Raf1, Raf-1 (fosfo-específico), RAIDD, Ras, Rad18, Carcinoma de célula renal, Oncoproteína Ret, Retinoblastoma, Retinoblastoma (Rb) (fosfo-específico Serina608), Receptor de ácido retinoico (b), Receptor X de retinoide (hRXR), Proteína de ligação de retion, Rodopsina (Opsina), ROC, RPA/p32, RPA/p70, Ruv A, Ruv B, Ruv C, S100, S100A4, S100A6, SHP-1, SIM Ag (SIMA-4D3), SIRP a1, sm, SODD (cilenciador de domínio de morte), Receptor I de somatostatina, SRC1 (Coativador 1 de receptor de esteroide) Ab-1, SREBP-1 (Proteína 1 de ligação de elemento regulador de esterol), SRF (Fator de resposta sérica), Stat-1, Stat3, Stat5, Stat5a, Stat5b, Stat6, Estraptavidina, Superóxido dismutase, Proteína A de tensoativo, Proteína B de tensoativo, Proteína B de tensoativo (Pro), Survivina, Antígeno T grande de SV40, Syk, Sinaptofisina, Sinucleína, Sinucleína beta, Sinucleína pan, TACE (enxima de conversão de TNF-alfa) / ADAM17, TAG-72, TdT, Tenascina, Testosterona, TGF beta 3, TGF beta 2, Antígeno de Thomsen-Friedenreich, Trombospondina, Timidina fosforilase, Timidilato Sintase, Timina glicóis, Tiroglobolina, Receptor beta de hormônio da tireoide, Receptor de hormônio da tireoide, Hormônio de estimulação da tireoide (TSH), TID-1, TIMP-1, TIMP-2, TNF alfa, TNFα, TNR-R2, Topo II beta, Topoisomerase IIa, Toxoplasma Gondii, TR2, TRADD, Fator a de crescimento por transformação, Transglutaminase II, TRAP, Tropomiosina, TRP75 / gp75, TrxR2, TTf-1, Tubulina, Tubulina-a, Tubulina-b, Tirosinase, Ubiquitina, UCP3, uPa, Urocortina, Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Vimentina, Vinculina, Receptor de Vitamina D (VDR), Proteína de von Hippel-Lindau, Wnt-1, Xantina Oxidase, XPA, XPF, XPG, XRCC1, XRCC2, ZAP-70, Zip quinase
Genes de câncer conhecidos	ABL1, ABL2, ACSL3, AF15Q14, AF1Q, AF3p21, AF5q31, AKAP9, AKT1, AKT2, ALDH2, ALK, ALO17, APC, ARHGEF12, ARHH, ARID1A, ARID2, ARNT, ASPSCR1, ASXL1, ATF1, ATIC, ATM, ATRX, BAP1, BCL10, BCL11A, BCL11B, BCL2, BCL3, BCL5, BCL6, BCL7A, BCL9, BCOR, BCR, BHD, BIRC3, BLM, BMPR1A, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD3, BRD4, BRIP1, BTG1, BUB1B, C12orf9, C15orf21, C15orf55, C16orf75, CANT1, CARD11, CARS, CBFA2T1, CBFA2T3, CBFB, CBL, CBLB, CBLC, CCNB1IP1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD273, CD274, CD74, CD79A, CD79B, CDH1, CDH11, CDK12, CDK4, CDK6, CDKN2A, CDKN2a(p14), CDKN2C, CDX2, CEBPA, CEP1, CHCHD7, CHEK2, CHIC2, CHN1, CIC, CIITA, CLTC, CLTCL1, CMKOR1, COL1A1, COPEB, COX6C, CREB1, CREB3L1, CREB3L2, CREBBP, CRLF2, CRTC3, CTNNB1, CYLD, D10S170, DAXX, DDB2, DDIT3, DDX10, DDX5, DDX6, DEK, DICER1, DNMT3A, DUX4, EBF1, EGFR, EIF4A2, ELF4, ELK4, ELKS, ELL, ELN, EML4, EP300, EPS15, ERBB2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EVI1, EWSR1, EXT1, EXT2, EZH2, FACL6, FAM22A, FAM22B, FAM46C, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FBXO11, FBXW7, FCGR2B, FEV, FGFR1, FGFR1OP, FGFR2, FGFR3, FH, FHIT, FIP1L1, FLI1, FLJ27352, FLT3, FNBP1, FOXL2, FOXO1A, FOXO3A, FOXP1, FSTL3, FUBP1, FUS, FVT1, GAS7,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	GATA1, GATA2, GATA3, GMPS, GNA11, GNAQ, GNAS, GOLGA5, GOPC, GPC3, GPHN, GRAF, HCMOGT-1, HEAB, HERPUD1, HEY1, HIP1, HIST1H4I, HLF, HLXB9, HMGA1, HMGA2, HNRNPA2B1, HOOK3, HOXA11, HOXA13, HOXA9, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13, HRAS, HRPT2, HSPCA, HSPCB, IDH1, IDH2, IGH@, IGK@, IGL@, IKZF1, IL2, IL21R, IL6ST, IL7R, IRF4, IRTA1, ITK, JAK1, JAK2, JAK3, JAZF1, JUN, KDM5A, KDM5C, KDM6A, KDR, KIAA1549, KIT, KLK2, KRAS, KTN1, LAF4, LASP1, LCK, LCP1, LCX, LHFP, LIFR, LMO1, LMO2, LPP, LYL1, MADH4, MAF, MAFB, MALT1, MAML2, MAP2K4, MDM2, MDM4, MDS1, MDS2, MECT1, MED12, MEN1, MET, MITF, MKL1, MLF1, MLH1, MLL, MLL2, MLL3, MLLT1, MLLT10, MLLT2, MLLT3, MLLT4, MLLT6, MLLT7, MN1, MPL, MSF, MSH2, MSH6, MSI2, MSN, MTCP1, MUC1, MUTYH, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYH11, MYH9, MYST4, NACA, NBS1, NCOA1, NCOA2, NCOA4, NDRG1, NF1, NF2, NFE2L2, NFIB, NFKB2, NIN, NKX2-1, NONO, NOTCH1, NOTCH2, NPM1, NR4A3, NRAS, NSD1, NTRK1, NTRK3, NUMA1, NUP214, NUP98, OLIG2, OMD, P2RY8, PAFAH1B2, PALB2, PAX3, PAX5, PAX7, PAX8, PBRM1, PBX1, PCM1, PCSK7, PDE4DIP, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PER1, PHOX2B, PICALM, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PLAG1, PML, PMS1, PMS2, PMX1, PNUTL1, POU2AF1, POU5F1, PPARG, PPP2R1A, PRCC, PRDM1, PRDM16, PRF1, PRKAR1A, PRO1073, PSIP2, PTCH, PTEN, PTPN11, RAB5EP, RAD51L1, RAF1, RALGDS, RANBP17, RAP1GDS1, RARA, RB1, RBM15, RECQL4, REL, RET, ROS1, RPL22, RPN1, RUNDC2A, RUNX1, RUNXBP2, SBDS, SDH5, SDHB, SDHC, SDHD, SEPT6, SET, SETD2, SF3B1, SFPQ, SFRS3, SH3GL1, SIL, SLC45A3, SMARCA4, SMARCB1, SMO, SOCS1, SOX2, SRGAP3, SRSF2, SS18, SS18L1, SSH3BP1, SSX1, SSX2, SSX4, STK11, STL, SUFU, SUZ12, SYK, TAF15, TAL1, TAL2, TCEA1, TCF1, TCF12, TCF3, TCF7L2, TCL1A, TCL6, TET2, TFE3, TFEB, TFG, TFPT, TFRC, THRAP3, TIF1, TLX1, TLX3, TMPRSS2, TNFAIP3, TNFRSF14, TNFRSF17, TNFRSF6, TOP1, TP53, TPM3, TPM4, TPR, TRA@, TRB@, TRD@, TRIM27, TRIM33, TRIP11, TSC1, TSC2, TSHR, TTL, U2AF1, USP6, VHL, VTI1A, WAS, WHSC1, WHSC1L1, WIF1, WRN, WT1, WTX, XPA, XPC, XPO1, YWHAE, ZNF145, ZNF198, ZNF278, ZNF331, ZNF384, ZNF521, ZNF9, ZRSR2
Genes de câncer conhecidos	AR, receptor de androgênio, ARPC1A, subunidade A de complexo 2/3 de proteína relacionada à actina; AURKA. Aurora quinase A; BAG4, antogene 4 associado a BC1-2; BC1212, BC1-2 similar a 2; BIRC2, proteína 2 que contém repetição de IAP de baculovírus; CACNA1E, subunidade alfa-1E dependente de voltagem de canal de cpaçcio; CCNE1, ciclina E1; CDK4, quinase 4 dependen de ciclina; CHD1L, domínio tipo 1 de ligação de DNA de cromodomínio helicase; CKS1B, CDC28 proteína quinase 1B; COPS3, subunidade 3 de COP9; DCUN1D1, proteína 1 contendo domínio DCN1; DYRK2, quinase 2 regulada por fosforilação de tirosina de especificidade dupla; EEF1A2, Fator 1 alfa 2 de transcrição de alongamento eucariótico; EGFR, receptor de fator de crescimento epidérmico; FADD, Fas-associado por meio de domínio de morte; FGFR1, receptor 1 de fator de crescimento de fibroblasto, GATA6, proteína 6 de ligação de GATA; GPC5, glipicano 5; GRB7, proteína 7 ligada a receptor de fator de crescimento; MAP3K5, proteína quinase quinase quinase 5 ativada por mitógeno, MED29, subunidade 5 de complexo mediador; MITF, fator de transcrição associado a microftalmia; MTDH, metaderina; NCOA3, coativador 3 de receptor nuclear; NKX2-1, NK2 homeobox 1; PAK1, quinase 1 ativada por p21/CDC42/RAC1; PAX9, gene 9 box pareado; PIK3CA, fosfatidilinosito-3 quinase catalítica a; PLA2G10, fosfolipase A2, grupo X, PPM1D, proteína fosfatase magnésio dependente 1D; PTK6, proteína tirosina quinase 6; PRKCI, proteína quinase C iota; RPS6KB1, proteína s6 quinase ribossômica 70kDa; SKP2, proteína associado a quinase de fase s, SMURF1, E3 ubiquitina proteína ligase 1 sMAD específica; SHH, homólogo de sonic hedgehog; STARD3, proteína 3 que contém domínio de transferência de lipídeo relacionado a sTAR; YWHAQ, proteína de ativação de tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase, isoforma zeta; ZNF217, proteína dedo de zinco 217
Genes de câncer relacionados mitóticos	Aurora quinase A (AURKA); Aurora quinase b (AURKB); IAP baculoviral contendo repetição 5. survivina (BIRC5); Germinação não inibida por benzimidazóis homólogo 1 (BUB1); Germinação não inibida por benzimidazóis homólogo 1 beta, BUBR1 (BUB1B); Germinação não inibida por benzimidazóis homólogo 3 (BUB3); subunidade 1B reguladora de CDC28 proteína quinase (CKS1B); subunidade 2 reguladora de CDC28 proteína quinase (CKS2); ciclo 2 de divisão celular (CDC2)/CDK1, homólogo de ciclo 20 de divisão celular (CDC20); Ciclo de divisão celular associado 8, borealina (CDCA8); proteína F centrômero, mitosina (CENPF); proteína centrossomal 110 kDa (CEP110); ponto de verificação com domínio de dedo de anel e forkhead (CHFR); Ciclina B1 (CCNB1); Ciclina B2 (CCNB2); proteína 5 associado a citoesqueleto (CKAP5/ch-TOG); proteína RP associada a microtúbulo/membro 1 da famínia EB. Proteína 1 de ligação de extremidade, EB1 (MAPRE1); oncogene de sequência 2 de

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	transformação de célula epitelial (ECT2); Polos de eixo extra tipo 1, separasse (ESPL1); Forkhead box M1 (FOXM1); família de histona H2A, membro X (H2AFX); membro 4A da famínia de quinesina (KIF4A); Cinetócoro associado 1 (KNTC1/ROD); Cinetócoro associado 2 ; altamente expresso em câncer 1 (KNTC2/HEC1); supressor de tumor grande, homólogo 1 (LATS1); supressor de tumor grande, homólogo 2 (LATS2); Captura mitótica deficiente tipo 1; MAD1 (MAD1L1); Captura mitótica deficiente tipo 2; MAD1 (MAD2L1); Mps1 proteína quinase (TTK); Nunca em quinase 2 a-relacionada a gene de mitose (NEK3); Nimeína, proteína de interação de GSK3b (NIN); Complexo de condensina I não SMC, subunidade D2 (NCAPD2/CNAP1); Complexo de condensina I não SMC, subunidade H (NCAPH/CNAPH); proteína 1 de mecanismo miótico nuclear (NUMA1); Nucleofosmina (fosfoproteína B23 nucleolar, numatrina); (NPM1); Nucleoporina (NUP98); Materia 1 pericentriolar (PCM1); transformação 1 de tumor da pituitária, securina (PTTG1); quinase 1 tipo polo (PLK1); quinase 4 tipo polo (PLK4/SAK); Proteína (pepdilprolil cis/trans isomerase) NIMa-interação 1 (PIN1); Regulador proteico de citocinese 1 (PRC1); homólogo de RAD21 (RAD21); Associação a Ras (RalGDS/AF-6); família de domínio 1 (RASSF1); antígeno de estroma (STAG1); Sinucleína-c, proteína 1 câncer de mama específica (SNCG, BCSG1); proteían de alvejamento para Xklp2 (TPX2); Transformação, proteína 3 contendo hélice enrolada ácida (TACC3);enzima E2C de conjugação a ubiquitina (UBE2C); enzima E2I de conjugação a ubiquitina (UBE2I/UBC9), interator ZW10, (ZWINT); ZW10, homólogo associado a cinetócoro (ZW10); Zwilch, homólogo associado a cinetócoro (ZWILCH)
Complexos de ribonucleoproteína	Membro da família argonauta, Ago1, Ago2, Ago3, Ago4, GW182 (TNRC6A), TNRC6B, TNRC6C, HNRNPA2B1, HNRPAB, ILF2, NCL (Nuleolina), NPM1 (Nucleofosmina), RPL10A, RPL5, RPLP1, RPS12, RPS19, SNRPG, TROVE2, apolipoproteína, apolipoproteína A, apo A-1, apo A-II, apo A-IV, apo A-V, apolipoproteína B, apo B48, apo B100, apolipoproteína C, apo C-I, apo C-II, apo C-IIII, apo C-IV, apolipoproteína D (ApoD), apolipoproteína E (ApoE), apolipoproteína H (ApoH), apolipoproteína L, APOL1, APOL2, APOL3, APOL4, APOL5, APOL6, APOLD1
Receptores de citocinas	4-1BB, ALCAM, B7-BCMA, CD14, CD30, Ligante CD40, CEACAM-1, DR6, Dtk, Endoglina, ErbB3, E-Selectina, Faz, Flt-3L, GITR, HVEM, ICAM-3, IL-1 R4, IL-1 RI, IL-10 Rbeta, IL-17R, IL-2Rgama, IL-21R, LIMPII, Lipocalina-2, L-Selectina, LYVE-1, MICA, MICB, NRG1-beta1, PDGF Rbeta, PECAM-1, RAGE, TIM-1, TRAIL R3, Trappin-2, uPAR, VCAM-1, XEDAR
Vesículas de câncer de próstata e colorretal	ErbB3, RAGE, Trail R3
Vesículas de câncer colorretal	IL-1 alfa, CA125, Filaminam Amiloide A
Câncer colorretal v vesículas de adenoma	Involucrina, CD57, Proibitina, Trombspondina, Laminina B1/b1, Filamina, 14.3.3 gama, 14.3.3 Pan
Vesículas de adenoma colorretal	Involucrina, Proibitina, Laminina B1/b1, IL-3, 14.3.3 gama, 14.3.3 Pan, MMP-15 / MT2-MMP, hPL, Ubiquitina e mRANKL
Vesículas de câncer cerebral	Proibitina, CD57, Filamina, b-2-Microglobulina, IL-2, IL-3, CD16, p170, Queratina 19, Pds1, Glicentina, SRF (Fator de resposta sérica), Proteína de ligação de E3 (ARM1), Colágeno II, SRC1 (Coativador 1 de receptor de esteroide) Ab-1, Caldesmon, GFAP, TRP75 / gp75, alfa-1-antiquimotripsina, Gator 3B nuclear hepático, PLAP, Tirosinase, NF kappa B / p50, Melanoma (gp100), Ciclina E, 6-Histidina, Mucina 3 (MUC3), TdT, CD21, XPA, Superóxido Dismutase, Glicogênio Sintase Quinae 3b (GSK3b), CD54/ICAM-1, Trombspondina, Gai1, CD79a mb-1, IL-1 beta, Citocromo c, RAD1, bcl-X, CD50/ICAM-3, Neurofilamento, Fosfatase alcalina (AP), ER-Ca+2 ATPase2, PCNA, F.VII/VWF, Antígeno T grande de SV40, Paxilina, Fascina, CD165, GRIP1, Cdk8, Nucleofosmina (NPM), alfa-1-antitripsina, Receptor II de CD32/Fcg, Queratina 8 (fosfo-específica Ser73), DR3, CD46, TID-1, MHC II (HLA-DQ), Marcador de célula do plasma, DR3, Calmodulina, AIF (fator de indução de apoptose), DNA polimerase beta, Receptor de vitamina D (VDR), Bs110 / CIPER / CLAO / mE10, Enolase neurônio específica, CXCR4 / Fusina, Neurofilamento (68

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	kDa), PDGFR, beta, Hormônio de crescimento (hGH), Mastócito quimase, Oncoproteína Ret e Fosfotirosina
Vesículas de melanoma	Caspase 5, Trombospondina, Filamina, Ferritina, 14.3.3 gama, 14.3.3 Pan, CD71 / Receptor de transferrina e Proteína 4 de resposta de apoptose de próstata
Vesículas de câncer de cabeça e pescoço	14.3.3 Pan, Filamina, 14.3.3 gama, CD71 / Receptor de transferrina , CD30, Cdk5, CD138, Timina fosforilase, Ruv 5, Trombospondina, CD1, Proteína de Von Hippel-Lindau, CD46, Rad51, c-Abl, Actina, Músculo específico, LewisB
Proteínas de membrana	anidrase carbônica, IX, B7, CCCL19, CCCL21, CSAp, HER-2/neu, BrE3, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD86, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CEACAM5, CEACAM-6, alfa-fetoproteína (AFP), VEGF, fibrinectina ED-B, EGP-1, EGP-2, receptor de EGP (ErbB1), ErbB2, ErbB3, Fator H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, Ga 733, GROB, HMGB-1, fator induzível por hipóxia (HIF), HM1.24, HER-2/neu, fator de crescimento similar a insulina (ILGF), IFN-γ, IFN-α, IL-β, IL-2R, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, IGF-1R, Ia, HM1,24, gangliosídeos, HCG, HLA-DR, CD66a-d, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, fator inibidor de migração de macrófago (MIF), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, fator de crescimento de placenta (P1GF), PSA (antígeno próstata-específico), PSMA, dímero de PSMA, antígeno de PAM4, NCA-95, NCA-90, A3, A33, Ep-CAM, KS-1, Le(y), mesotelina, S100, tenascina, TAC, antígeno Tn, antígenos de Thomas-Friedenreich, antígenos de necrose de tumor, antígenos de angiogênese de tumor, TNF-α, receptor TRAIL (R1 e R2), VEGFR, RANTES, T101, antígenos de célula-tronco de câncer, fatores de complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5
Proteínas de agrupamento de diferenciação (CD)	CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD12w, CD13, CD14, CD15, CD16, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD68, CD69, CD71, CD72, CD73, CD74, CD80, CD81, CD82, CD83, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD95, CD96, CD100, CD103, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD109, CD117, CD120, CD127, CD133, CD134, CD135, CD138, CD141, CD142, CD143, CD144, CD147, CD151, CD152, CD154, CD156, CD158, CD163, CD165, CD166, CD168, CD184, CDw186, CD195, CD197, CD209, CD202a, CD220, CD221, CD235a, CD271, CD303, CD304, CD309. CD326
Proteínas interleucina (IL)	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 or CXCL8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-35, IL-36
Receptores de IL	CD121a/IL1R1, CD121b/IL1R2, CD25/IL2RA, CD122/IL2RB, CD132/IL2RG, CD123/IL3RA, CD131/IL3RB, CD124/IL4R, CD132/IL2RG, CD125/IL5RA, CD131/IL3RB, CD126/IL6RA, CD130/IR6RB, CD127/IL7RA, CD132/IL2RG, CXCR1/IL8RA, CXCR2/IL8RB/CD128, CD129/IL9R, CD210/IL10RA, CDW210B/IL10RB, IL11RA, CD212/IL12RB1, IR12RB2, IL13R, IL15RA, CD4, CDw217/IL17RA, IL17RB, CDw218a/IL18R1, IL20R, IL20R, IL21R, IL22R, IL23R, IL20R. LY6E. IL20R1. IL27RA. IL28R. IL31RA
Proteínas Mucina (MUC)	MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC19, and MUC20
Isoformas de MUC1	Precursor ou forma madura de isoforma 2 de mucina 1 (NP_001018016.1), Precursor ou forma madura de isoforma 3 de mucina 1 (NP_001018017.1), Precursor ou forma madura de isoforma 5 de mucina 1 (NP_001037855.1), Precursor ou forma madura de isoforma 6 de mucina 1 (NP_001037856.1), Precursor ou forma madura de isoforma 7 de mucina 1 (NP_001037857.1), Precursor ou forma madura de isoforma 8 de mucina 1 (NP_001037858.1), Precursor ou forma madura de isoforma 9 de mucina 1 (NP_001191214.1), Precursor ou forma madura de isoforma 10 de mucina 1 (NP_001191215.1), Precursor ou forma madura de isoforma 11 de mucina 1 (NP_001191216.1), Precursor ou forma madura de isoforma 12 de mucina 1 (NP_001191217.1), Precursor ou forma madura de isoforma 13 de mucina 1 (NP_001191218.1), Precursor ou forma madura de isoforma 14 de mucina 1 (NP_001191219.1), Precursor ou forma madura de isoforma 15 de mucina 1

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	(NP_001191220.1), Precursor ou forma madura de isoforma 16 de mucina 1 (NP_001191221.1), Precursor ou forma madura de isoforma 17 de mucina 1 (NP_001191222.1), Precursor ou forma madura de isoforma 18 de mucina 1 (NP_001191223.1), Precursor ou forma madura de isoforma 19 de mucina 1 (NP_001191224.1), Precursor ou forma madura de isoforma 20 de mucina 1 (NP_001191225.1), Precursor ou forma madura de isoforma 21 de mucina 1 (NP_001191226.1), Precursor ou forma madura de isoforma 1 de mucina 1 (NP_002447.4), ENSP00000357380, ENSP00000357377, ENSP00000389098, ENSP00000357374, ENSP00000357381, ENSP00000339690, ENSP00000342814, ENSP00000357383, ENSP00000357375, ENSP00000338983, ENSP00000343482, ENSP00000406633, ENSP00000338172, ENSP00000357378, P15941-1, P15941-2, P15941-3, P15941-4, P15941-5, P15941-6, P15941-7, P15941-8, P15941-9, P15941-10, isoforma secretada, isoforma ligada à membrana, CA 27.29 (BR 27.29), CA 15-3, antígeno reativo a PAM4, isoforma sub glicosilada, isoforma não glicosilada, antígeno CanAg
Proteínas de interação de MUC1	ABL1, SRC, CTNND1, ERBB2, GSK3B, JUP, PRKCD, APC, GALNT1, GALNT10, GALNT12, JUN, LCK, OSGEP, ZAP70, CTNNB1, EGFR, SOS1, ERBB3, ERBB4, GRB2, ESR1, GALNT2, GALNT4, LYN, TP53, C1GALT1, C1GALT1C1, GALNT3, GALNT6, GCNT1, GCNT4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC17, MUC19, MUC2, MUC20, MUC3A, MUC4, MUC5B, MUC6, MUC7, MUCL1, ST3GAL1, ST3GAL3, ST3GAL4, ST6GALNAC2, B3GNT2, B3GNT3, B3GNT4, B3GNT5, B3GNT7, B4GALT5, GALNT11, GALNT13, GALNT14, GALNT5, GALNT8, GALNT9, ST3GAL2, ST6GAL1, ST6GALNAC4, GALNT15, MYOD1, SIGLEC1, IKBKB, TNFRSF1A, IKBKG, MUC1
Marcadores de tumor	Alfafetoproteína (AFP), Antígeno carcinoembriônico (CEA), CA-125, MUC-1, Antígeno de tumor epitelial (ETA), Tirosinase, Antígeno associado a melanoma (MAGE), p53
Marcadores de tumor	Alfa fetoproteína (AFP), CA15-3, CA27-29, CA19-9, CA-125, Calretinina, Antígeno carcinoembriônico, CD34, CD99, CD117, Cromogranina, Citoqueratina (vários tipos), Desmina, Proteína da membrana epitelial (EMA), Fator VIII, CD31 FL1, Proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína de fluido de doença cística bruta (GCDFP-15), HMB-45, Gonadotropina coriônica humano (hCG), imunoglobulina, inibina, queratina (vários tipos), PTPRC (CD45), marcador de linfócito, (vários tipos), MART-1 (Melan-A), Myo D1, actina músculo-específica (MAS), neurofilamento, enolase neurônio-específica (NSE), fosfatase alcalina placental (PLAP), antígeno próstata-específico, proteína S100, actina de músculo liso (SMA), sinaptofisina, tiroglobulina, fator 1 de transcrição de tireoide, Tumor M2-PK, vimentina
Moléculas de adesão de célula (CAMs)	Superfamília de imunoglobulina CAMs (IgSF CAMs), N-CAM (proteína de mielina zero), ICAM (1, 5), VCAM-1, PE-CAM, L1-CAM, Nectina (PVRL1, PVRL2, PVRL3), Integrinas, LFA-1 (CD11a+CD18), Integrina alfaXbeta2 (CD11c+CD18), Antígeno de macrófago 1 (CD11b+CD18), VLA-1 (CD97d+CD29), Glicoproteína IIb/IIIa (ITGA2B+ITGB3), Caderinas, CDH1, CDH2, CDH3, Desmossomal, Desmogleína (DSG1, DSG2, DSG3, DSG4), Desmocolina (DSC1, DSC2, DSC3), Protocaderina, PCDH1, T-caderina, CDH4, CDH5, CDH6, CDH8, CDH11, CDH12, CDH15, CDH16, CDH17, CDH9, CDH10, Selectinas, E-selectina, L-selectina, P-selectina, receptor de homing de linfócito: CD44, L-selectina, integrina (VLA-4, LFA-1), Antígeno carcinoembriônico (CEA), CD22, CD24, CD146, CD164
Anexinas	ANXA1; ANXA10; ANXA11; ANXA13; ANXA2; ANXA3; ANXA4; ANXA5; ANXA6; ANXA7; ANXA8; ANXA8L1; ANXA8L2; ANXA9
Caderinas ("adesão dependente de cálcio")	CDH1, CDH2, CDH12, CDH3, Deomogleína, DSG1, DSG2, DSG3, DSG4, Desmocolina, DSC1, DSC2, DSC3, Protocaderinas,PCDH1, PCDH10, PCDH11x, PCDH11y, PCDH12, FAT, FAT2, FAT4, PCDH15, PCDH17, PCDH18, PCDH19; PCDH20; PCDH7, PCDH8, PCDH9, PCDHA1, PCDHA10, PCDHA11, PCDHA12, PCDHA13, PCDHA2, PCDHA3, PCDHA4, PCDHA5, PCDHA6, PCDHA7, PCDHA8, PCDHA9, PCDHAC1, PCDHAC2, PCDHB1, PCDHB10, PCDHB11, PCDHB12, PCDHB13, PCDHB14, PCDHB15, PCDHB16, PCDHB17, PCDHB18, PCDHB2, PCDHB3, PCDHB4, PCDHB5, PCDHB6, PCDHB7, PCDHB8, PCDHB9, PCDHGA1, PCDHGA10, PCDHGA11, PCDHGA12, PCDHGA2; PCDHGA3, PCDHGA4, PCDHGA5, PCDHGA6, PCDHGA7, PCDHGA8, PCDHGA9, PCDHGB1, PCDHGB2, PCDHGB3, PCDHGB4, PCDHGB5, PCDHGB6, PCDHGB7, PCDHGC3, PCDHGC4, PCDHGC5, CDH9 (caderina 9, tipo 2 (T1-caderina)), CDH10 (caderina 10, tipo 2 (T2-caderina)), CDH5 (VE-caderina (endotelial vascular)),

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	CDH6 (K-caderina (rim)), CDH7 (caderina 7, tipo 2), CDH8 (caderina 8, tipo 2), CDH11 (OB-caderina (osteoblasto)), CDH13 (T-caderina-H-caderina (coração)), CDH15 (M-caderina (miotúbulo)), CDH16 (KSP-caderina), CDH17 (LI caderina (fígado-intestino)), CDH18 (caderina 18, tipo 2), CDH19 (caderina 19, tipo 2), CDH20 (caderina 20, tipo 2), CDH23 (caderina 23, (eptélio neurossensorial), CDH10, CDH11, CDH13, CDH15, CDH16, CDH17, CDH18, CDH19, CDH20, CDH22, CDH23, CDH24, CDH26, CDH28, CDH4, CDH5, CDH6, CDH7, CDH8, CDH9, CELSR1, CELSR2, CELSR3, CLSTN1, CLSTN2, CLSTN3, DCHS1, DCHS2, LOC389118, PCLKC, RESDA1, RET
Reguladores descendentes de ECAD (CDH1)	SNAI1/SNAIL, ZFHX1B/SIP1, SNAI2/SLUG, TWIST1, DeltaEF1
Reguladores ascendentes de ECAD	AML1, p300, HNF3
Proteínas de interação de ECAD	ACADVL, ACTG1, ACTN1, ACTN4, ACTR3, ADAM10, ADAM9, AJAP1, ANAPC1, ANAPC11, ANAPC4, ANAPC7, ANK2, ANP32B, APC2, ARHGAP32, ARPC2, ARVCF, BOC, C1QBP, CA9, CASP3, CASP8, CAV1, CBLL1, CCNB1, CCND1, CCT6A, CDC16, CDC23, CDC26, CDC27, CDC42, CDH2, CDH3, CDK5R1, CDON, CDR2, CFTR, CREBBP, CSE1L, CSNK2A1, CTNNA1, CTNNB1, CTNND1, CTNND2, DNAJA1, DRG1, EGFR, EP300, ERBB2, ERBB2IP, ERG, EZR, FER, FGFR1, FOXM1, FRMD5, FYN, GBAS, GNA12, GNA13, GNB2L1, GSK3B, HDAC1, HDAC2, HSP90AA1, HSPA1A, HSPA1B, HSPD1, IGHA1, IQGAP1, IRS1, ITGAE, ITGB7, JUP, KIFC3, KLRG1, KRT1, KRT9, LIMA1, LMNA, MAD2L2, MAGI1, MAK, MDM2, MET, MYO6, MYO7A, NDRG1, NEDD9, NIPSNAP1, NKD2, PHLPP1, PIP5K1C, PKD1, PKP4, PLEKHA7, POLR2E, PPP1CA, PRKD1, PSEN1, PTPN1, PTPN14, PTPRF, PTPRM, PTPRQ, PTTG1, PVR, PVRL1, RAB8B, RRM2, SCRIB, SET, SIX1, SKI, SKP2, SRC, TACC3, TAS2R13, TGM2, TJP1, TK1, TNS3, TTK, UBC, USP9X, VCL, VEZT, XRCC5, YAP1, YES1, ZC3HC1
Transição de epite-lial-mesenquimal (EMT)	SERPINA3, ACTN1, AGR2, AKAP12, ALCAM, AP1M2, AXL, BSPRY, CCL2, CDH1, CDH2, CEP170, CLDN3, CLDN4, CNN3, CYP4X1, DNMT3A, DSG3, DSP, EFNB2, EHF, ELF3, ELF5, ERBB3, ETV5, FLRT3, FOSB, FOSL1, FOXC1, FX YD 5, GPDIL, HMGA1, HMGA2, HOPX, IFI16, IGFBP2, IHH, IKBIP, IL-11, IL-18, IL6, IL8, ITGA5, ITGB3, LAMB1, LCN2, MAP7, MB, MMP7, MMP9, MPZL2, MSLN, MTA3, MTSS1, OCLN, PCOLCE2, PECAM1, PLAUR, PLXNB1, PPL, PPP1R9A, RASSF8, SCNN1A, SERPINB2, SERPINE1, SFRP1, SH3YL1, SLC27A2, SMAD7, SNAI1, SNAI2, SPARC, SPDEF, SRPX, STAT5A, TBX2, TJP3, TMEM125, TMEM45B, TWIST1, VCAN, VIM, VWF, XBP1, YBX1, ZBTB10, ZEB1, ZEB2

[00271] Os exemplos de biomarcadores adicionais que podem ser incorporados nos métodos e composições da invenção incluem, sem limitação, aqueles revelados nos Pedidos de Patente Internacionais nº PCT/US2012/042519 (número de referência do advogado 37901-797.601), depositado em 14, de junho de 2012 e PCT/US2012/050030 (número de referência do advogado 37901-797.602), depositado em 8 de agosto de 2012.

[00272] Em várias modalidades da invenção, os biomarcadores ou bioassinatura usados para detectar ou avaliar qualquer uma das afecções ou doenças reveladas no presente documento podem compreender um ou mais biomarcadores em uma de diversas categorias diferentes de marcadores, em que as categorias incluem, sem limitação,

um ou mais dentre: 1) biomarcadores específicos de doença; 2) biomarcadores célula ou tecido-específicos; 3) marcadores vesícula-específicos (por exemplo, biomarcadores de vesícula gerais); 4. biomarcadores angiogênese-específicos; e 5) biomarcadores imunomoduladores. Os exemplos de tais marcadores são revelados no presente documento e conhecidos por uma pessoa que tem habilidade comum na técnica. Ademais, um biomarcador conhecido na técnica que é caracterizado por ter um papel em uma doença ou afecção particular pode ser adaptado para uso como um alvo em composições e métodos da invenção. Em modalidades adicionais, tais biomarcadores que estão associados às vesículas podem ser todos marcadores de superfície de vesícula ou uma combinação de marcadores de superfície de vesícula e marcadores de carga útil de vesícula (isto é, moléculas confinadas por uma vesícula). Os biomarcadores avaliados podem ser de uma combinação de fontes. Por exemplo, uma doença ou distúrbio pode ser detectado ou caracterizado por avaliar uma combinação de proteínas, ácidos nucleicos, vesículas, biomarcadores circulantes, biomarcadores de uma amostra de tecido e similares. Adicionalmente, conforme citado no presente documento, a amostra biológica avaliada pode ser qualquer fluido biológico ou pode compreender componentes individuais presentes dentro de tal fluido biológico (por exemplo, vesículas, ácidos nucleicos, proteínas ou complexos dos mesmos).

[00273] EpCAM é um antígeno de diferenciação pan-epitelial que é expresso em muitas células tumorais. O mesmo está intrinsicamente ligado à trajetória de Caderina-Catenina e, portanto, à trajetória de WNT fundamental responsável pela sinalização e polaridade intracelular. O mesmo tem sido usado como um alvo imunoterapêutico no tratamento de carcinomas gastrointestinais, urológicos e outros. (Chaudry MA, Sales K, Ruf P, Lindhofer H, Winslet MC (abril de 2007). *Br. J. Cancer* 96 (7): 1013-9.). É expresso em células tronco pluripotentes

não diferenciadas. EpCAM é um membro de uma família que inclui pelo menos duas proteínas de membrana do tipo I e funciona como uma molécula de adesão de célula independente de cálcio homotípica. Mutações nesse gene resultam em enteropatia com formação de tufos congênita. EpCAM foi observado na superfície de microvesículas derivadas de célula cancerosa de várias linhagens. EpCAM é usado como um antígeno de superfície exemplificativo em vários exemplos no presente documento. Um versado na técnica perceberá que várias modalidades e exemplos que usam EpCAM podem ser também aplicados a outros biomarcadores, incluindo outros antígenos de superfície de microvesícula.

AGENTES TERAPÊUTICOS

[00274] Conforme usado no presente documento, "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de uma composição que alivia (em alguma extensão, conforme julgado por um profissional médico versado) um ou mais sintomas da doença ou afecção em um mamífero. Adicionalmente, por "quantidade terapeuticamente eficaz" de uma composição quer-se dizer uma quantidade que retorna ao normal, de modo ou parcial ou completo, parâmetros fisiológicos ou bioquímicos associados a ou causadores de uma doença ou afecção. Um clínico versado na técnica pode determinar a quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição a fim de tratar ou prevenir uma afecção de doença ou distúrbio particular quando administrada, tal como por via intravenosa, via cutânea, via intraperitoneal, via oral ou através de inalação. A quantidade exata da composição exigida para ser terapeuticamente eficaz dependerá de inúmeros fatores, por exemplo, tais como atividade específica do agente ativo, o dispositivo de entrega empregado, características físicas do agente, propósito da administração, adicionalmente a muitas considerações específicas do paciente. Porém, uma determinação de uma quantidade terapeutica-

mente eficaz está dentro da habilidade de um clínico com habilidade comum mediante apreciação da revelação apresentada no presente documento.

[00275] Os termos "tratar", "tratamento", "terapia" e "tratamento terapêutico", conforme usados no presente documento referem-se a terapia curativa, terapia profilática ou terapia preventiva. Um exemplo de "terapia preventiva" é a prevenção ou redução da possibilidade de uma doença alvejada (por exemplo, câncer ou outra doença proliferativa) ou afecção relacionada à mesma. Aqueles que precisam de tratamento incluem aqueles já com a doença ou afecção assim como aqueles propensos a ter a doença ou afecção a se prevenida. Os termos "tratar", "tratamento", "terapia" e "tratamento terapêutico", conforme usados no presente documento, também descrevem o gerenciamento e cuidado de um mamífero para o propósito de combater uma doença, ou afecção relacionada, e inclui a administração de uma composição para aliviar os sintomas, efeitos colaterais ou outras complicações da doença ou afecção. O tratamento terapêutico para câncer inclui, porém, sem limitação, cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia genética e imunoterapia.

[00276] Conforme usado no presente documento, o termo "agente" ou "fármaco" ou "agente terapêutico" refere-se a um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica ou um extrato feito de materiais biológicos, tais como células ou tecidos de bactérias, plantas, fungos ou animais (particularmente mamíferos) que são suspeitos de ter propriedades terapêuticas. O agente ou fármaco pode ser purificado, substancialmente purificado ou parcialmente purificado. Um "agente" de acordo com a presente invenção, também inclui um agente de radioterapia ou um "agente quimioterápico".

[00277] Conforme usado no presente documento, o termo "agente

diagnóstico" refere-se a qualquer produto químico usado no imageamento de tecido doente, tal como, por exemplo, um tumor.

[00278] Conforme usado no presente documento, o termo "agente quimioterápico" refere-se a um agente com atividade contra câncer, doenças neoplásticas e/ou proliferativas ou que tem capacidade de matar células cancerosas diretamente.

[00279] Conforme usado no presente documento, "formulações farmacêuticas" incluem formulações para uso humano ou veterinário sem nenhum efeito toxicológico adverso significativo. "Formulação farmaceuticamente aceitável", conforme usado no presente documento, refere-se a uma composição ou formulação que permite a distribuição eficaz das moléculas de ácido nucleico da presente invenção no local físico mais adequado para sua atividade desejada.

[00280] Conforme usado no presente documento, o termo "carreador farmaceuticamente aceitável" pretende incluir qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de atraso de absorção, e similares, compatíveis com administração farmacêutica. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmaceuticamente ativas é bem conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional é incompatível com o composto ativo, o uso do mesmo nas composições é contemplado.

CONJUGADOS DE APTÂMERO-TOXINA COMO UM AGENTE TERAPÊUTICO PARA CÂNCER

[00281] Um trabalho anterior extensivo desenvolveu o conceito de conjugados de anticorpo-toxina ("imunoconjugados") como terapias potenciais para uma faixa de indicações, principalmente direcionadas ao tratamento de câncer com um foco primário em tumores hematológicos. Uma variedade de cargas úteis diferentes para entrega alvejada foi testada em estudos pré-clínicos e clínicos, incluindo toxinas protei-

cas, citotóxicos de molécula pequena com alto potencial, radioisótopos e fármacos encapsulados por lipossomo. Apesar de esses esforços terem produzido com sucesso três terapias aprovadas pela FDA para tumores hematológicos, os imunoconjugados como uma classe (especialmente para tumores sólidos) têm produzido historicamente resultados desapontantes que foram atribuídos a múltiplas propriedades diferentes dos anticorpos, incluindo tendências a desenvolver respostas de anticorpo neutralizante a anticorpos não humanizados, penetração limitada em tumores sólidos, perda de afinidade de ligação ao alvo como um resultado de conjugação de toxina e desequilíbrios entre meia vida do anticorpo e meia vida conjugada da toxina, que limitam o índice terapêutico geral (analisado por Reff e Heard, Critical Reviews in Oncology/Hematology, 40 (2001):25 a 35)

[00282] Os aptâmeros são funcionalmente similares aos anticorpos, exceto pelo fato de que suas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção ("ADME") são intrinsicamente diferentes e carecem em geral das funções de efetor imunológico em geral associadas aos anticorpos (por exemplo, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, citotoxicidade dependente de complemento). Comparando-se muitas das propriedades de aptâmeros e anticorpos previamente descritas, diversos fatores sugerem que a entrega de toxina por meio de aptâmeros oferece diversas vantagens concretas sobre a entrega com anticorpos, proporcionando aos mesmos, por fim, melhor potencial como agentes terapêuticos. Diversos exemplos das vantagens de entrega de toxina por meio de aptâmeros em relação a anticorpos são como seguem:

[00283] 1) Conjugados de aptâmero-toxina são sintetizados quimicamente por inteiro. A síntese química fornece mais controle sobre a natureza do conjugado. Por exemplo, a estequiometria (razão de toxinas por aptâmero) e o sítio de ligação podem ser previamente defini-

dos. Diferentes químicas de ligante podem ser facilmente testadas. A reversibilidade de enovelamento de aptâmero significa que a perda de atividade durante a conjugação é improvável e fornece mais flexibilidade no ajuste de condições de conjugação para maximizar os rendimentos.

[00284] 2) Tamanho menor permite melhor penetração no tumor. A penetração insuficiente de anticorpos em tumores sólidos é normalmente citada como um fator limitante da eficácia de abordagem de conjugado. Consulte Colcher, D., Goel, A., Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B., Batra, S. K. (1999) "Effects of genetic engineering on the pharmacokinetics of antibodies," Q. *J.* Nucl. Med., 43: 132 a 139. Os estudos que comparam as propriedades de aptâmeros antitenascina C não peguilados com anticorpos correspondentes demonstram absorção eficaz em tumores (conforme definido pela razão tumor:sangue) e a evidência que o aptâmero localizado ao tumor tem inesperadamente uma vida útil longa ($t_{1/2}$>12 horas) (Hicke, B. *J.,* Stephens, A. W., "Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy", *J.* Clin. Invest., 106:923 a 928 (2000)).

[00285] 3) PK ajustável. O metabolismo/meia vida do aptâmero pode ser facilmente ajustado para corresponder às propriedades de carga útil, otimizando a capacidade de entregar toxina ao tumor enquanto minimiza a exposição sistêmica. As modificações apropriadas à cadeia principal do aptâmero e a adição de PEGs com alto peso molecular tornam possível a correspondência entre a meia vida do aptâmero e a meia vida intrínseca da toxina/ligante conjugado, minimizando a exposição sistêmica a metabólitos portadores de toxina não funcionais (esperado se $t_{1/2}$(aptâmero)<<$t_{1/2}$(toxina)) e reduzindo a probabilidade de que aptâmeros não conjugados persistentes bloqueiem funcionalmente a absorção de aptâmero conjugado (esperado se $t_{1/2}$(aptâmero)>$t_{1/2}$(toxina)).

[00286] 4) Requisitos de material relativamente baixos. É provável que os níveis de dosagem sejam limitados por toxicidade intrínseca à carga útil citotóxica. Como tal, um único curso de tratamento provavelmente acarretará em quantidades relativamente pequenas (<100 mg) de aptâmero, reduzindo a probabilidade de que o custo da síntese de oligonucleotídeo seja uma barreira para terapias baseadas em aptâmero.

[00287] 5) Administração parenteral é preferencial para essa indicação. Não haverá necessidade especial de desenvolver formulações alternativas para induzir a aceitação do paciente/médico.

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE APTÂMERO

[00288] As sequências de ácidos nucleicos desdobram-se em motivos secundários e terciários particulares a suas sequências de nucleotídeos. Esses motivos posicionam cargas positivas e negativas nas sequências de ácidos nucleicos em locais que possibilitam que as sequências liguem-se a locais específicos nas moléculas alvo, por exemplo, proteínas e outras sequências de aminoácidos. Essas sequências de ligação são conhecidas no campo como aptâmeros. Devido as trilhões de possíveis sequências de nucleotídeos únicas mesmo em um estiramento relativamente curto de nucleotídeos (por exemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 nucleotídeos), uma grande variedade de motivos pode ser gerada, resultando em aptâmeros para quase qualquer proteína desejada ou outro alvo.

[00289] Os aptâmeros são criados por geração aleatória de oligonucleotídeos de um comprimento específico, tipicamente 20 a 80 pares de bases de comprimento, por exemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 ou 80 pares de

bases. Esses oligonucleotídeos aleatórios são então incubados com a proteína alvo de interesse. Após diversas etapas de lavagem, os oligonucleotídeos que se ligam ao alvo são coletados e amplificados. Os aptâmeros amplificados são então adicionados ao alvo e o processo é repetido, normalmente 15 a 20 vezes. Uma versão comum desse processo é conhecida por aqueles versados na técnica como o método SELEX.

[00290] O resultado final compreende um ou mais aptâmeros com alta afinidade ao alvo. A invenção fornece ainda o processamento de tais aptâmeros resultantes que podem ser usados para fornecer características desejáveis. 1) ensaios de ligação competitiva para identificar aptâmeros para um epítopo desejado; 2) análise de motivo para identificar aptâmeros de ligação com alta afinidade *in silico;* e 3) ensaios de seleção de aptâmero baseados em microvesícula para identificar aptâmeros que podem ser usados para detectar uma doença particular. A invenção também fornece o uso dos aptâmeros para detectar um alvo de interesse, por exemplo, para detectar uma entidade biológica tal como uma proteína, ácido nucleico ou microvesícula. Os aptâmeros da invenção podem ligar-se a grupos funcionais de interesse, por exemplo, grupos carboxila, para uso como agentes de bloqueio, controles negativos e similares. Os métodos são descritos em mais detalhes abaixo e adicionalmente nos Exemplos.

[00291] A invenção abrange ainda sequências de aptâmeros que são altamente homólogas às sequências que são reveladas pelos métodos da invenção. "Alta homologia" tipicamente refere-se a uma homologia de 40% ou mais alta, de preferência 60% ou mais alta, de maior preferência 80% ou mais alta, de preferência ainda maior 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais alta entre uma sequência de polinucleotídeos e uma sequência de referência. Em uma modalidade, a sequência de referência compreende a

sequência de um ou mais aptâmeros fornecidos no presente documento. As homologias percentuais (também referidas como identidade percentual) são tipicamente executadas entre duas sequências idealmente alinhadas. Os métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na técnica. O alinhamento ideal de sequências e a comparação podem ser conduzidos, por exemplo, com o uso do algoritmo em "Wilbur and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 80: 726 a 30 (1983)". Os cálculos de homologia podem ser também realizados com o uso de BLAST, que pode ser encontrado no servidor NCBI em: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (Altschul S F, et al, Nucleic Acids Res. 1997; 25(17):3.389 a 3.402; Altschul S F, et al, J Mol. Biol. 1990; 215(3):403 a 410). No caso de um polinucleotídeo isolado que é mais longo ou equivalente em comprimento à sequência de referência, por exemplo, uma sequência identificada pelos métodos no presente documento, a comparação é feita com o comprimento completo da sequência de referência. Nos casos em que o polinucleotídeo isolado é mais curto que a sequência de referência, por exemplo, mais curto que uma sequência identificada pelos métodos no presente documento, a comparação é feita a um segmento da sequência de referência do mesmo comprimento (excluindo qualquer laço exigido pelo cálculo de homologia).

[00292] A invenção abrange ainda sequências de aptâmeros que são fragmentos funcionais das sequências que são reveladas pelos métodos da invenção. No contexto de uma sequência de aptâmeros, um "fragmento funcional" da sequência de aptâmeros pode compreender uma subsequência que se liga ao mesmo alvo que a sequência de comprimento completo. Em alguns casos, uma sequência de aptâmeros candidata é de um membro de uma biblioteca que contém sequências líder 5' e/ou uma sequência de cauda 3'. Tais sequências líder ou sequências de cauda podem servir para facilitar a ligação de iniciador

para amplificação ou captura, etc. Nessas modalidades, o fragmento funcional da sequência de comprimento completo pode compreender a subsequência da sequência de aptâmero candidata sem as sequências líder e/ou de cauda.

ADIÇÃO DE ANTICORPO COMPETITIVO

[00293] Os métodos de produção de aptâmero conhecidos podem envolver eluir todos os aptâmeros ligados da sequência alvo. Em alguns casos, isso não é suficiente para identificar a sequência de aptâmeros desejada. Por exemplo, ao tentar substituir um anticorpo em um ensaio, pode ser desejável apenas coletar aptâmeros que se ligam ao epítopo específico do anticorpo a ser substituído. A invenção fornece um método que compreende a adição de um anticorpo que deve ser substituído à reação de aptâmero/alvo a fim de permitir a coleta seletiva de aptâmeros que se ligam ao epítopo de anticorpo. Em uma modalidade, o método compreende incubar uma mistura de reação que compreende oligonucleotídeos gerados aleatoriamente com um alvo de interesse, remover aptâmeros não ligados da mistura de reação que não se ligam ao alvo, adicionar um anticorpo à mistura de reação que se ligam àquele epítopo de interesse e coletar os aptâmeros que são deslocados pelo anticorpo. O alvo pode ser uma proteína.

[00294] As Figuras 2A e 2B ilustram uma estratégia de seleção de ensaio competitivo. Um conjunto aleatório de candidatos de aptâmero de ácido nucleico (a biblioteca) é incubado com um alvo de interesse 202. Múltiplos ciclos de ligação podem ser realizados em que: 1) a biblioteca é incubada com o alvo; 2) a mistura de biblioteca e alvo é lavada para remover candidatos de aptâmero não ligados; 3) os candidatos de aptâmero ligados são eluídos do alvo; e 4) os candidatos de aptâmero eluídos são novamente adicionados ao alvo e deixados ligar-se. A Figura 2A ilustra um candidato de aptâmero 201 ligado ao alvo 202. Na etapa i), um anticorpo de competição 203 é então adicionado

à reação. A Figura 2B ilustra um anticorpo candidato 203 que compete com o candidato de aptâmero 201 no epítopo do anticorpo. O candidato de aptâmero 201 é deslocado pelo anticorpo e então coletado.

LIGAÇÃO COMPETITIVA

[00295] Conforme descrito no presente documento, os aptâmeros podem ser identificados contra um alvo de interesse. Um esquema de ligação competitiva 30 pode ser usado para identificar aptâmeros contra um alvo de interesse, conforme retratado na Figura 3. Um analito de interesse, por exemplo, uma entidade biológica tal como uma proteína ou microvesícula, é capturado para um substrato 31. O substrato pode ser, por exemplo, substrato plano ou esfera. O analito pode ser capturado de modo covalente ou não covalente, por exemplo, o analito pode ser capturado com o uso de um anticorpo, aptâmero, ou ligação de estreptavidina-biotina. O analito capturado é colocado em contato com um conjunto de candidatos de aptâmero de oligonucleotídeo 32. Em uma modalidade, o conjunto compreende oligonucleotídeos gerado aleatoriamente, por exemplo, pelo menos 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{23}, 10^{15}, 10^{16}, 10^{17}, 10^{18}, 10^{19} ou pelo menos 10^{20} oligonucleotídeos. Os oligonucleotídeos ligam-se a vários componentes na mistura, incluindo o analito, o substrato, o agente de captura (por exemplo, anticorpo (Ab), aptâmero, etc), tubo ou poço de reação, resíduos biológicos, etc. **33**. Os oligonucleotídeos que se ligam ao analito compreendem candidatos de aptâmero para o alvo de interesse **34.** Os oligonucleotídeos não ligados são removidos por meio de lavagem **35.** Após essa etapa, a mistura de reação compreende analito de captura ligado por candidatos de aptâmero. Um ligante que reconhece um epítopo específico, por exemplo, um anticorpo, é colocado em contato com a mistura de reação **37.** O ligante dissocia candidatos de aptâmero ligados ao mesmo epítopo que o ligante por meio de competição para o epítopo **38.** Os candidatos de aptâme-

ro dissociados são coletados e amplificados **39.** As etapas **32** a **39** são repetidas um número definido de vezes, n, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 vezes, para enriquecer adicionalmente os candidatos de aptâmero com aqueles que se ligam ao mesmo epítopo que o ligante. Após os ciclos repetidos, os aptâmeros remanescentes são avaliados por sequenciamento e outras caracterizações **310**, conforme descrito no presente documento.

[00296] Avaliação de controle é realizada em paralelo com o método acima. Qualquer aptâmero identificado por meio da avaliação de controle é descartado. Os analitos de controle incluem, sem limitação, substrato descoberto incubado com o analito, substrato sem analito e o método realizado com um ligante de controle, tal como um anticorpo que não se liga a um alvo de interesse.

[00297] O ligante pode ser um anticorpo para um biomarcador de interesse. O método pode ser usado para identificar um aptâmero para substituir um anticorpo em um ensaio biológico. Por exemplo, o aptâmero pode se reproduzido de modo mais reproduzível e eficaz que um anticorpo equivalente. O biomarcador pode ser qualquer biomarcador útil, incluindo, sem limitação, um biomarcador na **Tabela 3** ou **4.** Em uma modalidade, o biomarcador é um antígeno de superfície de microvesícula selecionado a partir da **Tabela 3** ou **4.**

[00298] Em uma modalidade, a invenção fornece um método para selecionar um grupo de aptâmeros que compreende: (a) colocar um conjunto de candidatos de aptâmero em contato com uma amostra que compreende uma molécula alvo; (b) remover os candidatos de aptâmero não ligados; (c) colocar a amostra em contato com um ligante para a molécula alvo; e (d) isolar os candidatos de aptâmero que são desassociados da molécula alvo através da competição com o ligante selecionando, desse modo, o grupo de aptâmeros que se ligam ao mesmo alvo que o ligante. A molécula alvo pode ser uma proteína. A

proteína pode ser um antígeno de superfície de microvesícula. O antígeno de superfície pode ser isolado de uma microvesícula ou permanecer incorporado dentro de uma membrana de microvesícula. A molécula alvo pode ser ancorada direta ou indiretamente a um substrato. Por exemplo, a molécula alvo pode ser uma proteína que está ligada por um anticorpo ou aptâmero na superfície do substrato. Em outro exemplo, a molécula alvo é um antígeno de superfície de uma microvesícula e a microvesícula é ancorada ao substrato.

[00299] O ligante usado para deslocar os candidatos de aptâmero pode compreender uma molécula ou proteína pequena. Em algumas modalidades, o ligante compreende um anticorpo. Portanto, o método pode ser usado para identificar aptâmeros que ligam o mesmo epítopo como um anticorpo.

[00300] Conforme descrito no presente documento, as etapas (a) a (d) podem ser repetidas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 vezes, em que os candidatos de aptâmeros isolados na etapa (d) são usados como o conjunto de candidatos de aptâmeros inseridos na etapa (a) em cada iteração. O processo iterativo é usado para enriquecer ainda mais o conjunto de candidatos de aptâmero com aqueles que ligam o mesmo alvo que o ligante.

[00301] Os membros do grupo selecionado de aptâmeros podem ser identificados por caracterização adicional. Em algumas modalidades, a identificação é realizada por sequenciamento de alto rendimento (HTS). O HTS pode ser sequenciamento de nova geração.

ANÁLISE DE MOTIVO

[00302] Na maioria dos experimentos de aptâmero, múltiplas sequências de aptâmeros são identificadas que se ligam ao alvo. Esses aptâmeros terão várias afinidades de ligação. Pode consumir tempo e ser trabalhoso gerar quantidades desses muitos aptâmeros suficientes para avaliar as afinidades de cada um. Para identificar grandes núme-

ros de aptâmeros com as afinidades mais altas sem avaliar fisicamente subconjuntos grandes, a invenção fornece um método que compreende a análise da estrutura bidimensional de um ou mais aptâmeros de alta afinidade ao alvo de interesse. Em uma modalidade, o método compreende analisar o banco de dados por aptâmeros que têm estruturas bidimensionais similares, ou motivos, mas não necessariamente sequências primárias similares. Em uma modalidade, o método compreende identificar um aptâmero de alta afinidade com o uso de métodos tradicionais, tal como revelado no presente documento ou conhecido na técnica (por exemplo, ensaio de ligação de ressonância de plásmon de superfície, consulte, por exemplo, a **Figura 4),** aproximar a estrutura bidimensional do aptâmero de alta afinidade e identificar aptâmeros de um conjunto de sequências que se prevê que têm uma estrutura bidimensional similar ao aptâmero de alta afinidade. O método fornece assim um conjunto de candidatos que também se ligam ao alvo de interesse. A estrutura bidimensional de um oligo pode ser prevista com o uso de métodos conhecidos na técnica, por exemplo, por meio de cálculos de energia livre (AG) realizados com o uso de um programa de software comercialmente disponível, tal como Vienna ou mFold, por exemplo, conforme descrito em Mathews, D., Sabina, *J.,* Zucker, M. & Turner, H. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters provides robust prediction of RNA secondary structure. *J .* Mol. Biol. 288, 911 a 940 (1999); Hofacker et al., Monatshefte f. Chemie 125: 167 a 188 (1994); e Hofacker, I. L. Vienna RNA secondary structure server. Nucleic Acid Res. 31, 3.429 a 3.431 (2003), cujos conteúdos são incorporados ao presente a título de referência em sua totalidade. Consulte as **Figuras 5A** e **5B.** O conjunto de sequências pode ser sequenciado a partir de um conjunto de candidatos de aptâmero aleatoriamente gerados com o uso de uma plataforma de sequenciamento de alto rendimento, tal como a plataforma Ion Tor-

rent da Life Technologies. Identificar aptâmeros a partir de um conjunto de sequências que se prevê que tenham uma estrutura bidimensional similar ao aptâmero de alta afinidade pode compreender carregar as sequências resultantes no programa de software de escolha para identificar membros do conjunto de sequências com estruturas bidimensionais similares àquela do aptâmero de alta afinidade. As afinidades do conjunto de sequências podem ser então determinadas *in situ*, por exemplo, por ensaio de ligação de ressonância de plásmon ou similares.

MÉTODOS DE SUBTRAÇÃO DE APTÂMERO

[00303] A fim de desenvolver um ensaio para detectar uma doença, por exemplo, câncer, avalia-se tipicamente uma grande população de biomarcadores conhecidos de pacientes normais e doentes a fim de identificar marcadores que se correlacionam com a doença. Esse processo apenas funciona se os marcadores de discriminação já estivem descritos. A fim de tratar esse problema, a invenção fornece um método que compreende subtrair aptâmeros não discriminantes de um conjunto grande de aptâmeros por incubação dos mesmos inicialmente com microvesículas ou células não alvo. As células não alvo podem ser células ou microvesículas normais vertidas a partir das mesmas. Os aptâmeros que não se ligam às microvesículas ou células normais são então incubados com microvesículas ou células doentes. Os aptâmeros que se ligam às microvesículas ou células doentes, mas que não se ligam às células normais são então candidatos possíveis para um ensaio para detectar a doença. Esse processo é independente de conhecer a existência de um marcador particular na amostra doente.

[00304] Os métodos de subtração podem ser usados para identificar aptâmeros que reconhecem de preferência uma população desejada de alvos. Em uma modalidade, o método de subtração é usado para identificar aptâmeros que reconhecem de preferência o alvo de

uma população alvo desejada em relação a uma população de controle (por exemplo, normal ou não doente). A população alvo doente pode ser uma população de vesículas de um indivíduo ou indivíduos doentes, enquanto a população de controle compreende vesículas de um indivíduo ou indivíduos não doentes. A doença pode ser um câncer ou outra doença revelada no presente documento ou conhecida na técnica. Dessa forma, o método fornece aptâmeros que identificam de preferência alvos doentes versus alvos de controle.

[00305] As microvesículas circulantes são isoladas do plasma de controle, por exemplo, plasma de indivíduos "normais" que não têm uma doença de interesse, tal como uma ausência de câncer. As vesículas no plasma são isoladas com o uso de um método revelado no presente documento ou conforme conhecido na técnica. Por exemplo, as vesículas podem ser isoladas do plasma por um dos seguintes métodos: filtração, reagente ExoQuick, ultracentrifugação, uso de um reagente de agrupamento molecular (por exemplo, TEXIS da Life Technologies), isolamento por afinidade, seleção por afinidade ou uma combinação de qualquer um desses métodos. As microvesículas isoladas em cada caso serão uma mistura de tipos de vesícula e terão vários tamanhos com a exceção dos métodos de ultracentrifugação, que têm uma tendência de produzir vesículas em tamanho de exossomo. As bibliotecas de oligonucleotídeos geradas aleatoriamente (por exemplo, produzidas conforme descrito no Exemplo 1 abaixo) são incubadas com as vesículas normais isoladas. Os aptâmeros que não se ligam a essas vesículas são isolados, por exemplo, por rotação das vesículas e coleta do sobrenadante contendo os aptâmeros de não ligação. Esses aptâmeros de não ligação são então colocados em contato com as vesículas isoladas de pacientes doentes (por exemplo, com o uso dos mesmos métodos conforme descritos acima) para permitir que os aptâmeros reconheçam as vesículas doentes. Em seguida, os aptâmeros

que estão ligados às vesículas doentes são coletados. Em uma modalidade, as vesículas são isoladas então lisadas com o uso de um agente caotrópico (por exemplo, SDS ou um detergente similar) e os aptâmeros são então capturados por execução da mistura de lise sobre uma coluna de afinidade. A coluna de afinidade pode compreender esferas de estreptavidina no caso de conjuntos de aptâmeros conjugados por biotina. Os aptâmeros isolados são então amplificados. O processo pode ser então repetido, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 ou mais vezes.

[00306] Em um aspecto da invenção, é identificado um perfil de aptâmero que pode ser usado para caracterizar uma amostra biológica de interesse. Em uma modalidade, um conjunto de oligonucleotídeos gerados aleatoriamente, por exemplo, pelo menos 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^2, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10", 10^{13}, 10^{14}, 10^{15}, 10^{16}, 10^{12}, 10^{18}, 10^{19} ou pelo menos 10^{20} oligonucleotídeos, é colocado em contato com um componente biológico ou alvo de interesse de uma população de controle. Os oligonucleotídeos que não se ligam ao componente biológico ou alvo de interesse da população de controle são isolados e então colocados em contato com um componente biológico ou alvo de interesse de uma população de teste. Os oligonucleotídeos que se ligam ao componente biológico ou alvo de interesse da população de teste são retidos. Os oligonucleotídeos retidos podem ser usados para repetir o processo por contato dos oligonucleotídeos retidos com o componente biológico ou alvo de interesse da população de controle, isolar os oligonucleotídeos retidos que não se ligam ao componente biológico ou alvo de interesse da população de controle e, novamente, colocar esses oligonucleotídeos isolados em contato com o componente biológico ou alvo de interesse da população de teste e isolar os oligonucleotídeos de ligação. O "componente" ou "alvo" pode ser algo que esteja presente em amostra ao qual os oligonucleotídeos têm ca-

pacidade de se ligar (por exemplo, polipeptídeos, peptídeo, moléculas de ácido nucleico, carboidratos, lipídeos, etc.). O processo é então repetido, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais vezes. Os oligonucleotídeos resultantes compreendem aptâmeros que podem detectar de modo diferencial a população de teste versus o controle. Os aptâmeros fornecem um perfil de aptâmero, que compreende uma bioassinatura que é determinada com o uso de um ou mais aptâmero, por exemplo, um bioassinatura que compreende uma presença ou nível do componente ou alvo que é detectado com o uso do um ou mais aptâmeros.

[00307] Um processo exemplificativo é ilustrado na **Figura 6,** que demonstra o método para identificar o aptâmero que reconhece de preferência vesículas de câncer com o uso de vesículas de indivíduos normais (sem câncer) como um controle. Na figura, os exossomos são exemplificados, porém, um versado perceberá que outras microvesículas podem ser usadas da mesma maneira. Os aptâmeros resultantes podem fornecer um perfil que pode detectar de modo diferencial as vesículas de câncer das vesículas normais. Um versado perceberá que as mesmas etapas podem ser usadas para derivar um perfil de aptâmero para caracterizar qualquer doença ou afecção de interesse.

[00308] Em uma modalidade, a invenção fornece um polinucleotídeo isolado identificado pelos métodos acima. A invenção fornece, ainda, um polinucleotídeo isolado que tem uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 60% idêntica à sequência de nucleotídeos identificada pelos métodos acima. De maior preferência, a molécula de ácido nucleico isolada é pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais, idêntica à sequência de nucleotídeos identificada pelos métodos acima. No caso de um polinucleotídeo isolado que é mais longo ou equivalente em comprimento à sequência de referência, por exemplo, uma sequência

identificada pelos métodos acima, a comparação é feita com o comprimento completo da sequência de referência. Nos casos em que o polinucleotídeo isolado é mais curto que a sequência de referência, por exemplo, mais curto que uma sequência identificada pelos métodos acima, a comparação é feita a um segmento da sequência de referência do mesmo comprimento (excluindo qualquer laço exigido pelo cálculo de homologia).

[00309] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para caracterizar um fenótipo biológico com o uso de um perfil de aptâmero. O perfil de aptâmero pode ser determinado com o uso do método acima. O perfil de aptâmero pode ser determinado para uma amostra de teste e comparado a um perfil de aptâmero de controle. O fenótipo pode ser uma doença ou um distúrbio, tal como um câncer. Caracterizar o fenótipo pode incluir, sem limitação, fornecer um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico. Portanto, o perfil de aptâmero pode fornecer uma leitura diagnóstica, prognóstica e/ou teragnóstica para o indivíduo de quem a amostra de teste é obtida.

[00310] Em outra modalidade, um perfil de aptâmero é determinado para uma amostra de teste por contato de um conjunto de moléculas de aptâmero com a amostra de teste, contato do mesmo conjunto de aptâmeros com uma amostra de controle e identificação de uma ou mais moléculas de aptâmero que se ligam de modo diferencial a um componente ou alvo na amostra de teste mas não na amostra de controle (ou vice versa). O "componente" ou "alvo", conforme usado no contexto da amostra de teste biológico ou amostra de controle, pode ser algo que esteja presente em amostra ao qual os oligonucleotídeos têm capacidade de se ligar (por exemplo, polipeptídeos, peptídeo, moléculas de ácido nucleico, carboidratos, lipídeos, etc.). Por exemplo, se uma amostra é uma amostra de plasma ou soro, as moléculas de aptâmero podem ligar um biomarcador de polipeptídeo que é apenas ex-

presso ou expresso de modo diferencial (super ou subexpresso) em um estado de doença em comparação a um indivíduo não doente. A comparação do perfil de aptâmero na amostra de teste em comparação à amostra de controle pode ser baseada na medida qualitativa e quantitativa de ligação de aptâmero (por exemplo, ligação versus não ligação, ou nível de ligação na amostra de teste versus nível diferente de ligação na amostra de controle de referência).

[00311] Em um aspecto, a invenção fornece um método para identificar um perfil de aptâmero alvo-específico, que compreende colocar uma amostra de teste biológico em contato com um conjunto de moléculas de aptâmero, colocar o conjunto em contato com uma amostra biológica de controle, identificar um ou mais aptâmeros que se ligam a um componente na dita amostra de teste, mas não à amostra de controle, identificando, assim, um perfil de aptâmero para a dita amostra de teste biológico. Em uma modalidade, um conjunto de aptâmeros é selecionado contra uma amostra de doença e comparado a uma amostra de referência, os aptâmeros em um subconjunto que se ligam a um componente(s) na amostra de doença, mas não na amostra de referência, podem ser sequenciados com o uso de técnicas de sequenciamento convencionais para identificar o subconjunto que se liga, identificando, assim, um perfil de aptâmero para a amostra de doença particular. Dessa forma, o perfil de aptâmero fornece uma plataforma individualizada para detectar doença em outras amostras que são analisadas. Além disso, selecionando-se uma amostra de referência ou controle apropriada, o perfil de aptâmero pode fornecer uma leitura diagnóstica, prognóstica e/ou teragnóstica para o indivíduo de quem a amostra de teste é obtida.

[00312] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para selecionar um conjunto de aptâmeros que compreende: (a) colocar uma amostra de controle biológico em contato com um conjunto de

oligonucleotídeos; (b) isolar um primeiro subconjunto do conjunto de oligonucleotídeos que não se ligam à amostra de controle biológico; (c) colocar a amostra de teste biológico em contato com o primeiro subconjunto do conjunto de oligonucleotídeos; e (d) isolar um segundo subconjunto do conjunto de oligonucleotídeos que se ligam à amostra de teste biológico selecionado, desse modo, o conjunto de aptâmeros. O conjunto de oligonucleotídeos pode compreender qualquer número de sequências desejadas, por exemplo, pelo menos 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^2, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15}, 10^{16}, 10^{12}, 10^{18}, 10^{19} ou pelo menos 10^{20} oligonucleotídeos podem estar presentes no conjunto de partida. As etapas (a) a (d) podem ser repetidas apurar adicionalmente o conjunto de aptâmeros. Em uma modalidade, essas etapas são repetidas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou pelo menos 20 vezes.

[00313] Conforme descrito no presente documento, a amostra de teste biológico e a amostra de controle biológico podem compreender microvesículas. Em uma modalidade, a amostra de teste biológico e opcionalmente amostra de controle biológico compreendem um fluido corporal. O fluido corporal pode compreender, sem limitação, sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de Cowper, fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural, fluido peritoneal, fluido de malignidade, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreção vaginal, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares ou outros fluidos de lavagem. A amostra de teste biológico e opcionalmente controle biológico pode também compreender uma

amostra de tumor, por exemplo, células de um tumor ou tecido tumoral. Em outras modalidades, a amostra de teste biológico e opcionalmente amostra de controle biológico compreendem um meio de cultura de células. Nas modalidades, a amostra de teste biológico compreende uma amostra doente e a amostra de controle biológico compreende uma amostra não doente. Dessa forma, o conjunto de aptâmeros pode ser usado para fornecer uma leitura diagnóstica, prognóstica e/ou teragnóstica de uma doença.

[00314] Conforme observado, a invenção pode ser usada para avaliar microvesículas. As microvesículas são biomarcadores potentes devido ao fato de que as vesículas fornecem uma entidade biológica que compreende múltiplos fragmentos de informações. Por exemplo, conforme descrito, uma vesícula pode ter múltiplos agentes de superfície, cada um dos quais fornece informações complementares. Considera-se um marcador de câncer e um marcador específico de tecido. Se ambos os marcadores estiverem individualmente presentes em uma amostra, por exemplo, ambos forem proteínas ou ácidos nucleicos circulantes, pode não ser determinável se o marcador de câncer e o marcador tecido-específico são derivados do mesmo local anatômico. No entanto, se tanto o marcador de câncer como o marcador tecido-específico forem antígenos de superfície em uma única microvesícula, a própria vesícula liga os dois marcadores e fornece uma indicação de uma doença (por meio do marcador de câncer) e origem da doença (por meio do marcador específico de tecido). Além disso, a vesícula pode ter qualquer número de antígenos de superfície e também carga útil que possa ser avaliada. Dessa forma, a invenção fornece um método para identificar agentes de ligação que compreende colocar uma pluralidade de microvesículas extracelulares em contato com uma biblioteca gerada aleatoriamente de agentes de ligação, identificar um subconjunto da biblioteca de agentes de ligação que tem uma afinida-

de a um ou mais componentes das microvesículas extracelulares. Os agentes de ligação podem compreender aptâmeros, anticorpos e/ou qualquer outro tipo útil de agente de ligação revelado no presente documento ou conhecido na técnica.

[00315] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para identificar uma pluralidade de ligantes alvo que compreende (a) colocar uma população de microvesículas de referência em contato com uma pluralidade de ligantes que têm capacidade para se ligar a um ou mais marcadores de superfície de microvesícula; (b) isolar uma pluralidade de ligantes de referência, em que a pluralidade de ligantes de referência compreende um subconjunto da pluralidade de ligantes que não têm uma afinidade com a população de microvesículas de referência; (c) colocar uma ou mais microvesículas de teste em contato com a pluralidade de ligantes de referência; e (d) identificar um subconjunto de ligantes a partir da pluralidade de ligantes de referência que formam complexos com um marcador de superfície na uma ou mais microvesículas de teste identificando, desse modo, a pluralidade de ligantes alvo. O termo "ligante" pode referir-se a uma molécula, ou um grupo molecular, que se liga a outra entidade química para formar um complexo maior. Dessa forma, um agente de ligação compreende um ligante. A pluralidade de ligantes pode compreender aptâmeros, anticorpos e/ou qualquer outro tipo útil de agentes de ligação descritos no presente documento ou conhecidos na técnica.

[00316] A invenção fornece, ainda, kits que compreendem um ou mais reagentes para executar os métodos acima. Em uma modalidade, o um ou mais reagentes compreendem uma biblioteca de agentes de ligação potenciais que compreendem um ou mais dentre um aptâmero, anticorpo e outros agentes de ligação úteis descritos no presente documento ou conhecidos na técnica.

COMPLEXOS DE AMOSTRA DE SUBSTRATO

[00317] A invenção contempla múltiplas variações do método para identificar um agente de ligação que é específico para ou se liga a uma molécula alvo presente em uma amostra. O agente de ligação no contexto de qualquer uma das modalidades no presente documento pode ser qualquer molecular que tem a capacidade de ligação a uma molécula alvo desejada. Os exemplos de tais agentes de ligação são revelados no presente documento abaixo. Qualquer uma das modalidades no presente documento pode incluir um método para identificar vários tipos de agentes de ligação que têm a capacidade de se ligar a um ou mais componentes presentes em uma amostra biológica testada. Em modalidades adicionais, o alvo específico ao qual um agente de ligação se liga ou associada é caracterizado conforme descrito acima.

[00318] Em um aspecto, a invenção fornece um método que compreende: (a) contatar um substrato com uma amostra biológica para permitir a formação de um complexo de substrato-amostra biológica; (b) contatar o complexo com uma pluralidade de agentes de ligação candidatos; e (c) identificar um ou mais agentes de ligação que se ligam ou se associam ao complexo, selecionando assim um ou mais agentes de ligação.

[00319] Em qualquer uma das modalidades no presente documento, o agente de ligação pode ser qualquer agente de ligação apropriado, incluindo aqueles descritos no presente documento tal como um ácido nucleico, molécula de DNA, molécula de RNA, anticorpo, fragmento de anticorpo, aptâmero, peptoide, zDNA, ácido nucleico de peptídeo (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), lectina, peptídeo, dendrímero, agente de identificação de proteína de membrana, composto químico ou uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade, o agente de ligação compreende um anticorpo, conjugado de anticorpo, fragmento de anticorpo e/ou aptâmero. Em algumas modalidades, o agente de ligação compreende um polipeptídeo, peptídeo ou uma mo-

lécula de ácido nucleico. Por exemplo, o agente de ligação pode ser um aptâmero. O polipeptídeo pode ser um anticorpo ou fragmento funcional do mesmo.

[00320] A amostra biológica pode compreender uma amostra de tecido ou amostra de cultura de células, um fluido corporal ou qualquer componente de um indivíduo animal ou humano que pode ser isolado para avaliação. Em qualquer uma das modalidades no presente documento, o fluido corporal compreende sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de Cowper ou fluido de pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural e peritoneal, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreções vaginais, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares, fluido de cavidade blastocística, sangue do cordão umbilical ou um derivado de qualquer um dos mesmos. A amostra biológica dessas ou de outras origens pode compreender uma população de microvesícula heterogênea ou uma população de microvesícula homogênea.

[00321] Em algumas modalidades, a amostra biológica compreende uma amostra de plasma concentrada, uma amostra de soro, uma amostra de soro clarificado ou uma amostra de plasma clarificado. A amostra biológica dessas ou de outras origens pode compreender uma população de microvesícula heterogênea ou uma população de microvesícula homogênea. Conforme usado no contexto de microvesículas, o termo "heterogêneo" significa a população de microvesícula pode compreender microvesículas que são de origens celulares ou de tecido diferentes, são produzidas através de mecanismos celulares ou bioló-

gicos diferentes e/ou compreendem microvesículas de diferentes tamanhos conforme discutido no presente documento. Conforme usado no contexto de microvesículas, o termo "homogêneo" significa, sem limitação, que a população de microvesícula compreende microvesículas que são de origens celulares ou de tecido iguais, são produzidas através de mecanismos celulares ou biológicos iguais e/ou compreendem microvesículas da mesma faixa de tamanho conforme discutido no presente documento. Em um exemplo não limitante, uma população de microvesícula homogênea pode ser obtida a partir de uma população de microvesícula heterogênea submetendo-se a população de microvesícula heterogênea à metodologia de exclusão de tamanho ou isolamento de afinidade.

[00322] Conforme usado no presente documento, uma amostra de soro "clarificado" ou plasma "clarificado" tem níveis reduzidos de uma ou mais proteínas abundantes em comparação a uma amostra não clarificada. Em tais casos, as uma ou mais proteínas abundantes compreendem uma proteína do sangue. Por exemplo, as uma ou mais proteínas abundantes podem compreender um ou mais dentre albumina, IgG, transferrina, fibrinogênio, fibrina, IgA, α2-Marcroglobulina, IgM, α1-Antitripsina, complemento C3, haptoglobulina, apolipoproteína A1, A3 e B; Glicoproteína α1-Ácida, ceruloplasmina, complemento C4, C1q, IgD, prealbumina (transtiretina), plasminogênio, um derivado de qualquer um dos mesmos e uma combinação dos mesmos. As uma ou mais proteínas abundantes podem compreender um ou mais dentre Albumina, Imunoglobulinas, Fibrinogênio, Prealbumina, Alfa 1 antitripsina, Alfa 1 glicoproteína ácida, Alfa 1 fetoproteína, Haptoglobina, Alfa 2 macroglobulina, Ceruloplasmina, Transferrina, proteínas de complemento C3 e C4, Beta 2 microglobulina, Beta lipoproteína, Gama proteínas globulina, proteína C-reativa (CRP), Lipoproteínas (quilomícrons, VLDL, LDL, HDL), outras globulinas (tipos alfa, beta e gama), Pro-

trombina, Lectina de ligação à manose (MBL), um derivado de qualquer um dos mesmos e uma combinação dos mesmos.

[00323] As uma ou mais proteínas abundantes podem ser depletadas com o uso de métodos conhecidos na técnica ou revelados no presente documento. Por exemplo, as proteínas abundantes podem ser separadas no total ou em parte por métodos de cromatografia (exclusão de tamanho, troca iônica, imunoafinidade, etc.), imunoafinidade, precipitação ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a depleção seletiva das uma ou mais proteínas abundantes compreende contatar a amostra biológica com tromboplastina. Essa etapa pode servir para precipitar fibrinogênio, facilitando assim sua remoção.

[00324] As uma ou mais proteínas abundantes são, de preferência, depletadas a um nível que melhora o desempenho de etapas de processamento a jusante. Por exemplo, depletar seletivamente as uma ou mais proteínas abundantes da amostra biológica pode compreender depletar pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% das uma ou mais proteínas abundantes.

[00325] O complexo de substrato-amostra biológica pode compreender uma ligação entre o substrato e um componente da amostra. Qualquer método útil de reticulação revelado no presente documento ou conhecido na técnica pode ser usado. Em qualquer uma das modalidades no presente documento, a ligação pode compreender uma reticulação. Qualquer método útil de reticulação conforme revelado no presente documento ou conhecido na técnica pode ser usado. Em uma modalidade, a reticulação compreende uma fotorreticulação, um reticulador de imidoéster, suberimidato de dimetila, um reticulador de lipídeo, um reticulador de N-Hidroxissuccinimida-éster, suberato de bissulfosuccinimidila (BS3), um aldeído, acroleína, crotonaldeído, for-

maldeído, um reticulador de carbodiimida, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DDC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), cloridrato de 1-Etil-343-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC ou EDAC), Succinimidi1-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), um Sulfosuccinimidi1-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (Sulfo-SMCC), um Sulfo-N-hidroxissuccinimidi1-2-(6-[biotinamido]-2-(p-azido benzamido)-hexanoamido) etil-1,3'-dithioproprionato (Sulfo-SBED), 2-[N2-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil)-N6-(6-biotinamidocaproil)-L-lisinil]etil metanotiossulfonato (Mts-Atf-Biotin; disponível junto à Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford IL.), 2- {N2-N6-(4-Azido-2,3,5,6- tetrafluorobenzoil-6-amino-caproil)-N6-(6-biotinamidocaproil)-L-lisinilamido]letil metanotiossultonato (Mts-Atf-LC-Biotin; disponível junto à Thermo Fisher Scientific Inc), um aminoácido fotorreativo (por exemplo, L-Foto-Leucina e L-Foto-Metionina, consulte, por exemplo, Suchanek, M., et al. (2005). Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions. Nat. Methods 2:261 a 267), um reticulador de N-Hidroxissuccinimida (NHS), um reagente de NHS-Azida (por exemplo, NHS-Azida, NHS-PEG4-Azida, NHS-PEG12-Azida; cada um disponível junto à Thermo Fisher Scientific, Inc.), um reagente de NHS-Fosfina, (por exemplo, NHS-Fosfina, Sulfo-NHS-Fosfina; cada um disponível junto à Thermo Fisher Scientific, Inc.) ou qualquer combinação ou modificação dos mesmos.

[00326] Em qualquer uma das modalidades no presente documento, o substrato é reticulado diretamente a um componente de amostra, por exemplo, uma microvesícula. Qualquer porção química útil na superfície da microvesícula pode ser um alvo da ligação, por exemplo, uma porção química de proteína de superfície, carboidrato ou lipídeo. Em outras modalidades, o substrato é ligado à microvesícula por meio de um ligante.

[00327] Em qualquer uma das modalidades no presente documen-

to, o substrato e amostra podem ser ligados através de um ligante que compreende componentes adicionais que fornecem ligação funcional, em que, por exemplo, o ligante tem dois componentes iguais ou diferentes em cada extremidade (por exemplo, a fórmula de X — ligante — X ou X — LIGANTE — Y), em que "X" e "Y" representam porções químicas funcionais que são configuradas para se ligar ou se associar a um substrato e um componente presentes na amostra biológica. Assim, será evidente que, em algumas ocorrências, X e Y são porções químicas funcionais iguais ou diferentes. Os exemplos não limitantes de tais porções químicas funcionais para ligação, reticulação ou interquelação com uma porção química alvo desejada são revelados no presente documento. O ligante pode ser uma molécula de ácido nucleico ou peptídeo (por exemplo, fornecendo um braço que reduz ou impede o impedimento estérico). O ligante pode também ser uma cadeia principal química que termina em grupos funcionais que são disponíveis para ligação covalente a um grupo químico especificado presente no substrato selecionado (por exemplo, esfera) e a amostra selecionada (por exemplo, microvesículas). O ligante pode compreender um lipídeo funcionalizado. Os lipídeos funcionalizados úteis incluem, sem limitação, 16:0 Biotinila PE 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(biotinila) (sal de sódio), 18:1 Biotinila PE 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(biotinila) (sal de sódio), 16:0 Biotinila Cap PE 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(cap biotinila) (sal de sódio), Biotina Esfingosina, Biotina S1P, 12:0 Biotinila MG, 18:1-12:0 Biotina DG, 12:0 N-Biotinila Ácido Graxo, 18:1-12:0 Biotina PS, 18:1-12:0 Biotina PA, 18:1-12:0 Biotina PE, 18:1-12:0 Biotina PC, 18:1-12:0 Biotina CA, 12:0 Biotinila LPA, 18:1-12:0 Biotina PIP3, 12:0 Biotinila Coenzima A, todos os quais são disponíveis junto à Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama). O lipídeo funcional pode servir como uma fixação de membrana ou lipídeo.

[00328] Para ilustração, em um exemplo de X — LIGANTE — Y, o X é uma porção química que tem a capacidade de se ligar ou se associar fortemente com o substrato (por exemplo, esfera, placa, arranjo) e Y é uma porção química que tem a capacidade de se ligar a um componente da amostra biológica tal como uma célula, microvesícula, etc. X pode ser um reticulador convencional, tais compostos específicos para amina/carbonila conforme descrito no presente documento ou conhecido na técnica. Y pode também ser um reticulador convencional, tais compostos específicos para amina/carbonila conforme descrito no presente documento ou conhecido na técnica. Em outras modalidades, Y é uma porção química específica para membrana de lipídeo. Y pode ser configurado para incorporar dentro de uma membrana de lipídeo de uma vesícula, célula ou outra entidade biológica.

[00329] Adicionalmente aos lipídeos funcionais descritos acima, outras entidades de fixação de membrana úteis incluem, sem limitação, diacil gliceróis, diacil fosfogliceróis (fosfolipídeos) ou esteróis, dialquil gliceróis, dialquil- ou diacil-1-amino-2,3-diidroxipropanos, alquilas ou acilas de cadeia longa com 8 a 25 átomos de carbono, esfingolipídeo, ceramida, fosfolipídeos, sequências de fixação de membrana de glicosil fosfatidilinositol (GPI), fixações de membrana de glicofosfolipídeo, fragmentos de receptor de membrana, receptores de ligação à proteína, receptores de quelação de metal, receptores de ligação à imunoglobulina Fc, receptores de ligação ao fator de crescimento ou citocina, receptores de ligação ao fármaco, receptor de simulação de lipídeo, receptores de transmembrana, receptores de ligação à proteína sintéticos, receptores de quelação de metal sintéticos, receptores de ligação de Fc imunoglobulina sintéticos, receptores de ligação à citocina ou fator de crescimento sintéticos, receptores de ligação ao fármaco sintéticos, receptores de simulação de lipídeo sintéticos, receptores de transmembrana sintéticos, proteínas, peptídeos, peptidomiméticos,

fosfolipídeos, esfingolipídeos, esteroides, colesterol, diidrocolesterol, ergosterol, brassicasterol, colesterilamina, diidrocolesterilamina, ergosterilamina, brassicasterilamina, 3-colesterilamina, 3-diidrocolesterilamina, 3-ergosterilamina, 3-brassicasterilamina 3β-colesterilamina, 3-diidrocolesterilamina, 3β-ergosterilamina, 3β-brassicasterilamina e derivados de qualquer um dos mesmos. O termo "derivado" pode ser usado para se referir a uma molécula que contém pelo menos a porção de que permite que a molécula se insira em uma membrana de lipídeo. Os exemplos de derivados de colesterol incluem ésteres de colesteril e carbamatos de colesteril. Os exemplos de derivados de 3β-colesterilamina incluem, sem limitação, N-alquil, N-aril e N-acil 3β-colesterilaminas. Ainda outras porções químicas de fixação de membrana úteis e métodos de uso são revelados conforme descrito nas referências a seguir, cada um dos quais é incorporado e título de referência no presente documento em sua totalidade: Nizard et al., "Anchoring Antibodies to Membranes Using a Diphtheria Toxin T Domain-ZZ Fusion Protein as a pH Sensitive Membrane Anchor," FEBs Letters 433:83 a 88, 1998; Nizard et al., "Prolonged Display or Rapid Internalization of the IgG-Binding Protein ZZ Anchored to the Surface of Cells Using the Diphtheria Toxin T Domain," Protein Engineering 14(6):439 a 446, 2001; Caras et al., "Signal peptide for protein secretion directing glycophospholipid membrane anchor attachment", Science, volume 243:1.196 a 1.198 (1989); Lin et al., "Expression of T Cell Antigen Receptor Heterodimers in a Lipid-Linked Form," Science Reports, 1990; 249:677 a 679; Hussey, Stephen L., et al., "A Synthetic Membrane-Anchored Antigen Efficiently Promotes Uptake of Antifluorescein Antibodies and Associated Protein a by Mammalian Cells", J. Am. Chem. Soc., 2001, volume 123, páginas 12.712 a 12.713; Pedido de Patente nº U.S. 2006/0068388 Al; Patentes nº U.S. 7.083.958, 7.160.856, 7.288.368, 7.371.404, 7.407.947, 7.514.400, 7.611.863,

7.858.117, 7.947.647, 8.013.131, 8.048.448, 8.088.601, 8.198.230; Pedidos de Patente PCT PCT/US98/15124 (WO 99/05255), WO 00/59474, PCT/NZ02/00214 (WO 03/034074), PCT/NZ03/00059 (WO 03/087346).

[00330] A invenção compreende adicionalmente a identificação do agente de ligação identificado pelo método no presente documento. Os métodos para identificar as entidades biológicas são conhecidos na técnica. Por exemplo, os ácidos nucleicos podem ser identificados por sequenciamento (Sanger, NextGen, etc.).

[00331] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição de matéria que compreende um complexo de substrato-microvesícula, em que o substrato é sintético. Conforme usado no contexto de um complexo de substrato-microvesícula, o termo "sintético" significa que o substrato é artificial. O substrato pode ser uma esfera (por exemplo, uma esfera magnética, uma esfera poliestireno, etc.), um substrato plano ou outro substrato útil revelado no presente documento ou conhecido na técnica. A composição pode ser usada nos métodos acima para identificar os agentes de ligação. A composição pode também ser usada para fornecer normalização em um ensaio que compreende um substrato. Como um exemplo não limitante, uma esfera ligada a uma microvesícula pode ser usada para fornecer a normalização em um ensaio em que as microvesículas em uma amostra biológica são capturadas e detectadas com o uso de esferas.

[00332] Em uma modalidade, a amostra compreende uma microvesícula ligada a um substrato. O método pode, então, ser usado para identificar aptâmeros e/ou outros agentes de ligação que ligam uma microvesícula, incluindo, sem limitação, um antígeno de superfície de microvesícula. As microvesículas podem ser ligadas a um substrato com o uso de vários métodos, por exemplo: 1) conjugação direta; 2) ancoragem de lipídeo; 3) ligação de anticorpo; e 4) ligação de aptâme-

ro. Consulte os esquemas nas **Figuras 7A** a **D.** A **Figura 7A** ilustra a conjugação direta de uma microesfera carboxilada a um antígeno de superfície de vesícula. A **Figura 7B** ilustra a fixação de uma microvesícula a uma microesfera por meio de uma fixação de lipídeo funcionalizado por biotina. A F**igura 7C** ilustra a ligação de anticorpo a um antígeno de superfície de vesícula, em que o anticorpo é conjugado com uma microesfera carboxilada. A **Figura 7D** ilustra a ligação de aptâmero a um antígeno de superfície de vesícula, em que o aptâmero é conjugado com uma microesfera carboxilada**.** As microvesículas fixadas por substrato produzidas pelo método podem ser usadas para avaliar uma biblioteca de aptâmero contra a microvesícula conforme descrito no presente documento. As **Figuras 8** a **10** ilustram o uso de complexos de microvesícula-substrato para avaliar bibliotecas de aptâmero. As **Figuras 11** a **12** apresentam imagens de microvesículas conjugadas por microesferas.

[00333] Em um aspecto, a invenção fornece um método para produzir um complexo de substrato-microvesícula estável, que compreende contatar um substrato com uma microvesícula, em que o substrato é funcionalizado com um grupo químico que tem a capacidade de se ligar diretamente a pelo menos um componente presente na superfície da microvesícula. O substrato pode ser uma esfera, um poço, uma matriz, por exemplo, uma matriz em gel em uma coluna ou um substrato plano. O grupo químico pode compreender qualquer grupo químico útil que pode ligar uma microvesícula a uma esfera, tal como aqueles descritos acima. Por exemplo, o grupo químico pode compreender, sem limitação, peptoide, zDNA, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), lectina, peptídeo/polipeptídeo, dendrímero, agente de identificação de proteína de membrana, composto químico, uma fotorreticulação, um reticulador de imidoéster, suberimidato de dimetila, um reticulador de lipídeo, um reticulador de N-

Hidroxissuccinimida-éster, suberato de bisSulfosuccinimidila (BS3), um aldeído, acroleína, crotonaldeído, formaldeído, um reticulador de carbodiimida, N,N'-dicicloexilcarbodiimida (DDC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), cloridrato de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC ou EDAC), Succinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (SMCC), um Sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (Sulfo-SMCC), um Sulfo-N-hidroxissuccinimidil-2-(6-[biotinamido]-2-(p-azido benzamido)-hexanoamido) etil-1,3'-ditioproprionato (Sulfo-SBED), 2-[N2-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil)-N6-(6-biotina-amidocaproil)-L-lisinil]etil metanotiossulfonato (Mts-Atf-Biotina; disponível junto à Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford IL.), 2-{N2-[N6-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil-6-amino-caproil)-N6-(6-biotinamidocaproil)-L-lisinilamido]} metanotiossulfonato de etila (Mts-Atf-LC-Biotina; disponível junto à Thermo Fisher Scientific Inc), um aminoácido fotorreativo (por exemplo, L-Foto-Leucina, L-Foto-Metionina, consulte, por exemplo, Suchanek, M., et al. (2005). Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-proteininteractions. Nat. Methods 2:261 a 267), um reticulador de N-Hidroxissuccinimida (NHS), um reagente de NHS-Azida (por exemplo, NHS-Azida, NHS-PEG4-Azida, NHS-PEG12-Azida; cada um disponível junto à Thermo Fisher Scientific, Inc.), um reagente de NHS-Fosfina, (por exemplo, NHS-Fosfina, Sulfo-NHS-Fosfina; cada um disponível junto à Thermo Fisher Scientific, Inc.) ou uma combinação dos mesmos. O grupo químico pode não incluir anticorpos ou aptâmeros. O grupo químico pode compreender um grupo funcional tal como revelado no presente documento, incluindo, sem limitação, um hidrocarboneto, um halogênio, um grupo contendo oxigênio (isto é, ligações C-O), um grupo contendo nitrogênio, um grupo contendo enxofre, um grupo contendo fósforo, um grupo contendo boro, um grupo carboxila, um grupo amino, um grupo hidroxila, um

grupo hidrazida, um grupo clorometila ou uma combinação desses. O pelo menos um componente pode compreender qualquer componente biológico útil tal como revelado no presente documento, incluindo, sem limitação, um peptídeo, polipeptídeo, proteína, lipídeo, carboidrato, um derivado dos mesmos ou uma combinação dos mesmos.

[00334] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para isolar uma microvesícula de uma amostra que compreende, contatando uma amostra biológica a um substrato disposto com uma porção química de lipídeo que tem a capacidade de formar um complexo com uma microvesícula, dividir qualquer complexo formado a partir da amostra, isolando, assim, a microvesícula. A invenção também fornece um complexo isolado que compreende um substrato sintético diretamente ligado a uma porção química de lipídeo que é complexada a uma microvesícula tal como na Figura 10B. Um aspecto da invenção é a incorporação de uma porção química de lipídeo (também referida como "fixação de lipídeo" em um substrato fixado, tal como uma esfera ou folha plana que é, então, utilizada como um reagente para separar ou isolar uma microvesícula de uma amostra biológica de fonte (Figura 10B). O substrato é ligado à fixação de lipídeo através da ligação covalente direta (tal como através de uma ligação de amida) ou a fixação de lipídeo é funcionalizada para se ligar ao substrato indiretamente, tal como com o uso de estreptavidina ou avidina (Figura 10B). A amostra biológica usada nos métodos da invenção pode ser qualquer líquido biológico de um indivíduo ou da cultura celular, incluindo, porém sem limitação, sangue, plasma, soro, meio de cultura celular (ou cru ou clarificado). Os exemplos de fixações de lipídeo que podem ser incorporados na prática dos métodos da invenção ou fabricação das composições da invenção incluem aqueles revelados no presente documento ou nas Publicações de Pedido de Patente dos Estados Unidos que têm os números de referência a seguir: 2013/0035371, 2012/0264810,

2012/0101148, 2012/0027803; ou Patente nº US 6.986.902, o relatório descritivo para cada uma das quais é incorporado no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00335] A invenção fornece adicionalmente kits que compreendem um ou mais reagentes para executar os métodos acima. Em uma modalidade, os um ou mais reagentes compreendem uma biblioteca de agentes de ligação potenciais que compreendem um ou mais dentre um aptâmero, anticorpo e outros agentes de ligação úteis descritos no presente documento ou conhecidos na técnica. Em outra modalidade, os um ou mais reagentes compreendem um aptâmero identificado pelos métodos acima. Em ainda outra modalidade, os um ou mais reagentes compreendem um complexo de substrato-microvesícula e/ou um reagente que é parte de tal complexo, por exemplo, um ligante ou reticulador conforme descrito no presente documento. O kit pode compreender componentes revelados no presente documento úteis para formar complexos de microvesícula-substrato por vários métodos, por exemplo, por meio de conjugação direta, fixação de lipídeo, ligação de anticorpo e/ou ligação de aptâmero.

SELEÇÃO DE APTÂMERO NEGATIVA E POSITIVA

[00336] Os aptâmeros podem ser usados em vários ensaios biológicos, incluindo inúmeros tipos de ensaios que dependem de um agente de ligação. Por exemplo, os aptâmeros podem ser usados ao invés de ou ao longo de anticorpos laterais em ensaios com base imunológica. A invenção fornece um método de avaliação de aptâmero que identifica os aptâmeros que não se ligam a quaisquer superfícies (substratos, tubos, filtros, esferas, outros antígenos, etc.) por todas as etapas de ensaio e se ligam especificamente a um antígeno de interesse. O ensaio dependente da seleção negativa para remover aptâmeros que ligam componentes de antígeno não alvo do ensaio final. A seleção negativa é seguida pela seleção positiva para identificar os

aptâmeros que se ligam ao antígeno desejado.

[00337] Em um aspecto, a invenção fornece um método para identificar um aptâmero específico para um alvo de interesse que compreende (a) contatar um conjunto de aptâmeros candidatos com um ou mais componentes de ensaio, em que os componentes de ensaio não compreendem o alvo de interesse; (b) recuperar os membros do conjunto de aptâmeros candidatos que não se ligam aos um ou mais componentes de ensaio em (a); (c) contatar os membros do conjunto de aptâmeros candidatos recuperados em (b) com o alvo de interesse na presença de um ou mais alvos de confusão; e (d) recuperar um aptâmero candidato que se liga ao alvo de interesse na etapa (c), identificando, assim, o aptâmero específico para o alvo de interesse . No método, as etapas (a) e (b) fornecem a seleção negativa para remover os aptâmeros que ligam entidades não alvo. Inversamente, as etapas (c) e (d) fornecem a seleção positiva identificando os aptâmeros que ligam o alvo de interesse, mas não outros alvos de confusão, por exemplo, outros antígenos que podem estar presentes em uma amostra biológica que compreende o alvo de interesse. O conjunto de aptâmeros candidatos pode compreender pelo menos 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15}, 10^{16}, 10^{17}, 10^{18}, 10^{19} ou pelo menos 10^{20} sequências de ácido nucleico. Um meio de realizar o método é ilustrado em detalhes no **Exemplo 9.**

[00338] Em algumas modalidades, as etapas (a)-(b) são opcionais. Em outras modalidades, as etapas (a)-(b) são repetidas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou pelo menos 20 vezes antes da seleção positiva na etapa (c) ser realizada. A seleção positiva pode também ser realizada em múltiplos ciclos. As etapas (c)-(d) podem ser repetidas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou pelo menos 20 vezes antes da identificação do aptâmero específico para o alvo de interesse. Múlti-

plos ciclos podem fornecer um rigor de seleção melhorado.

[00339] Em algumas modalidades, os um ou mais componentes de ensaio contatados com o conjunto de aptâmeros durante a seleção negativa compreendem um ou mais dentre um substrato, uma esfera, um arranjo plano, uma coluna, um tubo, um poço ou um filtro. Uma pessoa versada na técnica apreciará que os componentes de ensaio podem incluir qualquer substância que pode ser parte de um ensaio biológico.

[00340] O alvo de interesse pode ser qualquer entidade apropriada que pode ser detectada quando reconhecida por um aptâmero. Em uma modalidade, o alvo de interesse compreende uma proteína ou polipeptídeo. Conforme usado no presente documento, "proteína", "polipeptídeo" e "peptídeo" são usados de modo intercambiável a não ser que declarado de outra maneira. O alvo de interesse pode ser um ácido nucleico, incluindo DNA, RNA e várias subespécies de qualquer um dos mesmos conforme revelado no presente documento ou conhecido na técnica. O alvo de interesse pode compreender um lipídeo. O alvo de interesse pode compreender um carboidrato. O alvo de interesse pode também ser um complexo, por exemplo, um complexo que compreende proteína, ácidos nucleicos, lipídeos e/ou carboidratos. Em algumas modalidades, o alvo de interesse compreende uma microvesícula. Em tais casos, o aptâmero pode ser um agente de ligação a um antígeno de superfície de microvesícula, por exemplo, uma proteína. Os antígenos de superfície de microvesícula gerais incluem tetraspanina, CD9, CD63, CD81, CD63, CD9, CD81, CD82, CD37, CD53, Rab-5b, Anexina V e MFG-E8. Os antígenos de superfície de microvesícula gerais adicionais são fornecidos na **Tabela 3** no presente documento.

[00341] O antígeno de superfície de microvesícula pode também ser um biomarcador de uma doença ou distúrbio. Em tais casos, o aptâmero pode ser usado para fornecer um diagnóstico, prognóstico ou

teranóstico da doença ou distúrbio. Por exemplo, as uma ou mais proteínas podem compreender um ou mais dentre PSMA, PCSA, B7H3, EpCAM, ADAM-10, BCNP, EGFR, IL1B, KLK2, MMP7, p53, PBP, SERPINB3, SPDEF, SSX2 e SSX4. Esses marcadores podem ser usados para detectar um câncer de próstata. Os antígenos de superfície de microvesícula adicionais são fornecidos nas Tabelas 3 a 4 no presente documento.

[00342] Os um ou mais alvos de confusão podem ser um antígeno diferente do alvo de interesse. Por exemplo, um alvo de confusão pode ser outra entidade que pode estar presente em uma amostra a ser avaliada. Como um exemplo não limitante, considere que a amostra a ser avaliada é uma amostra de plasma de um indivíduo. O alvo de interesse pode ser uma proteína, por exemplo, um antígeno de superfície de microvesícula, que está presente na amostra. Nesse caso, um alvo de confusão poderia ser selecionado a partir de qualquer outro antígeno que é provável de estar presente a amostra de plasma. Consequentemente, a seleção positiva deve fornecer aptâmeros candidatos que reconhecem o alvo de interesse, mas têm interações mínimas, se houver, com os alvos de confusão. Em algumas modalidades, o alvo de interesse e os um ou mais alvos de confusão compreendem o mesmo tipo de entidade biológica, por exemplo, todas as proteínas, todos os ácidos nucleicos, todos os carboidratos ou todos os lipídeos. Como um exemplo não limitante, o alvo de interesse pode ser uma proteína selecionada a partir do grupo que consiste em SSX4, SSX2, PBP, KLK2, SPDEF e EpCAM e os um ou mais alvos de confusão compreendem os outros membros desse grupo. Em outras modalidades, o alvo de interesse e os um ou mais alvos de confusão compreendem diferentes tipos de entidades biológicas, por exemplo, qualquer combinação de proteína, ácido nucleico, carboidrato e lipídeos. Os um ou mais alvos de confusão podem também compreender diferentes

tipos de entidades biológicas, por exemplo, qualquer combinação de proteína, ácido nucleico, carboidrato e lipídeos.

[00343] Em uma modalidade, a invenção fornece um polinucleotídeo isolado ou um fragmento do mesmo, identificado pelos métodos acima. A invenção fornece adicionalmente um polinucleotídeo isolado que tem uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 60% idêntica à sequência de nucleotídeos identificada pelos métodos acima. De maior preferência, a molécula de ácido nucleico isolada é pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de nucleotídeos identificada pelos métodos acima. No caso de um polinucleotídeo isolado que é mais longo do que ou equivalente em comprimento à sequência de referência, por exemplo, uma sequência identificada pelos métodos acima, a comparação é feita com o comprimento inteiro da sequência de referência. Quando o polinucleotídeo isolado é mais curto do que a sequência de referência, por exemplo, mais curto do que uma sequência identificada pelos métodos acima, a comparação é feita a um segmento da sequência de referência do mesmo comprimento (excluindo qualquer laço exigido pelo cálculo de homologia).

[00344] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para selecionar um grupo de aptâmeros que compreende: (a) contatar um conjunto de aptâmeros a uma população de microvesículas de uma primeira amostra; (b) enriquecer um subconjunto de aptâmeros que mostra a afinidade à população de microvesículas da primeira amostra; (c) contatar o subconjunto a uma segunda população de microvesículas de uma segunda amostra; e (d) depletar um segundo subconjunto de aptâmeros que mostra a afinidade à segunda população de microvesículas da segunda amostra, selecionando, assim, o grupo de aptâmeros que tem a afinidade preferencial para a população de microvesículas da primeira amostra.

[00345] A primeira amostra e/ou a segunda amostra podem compreender um fluido biológico tal como revelado no presente documento. Por exemplo, o fluido biológico pode incluir sem limitação sangue, um derivado de sangue, plasma, soro ou urina. A primeira amostra e/ou segunda amostra podem também ser derivadas de uma cultura de células.

[00346] Em uma modalidade, a primeira amostra compreende uma amostra de câncer e a segunda amostra compreende uma amostra de controle, tal como uma amostra de não câncer. A primeira amostra e/ou a segunda amostra podem compreender, cada uma, uma amostra agrupada. Por exemplo, a primeira amostra e/ou a segunda amostra podem compreender fluido corporal de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou mais do que 100 indivíduos. Em tais casos, os membros de um conjunto podem ser escolhidos para representar um fenótipo desejado. Em um exemplo não limitante, os membros do primeiro grupo de amostra podem ser de pacientes com um câncer e os membros do segundo conjunto de amostra podem ser de controles de não câncer.

[00347] As etapas (a)-(d) podem ser repetidas um número desejado de vezes a fim de enriquecer adicionalmente o conjunto nos aptâmeros que têm afinidade preferencial para a população de microvesículas da primeira amostra. Por exemplo, as etapas (a)-(d) podem ser repetidas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais do que 20 vezes. A saída da etapa (d) pode ser usada como a entrada para a etapa repetida (a). Na modalidade, a primeira amostra e/ou a segunda amostra são substituídas por uma amostra diferente antes de repetir as etapas (a)-(d). Em um exemplo não limitante, os membros de um primeiro grupo de amostra podem ser de pacientes com um câncer e os membros de um segundo conjunto de amostra podem ser de controles de não câncer. Durante as repetições subse-

quentes das etapas (a)-(d), o primeiro conjunto de amostra pode compreender amostras de pacientes com câncer diferentes dos ciclos anteriores. Similarmente, o segundo conjunto de amostra pode compreender amostras de controles diferentes dos ciclos anteriores.

[00348] O método pode compreender adicionalmente identificar os membros do grupo selecionado de aptâmeros, por exemplo, por sequenciamento de DNA. O sequenciamento pode ser realizado pelo sequenciamento da Próxima Geração conforme desejado.

[00349] O método pode também compreender identificar os alvos do grupo selecionado de aptâmeros. Os métodos para identificar os alvos de aptâmero são revelados no presente documento.

[00350] A **Figura 13A** ilustra um esquema **1300** para ciclos positivos e opcionalmente negativos de avaliação de uma biblioteca de oligonucleotídeo contra um alvo de interesse. Um conjunto de biblioteca de oligo candidatos é fornecido **1301.** O conjunto de aptâmeros de oligo candidatos pode compreender pelo menos 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15}, 10^{16}, 10^{17}, 10^{18}, 10^{19} ou pelo menos 10^{20} sequências de ácido nucleico. Para realizar a seleção positiva, os oligos são contatados com o alvo de interesse **1302.** O alvo de interesse pode ser qualquer entidade apropriada que pode ser detectada quando reconhecida por um aptâmero. O alvo de interesse pode compreender uma proteína ou polipeptídeo, um ácido nucleico, incluindo DNA, RNA e várias subespécies dos mesmos, um lipídeo, um carboidrato, um complexo, por exemplo, um complexo que compreende proteína, ácidos nucleicos, lipídeos e/ou carboidratos. Em algumas modalidades, o alvo de interesse compreende uma microvesícula. O alvo pode ser imobilizado a um substrato com o uso dos métodos revelados no presente documento (consulte, por exemplo, os **Exemplos 28** a **31)** ou conhecidos na técnica. A mistura é lavada para remover oligos não ligados e, então, os oligos são dissociados da mis-

tura lavada e coletada **1303.** Os oligos coletados podem ser usados como uma entrada para um novo ciclo da ligação de alvo, que pode ser repetida qualquer número de vezes (indicado como 1...n). Por exemplo, a seleção positiva pode ser repetida 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais do que 20 vezes. Entre os ciclos da seleção positiva, a seleção negativa é opcionalmente realizada em que os oligos são contatados com uma ou mais entidades não alvo **1304.** A entidade não alvo pode ser qualquer entidade que pode interferir com a ligação específica dos aptâmeros resultantes ao alvo de interesse, incluindo, sem limitação, outras entidades biológicas, alvos específicos de não doença e vários componentes de ensaio (substratos, tubos, etc.). Durante a seleção negativa, oligos que não ligam as uma ou mais entidades não alvo são retidos e usados como uma entrada para um novo ciclo da seleção positiva **1302.** Essa etapa serve para remover oligos que têm uma afinidade para as entidades não alvo. Os oligos coletados após os números desejados de ciclos da seleção positiva **1303** e/ou seleção negativa **1304** são coletados como aptâmeros candidatos que são indicados para ligar o alvo de interesse **1305.**

[00351] A **Figura 13B** ilustra tal esquema para a seleção de aptâmeros contra amostras de câncer versus amostras de controle de não câncer. O esquema mostra 8 amostras de câncer (Cal-Ca8) e 7 amostras de controle (nCal-nCa7) cada uma consistindo em amostras individuais ou amostras agrupadas. Sete seleções diferentes (Seleção 1 - Seleção 7) são executadas em paralelo. Em cada Seleção, um conjunto de entrada de aptâmeros candidatos é enriquecido para aptâmeros contra uma das amostras de câncer ("seleção positiva") e, então, o conjunto é depletado de aptâmeros contra uma das amostras de controle ("seleção negativa"). Esse processo é repetido conforme indicado. A ordem das amostras é alterada em cada Seleção para evitar a

propensão de seleção. Os aptâmeros restantes após o último ciclo da seleção positiva compreendem os aptâmeros selecionados, que podem, então, ser adicionalmente desenvolvidos, por exemplo, como parte de um ensaio para diferenciar amostras de câncer de não câncer. Os conjuntos de aptâmero podem ser sequenciados após cada ciclo para rastrear o enriquecimento, depleção, problemas potenciais, etc.

IDENTIFICAÇÃO DE ALVO DE APTÂMERO

[00352] Os métodos e os kits acima podem ser usados para identificar os agentes de ligação que se diferenciam entre duas populações de biomarcador. A invenção fornece adicionalmente métodos para identificar os alvos dos agentes de ligação, conforme descrito nessa seção. Por exemplo, os métodos podem compreender adicionalmente identificar um marcador de superfície de uma microvesícula alvo que é reconhecida pelo agente de ligação.

[00353] Em uma modalidade, a invenção fornece um método para identificar um alvo de um agente de ligação que compreende: (a) contatar o agente de ligação com o alvo para ligar o alvo com o agente de ligação, em que o alvo compreende um antígeno de superfície de uma microvesícula; (b) romper a microvesícula sob as condições que não rompem a ligação do alvo com o agente de ligação; (c) isolar o complexo entre o alvo e o agente de ligação; e (d) identificar a ligação de alvo pelo agente de ligação. O agente de ligação pode ser um agente de ligação identificado pelos métodos acima, por exemplo, um aptâmero, ligante, anticorpo ou outro agente de ligação útil que pode se diferenciar entre duas populações de biomarcadores.

[00354] Um esquema ilustrativo para executar o método é mostrado na **Figura 14.** A figura mostra um agente de ligação **1402,** aqui um aptâmero para propósitos de ilustração, ancorado a um substrato **1401.** O agente de ligação **1402** pode ser covalentemente ligado ao substra-

to **1401.** O agente de ligação **1402** pode também ser ligado não covalentemente. Por exemplo, o agente de ligação **1402** pode compreender uma identificação que pode ser atraída ao substrato, tal como um grupo biotina que pode formar um complexo com uma molécula de avidina/estreptavidina que é covalentemente ligada ao substrato. Isso pode permitir que um complexo seja formado entre o aptâmero e a microvesícula enquanto na solução, seguido pela captura do aptâmero com o uso da identificação de biotina. O agente de ligação **1402** se liga a um antígeno de superfície **1403** da microvesícula **1404.** Na etapa indicada pela seta (i), a microvesícula é rompida enquanto deixa do complexo entre o agente de ligação **1402** e o antígeno de superfície **1403** intactos. A microvesícula rompida **1405** é removida, por exemplo, por meio de lavagem ou troca de tampão, na etapa indicada pela seta (ii). Na etapa indicada pela seta (iii), o antígeno de superfície **1403** é liberado do agente de ligação **1402.** O antígeno de superfície **1403** pode ser analisado para determinar sua identidade com o uso dos métodos revelados no presente documento e/ou conhecidos na técnica. O alvo do método pode ser qualquer entidade biológica útil associada com uma microvesícula. Por exemplo, o alvo pode compreender uma proteína, ácido nucleico, lipídeo ou carboidrato ou outra entidade biológica revelada no presente documento ou conhecida na técnica.

[00355] Em algumas modalidades do método, o alvo é reticulado ao agente de ligação antes de romper a microvesícula. Sem ater-se à teoria, essa etapa pode assistir na manutenção do complexo entre o agente de ligação e o alvo enquanto a vesícula é rompida. Qualquer método útil de reticulação revelado no presente documento ou conhecido na técnica pode ser usado. Nas modalidades, a reticulação compreende fotorreticulação, um reticulador de imidoéster, suberimidato de dimetila, um reticulador de N-Hidroxissuccinimida-éster, suberato de bissulfosuccinimidila (BS3), um aldeído, acroleína, crotonaldeído,

formaldeído, um reticulador de carbodiimida, N,N'-dicicloexilcarbodiimida (DDC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), cloridrato de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC ou EDAC), Succinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (SMCC) e Sulfosuccinimidil-4-(V-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato (Sulfo-SMCC), um Sulfo-N-hidroxissuccinimidil-2-(6-[biotinamido]-2-(p-azido benzamido)-hexanoamido) etil-1,3'-ditioproprionato (Sulfo-SBED), 2-[N2-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil)-N6-(6-biotina-amidocaproil)-L-lisinil]etil metanotiossulfonato (Mts-Atf-Biotina disponível junto à Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford IL.), 2-{N2-[N6-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil-6-amino-caproil)-N6-(6-biotinamidocaproil)-L-lisinilamido]} metanotiossultonato de etila (Mts-Atf-LC-Biotina; disponível junto à Thermo Fisher Scientific Inc), um aminoácido fotorreativo (por exemplo, L-Foto-Leucina e L-Foto-Metionina, consulte, por exemplo, Suchanek, M., et al. (2005). Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions. Nat. Methods 2:261 a 267), um reticulador de N-Hidroxissuccinimida (NHS), um reagente de NHS-Azida (por exemplo, NHS-Azida, NHS-PEG4-Azida, NHS-PEG12-Azida; cada um disponível junto à Thermo Fisher Scientific, Inc.), um reagente de NHS-Fosfina, (por exemplo, NHS-Fosfina, Sulfo-NHS-Fosfina; cada um disponível junto à Thermo Fisher Scientific, Inc.) ou qualquer combinação ou modificação dos mesmos.

[00356] Uma variedade de métodos pode ser usada para romper a microvesícula. Por exemplo, a membrana de vesícula pode ser rompida com o uso de forças mecânicas, agentes químicos ou uma combinação dos mesmos. Nas modalidades, romper a microvesícula compreende o uso de um ou mais dentre um detergente, um tensoativo, um solvente, uma enzima ou qualquer combinação útil dos mesmos. A enzima pode compreender um ou mais dentre lisozima, lisostafina, zimolase, celulase, mutanolisina, um glicanase, uma protease e ma-

nase. O detergente ou tensoativo pode compreende um ou mais dentre um octiltioglucosídeo (OTG), octil beta-glucosídeo (OG), um detergente não iônico, Triton X, Tween 20, um álcool graxo, um álcool cetílico, um álcool estearílico, álcool cetoestearílico, um álcool oleílico, um éter alquílico de polioxietileno glicol (Brij), éter monododecílico de octaetileno glicol, éter monododecílico de pentaetileno glicol, um éter alquílico de polioxipropileno glicol, um éter alquílico de glucosídeo, decil glicosídeo, lauril glicosídeo, octil glicosídeo, um polioxietileno glicol octilfenol éter, um polioxietileno glicol alquilfenol éter, nonoxinol-9, um éster alquílico de glicerol, laurato de glicerila, um éster alquílico de polioxietileno glicol sorbitano, polissorbato, um éster alquílico de sorbitano, cocamida MEA, cocamida DEA, óxido de dodecildimetilamina, copolímeros de bloco de polietileno glicol e polipropileno glicol, poloxâmeros, amina de sebo polietoxilado (POEA), um detergente zwitteriônico, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanossulfonato (CHAPS), um alquilbenzeno sulfonato linear (LAS), um alquil fenol etoxilado (APE), cocamidopropil hidroxissultaína, uma betaína, cocamidopropil betaína, lecitina, um detergente iônico, dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetrimônо (CTAB), cloreto de cetil trimetilamônio (CTAC), diidrocloreto de octenidina, cloreto de cetilpiridínio (CPC), cloreto de benzalcônio (BAC), cloreto de benzetônio (BZT), 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano, cloreto de dimetildioctadecilamônio, brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), desoxicolato de sódio, nonil fenoxipolietoxiletanol (Tergitol-tipo NP-40; NP-40), lauril sulfato de amônio, lauret sulfato de sódio (lauril éter sulfato de sódio (SLES)), miret sulfato de sódio, um carboxilato de alquila, estearato de sódio, lauroil sarcosinato de sódio, um fluorotensoativo à base de carboxilato, perfluorononanoato, perfluorooctanoato (PFOA ou PFO) e um biotensoativo. Os métodos mecânicos de rompimento que podem ser usados compreendem, sem limitação, cisalhamento mecânico, moinho de esferas, ho-

mogeneização, microfluidização, sonicação, Prensa Francesa, colisão, um moinho coloidal, descompressão, choque osmótico, termólise, congelamento-descongelamento, dessecação ou qualquer combinação dos mesmos.

[00357] Conforme mostrado na **Figura 14**, o agente de ligação pode ser ancorado a um substrato. O agente de ligação pode ser ancorado antes ou após o complexo entre o agente de ligação e o alvo é formado. O substrato pode ser qualquer substrato útil tal como revelado no presente documento ou conhecido na técnica. Em uma modalidade, o substrato compreende uma microesfera. Em outra modalidade, o substrato compreende um substrato plano. O agente de ligação pode também ser identificado. Isolar o complexo entre o alvo e o agente de ligação pode compreender capturar o agente de ligação por meio da identificação. Por exemplo, a identificação pode ser uma identificação de biotina. Em tais casos, o agente de ligação pode ser ligado ao substrato por meio de um evento de ligação de biotina-avidina.

[00358] Os métodos para identificar o alvo após a liberação do agente de ligação dependerão do tipo de alvo de interesse. Por exemplo, quando o alvo compreende uma proteína, identificar o alvo pode compreender o uso de espectrometria de massa (MS), impressão digital de massa de peptídeo (PMF; impressão digital de proteína), sequenciamento, análise de aminoácido N-terminal, análise de aminoácido C-terminal, degradação de Edman, cromatografia, eletroforese, eletroforese em gel bidimensional (gel 2D), arranjo de anticorpo e imunoensaio. Os ácidos nucleicos podem ser identificados por sequenciamento.

[00359] Um versado na técnica apreciará que o método pode ser usado para identificar qualquer alvo apropriado, incluindo aqueles não associados a uma vesícula. Por exemplo, em relação à **Figura 14,** todas as etapas exceto a etapa indicada pela seta (i) (isto é, romper a

microvesícula) poderiam ser realizadas para um alvo circulante tal como uma proteína, ácido nucleico, lipídeo, carboidrato ou combinação dos mesmos.

CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRA

[00360] Os aptâmeros da invenção podem ser usados para caracterizar uma amostra biológica. Por exemplo, um aptâmero pode ser usado para ligar um biomarcador na amostra. A presença ou o nível do biomarcador ligado pode indicar uma característica do exemplo, tal como um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico de uma doença ou distúrbio associado com a amostra.

[00361] Em um aspecto, a invenção fornece um método para caracterizar uma doença ou distúrbio que compreende: (a) colocar uma amostra de teste biológica em contato com um ou mais aptâmeros da invenção; (b) detectar uma presença ou nível de um complexo entre os um ou mais aptâmeros e o alvo ligado pelo um ou mais aptâmeros na amostra de teste biológica formada na etapa (a); (c) colocar uma amostra de controle biológica em contato com um ou mais aptâmero; (d) detectar uma presença ou nível de um complexo entre os um ou mais aptâmeros e o alvo ligado pelos um ou mais aptâmeros na amostra de controle biológica formada na etapa (c); e (e) comparar a presença ou o nível nas etapas (b) e (d), caracterizado, assim, a doença ou distúrbio. Os um ou mais aptâmeros podem compreender qualquer aptâmero útil para caracterizar a doença ou distúrbio, por exemplo, os aptâmeros que compreendem qualquer uma das SEQ ID NOs. 1 a 241535 no presente documento, uma modificação útil ou um fragmento funcional dos mesmos.

[00362] A amostra de teste biológica e a amostra de controle biológica podem compreender, cada um, uma amostra de tecido, uma cultura de células ou um fluido biológico. Em algumas modalidades, a amostra de teste biológica e a amostra de controle biológica compre-

endem o mesmo tipo de amostra, por exemplo, ambas são amostras de tecido ou ambas são amostras de fluido. Em outras modalidades, diferentes tipos de amostra podem ser usados para as amostras de teste e controle. Por exemplo, a amostra de controle pode compreender uma amostra modificada ou artificial de outra maneira.

[00363] O fluido biológico pode compreender um fluido corporal. O fluido corporal pode incluir, sem limitação, um ou mais dentre sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de Cowper ou fluido de pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural e peritoneal, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreções vaginais, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares, fluido de cavidade blastocística, sangue do cordão umbilical. Em algumas modalidades, o fluido corporal compreende sangue, soro ou plasma.

[00364] O fluido biológico pode compreender microvesículas. Por exemplo, o fluido biológico pode ser um tecido, cultura de células ou fluido corporal que compreende microvesículas liberadas das células na amostra. As microvesículas podem ser microvesículas circulantes.

[00365] Os um ou mais aptâmeros podem ligar um biomarcador alvo, por exemplo, um biomarcador útil na caracterização da amostra. O biomarcador pode compreender um polipeptídeo ou fragmento do mesmo ou outro biomarcador útil descrito no presente documento ou conhecido na técnica (lipídeo, carboidrato, complexo, ácido nucleico, etc.). Nas modalidades, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo é solúvel ou membrana ligada. Os polipeptídeos ligados por membrana podem compreender um antígeno de superfície celular ou um antígeno

de superfície de microvesícula. O biomarcador pode ser um biomarcador selecionado a partir da **Tabela 3** ou da **Tabela 4.**

[00366] A caracterização pode compreender um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico da doença ou distúrbio. Várias doenças e distúrbios podem ser caracterizados com o uso das composições e métodos da invenção, incluindo, sem limitação, um câncer, uma afecção pré-maligna, uma doença inflamatória, uma doença imune, uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio cardiovascular, a uma doença ou distúrbio neurológico, uma doença infecciosa e/ou dor. Consulte a seção no presente documento "Fenótipos" para mais detalhes. Nas modalidades, a doença ou distúrbio compreende uma doença ou distúrbio proliferativo ou neoplástico. Por exemplo, a doença ou distúrbio pode ser um câncer. Em algumas modalidades, o câncer compreende um câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer colorretal, melanoma ou câncer no cérebro.

[00367] A **Figura 15A** é um esquema **1500** que mostra uma configuração de ensaio que pode ser usada para detectar e/ou quantificar um alvo de interesse com o uso um ou mais aptâmeros da invenção. O aptâmero de captura **1502** é ligado ao substrato **1501.** O substrato pode ser um substrato plano, poço, microesfera ou outro substrato útil conforme revelado no presente documento ou conhecido na técnica. O alvo de interesse **1503** é ligado pelo aptâmero de captura **1502.** O alvo de interesse pode ser qualquer entidade apropriada que pode ser detectada quando reconhecida por um aptâmero ou outro agente de ligação. O alvo de interesse pode compreender uma proteína ou polipeptídeo, um ácido nucleico, incluindo DNA, RNA e várias subespécies dos mesmos, um lipídeo, um carboidrato, um complexo, por exemplo, um complexo que compreende proteína, ácidos nucleicos, lipídeos e/ou carboidratos. Em algumas modalidades, o alvo de interesse com-

preende uma microvesícula. O alvo de interesse pode ser um antígeno de superfície de microvesícula. O alvo de interesse pode ser um biomarcador, incluindo um biomarcador associado à vesícula, nas **Tabelas 3 ou 4.** A entrada de microvesícula pode ser isolada de uma amostra com o uso de várias técnicas conforme descrito no presente documento, por exemplo, cromatografia, filtração, centrifugação, citometria de fluxo, captura de afinidade (por exemplo, a uma superfície plana, coluna ou esfera) e/ou com o uso de microfluidos. O aptâmero de detecção **1504** é também ligado ao alvo de interesse **1503.** O aptâmero de detecção **1504** carrega a identificação **1505** que pode ser detectada para identificar o alvo capturado para o substrato **1501** por meio do aptâmero de captura **1502.** A identificação pode ser identificação fluorescente, identificação radioativa, enzima ou outra identificação detectável conforme revelada no presente documento. Ou o aptâmero de captura **1502** ou o aptâmero de detecção **1504** pode ser substituído por outro agente de ligação, por exemplo, um anticorpo. Por exemplo, o alvo pode ser capturado com um anticorpo e detectado com um aptâmero ou vice-versa. Quando o alvo de interesse compreende um complexo, os agentes de captura e detecção (aptâmero, anticorpo, etc.) podem reconhecer alvos iguais ou diferentes. Por exemplo, quando o alvo é uma microvesícula, o agente de captura pode reconhecer um antígeno de superfície de microvesícula enquanto o agente de detecção reconhece outro antígeno de superfície de microvesícula. Alternativamente, os agentes de captura e detecção podem reconhecer o mesmo antígeno de superfície.

[00368] A configuração acima compreende um formato de ensaio de "sanduíche" que pode compreender um formato de imunoensaio tal como ELISA ou ensaio de microesfera. Em outras modalidades, o alvo de interesse **1503** não é capturado para um substrato, mas é detectado na solução. Em tais casos, o aptâmero de detector **1504** pode ser

contatado com o alvo de interesse e detectado diretamente na solução, por exemplo, com o uso de ensaio de citometria de fluxo ou similares.

CONJUNTOS DE APTÂMERO PARA CARACTERIZAR UMA AMOSTRA

[00369] Em um aspecto, a invenção fornece um método para caracterizar uma amostra contatando-se a amostra com um conjunto de aptâmeros diferentes e determinar a frequência na qual vários aptâmeros no conjunto ligam a amostra. Por exemplo, um conjunto de aptâmeros é identificado que se liga, de preferência, a microvesículas de pacientes com câncer em comparação a pacientes sem câncer. Uma amostra de teste, por exemplo, de um paciente com suspeita de ter o câncer é coletada e contatada com o conjunto de aptâmeros. Os aptâmeros que ligam a amostra de teste são eluídos da amostra de teste, coletados e identificados e a composição dos aptâmeros ligados é comparada àquelas conhecidas por ligar as amostras de câncer. Várias técnicas de sequenciamento, amplificação e hibridização podem ser usadas para identificar os aptâmeros eluídos. Quando um grande conjunto de aptâmeros é usado, a identificação de aptâmero pode ser realizada por sequenciamento de rendimento alto ou por meio de hibridização. Se a amostra de teste for ligada pelo conjunto de aptâmeros de uma maneira similar (por exemplo, conforme determinado por métodos de classificação de bioinformática) às microvesículas de pacientes com câncer, então, a amostra de teste é indicativa de câncer também. Com o uso desse método, um conjunto de aptâmeros que liga um ou mais antígenos de microvesícula pode ser usado para caracterizar a amostra sem conhecer necessariamente o alvo preciso de cada membro do conjunto de aptâmeros. Os **Exemplos 23** e **24** no presente documento ilustram uma modalidade da invenção.

[00370] Em um aspecto, a invenção fornece um método para carac-

terizar uma condição para uma amostra de teste que compreende: contatar uma amostra de microvesícula com uma pluralidade de aptâmeros de oligonucleotídeo que têm a capacidade de ligar um ou mais alvos presentes na dita amostra de microvesícula, identificando um conjunto de oligonucleotídeos que formam um complexo com a amostra em que o conjunto é predeterminado para caracterizar uma condição para a amostra, caracterizando assim uma condição para uma amostra.

[00371] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para identificar um conjunto de aptâmeros de oligonucleotídeo associados com uma amostra de teste que compreende: (a) contatar uma amostra de microvesícula com uma pluralidade de oligonucleotídeos, isolando um conjunto de oligonucleotídeos que formam um complexo com a amostra de microvesícula, (b) determinar a sequência e/ou número de cópia para cada um dos oligonucleotídeos, identificando, assim, um conjunto de oligonucleotídeos associados com a amostra de teste.

[00372] Em ainda outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método para diagnosticar uma amostra como cancerosa ou predisposta a ser cancerosa que compreende contatar uma amostra de microvesícula com uma pluralidade de aptâmeros de oligonucleotídeo que são predeterminadas para formar preferencialmente um complexo com microvesículas de uma amostra de câncer em comparação às microvesículas de uma amostra de não câncer.

[00373] Os oligonucleotídeos podem ser identificados por sequenciamento, por exemplo, por sequenciamento de terminação de tintura (Sanger) ou métodos de altos rendimentos. Os métodos de rendimento alto podem compreender técnicas para sequenciar rapidamente um grande número de ácidos nucleicos, incluindo técnicas de da próxima geração tal como sequenciamento de assinatura massivamente para-

lelo (MPSS); Sequenciamento Polony; pirossequenciamento 454; sequenciamento Illumina (Solexa) ; sequenciamento SOLiD; Sequenciamento por semicondutores Ion Torrent; sequenciamento por nanoesferas de DNA; sequenciamento de molécula única Heliscope; sequenciamento em tempo real de molécula única (SMRT) ou outros métodos tal como sequenciamento de DNA Nanopore; sequenciamento de DNA por correntes de tunelamento; sequenciamento por hibridização; sequenciamento com espectrometria de massa; sequenciamento de Sanger microfluídico; técnicas com base em microscopia; sequenciamento de RNAP; sequenciamento de alto rendimento de vírus in vitro. Os oligonucleotídeos podem também ser identificados por técnicas de hibridização. Por exemplo, um microarranjo que tem locais endereçáveis para hibridizar e detectar, assim, os vários membros do conjunto pode ser usado.

[00374] A pluralidade ou conjunto de aptâmeros de oligonucleotídeo pode compreender qualquer número desejado de aptâmeros de oligonucleotídeo para permitir a caracterização da amostra. Em várias modalidades, o conjunto compreende pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000 ou pelo menos 10.000 membros de oligonucleotídeo diferentes.

[00375] A pluralidade de aptâmeros de oligonucleotídeo pode ser pré-selecionada através de uma ou mais etapas de seleção positiva ou negativa, em que a seleção positiva compreende a seleção de oligonucleotídeos contra uma amostra que tem características substancialmente similares em comparação à amostra de teste e em que a seleção negativa compreende a seleção de oligonucleotídeos contra uma amostra que tem características substancialmente diferentes em comparação à amostra de teste. As características substancialmente simi-

lares significam que as amostras usadas para seleção positiva são representativas da amostra de teste em uma ou mais características de interesse. Por exemplo, as amostras usadas para a seleção positiva podem ser de pacientes com câncer ou linhagens celulares e a amostra de teste pode ser uma amostra de um paciente que tem ou é suspeito de ter um câncer. As características substancialmente diferentes significam que as amostras usadas para seleção negativa se diferem da amostra de teste em uma ou mais características de interesse. Por exemplo, as amostras usadas para a seleção negativa podem ser de indivíduos ou linhagens celulares que não têm câncer (por exemplo, amostras "normais" ou, de outra maneira, de "controle") e a amostra de teste pode ser uma amostra de um paciente que tem ou é suspeito de ter um câncer. O câncer pode ser um câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer colorretal, melanoma, câncer no cérebro ou outro câncer.

[00376] Selecionando-se as amostras representativas dos fenótipos desejados para detectar e/ou distinguir, a caracterização pode compreender um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico para qualquer número de doenças ou distúrbios. Várias doenças e distúrbios podem ser caracterizados com o uso das composições e métodos da invenção, incluindo, sem limitação, um câncer, uma afecção pré-maligna, uma doença inflamatória, uma doença imune, uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio cardiovascular, a uma doença ou distúrbio neurológico, uma doença infecciosa e/ou dor. Consulte a seção no presente documento "Fenótipos" para mais detalhes. Nas modalidades, a doença ou distúrbio compreende uma doença ou distúrbio proliferativo ou neoplástico. Por exemplo, a doença ou distúrbio pode ser um câncer. Em algumas modalidades, o câncer compreende um câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer colorretal, melanoma ou câncer de cérebro.

[00377] A **Figura 15B** é um esquema **1510** que mostra o uso de um conjunto de aptâmeros para caracterizar um fenótipo de uma amostra, tais como aqueles listados acima. Um conjunto de aptâmeros para um alvo de interesse é fornecido **1511.** Por exemplo, o conjunto de aptâmeros pode ser enriquecido para alvejar uma ou mais microvesículas. Os membros do conjunto podem ligar diferentes alvos (por exemplo, um antígeno de superfície de microvesícula) ou diferentes epítopos do mesmo alvo presente nas uma ou mais microvesículas. O conjunto é contatado com uma amostra de teste a ser caracterizada **1512.** Por exemplo, a amostra de teste pode ser uma amostra biológica de um indivíduo que tem ou é suspeito de ter uma doença ou distúrbio dado. A mistura é lavada para remover aptâmeros não ligados. Os aptâmeros restantes são eluídos ou dissociados de outra maneira da amostra e coletados **1513.** Os aptâmeros coletados são identificados, por exemplo, por sequenciamento ou hibridização. A presença e/ou número de cópia do identificado é usado para caracterizar o fenótipo **1514.** Por exemplo, o conjunto de aptâmeros pode ser escolhido como os aptâmeros que reconhecem, de preferência, as microvesículas dispersas a partir de células de câncer. O método pode ser empregado para detectar se a amostra retém os aptâmeros que ligam as microvesículas relacionadas a câncer, permitindo, assim, que a amostra seja caracterizada como cancerosa ou não.

[00378] A **Figura 15C** é um esquema **1520** que mostra uma implantação do método na **Figura 15B.** Um conjunto de aptâmeros identificado como ligando uma população de microvesícula é fornecido **1521.** A população de microvesícula pode ser isolada de uma amostra com o uso de várias técnicas conforme descrito no presente documento, por exemplo, cromatografia, filtração, ultrafiltração, centrifugação, ultracentrifugação, citometria de fluxo, captura de afinidade (por exemplo, a uma superfície plana, coluna ou esfera) e/ou com o uso de microflui-

dos. A amostra de entrada compreende microvesículas que são isoladas de uma amostra de teste **1522**. Por exemplo, a amostra de teste pode ser uma amostra biológica de um indivíduo que tem ou é suspeito de ter uma doença ou distúrbio dado. O conjunto é contatado com as microvesículas isoladas a serem caracterizadas **1523.** A mistura é lavada para remover aptâmeros não ligados e os aptâmeros restantes são eluídos ou dissociados de outra maneira da amostra e coletados **1524.** Os aptâmeros coletados são identificados **1525** e a presença e/ou número de cópia dos aptâmeros retidos é usado para caracterizar o fenótipo **1526** conforme acima.

[00379] Em uma modalidade alternativa à **Figura 15C,** o conjunto de aptâmeros **1520** é contatado diretamente com uma amostra biológica que compreende ou espera-se que compreenda microvesículas. As microvesículas são, posteriormente, isoladas da amostra e a mistura é lavada para remover os aptâmeros não ligados e os aptâmeros restantes são dissociados e coletados **1524.** As etapas a seguir são realizadas conforme acima. Como um exemplo dessa configuração alternativa, uma amostra biológica, por exemplo, um sangue, soro ou amostra de plasma, é contatada diretamente com o conjunto de aptâmeros. As microvesículas são, então, isoladas por várias técnicas reveladas no presente documento, incluindo, sem limitação, ultracentrifugação, ultrafiltração, citometria de fluxo, isolamento de afinidade ou similares. Os aptâmeros restantes são, então, identificados, por exemplo, por sequenciamento, hibridização ou amplificação.

[00380] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma composição de matéria que compreende uma pluralidade de oligonucleotídeos que pode ser usada para executar os métodos que compreendem o uso de um conjunto de aptâmeros para caracterizar um fenótipo. A pluralidade de oligonucleotídeos pode compreender qualquer um daqueles descritos no presente documento, incluindo

uma ou mais das SEQ ID NOs. 1 a 241535. Em algumas modalidades, a pluralidade de oligonucleotídeos é selecionada dentre as SEQ ID NOs. 1 a 230810. Em ainda outras modalidades, a pluralidade de oligonucleotídeos é selecionada dentre as SEQ ID NOs. 230811 a 230899. A pluralidade de oligonucleotídeos pode ser selecionada dentre as SEQ ID NOs. 230900 a 230927 ou dentre as SEQ ID NOs. 231018 a 241535. A composição pode compreender qualquer uma dessas sequências. Os oligonucleotídeos selecionados podem ter a capacidade de se ligar a uma pluralidade de alvos presentes em uma amostra biológica. Em algumas modalidades da invenção, a composição compreende pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000 ou todos os oligonucleotídeos listados nas SEQ ID NOs. 231018 a 241535. A composição pode compreender pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000 ou todos os oligonucleotídeos listados nas SEQ ID NOs. 231018 a 241535. A composição da matéria pode também compreender um ou mais oligonucleotídeos estabelecidos em qualquer uma das **Tabelas 23** e **24** que têm a capacidade de se ligar a uma pluralidade de alvos presentes em uma amostra biológica. Por exemplo, a composição pode compreender pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 oligonucleotídeos listados na **Tabela 23** ou na **Tabela 24.** Os oligonucleotídeos podem ser usados nos métodos expostos para caracterizar uma amostra de câncer, incluindo, sem limitação, uma amostra de câncer de mama ou uma amostra de câncer de próstata.

[00381] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método

para realizar o sequenciamento de alto rendimento que compreende: realizar pelo menos uma (i) seleção negativa ou (ii) uma seleção positiva de uma pluralidade de oligonucleotídeos com uma amostra de microvesícula; obter um conjunto de oligonucleotídeos para fornecer um subconjunto aglutinante negativo ou subconjunto aglutinante positivo da pluralidade de oligonucleotídeos, em que o subconjunto aglutinante negativo da pluralidade de oligonucleotídeos não se liga à amostra de microvesícula e em que o subconjunto aglutinante positivo da pluralidade de oligonucleotídeos não se liga à amostra de microvesícula; colocar o subconjunto aglutinante negativo ou subconjunto aglutinante positivo em contato com uma amostra de teste; eluir os oligonucleotídeos que se ligam à amostra de teste para fornecer uma pluralidade de oligonucleotídeos eluídos; e realizar o sequenciamento de alto rendimento da pluralidade de oligonucleotídeos eluídos para identificar a sequência e/ou número de cópias dos membros da pluralidade de oligonucleotídeos eluídos. A seleção negativa e positiva da pluralidade de oligonucleotídeos com o uso da amostra de microvesícula pode ser realizada conforme revelado no presente documento. O perfil de aptâmero revelado pela sequência e/ou número de cópia dos membros da pluralidade de oligonucleotídeos eluídos pode ser usado para caracterizar um fenótipo da amostra de teste conforme descrito no presente documento.

[00382] Em um aspecto similar, a invenção fornece um método para identificar os oligonucleotídeos específicos para uma amostra de teste. O método compreende: (a) enriquecer uma pluralidade de oligonucleotídeos para uma amostra fornecer um conjunto de oligonucleotídeos predeterminados para formar um complexo com uma amostra alvo; (b) colocar a pluralidade em (a) em contato com uma amostra de teste para permitir a formação de complexos de oligonucleotídeos com a amostra de teste; (c) recuperar oligonucleotídeos que formaram com-

plexos em (b) para fornecer um subconjunto recuperado de oligonucleotídeos; e (d) perfilar o subconjunto recuperado de oligonucleotídeos por sequenciamento, amplificação ou hibridização de alto rendimento identificando, desse modo, oligonucleotídeos específicos para uma amostra de teste. A amostra de teste pode compreender uma pluralidade de microvesículas. Os oligonucleotídeos podem compreender RNA, DNA ou ambos. Em alguma modalidade, o método compreende adicionalmente realizar a análise informática para identificar um subconjunto de oligonucleotídeos que compreende a identidade de sequência de pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos 99% aos oligonucleotídeos predeterminados para formar um complexo com a amostra alvo.

[00383] A invenção fornece adicionalmente um kit para facilitar o uso de um conjunto de aptâmero para caracterizar um fenótipo. O kit pode compreender um reagente para executar a metodologia exposta. De modo relacionado, a invenção fornece o uso de um reagente para executar tais métodos. O reagente pode compreender um aptâmero, um conjunto de aptâmeros ou uma composição que compreende tais aptâmeros conforme descrito acima.

CONTROLES NEGATIVOS DE ÁCIDO NUCLEICO

[00384] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição de controle negativo que compreende um ácido nucleico de ligação de não alvo e um substrato. O ácido nucleico de ligação de não alvo pode ser fornecido pelos métodos de seleção da invenção descritos acima, em que o ácido nucleico é identificado como um aptâmero de ligação de não alvo. Por exemplo, o aptâmero de ligação de não alvo pode ser identificado como um aptâmero de ligação de não alvo durante a seleção positiva. Em algumas modalidades, prevê-se que o aptâmero de não ligação tenha uma estrutura secundária mínima, se houver. Uma

vez que uma sequência de ácido nucleico é identificada, sua sequência pode ser analisada com o uso de um programa de software para estimar sua estrutura de dobra bidimensional. Os algoritmos e programas de alinhamento de sequência bem conhecidos para a identificação de motivo podem ser usados para identificar os motivos de sequência e reduzir a dimensionalidade de até mesmo conjuntos de dados grandes das sequências. Ademais, os programas de software tais como Vienna e mfold são bem conhecidos por aqueles versados na técnica da seleção de aptâmero e podem ser usados para agrupar adicionalmente sequências com base em motivos de estrutura secundários (formatos compartilhados).

[00385] O ácido nucleico de ligação de não alvo pode ser associado ao substrato. A associação pode ser pode meio de ligação covalente ou não covalente. Em algumas modalidades, o ácido nucleico de ligação de não alvo é conjugado com o substrato. Um ensaio de detecção conforme descrito no presente documento ou conhecido na técnica pode ser realizado com o uso da composição como um controle negativo. O controle negativo pode ser usado de qualquer maneira apropriada. Por exemplo, ao usar uma placa de microtitulação ou arranjo plano (consulte, por exemplo, a **Figura 1A),** um poço ou uma área do arranjo pode ser contatada com o ácido nucleico de ligação de não alvo. O ensaio pode ser realizado e qualquer sinal resultando da área do arranjo contatada com o ácido nucleico de ligação de não alvo pode ser subtraído do sinal de ensaio derivado do alvo. Similarmente, ao usar um arranjo de microesfera em um ensaio consulte, por exemplo, a **Figura 1B),** uma porção de esferas pode ser incluída no ensaio que é contatada com o ácido nucleico de ligação de não alvo. O ensaio pode ser realizado e qualquer sinal resultando das esferas contatadas com o ácido nucleico de ligação de não alvo pode ser subtraído do sinal de ensaio derivado do alvo. Conforme notado, o ácido nucleico de

ligação de não alvo pode ou não ser conjugado com o substrato conforme desejado.

[00386] Em uma modalidade, o ácido nucleico de controle negativo de ligação de não alvo da invenção compreende um ácido nucleico que tem uma sequência pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% homóloga a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs. 230938 a 231008. Por exemplo, o ácido nucleico pode ter uma sequência pelo menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% homóloga a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs. 230938 a 231008. O ácido nucleico pode ter a sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs. 230938 a 231008, por exemplo, SEQ ID NO. 230938. O ácido nucleico pode ser usado como um ácido nucleico de controle negativo de acordo com os métodos e composições da invenção.

[00387] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para detectar uma presença ou o nível de uma entidade biológica em amostra biológica suspeita de conter a entidade biológica que compreende (a) fornecer uma composição que compreende um substrato e uma composição de controle negativo conforme descrito acima, em que o substrato compreende um ou mais agentes de ligação para a entidade biológica; (b) colocar a amostra biológica em contato com a composição fornecida na etapa (a); (c) detectar um sinal alvo que corresponde à quantidade de entidade biológica reconhecida pelos um ou mais agentes de ligação na etapa (b); e (d) normalizar o sinal alvo detectado na etapa (c) para um sinal de controle que corresponde à quantidade de sinal produzida pela composição de controle negativo, detectando, assim, a presença ou o nível da entidade biológica na amostra biológica. Conforme notado, normalizar o sinal alvo pode compreender subtrair o sinal de controle do sinal alvo.

[00388] Os um ou mais agentes de ligação podem ser um anticorpo, aptâmero ou outro agente de ligação apropriado revelado no presente documento ou conhecido na técnica. Similarmente, a entidade biológica pode ser qualquer biomarcador apropriado revelado no presente documento ou conhecido na técnica. Em uma modalidade, a entidade biológica compreende uma proteína. Em outra modalidade, a entidade biológica compreende uma microvesícula. Em tal caso, os um ou mais agentes de ligação podem ser específicos para um antígeno de superfície de microvesícula. O antígeno de superfície de microvesícula pode ser um antígeno revelado no presente documento, por exemplo, nas **Tabelas 3** a **4.** Em algumas modalidades, o antígeno de superfície de microvesícula é um biomarcador de uma doença ou distúrbio. Consequentemente, o método pode fornecer um diagnóstico, prognóstico ou teranóstico da doença ou distúrbio.

[00389] Em uma modalidade, a invenção fornece um polinucleotídeo isolado ou um fragmento do mesmo, identificado pelos métodos acima. A invenção fornece adicionalmente um polinucleotídeo isolado que tem uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 60% idêntica à sequência de nucleotídeos identificada pelos métodos acima. De maior preferência, a molécula de ácido nucleico isolada é pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de nucleotídeos identificada pelos métodos acima. No caso de um polinucleotídeo isolado que é mais longo do que ou equivalente em comprimento à sequência de referência, por exemplo, uma sequência identificada pelos métodos acima, a comparação é feita com o comprimento inteiro da sequência de referência. Quando o polinucleotídeo isolado é mais curto do que a sequência de referência, por exemplo, mais curto do que uma sequência identificada pelos métodos acima, a comparação é feita a um segmento da sequência de referência do mesmo comprimento (excluindo

qualquer laço exigido pelo cálculo de homologia).

[00390] Em um aspecto, a invenção fornece aptâmeros de controle negativo em que as sequências de aptâmero compreendem versões embaralhadas de um ácido nucleico de ligação de alvo. Por exemplo, aptâmeros no presente documento são revelados que ligam proteínas (por exemplo, EpCAM, PSMA) ou microvesículas (por exemplo, microvesículas de câncer de mama e próstata). Um controle negativo para quaisquer aptâmeros de ligação de alvo pode ser uma sequência embaralhada aleatoriamente dos mesmos.

[00391] A invenção fornece adicionalmente um kit para executar os métodos da invenção. Conforme descrito adicionalmente abaixo, o kit pode compreender um ou mais reagentes para executar o método. Em determinadas modalidades, os um ou mais reagentes compreendem a ligação de não alvo, ácido nucleico de controle negativo ou a composição de controle negativo. O kit pode compreender o substrato e/ou um agente de ligação de interesse a um alvo de interesse. A composição de controle negativo pode ser usada para normalizar um sinal produzido pela ligação de um agente de ligação e um alvo de interesse.

APTÂMEROS DE BLOQUEIO

[00392] Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos da invenção servem como um agente de bloqueio para o substrato. Seguindo a reação de acoplamento entre um substrato e uma molécula ou entidade desejada, por exemplo, um agente de ligação, os agentes de bloqueio podem ser aplicados ao substrato para minimizar as interações não específicas entre o substrato revestido e as moléculas não alvo. Os agentes de bloqueio podem ser selecionados para minimizar as interações não específicas, mas não interferir com as interações desejadas, tal como a interação específica entre uma molécula de interesse conjugada com o substrato e outra molécula de interesse em uma solução de teste. Os bloqueadores comumente usados incluem BSA (albumina

sérica bovina), caseína (uma proteína à base de leite), pepticase (caseína hidrolisada), tensoativos não iônicos (por exemplo, Tween® 20 e Triton® X-100), anticorpos não reativos ou fragmentos dos mesmos (por exemplo, sem espécie), FSG (gelatina de pele de peixe), gelatina pura ou uma hidrolase de gelatina, PEG (polietileno glicol), soro não reativo, proteína não reativa e vários bloqueadores comercialmente disponíveis conhecidos por aqueles na técnica. Uma proteína não reativa refere-se a uma proteína que deve ser interação mínima, se houver, com componentes de um ensaio.

[00393] As **Figuras 16A** e **16B** ilustram o uso de um aptâmero para bloquear um grupo carboxila não conjugado em um substrato. A **Figura 16A** ilustra a ligação de hidrogênio entre uma porção de um aptâmero **1601** a grupos carboxila **1602** ligados a um substrato plano **1603.** A **Figura 16B** ilustra a ligação de hidrogênio entre uma porção de um aptâmero **1601** a grupos carboxila **1602** ligados a um substrato de microesfera **1604.** Os grupos carboxila **1602** são adicionalmente ligados a um anticorpo **1605.** Guanina é o único nucleotídeo que pode formar duas ligações de hidrogênio.

[00394] Em um aspecto, a invenção fornece um ácido nucleico de não ligação. O ácido nucleico de não ligação pode ser selecionado para ter interação mínima, se houver, com os componentes de um ensaio de interesse. Por exemplo, o ácido nucleico de não ligação pode ter interação mínima, se houver, com as moléculas alvos de um ensaio de interesse. Entretanto, o aptâmero de bloqueio pode ligar outros componentes de ensaio, por exemplo, substratos, tubos, esferas, etc. minimizando, assim, a interação entre as moléculas alvos e quaisquer componentes de ensaio diferentes dos agentes de ligação específicos para as moléculas alvos. A invenção também fornece composições de bloqueio que compreendem o ácido nucleico de não ligação e um ou mais componentes de bloqueio selecionados a partir do grupo que

consiste em BSA (albumina sérica bovina), caseína (uma proteína à base de leite), pepticase (caseína hidrolisada), tensoativos não iônicos (por exemplo, Tween® 20 e Triton® X-100), anticorpos não reativos ou fragmentos dos mesmos (por exemplo, sem espécie), FSG (gelatina de pele de peixe), gelatina pura ou uma hidrolase de gelatina, PEG (polietileno glicol), soro não reativo, proteína não reativa e vários bloqueadores comercialmente disponíveis conhecidos por aqueles na técnica.

[00395] Em uma modalidade, o ácido nucleico de não ligação compreende uma sequência pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% homóloga a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs. 230938 a 231008. Por exemplo, o ácido nucleico pode ter uma sequência pelo menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou 100% homóloga a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs. 230938 a 231008. O ácido nucleico pode ter a sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs. 230938 a 231008, por exemplo, SEQ ID NO. 230938.

[00396] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método que compreende contatar o ácido nucleico de não ligação com um substrato para bloquear o substrato, contatar uma amostra biológica com o substrato bloqueado e detectar a ligação de uma ou mais entidades biológicas ao substrato. O ácido nucleico de não ligação pode ser incluído em uma composição de bloqueio fornecida acima. O substrato pode também ser um substrato tal como descrito no presente documento, incluindo, sem limitação, um substrato plano ou uma microesfera. Tal bloqueio pode inibir completamente ou em parte os eventos de ligação indesejados.

[00397] A invenção fornece adicionalmente um kit para executar os métodos da invenção. Conforme descrito adicionalmente abaixo, o kit

pode compreender um ou mais reagentes para executar o método. Em determinadas modalidades, os um ou mais reagentes compreendem o ácido nucleico de não ligação ou a composição de bloqueio. O kit pode compreender o substrato e/ou um agente de ligação de interesse a um alvo de interesse. O ácido nucleico de não ligação ou a composição de bloqueio podem ser usados para bloquear o substrato.

[00398] Em uma modalidade, a invenção fornece um polinucleotídeo isolado ou um fragmento do mesmo, identificado pelos métodos acima. A invenção fornece adicionalmente um polinucleotídeo isolado que tem uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 60% idêntica à sequência de nucleotídeos identificada pelos métodos acima. De maior preferência, a molécula de ácido nucleico isolada é pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de nucleotídeos identificada pelos métodos acima. No caso de um polinucleotídeo isolado que é mais longo do que ou equivalente em comprimento à sequência de referência, por exemplo, uma sequência identificada pelos métodos acima, a comparação é feita com o comprimento inteiro da sequência de referência. Quando o polinucleotídeo isolado é mais curto do que a sequência de referência, por exemplo, mais curto do que uma sequência identificada pelos métodos acima, a comparação é feita a um segmento da sequência de referência do mesmo comprimento (excluindo qualquer laço exigido pelo cálculo de homologia).

[00399] Em algumas modalidades, os aptâmeros de bloqueio são selecionados que se ligam a grupos funcionais, por exemplo, os grupos funcionais que estão presentes em um ou mais componentes de um ensaio biológico. Tais aptâmeros de ligação de grupo funcional são descritos em detalhes adicionais abaixo.

APTÂMEROS DE LIGAÇÃO DE GRUPO FUNCIONAL

[00400] Em um aspecto, a invenção fornece um aptâmero que tem

a capacidade de ligar um grupo funcional de interesse. Os grupos funcionais conforme usados no presente documento são grupos de átomos ou ligações dentro de moléculas que são responsáveis pelas reações químicas características dessas moléculas. O mesmo grupo funcional passará por reação(ões) química(s) igual(is) ou similar(es) independentemente do tamanho da molécula da qual o mesmo faz parte. Entretanto, sua reatividade relativa pode ser modificada por grupos funcionais próximos. Uma "porção química" pode ser um grupo funcional ou pode ser compreendido de um ou mais grupos funcionais.

[00401] Os átomos de grupos funcionais são ligados um ao outro e o resto da molécula por ligações covalentes. Quando o grupo de átomos ligados covalentemente possui uma carga líquida, o grupo pode ser referido como um íon poliatômico ou um íon complexo. Qualquer subgrupo de átomos de um composto também pode ser chamado de radical e se uma ligação covalente for rompida homoliticamente, os radicais de fragmento resultantes são referidos como radicais livres.

[00402] Os aptâmeros da invenção podem ser direcionados a vários grupos funcionais de interesse. O grupo funcional pode incluir, sem limitação, hidrocarbonetos, halogênios, grupos que contêm oxigênio (isto é, ligações de C-O), grupos que contêm nitrogênio, grupos que contêm enxofre, grupos que contêm fósforo ou grupos que contêm boro. Os hidrocarbonetos ilustrativos incluem, sem limitação, alcanos, alcenos, alquinos, derivados de benzeno, derivados de tolueno, alcanos ramificados ou de anel, carbocátions e carboânions. Os halogênios ilustrativos incluem, sem limitação, haloalcanos, fluoroalcanos, cloroalcanos, bromoalcanos e iodoalcanos. Os grupos ilustrativos que contêm oxigênio incluem, sem limitação, álcoois, cetonas, aldeídos, haletos de acila, carbonatos, carboxilatos, ácidos carboxílicos, ésteres, hidroperóxidos, éteres, hemiacetais, hemicetais, acetais, cetais, ortoésteres e ortocarbonatos. Os grupos ilustrativos que contêm nitrogê-

nio incluem, sem limitação, amidas, aminas, iminas, imidas, azidas, compostos azo, cianatos, nitratos, nitrilos, nitritos, compostos nitro, compostos nitrosos e derivados de piridina. Os grupos ilustrativos que contêm enxofre incluem, sem limitação, tióis, sulfetos, dissulfetos, sulfóxidos, sulfonas, ácidos sulfúnicos, ácidos sulfônicos, tiocianatos, isotianatos, tionas e tiais. Os grupos ilustrativos que contêm fósforo incluem, sem limitação, fosfinas, fosfanos, ácidos fosfônicos, fosfatos e fosfodiésteres. Os grupos ilustrativos que contêm boro incluem, sem limitação, ácidos borônicos, ésteres borônicos, ácidos borínicos e ésteres borínicos.

[00403] Os aptâmeros da invenção podem ser direcionados a um ou mais grupos funcionais selecionados a partir do grupo que consiste em acetais, grupos acila, haletos de acila, grupos alquenila, alcóxidos, grupos alcóxi, grupos alquinila, amidas, óxidos de amina, aminas, carbodiimidas, carboximidatos, ácidos carboxílicos, cianamidas, cianatos, ditiocarbamatos, enóis, ésteres, éteres, hidrazinas, hidrazonas, ácidos hidroxâmicos, imidas, isocianatos, isocianetos, isotiocianatos, cetais, cetenos, cetonas, grupos de saída, nitrilas, organoaletos, organofósforo, ortoésteres, oximas, fosfonofluoridatos, fosfonotioatos, fosforamidotioatos, fosforoditioatos, fosforofluoridatos, fosforotioatos, grupos de proteção, pirofosfatos, semicarbazidas, semicarbazonas, sulfamatos, ésteres de sulfonato, sulfonas, ácidos sulfônicos, grupos sulfonila, sulfoximinas, compostos sulfurila, tioamidas, tiocianatos, tioésteres, tiolatos, tionas, compostos tiofosforila e tiossulfinatos.

[00404] Os aptâmeros da invenção podem ser direcionados a um ou mais grupos funcionais selecionados a partir do grupo que consiste em acetal, grupo acetóxi, acetileto, anidrido ácido, grupo de ativação, cloreto de acila, haleto de acila, acilal, aciloína, acilsilano, álcool, aldeído, aldimina, alcano, alceno, alcóxido, cicloalcano de alquila, nitritos de alquila, alcino, aleno, amida, amidina, aminal, óxido de amina, azi-

da, azina, aziridina, azóxi, bifuncional, bistiosemicarbazona, biureto, ácido borônico, carbamato, carbamino, carbazida, carbeno, carbinol, éster de carbonato, carbonila, carboxamida, carboximidato, ácido carboxílico, formato de cloro, cumuleno, éster de cianato, cianimida, cianoidrina, grupos de desativação, depsídeo, diazo, diol, ditiocarbamato, enamina, enediina, enol, éter de enol, enona, enina, epissulfeto, epóxido, éster, éter, fluorossulfonato, haloidrina, halocetona, hemiacetal, hemiaminal, hemitioacetal, hidrazida, hidrazona, ácido hidroxâmico, hidroxila, hidroxilamina, imina, imínio, isotiourônio, ceteno, cetenimina, cetona, cetila, lactam, lactol, lactona, metina, grupo metila, nitrato, ileto de nitrila, nitrilimina, composto nitro, nitroamina, nitronato, nitrona, íon de nitrônio, nitrosamina, nitroso, ortoéster, osazona, oxaziridina, oxima, sal de n-oxoamônio, peróxido, ácido peróxi, carbeno persistente, fenóis, fosfaalceno, fosfaalcino, fosfato, fosfinato, fosfina, fosfina oxeto, fosfinito, fosfonato, fosfonito, fosfônio, fosforano, s-nitrosotiol, base de schiff, selenol, ácido selenônico, selona, semicarbazeto, semicarbazona, enol éter de silila, éter de silila, sulfenameto, ácido sulfênico, cloreto de sulfenila, sulfeto, sulfilimina, sulfanameto, ácido sulfínico, éster de sulfito, sulfonameto, sulfonanileto, sulfonato, sulfonila, haleto de sulfonila, sulfoxeto, sulfurila, sultona, telurol, tial, tioacetal, tioameto, tiocarbamato, tiocarbóxi, tiocianato, tioéster, tioéter, tiocetal, tiocetona, tiol, tiolactona, tioureia, tosilidrazona, triazeno, triol, ureia, vanilila, xantato, ileto e inolato.

[00405] O grupo funcional pode ser ancorado à superfície de um substrato para facilitar a ligação covalente de outras moléculas à superfície do substrato. Por exemplo, o substrato pode ser modificado por carboxila, modificador por amino, modificador por hidroxila, modificador por hidrazida e/ou modificador por clorometila.

[00406] Em uma modalidade, o aptâmero se ligam a um grupo carboxila. O aptâmero pode ter um alto teor de GC, por exemplo, maior

do que 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais de teor de GC. A sequência de ácido nucleico do aptâmero pode ser um ácido nucleico que tem uma sequência pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% homóloga a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs. 230938 a 231008. Por exemplo, o ácido nucleico pode ter uma sequência pelo menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100% homóloga a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em qualquer uma das SEQ ID NOs. 230938 a 231008. O ácido nucleico pode ter a sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs. 230938 a 231008, por exemplo, o aptâmero pode ter a sequência de SEQ ID NO. 230938.

[00407] Em algumas modalidades, o aptâmero é adicionalmente modificado para compreender pelo menos uma modificação química. A modificação química pode ser selecionada a partir de grupo que consiste: em uma substituição química em uma posição de açúcar; uma substituição química em uma posição de fosfato; e uma substituição química em uma posição de base do ácido nucleico. A modificação química pode também ser selecionada a partir do grupo que consiste em: incorporação de um nucleotídeo modificado, terminação 3', conjugação com um ligante de amina, conjugação com um alto peso molecular, composto não imunogênico, conjugação com um composto lipofílico, conjugação com um fármaco, conjugação com uma porção química citotóxica e identificação com um radioisótopo. A porção química citotóxica pode ser conjugada com a extremidade 5' do aptâmero, a mesma pode ser conjugada com a extremidade 3' do aptâmero ou uma porção química citotóxica pode ser conjugada com ambas as extremidades do aptâmero. Em algumas modalidades, a porção química citotóxica é encapsulada em uma nanopartícula, por exemplo, um lipossoma, dendrímero e/ou polímero em pente. Em outras modalida-

des, a porção química citotóxica compreende uma porção química citotóxica de molécula pequena. A porção química citotóxica de molécula pequena pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em vinblastina hidrazida, caliqueamicina, vinca alcaloide, uma criptoficina, uma tubulisina, dolastatina-10, dolastatina-15, auristatina E, rizoxina, epotilona B, epitilona D, taxoides, maitansinoides e variantes e derivados de qualquer um dos mesmos. A porção química citotóxica pode também ser uma toxina de proteína. Nas modalidades, a toxina de proteína é selecionada a partir do grupo que consiste em toxina da difteria, ricina, abrina, gelonina e exotoxina A de Pseudomonas. O radioisótopo pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em ítrio-90, índio-111, iodo-131, lutécio-177, cobre-67, rênio-186, rênio-188, bismuto-212, bismuto-213, astatina-211 e actínio-225. O composto de peso molecular alto não imunogênico pode ser um polialquileno glicol, tal como polietileno glicol.

[00408] Em outro aspecto, a invenção fornece uma composição que compreende um aptâmero da invenção, por exemplo, conforme descrito acima e um substrato. Conforme descrito no presente documento, o substrato pode ser qualquer sólido fisicamente separável ao qual um agente de ligação pode ser direta ou indiretamente ligado incluindo, porém sem limitação, superfícies fornecidas por microarranjos e poços, partículas tais como esferas, colunas, fibras ópticas, lenços, vidro e vidro modificado ou funcionalizado, quartzo, mica, membranas diazotizadas (papel ou náilon), poliformaldeído, celulose, acetato de celulose, papel, cerâmica, metais, metaloides, materiais semicondutores, pontos quânticos, esferas ou partículas revestidas, outros materiais cromatográficos, partículas magnéticas; plásticos (incluindo acrílicos, poliestireno, copolímeros de estiremo ou outros materiais, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, material de Teflon, etc.), polissacarídeos, náilon ou nitrocelulose, resinas, sílica ou materiais à ba-

se de sílica incluindo silício e silício modificado, carbono, metais, vidros inorgânicos, plásticos, cerâmicas, polímeros condutores (incluindo polímeros tal como polipirrol e poliindol); superfícies micro ou nanoestruturadas tais como arranjos de alta resolução de ácido nucleico, nanotubo, nanofio ou nanoparticulado superfícies decoradas; ou superfícies porosas ou géis tais como metacrilatos, acrilamidas, polímeros de açúcar, celulose, silicatos ou outros polímeros fibrosos ou com filamento. Adicionalmente, conforme é conhecido na técnica, o substrato pode ser revestido com o uso de revestimentos passivos ou quimicamente derivados com qualquer número de materiais, incluindo polímeros, tais como dextranos, acrilamidas, gelatinas ou agarose. O substrato pode também ser revestido com um grupo funcional para facilitar a ligação covalente à superfície de quaisquer moléculas desejadas. Tais revestimentos podem facilitar o uso do arranjo com uma amostra biológica. O substrato pode estar em qualquer forma útil. Em uma modalidade, o substrato é um substrato plano. Por exemplo, o substrato pode ser o poço de uma placa ou um microarranjo. Em outra modalidade, o substrato é uma microesfera. Por exemplo, o substrato pode ser uma esfera ou microesfera identificada fluorescentemente ou magnética.

[00409] Em uma modalidade, o substrato da composição compreende um grupo carboxila. Por exemplo, a superfície do substrato pode ser revestida com um grupo funcional tal como um grupo carboxila. O aptâmero pode ser ligado ao grupo carboxila. Em uma modalidade, o aptâmero liga o grupo carboxila por meio da ligação de hidrogênio.

[00410] Em algumas modalidades, o aptâmero serve como um agente de bloqueio para o substrato. Seguindo uma reação de acoplamento entre um substrato e uma molécula ou entidade desejada, por exemplo, um agente de ligação, os agentes de bloqueio podem ser aplicados ao substrato para minimizar interações não específicas entre

o substrato revestido e as moléculas não alvo. Os agentes de bloqueio podem ser selecionados para minimizar interações não específicas, mas não interferem com quaisquer interações desejadas, tais como interações específicas entre uma molécula de interesse conjugada com o substrato e outra molécula de interesse em uma solução de teste. Os bloqueadores comumente usados incluem BSA (albumina sérica bovina), caseína (uma proteína à base de leite), pepticase (caseína hidrolisada), tensoativos não iônicos (por exemplo, Tween® 20 e Triton® X-100), anticorpos não reativos ou fragmentos dos mesmos (por exemplo, sem espécie), FSG (gelatina de pele de peixe), gelatina pura ou uma hidrolase de gelatina, PEG (polietileno glicol), soro não reativo e vários bloqueadores comercialmente disponíveis conhecidos por aqueles na técnica.

[00411] Em uma modalidade, o substrato compreende um agente de ligação. O agente de ligação pode ser um ácido nucleico, proteína ou outra molécula que pode se ligar a um alvo de interesse, por exemplo, uma entidade biológica. Na modalidade preferencial, o agente de ligação tem especificidade para o alvo de interesse. O agente de ligação pode compreender DNA, RNA, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, Fabs, Fab', anticorpos de cadeia única, anticorpos sintéticos, aptâmeros (DNA/RNA), peptoides, zDNA, ácidos nucleicos de peptídeo (PNAs), ácido nucleicos bloqueados (LNAs), lectinas, compostos químicos de ocorrência natural ou sintéticos (incluindo, porém sem limitação, fármacos, reagentes de identificações), dendrímeros ou uma combinação dos mesmos. Por exemplo, o agente de ligação pode ser um anticorpo ou um aptâmero. Nas modalidades da invenção, o agente de ligação compreende um agente de identificação de proteína de membrana. Consulte, por exemplo, os agentes de identificação de proteína de membrana revelados em Alroy et al., Publicação de Patente nº US 2005/0158708.

[00412] A composição pode compreender entidades adicionais. Nas modalidades, a composição compreende uma entidade biológica. Por exemplo, a entidade biológica pode ser um ácido nucleico/polinucleotídeo, uma proteína ou uma microvesícula. Em uma modalidade, a proteína é associada a uma microvesícula. Por exemplo, a proteína pode ser um antígeno de superfície de microvesícula. A proteína pode também ser uma carga útil de microvesícula. O antígeno de superfície de microvesícula e/ou a carga útil podem ser um biomarcador revelado no presente documento, por exemplo, nas **Tabelas 3** e **4.**

[00413] Uma configuração exemplificativa de uma composição da invenção é mostrada na **Figura 17A.** A **Figura 17A** ilustra a ligação de hidrogênio entre uma porção de um aptâmero **1701** aos grupos carboxila **1702** ligados a um substrato **1703.** O agente de ligação **1704** é também ligado ao substrato **1703.** O agente de ligação tem especificidade para o alvo **1705,** que pode ser qualquer entidade biológica apropriada descrita no presente documento ou conhecida na técnica, tal como uma proteína, ácido nucleico, microvesícula, célula ou uma porção de qualquer um dos mesmos. Sem ater-se à teoria, o aptâmero **1701** pode servir para bloquear algumas ou todas as ligações indesejadas do alvo **1705** ou qualquer outra molécula ou entidade ao substrato **1703.** A **Figura 17B** mostra uma configuração alternativa em que uma entidade biológica de interesse é ligada ao substrato **1703.**

[00414] Conforme descrito adicionalmente abaixo, a invenção fornece um kit que compreende um aptâmero ou composição da invenção, tais como aqueles descritos acima.

[00415] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um método que compreende contatar o aptâmero da invenção com um substrato. O aptâmero pode ser um aptâmero da invenção tal como descrito acima. O substrato pode também ser um substrato tal como descrito acima, incluindo um substrato plano ou uma microesfera. O substrato po-

de compreender um grupo carboxila. Por exemplo, a superfície do substrato pode ser funcionalizada com porções químicas de carboxila. Nas modalidades, o aptâmero é ligado ao grupo carboxila. O aptâmero pode ser ligado ao grupo carboxila por meio de uma ligação de hidrogênio. Sem ater-se à teoria, o aptâmero pode servir para bloquear os grupos carboxila no substrato de eventos de ligação indesejados.

[00416] Em uma modalidade, o substrato compreende um agente de ligação. O agente de ligação pode ser qualquer agente de ligação revelado no presente documento ou conhecido na técnica que pode ser ligado por meio de ligações covalentes ou não covalentes ao substrato. Em algumas modalidades, o agente de ligação compreende um anticorpo ou aptâmero.

[00417] O método para contatar o aptâmero da invenção com um substrato pode compreender adicionalmente contatar o substrato com uma amostra que compreende um alvo do agente de ligação. Uma configuração possível para o método é mostrada na **Figura 17A.** Conforme mostrado na **Figura 17A,** o alvo **1705** é reconhecido pelo agente de ligação **1704** enquanto o grupo carboxila **1702** é mascarado pelo aptâmero **1701.** Nas modalidades, a superfície do substrato **1703** é coberta por grupos carboxila **1702** para facilitar a ligação covalente do agente de ligação **1704** ao substrato. Após a ligação do agente de ligação **1704** ao substrato **1703,** o aptâmero **1701** pode ser aplicado para bloquear qualquer grupo carboxila não conjugado **1702.** Finalmente, o substrato bloqueado **1703** pode ser contatado com uma amostra que compreende o alvo **1705.** O método pode aprimorar na capacidade de detectar os eventos de ligação entre o agente de ligação **1704** e alvo **1705.** Por exemplo, o bloqueio pelo aptâmero pode reduzir quaisquer eventos de ligação não específicos com o substrato **1703** que poderiam interferir com a ligação específica entre o agente de ligação **1704** e alvo **1705.** Alternativamente, o bloqueio pelo aptâ-

mero pode reduzir quaisquer eventos de ligação não específicos entre o alvo **1705** e o substrato **1703.** Uma pessoa versada na técnica apreciará que ambos os mecanismos podem operar simultaneamente. A **Figura 17B** mostra uma configuração alternativa em que uma entidade biológica de interesse é ligada ao substrato **1703.**

[00418] Em uma modalidade, a invenção fornece um polinucleotídeo isolado ou um fragmento do mesmo, identificado pelos métodos acima. A invenção fornece adicionalmente um polinucleotídeo isolado que tem uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 60% idêntica à sequência de nucleotídeos identificada pelos métodos acima. De maior preferência, a molécula de ácido nucleico isolada é pelo menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de nucleotídeos identificada pelos métodos acima. No caso de um polinucleotídeo isolado que é mais longo do que ou equivalente em comprimento à sequência de referência, por exemplo, uma sequência identificada pelos métodos acima, a comparação é feita com o comprimento inteiro da sequência de referência. Quando o polinucleotídeo isolado é mais curto do que a sequência de referência, por exemplo, mais curto do que uma sequência identificada pelos métodos acima, a comparação é feita a um segmento da sequência de referência do mesmo comprimento (excluindo qualquer laço exigido pelo cálculo de homologia).

[00419] A invenção fornece adicionalmente um kit para executar os métodos da invenção. Conforme descrito adicionalmente abaixo, o kit pode compreender um ou mais reagentes para executar o método. Em determinadas modalidades, os um ou mais reagentes compreendem o aptâmero e/ou o substrato.

[00420] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para detectar uma presença ou o nível de uma entidade biológica em amostra biológica suspeita de conter a entidade biológica. O método compre-

ende: (a) fornecer uma composição que compreende um ou mais agentes de ligação específicos à entidade biológica ligados a um substrato carboxilado, em que o substrato carboxilado é ligado ao aptâmero fornecido pela invenção; (b) colocar a amostra biológica em contato com a composição fornecida na etapa (a); e (c) detectar se a entidade biológica é reconhecida pelo um ou mais agentes de ligação na etapa (b), detectando assim a presença ou o nível da entidade biológica na amostra biológica. Uma configuração possível para o método é mostrada na **Figura 17A.** Conforme mostrado na Figura 17A, o alvo 1705 é reconhecido pelo agente de ligação 1704 enquanto o grupo carboxila 1702 é mascarado pelo aptâmero 1701. Nas modalidades, a superfície do substrato 1703 é coberta por grupos carboxila 1702 para facilitar a ligação covalente do agente de ligação 1704 ao substrato. Após a ligação do agente de ligação 1704 ao substrato 1703, o aptâmero 1701 pode ser aplicado para bloquear qualquer grupo carboxila não conjugado 1702. Finalmente, o substrato bloqueado 1703 pode ser contatado com uma amostra que compreende o alvo 1705. O método pode aprimorar na capacidade de detectar os eventos de ligação entre o agente de ligação 1704 e alvo 1705. Por exemplo, o bloqueio pelo aptâmero pode reduzir quaisquer eventos de ligação não específicos com o substrato 1703 que poderiam interferir com a ligação específica entre o agente de ligação 1704 e alvo 1705. Alternativamente, o bloqueio pelo aptâmero pode reduzir quaisquer eventos de ligação não específicos entre o alvo **1705** e o substrato 1703. Uma pessoa versada na técnica apreciará que ambos os mecanismos podem operar simultaneamente. A **Figura 17B** mostra uma configuração alternativa em que uma entidade biológica de interesse é ligada ao substrato **1703.**

[00421] A entidade biológica pode ser qualquer entidade apropriada que pode ser detectada quando reconhecida pelo agente de ligação. Em uma modalidade, a entidade biológica compreende uma proteína

ou polipeptídeo. Conforme usado no presente documento, "proteína", "polipeptídeo" e "peptídeo" são usados de modo intercambiável a não ser que declarado de outra maneira. A entidade biológica pode ser um ácido nucleico, incluindo DNA, RNA e várias subespécies de qualquer um dos mesmos conforme revelado no presente documento ou conhecido na técnica. A entidade biológica pode compreender um lipídeo. A entidade biológica pode compreender um carboidrato. A entidade biológica pode também ser um complexo, por exemplo, um complexo que compreende proteína, ácidos nucleicos, lipídeos e/ou carboidratos. Em algumas modalidades, a entidade biológica compreende uma microvesícula. Em tais casos, o agente de ligação pode ser um agente de ligação a um antígeno de superfície de microvesícula, por exemplo, uma proteína. Os antígenos de superfície de microvesícula gerais incluem tetraspanina, CD9, CD63, CD81, CD63, CD9, CD81, CD82, CD37, CD53, Rab-5b, Anexina V e MFG-E8. Os antígenos de superfície de microvesícula gerais adicionais são fornecidos na Tabela 3 no presente documento.

[00422] O antígeno de superfície de microvesícula pode também ser um biomarcador de uma doença ou distúrbio. O método pode fornecer um diagnóstico, prognóstico ou teranóstico da doença ou distúrbio. Por exemplo, as uma ou mais proteínas podem compreender um ou mais dentre PSMA, PCSA, B7H3, EpCAM, ADAM-10, BCNP, EGFR, IL1B, KLK2, MMP7, p53, PBP, SERPINB3, SPDEF, SSX2 e SSX4. Esses marcadores podem ser usados para detectar um câncer de próstata. Os antígenos de superfície de microvesícula adicionais são fornecidos nas **Tabelas 3** e **4** no presente documento.

[00423] A invenção fornece adicionalmente um kit para executar os métodos da invenção. Conforme descrito adicionalmente abaixo, o kit pode compreender um ou mais reagentes para executar o método. Em determinadas modalidades, os um ou mais reagentes compreendem o

aptâmero, o substrato e/ou o agente de ligação. O kit pode compreender o substrato revestido com o grupo carboxila, instruções para conjugar um agente de ligação de interesse com o substrato e o aptâmero. O aptâmero pode ser usado para bloquear quaisquer grupos carboxila não conjugados.

[00424] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para aprimorar a ligação que compreende: (a) colocar um substrato em contato com um aptâmero que tem a capacidade de ligar um grupo carboxila, em que o substrato também compreende uma ou mais moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeo selecionadas; e (b) contatar o substrato com um agente de ligação que tem a capacidade de ligar a molécula de ácido nucleico ou polipeptídeo, com isso o aptâmero que se liga ao grupo carboxila aumenta a ligação do agente de ligação à molécula de ácido nucleico ou polipeptídeo. O aptâmero pode ser um aptâmero da invenção, por exemplo, um aptâmero que tem uma sequência selecionada a partir das SEQ ID NOs. 230938 a 231008. O substrato pode ser um substrato tal como descrito no presente documento ou conhecido na técnica, incluindo substratos planos ou microesferas/esferas. Um esquema ilustrativo é mostrado na **Figura 17A** e na **Figura 17B.** Em relação à **Figura 17A,** o substrato **1703** compreende as uma ou mais moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeo selecionadas **1704** que, nessa ilustração, representam um anticorpo. O aptâmero **1701** é mostrado ligando um grupo carboxila **1702** na superfície do substrato **1703.** O agente de ligação **1705** é uma molécula ou entidade que liga as uma ou mais moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeo selecionadas **1704.** Em relação à **Figura 17B,** o substrato **1703** compreende as uma ou mais moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeo selecionadas **1705** que, nessa ilustração, representam uma entidade alvo, por exemplo, uma proteína ou microvesícula. O aptâmero **1701** é mostrado ligando um grupo carboxila **1702** na superfície do

substrato **1703.** O agente de ligação **1704** é um anticorpo específico para as uma ou mais moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeo selecionadas **1705.** Uma pessoa versada na técnica apreciará que vários agentes de ligação podem ser usados conforme revelado no presente documento ou conhecido na técnica.

[00425] O ácido nucleico ou polipeptídeo pode ser covalentemente ligado a um grupo carboxila por meio de uma ligação de amida. Uma ligação de amida ou ligação de peptídeo é uma ligação química covalente formada entre duas moléculas quando o grupo carboxila de uma molécula reage com o grupo amino da outra molécula, causando a liberação de uma molécula de água.

[00426] Os aptâmeros da invenção podem ser identificados com o uso de qualquer metodologia de seleção útil. Por exemplo, um aptâmero pode ser identificado com o uso de SELEX ou variantes do mesmo, tal como descrito em Pan e Clawson, Primer-free aptamer selection using a random DNA library. Methods Mol Biol. 2010;629:369 a 385; tal publicação é incorporada no presente documento a título de referência em sua totalidade. O aptâmero pode ser identificado com o uso de métodos de seleção positiva e negativa tal como descrito no presente documento. O aptâmero pode ser identificado com o uso do método descrito por Mei, H, et al. Functional-group specific aptamers indirectly recognizing compounds with alkyl amino group. Anal Chem. 4 de setembro de 2012;84(17):7323 a 7329. Epub 21 de agosto de 2012; tal publicação é incorporada no presente documento a título de referência em sua totalidade.

KITS

[00427] A invenção também fornece um kit que compreende um ou mais reagentes para executar os métodos da invenção. Por exemplo, os um ou mais reagentes podem ser os um ou mais aptâmeros, um tampão, bloqueador, enzima ou combinação dos mesmos. Os um ou

mais reagentes podem compreender quaisquer reagentes úteis para executar os métodos expostos, incluindo, sem limitação, bibliotecas de aptâmero, substratos tais como microesferas ou arranjos planos ou poços, reagentes para e/ou isolamento de microvesícula, aptâmeros direcionados a alvos específicos, conjuntos de aptâmero que facilitam a detecção de um biomarcador/população de microvesícula, reagentes tais como iniciadores para sequenciamento ou amplificação de ácido nucleico, arranjos para hibridização de ácido nucleico, identificações detectáveis, solventes ou tampões ou similares, vários ligantes, vários componentes de ensaio, bloqueadores e similares. Os um ou mais reagentes podem também compreender várias composições fornecidas pela invenção. Em uma modalidade, os um ou mais reagentes compreendem um ou mais aptâmeros da invenção. Os um ou mais reagentes podem compreender um substrato, tal como um substrato plano, coluna ou esfera. O kit pode conter as instruções para executar os vários ensaios com o uso dos um ou mais reagentes.

[00428] Em uma modalidade, o kit compreende um aptâmero ou composição fornecida no presente documento. O kit pode ser configurado para executar os métodos fornecidos no presente documento. Por exemplo, o kit pode incluir um aptâmero da invenção, um substrato ou tanto um aptâmero da invenção quanto um substrato.

[00429] Em uma modalidade, o kit é configurado para executar um ensaio. Por exemplo, o kit pode conter um ou mais reagentes e instruções para detectar a presença ou o nível de uma entidade biológica em uma amostra biológica. Em tais casos, o kit pode incluir um ou mais agentes de ligação a uma entidade biológica de interesse. O um ou mais agentes de ligação podem ser ligados a um substrato.

[00430] Em uma modalidade, o kit compreende um conjunto de aptâmeros que fornece um perfil de aptâmero particular para uma amostra biológica. Um perfil de aptâmero pode incluir, sem limitação, um

perfil que pode ser usado para caracterizar uma doença ou distúrbio. Por exemplo, a doença ou distúrbio pode ser um distúrbio ou doença proliferativa incluindo, sem limitação, um câncer.

EXEMPLO 1: IDENTIFICAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE DNA QUE LIGAM UM ALVO

[00431] O alvo é afixado a um substrato sólido, tal como uma lâmina de vidro ou uma esfera magnética. Para uma preparação de esfera magnética, esferas são incubadas com uma concentração de proteína alvo que varia de 0,1 a 1 mg/ml. A proteína alvo é conjugada com as esferas de acordo com um composto químico fornecido pelo fabricante de esfera particular. Tipicamente, isso envolve o acoplamento por meio de um processo de grupo funcional N-hidroxissuccinimida (NHS). Os grupos NHS não ocupados são tornados inativos seguindo a conjugação com o alvo.

[00432] Os oligonucleotídeos (oligos) gerados aleatoriamente de um determinado comprimento, tal como 32 pares de base de comprimento, são adicionados a um recipiente que retém o alvo estabilizado. Cada oligo contém 6 nucleotídeos de timina (uma "cauda de timina") na extremidade prime ou 5 ou 3, juntamente com uma única molécula de biotina conjugada com a cauda de timina. As moléculas adicionais de biotina poderiam ser adicionadas. Cada oligo é também fabricado com uma extensão curta de nucleotídeos em cada extremidade (5 a 10 pares de base de comprimento) que corresponde a iniciadores de amplificação para PCR ("caudas de iniciador"). As sequências de um conjunto grande de aptâmeros de 32-mer são mostradas nas SEQ ID NOs. 1 a 230810. As sequências são mostradas ausentes nas caudas de timina ou caudas de iniciador.

[00433] Os oligonucleotídeos são incubados com o alvo a uma temperatura especificada e o tempo em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) a 37 graus Celsius em um volume de reação de 500

microlitros.

[00434] A combinação de alvo/oligo é lavada 1 a 10 vezes com o tampão para remover o oligo não ligado. O número de lavagens aumenta com cada repetição do processo (conforme notado abaixo).

[00435] Os oligos ligados ao alvo são eluídos com o uso de um tampão que contém um agente caotrópico tal como ureia a 7 M ou SDS 1% e coletados com o uso da etiqueta de biotina. Os oligos são amplificados com o uso da reação em cadeia de polimerase com o uso de iniciadores específicos para sequências 5' e 3' adicionadas à região randomizada dos oligos. Os oligos amplificados são adicionados ao alvo novamente para outro ciclo da seleção. Esse processo é repetido conforme necessário para observar o enriquecimento de ligação.

EXEMPLO 2: ENSAIO COMPETITIVO

[00436] O processo é realizado como no **Exemplo 1** acima, exceto que um ligante conhecido ao alvo, tal como um anticorpo, é usado para eluir a espécie de oligo ligado (em oposição ou adicionalmente ao agente caotrópico). Nesse caso, o anticorpo anti-EpCAM junto à Santa Cruz Biotechnology, Inc. foi usado para eluir os aptâmeros da EpCAM alvo.

EXEMPLO 3: AVALIAÇÃO E ANÁLISE DE AFINIDADE

[00437] Os aptâmeros gerados a partir dos ensaios de ligação descritos acima são sequenciados com o uso de uma plataforma de sequenciamento de alto rendimento, tal como a Ion Torrent junto à Life Technologies:

[00438] Preparação de Biblioteca – Os aptâmeros foram agrupados após ligar códigos de barras e sequências de adaptador (Life Technologies) de acordo com os protocolos de fabricante. Em resumo, os conjuntos equimolares dos aptâmeros foram feitos com o uso das etapas a seguir: Uma alíquota analisada de cada biblioteca com um instrumento Bioanalyzer™ e Kit Agilent DNA 1000 ou Kit Agilent High

Sensitivity, conforme apropriado para a concentração de biblioteca final. A concentração molar (nmol/l) de cada biblioteca de amplicon foi determinada com o uso do software comercialmente disponível (Agilent).

[00439] Um conjunto equimolar da biblioteca foi preparado na maior concentração possível.

[00440] A concentração combinada do estoque de biblioteca agrupado foi calculada.

[00441] O fator de diluição de modelo do conjunto de biblioteca foi determinado com o uso da equação a seguir: Fator de Diluição de Modelo = (Concentração de conjunto de biblioteca [pM])/26 pM).

[00442] Preparação de Modelo — Com o uso de uma biblioteca recentemente diluída, o conjunto de aptâmeros resultante de ensaios de ligação fornecidos acima foram sequenciados com o uso de protocolos de sequenciamento convencionais. Os métodos de sequenciamento de alto rendimento (NextGen) podem ser usados conforme desejado. As sequências de conjunto de aptâmeros são identificadas nas SEQ ID NOs. 1 a 230810.

[00443] Vinte aptâmeros foram selecionados com base nos ensaios diretos ou competitivos que avaliam a ligação à EpCAM (conforme descrito acima). Consulte, o **Exemplo 7** e a **Tabela 8** para as sequências selecionadas.

[00444] Medições de Afinidade — Esses vinte aptâmeros foram, então, testados quanto à afinidade de ligação com o uso de uma plataforma de ligação *in vitro*. SPR pode ser usado para essa etapa, por exemplo, uma máquina Biacore SPR com o uso do software de controle T200, conforme segue:

[00445] Diluir o antígeno a uma concentração de 32 nM.

[00446] Preparar as diluições necessárias para cinética, iniciando a 32 nM, preparar diluições de duas vezes de antígeno até 0,5 nM.

[00447] O software de controle Biacore 200 é programado com as condições a seguir: Solução: Tampão HBS-EP+; Número de ciclos: 3; Tempo de contato: 120 s; Taxa de fluxo: 30 µl/min; Tempo de dissociação: 300s; Solução: Glicina-HC1 pH 2,5; Tempo de contato: 120 s; Taxa de fluxo: 20 µl/min; Período de estabilização: 0 s. As afinidades de ligação desses aptâmeros são, então, medidas com o uso do ensaio SPR acima ou um ensaio in vitro alternativo que avalia o aptâmero quanto a uma função desejada.

[00448] A Figura 4 mostra os dados SPR para o aptâmero BTX176881 (SEQ ID NO: 98883). A figura compreende um gráfico de associação e dissociação do modelo de ajuste de 1:1 dos aptâmeros biotinilados para a proteína de EPCAM nas concentrações indicadas (nM). A Tabela 5 mostra os valores K_d calculados a partir das medições SPR que são ilustradas na Figura 4. Adicionalmente, a Tabela 5 mostra os dados SPR e os valores K_d calculados para BTX187269 (SEQ ID NO: 109271) e Aptâmero 4 (SEQ ID NO. 1).

TABELA 5: VALORES K_D CALCULADOS A PARTIR DAS MEDIÇÕES SPR

Aptâmero imobilizado	Analito	Conc (nM)	Resposta	K_d (nM)	R^2 Completo	Chi^2 Completo
BTX176881 (SEQ ID No: 98883)	Proteína de EPCAM	500	0,2434	8,40	0,989322	0,179008
		250	0,136	8,40	0,989322	0,179008
		100	0,0776	8,40	0,989322	0,179008
BTX187269 (SEQ ID NO: 109271)	Proteína de EPCAM	500	0,2575	7,12	0,990323	0,215697
		250	0,1584	7,12	0,990323	0,215697
		100	0,0551	7,12	0,990323	0,215697
Aptâmero 4 (SEQ ID NO.1)	Proteína de EPCAM	500	0,2742	10,10	0,986276	0,299279
		250	0,1618	10,10	0,986276	0,299279
		100	0,0809	10,10	0,986276	0,299279

**Valores K_d, R^2 e Chi^2 por ajuste Global para método de referência único.*

EXEMPLO 4: ANÁLISE DE MOTIVO

[00449] O processo nos Exemplos acima é seguido para identificar um aptâmero de alta afinidade para um alvo de interesse. Uma vez

que um aptâmero de alta afinidade é identificado, sua sequência é, então, analisada com o uso de um programa de software para estimar sua estrutura de dobra bidimensional. Os algoritmos e programas de alinhamento de sequência bem conhecidos para a identificação de motivo podem ser usados para identificar os motivos de sequência e reduzir a dimensionalidade de até mesmo conjuntos de dados grandes das sequências. Ademais, os programas de software tais como Vienna e mfold são bem conhecidos por aqueles versados na técnica da seleção de aptâmero e podem ser usados para agrupar adicionalmente sequências com base em motivos de estrutura secundários (formatos compartilhados). Consulte as Figuras 5A e 5B, por exemplo, as previsões de estrutura. A estrutura de curso secundária compartilhada não garante uma estrutura tridimensional idêntica. Portanto, a validação de "laboratório úmido" dos aptâmeros é ainda útil como nenhum conjunto de ferramentas *in silico* ainda foi capaz de prever precisamente o aptâmero ideal dentre um conjunto de candidatos de aptâmero.

[00450] Com o uso do mesmo software, as sequências produzidas no sequenciamento de alto rendimento de um conjunto de candidatos (produzido conforme descrito no Exemplo 1 acima) são analisadas quanto a motivos estruturais similares ao aptâmero de alta afinidade. As comparações de estrutura baseiam-se nos cálculos de energia livre realizados com o uso de Vienna. As Tabelas 6 e 7 apresentam uma seleção ilustrativa dos cálculos de energia livre para os vinte principais membros de biblioteca calculados para ter alta identidade para o Aptâmero 4 (SEQ ID NO. 1) e Oligo6 (SEQ ID NO. 230810), respectivamente. Nas Tabelas 6 e 7, a coluna "Identidade" indica a proporção de alinhamento idêntica do Aptâmero 4 para as sequências de biblioteca indicadas. O valor de identidade compreende o resultado do alinhamento pareado dividido pelo número de nucleotídeos no alinhamento. A coluna "mfeCode" compreende a saída de "notação de ponto-

parêntese" do Vienna 2.0.7. As estruturas secundárias livres de pseudo-nó podem ser representadas na notação de ponto-parêntese eficiente em termos de espaço, que é usada por todo o pacote de RNA Vienna. Em resumo, uma estrutura em uma sequência de comprimento n é representada por uma cadeia de comprimento igual que consiste em parênteses e pontos. Um par de bases entre a base i e j é representado por um '(' na posição i e a ')' na posição j e as bases não pareadas são representadas por pontos. As informações adicionais na notação de ponto-parêntese mfeCode está disponível em http://ma.tbi.univie.ac.at/help.html. A coluna "mfeValue" nas Tabelas 6 e 7 fornece o cálculo de energia livre mínima conforme calculado com Vienna 2.0.7 com arquivo de parâmetro padrão.

TABELA 6: COMPARAÇÃO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA E IDENTIDADE PARA O APTÂMERO 4

ID	Sequência (5'->3')	Identidade	mfeCode	Valor mfe (kcal/mol)
Aptamer4 (SEQ ID NO. I)	CCCCCCGAATCACATGACTTGGGCGGGGGTCG	1	(((((((.((....)).)))))..))).....	-13,5
BTX175447 (SEQ ID NO. 97449)	CCCCCCGAATCACATGACTTGGGCGGGGGTCG	1	(((((((.((....)).)))))..))).....	-13,5
BTX100359 (SEQ ID NO. 22361)	CCGCCAGCATAACTGACTAGTGCTGTCTTTTT	0,78125	....((((((.........)))))).....	-6
BTX6393 (SEQ ID NO. 160929)	CCGGCCATCACTGCCTTTAACGTGGTGGTTTT	0,75	..(((((((((.........)))))))))..	-10,7
BTX141572 (SEQ ID NO. 63574)	TCCTCACGAATGTGACTGACGTGGGGTTTTAC	0,75	.(((((((.........))))))).....	-9,3
BTX53793 (SEQ ID NO. 208329)	TCTCCTGAATGTGTTGTTCGGGGATGTTTTGT	0,75	..(((((((.....)))))))........	-7,8
BTX176890 (SEQ ID NO. 98892)	CCGCGCTACATCACATGCTGGGGCAGGTCGCC	0,75	((((.((((((...)))).)))).)).))....	-7,5
BTX34119 (SEQ ID NO. 188655)	ACCGAACAGTGTCGGGCGGGGTGGAGGTGTTT	0,75	.(((..(......)..)))...........	-5,1

ID	Sequência (5'->3')	Identidade	mfeCode	Valor mfe (kcal/mol)
BTX4758 (SEQ ID NO. 159294)	CCCACGCTACACCTGGCGAGCGTTCGTTTTTT	0,75	....(((((....))))).....	-5
BTX 175446 (SEQ ID NO. 97448)	CCCCCCGAATCACAGGTTGGTCCGTTGAAATT	0,75	((..((.......))..)).....	-2,9
BTX6079 (SEQ ID NO. 160615)	CCGCGATCCACGTAAGGTTCGGGGGTCTCTTT	0,71875	((.(((.((.....)).))).))....	-10,6
BTX112777 (SEQ ID NO. 34779)	CTGGGTCCTGTTGGGCTGGGGTCGGTCTTGAT	0,71875	((.(((((....)))))..)).....	-10,4
BTX18213 (SEQ ID NO. 172749)	TAGCCCGCCAGATACTTGGGTGGGAATCCTTT	0,71875	...((((((.........))))))....	-10,2
BTX186007 (SEQ ID NO. 108009)	CTCTGCTCAATGCGTGGGCTGGGGCGGTCAGT	0,71875	..((((((...((....))..))))))....	-10,1
BTX178871 (SEQ ID NO, 100873)	CCTTGAAGACTGGGCGCTGGTCCTAGCTCTTT	0,71875	....((((((((((....).))))).))))	-9,7
BTX27728 (SEQ ID NO. 182264)	GCGCTGGAACTCGTGACAGTGCGTGGCGTTTT	0,71875	((((((.........)))))).....	-8,8
BTX39166 (SEQ ID NO. 193702)	CCAGCCCTGGATCCCATTGACCTCGGGGATTG	0,71875	.(((((((((.((.....)).).))))).)))	-7,6
BTX79672 (SEQ ID NO. 1674)	AATCACCGATGGGCGGGGAATCACGTGTTGGT	0,71875	....(((((((.(.((....)).).)))))))	-7,6
BTX 13384 (SEQ ID NO. 167920)	GCGACGCATGTGTTGTGCTGTGCTCGTGTTTT	0,71875	((((.((((((.....)).))))))))....	-7,5
BTX 4712 (SEQ ID NO. 159248)	CCCACAATCGACAGCGAACTTGGGGGGTGCGG	0,71875	((((...(((....)))...))))....	-7,5

[00451] No total, 880 sequências tinham uma pontuação de identidade de 0,65 ou maior em comparação ao Aptâmero4. As SEQ ID NOs. dessas sequências ordenadas por identidade para o Aptâmero4 de modo decrescente são 1, 83833, 404, 192457, 46196, 181195, 85436, 159336, 174291, 83832, 188968, 14201, 91259, 95567, 87637, 152235, 164943, 208225, 37604, 173781, 229801, 162649, 141236, 229277, 197636, 208288, 222015, 46488, 41404, 20282, 37215,

164674, 88106, 230291, 222830, 86840, 106217, 153548, 69938, 22919, 148527, 23133, 62644, 150047, 195461, 165410, 95492, 187335, 143568, 229624, 211801, 89529, 49853, 86203, 229309, 148998, 227639, 12831, 207967, 83812, 100031, 24403, 44443, 86417, 85531, 177048, 222142, 224357, 191046, 25876, 176402, 78410, 169614, 170692, 220915, 227125, 88394, 211129, 167260, 21437, 95247, 229151, 1344, 18302, 94815, 105377, 130159, 47458, 77703, 229665, 446, 6632, 222154, 5925, 89185, 166992, 82685, 190696, 227012, 165589, 140293, 165488, 184824, 22443, 89500, 139968, 26382, 223375, 21852, 175936, 191752, 227183, 229246, 28597, 79173, 218544, 90815, 115055, 118391, 147334, 228629, 63019, 112671, 14867, 31453, 49788, 83331, 170600, 182781, 65037, 77839, 219756, 22498, 169879, 84231, 87890, 87951, 93241, 95274, 25145, 229605, 229647, 145760, 5602, 5944, 129548, 229432, 148342, 165400, 62962, 71321, 130354, 227261, 96175, 1923, 3602, 88544, 112311, 229170, 168079, 195903, 203783, 129930, 208300, 215426, 224543, 227717, 82099, 221395, 10847, 61398, 99233, 165100, 208999, 15946, 44819, 164778, 190331, 224367, 181869, 221786, 229009, 67955, 87277, 202044, 63204, 97683, 119091, 127373, 176380, 2790, 182858, 226993, 40773, 86822, 149227, 189749, 223226, 109, 7382, 142902, 190403, 2511, 14476, 125189, 224206, 86454, 130486, 147726, 108815, 18082, 190843, 45237, 83778, 191228, 229117, 96465, 171461, 186224, 82242, 176191, 181376, 184432, 147735, 214179, 159297, 2709, 45318, 105849, 171053, 222127, 52894, 125871, 164642, 84142, 45997, 86837, 94742, 130073, 175675, 222007, 112130, 221515, 127575, 141509, 525, 173934, 201340, 135715, 209835, 23712, 83926, 6015, 215164, 206485, 5690, 50212, 118847, 61503, 202365, 225979, 8859, 45779, 176358, 113963, 45463, 66945, 188869, 15231, 22936, 84157, 12271, 58672, 135632, 180563, 200213, 12292, 74327, 88219, 163713,

208378, 229071, 3089, 12468, 140336, 155915, 331, 115507, 206325, 225180, 230194, 21183, 113125, 229023, 41920, 105992, 210427, 213341, 76296, 104423, 146335, 178047, 228984, 12604, 83530, 90950, 185519, 222186, 222283, 27831, 88097, 116409, 154939, 168206, 5549, 195919, 217797, 22658, 154805, 171036, 214987, 225767, 62979, 85662, 222046, 224554, 226930, 227276, 27161, 166910, 202893, 8124, 8714, 23847, 39241, 27746, 165206, 166056, 423, 36640, 86849, 137280, 190114, 202287, 230304, 5179, 6067, 6505, 6611, 41483, 37479, 45749, 107382, 117315, 202535, 29748, 82654, 84060, 87907, 157362, 206589, 223382, 28495, 44462, 62270, 100524, 173820, 192490, 222297, 1390, 19210, 22495, 118163, 133889, 179659, 192074, 204965, 2461, 77762, 106037, 166379, 167776, 182280, 228707, 808, 47456, 152081, 222818, 229813, 148355, 148387, 167853, 167857, 187723, 357, 163173, 175586, 224340, 12254, 24110, 158863, 199558, 228579, 500, 85061, 94630, 162650, 165617, 168065, 222121, 228609, 51102, 112611, 125773, 190879, 215724, 227812, 229506, 442, 12284, 36658, 44057, 95079, 97943, 167653, 177081, 204180, 209922, 18882, 62824, 89180, 107532, 131610, 179747, 181924, 208078, 208690, 631, 46216, 96215, 105283, 150525, 166187, 227449, 103425, 185880, 837, 26023, 157638, 165823, 175971, 228232, 230020, 36086, 61478, 171159, 177192, 196612, 215002, 225782, 84127, 88107, 111059, 147670, 149254, 166308, 175530, 206924, 221620, 2514, 2717, 23418, 51045, 83895, 83974, 84095, 84146, 86150, 104166, 106868, 152996, 185740, 222844, 229172, 229254, 27401, 160516, 165619, 172635, 189302, 220615, 221183, 229356, 230021, 83828, 124068, 152013, 181636, 190744, 194448, 195157, 196263, 215307, 229390, 229807, 28160, 33150, 84689, 150169, 170181, 175758, 202239, 1872, 7459, 22350, 39454, 82329, 101757, 151736, 162225, 7946, 83756, 159512, 164932, 185169, 217855, 229824, 7381, 45608,

55427, 85522, 92756, 94362, 149604, 166378, 166572, 185619, 1200, 20260, 20952, 22787, 78128, 80744, 108103, 116667, 129831, 130067, 168581, 178969, 208724, 222116, 8122, 144078, 164779, 218167, 220960, 22637, 24612, 24944, 106584, 156344, 167262, 222022, 228813, 44051, 77865, 82089, 88152, 93245, 94935, 152153, 190789, 200547, 201908, 225916, 1323, 2837, 10181, 22043, 25177, 26567, 93412, 104099, 127374, 130454, 147664, 150419, 177674, 183092, 9715, 12644, 22918, 40833, 77732, 82992, 83365, 210202, 229833, 3976, 11015, 13524, 65438, 90954, 98759, 148864, 163106, 163192, 74660, 79359, 83110, 95108, 95525, 112590, 171072, 172776, 183058, 224159, 226062, 228518, 12809, 15906, 23455, 42107, 76961, 91318, 129989, 137160, 155158, 177958, 2759, 46018, 48333, 78031, 86611, 128087, 135823, 180253, 191245, 209093, 230546, 20542, 63496, 71991, 83901, 142432, 171932, 227515, 61337, 160422, 172960, 173608, 189801, 210407, 216678, 229101, 65755, 79467, 94134, 98247, 197374, 202491, 225597, 77739, 94166, 95667, 151387, 168443, 187779, 220937, 5921, 7576, 148846, 177037, 190387, 190580, 190594, 229692, 12103, 32693, 92399, 114220, 163673, 223983, 652, 5953, 22926, 45297, 119857, 181369, 190352, 227216, 173208, 191585, 207218, 214989, 229099, 229137, 19556, 20676, 20726, 55409, 63187, 82431, 83731, 91667, 108942, 167838, 208244, 208660, 226483, 486, 98243, 147746, 186732, 190125, 222129, 13059, 47113, 63281, 63816, 147364, 191597, 194319, 226191, 80867, 88703, 141125, 165353, 7836, 44100, 84750, 97305, 151159, 163292, 166160, 174457, 187346, 206359, 212868, 3743, 4210, 7231, 77720, 101878, 151668, 158168, 203331, 226481, 12095, 51060, 78232, 85545, 145684, 164617, 169839, 180765, 203890, 209861, 222276, 12511, 120891, 163107, 171003, 176280, 20466, 195366, 222140, 72978, 141852, 158096, 162904, 2767, 8748, 105451, 111950, 229203, 229612, 6031, 12231, 93001, 172784,

174080, 195635, 222160, 2077, 148220, 190414, 207102, 84111, 89221, 177736, 222281, 51841, 83873, 112121, 129029, 130969, 147734, 148231, 148343, 152004, 172491, 192443, 200375, 230195, 165471, 169651, 87960, 230440, 83966, 101115, 158138, 191593, 191892, 229621, 13073, 31147, 44055, 71915, 905, 130121, 130286, 83984, 94826, 201315, 2654, 3052, 5288, 62828, 109159, 45345, 57797, 77490, 83203, 150059, 180295, 210195, 227209, 229074, 7529, 86462, 87778, 130059, 229341, 83520, 14855, 45242, 51014, 89143, 163311, 164805, 206146, 210232, 156377, 172805, 192953, 4313, 22875, 63708, 77497, 165430, 187428, 190477, 105395, 176513, 172889, 217595, 2587, 75016, 193089, 12089, 211658, 61730, 61745, 63353, 83986, 84548, 94951, 124283, 229118.

TABELA 7: COMPARAÇÃO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA E IDENTIDADE PARA OLIGO6

ID	Sequência (5'->3')	Identidade	mfeCode	Valor mfe (kcal/mol)
BTX28676 (SEQ ID NO. 183212)	GGCGCAGGGGGGGGCCCAGAGTATGGGGCCTG	1	..........(((.((((.....)))).))).	-12,2
Oligo6 (SEQ ID NO. 230810)	GGCGCAGGGGGGGGCCCAGAGTATGGGGCCTG	1	..........(((.((((.....)))).))).	-12,2
BTX165089 (SEQ ID NO. 87091)	ATCGCCCAGGGCAGCCAAGAGATGGGCCCTGC	0,75	......((((((..(((.....)))))))))).	-12,5
BTX125376 (SEQ ID NO. 47378)	GCTTGGGAGGTGGGCCTGGTAGTGTGGGCCTG	0,75	...........(((((((......))))))).	-9,7
BTX148478(SEQ ID NO. 70480)	TTACAGCCCAGGTGGGGGAGATGGAGGGCCTG	0,75	.....((((..............))))....	-6
BTX54083 (SEQ ID NO. 208619)	TGACGCAGGCGGCCGATAGTCATGGGAAGGCT	0,75	......((.(..((.((....)).)).)..).))	-5
BTX138117 (SEQ ID NO. 60119)	TAGCGAGGGATGTGCCAGAGCAAGGGGCGATG	0,75	..........(((.((.......)).)))...	-4,6
BTX151736 (SEQ ID NO. 73738)	TTTTGGTGGTTTTGGGCACAGAGATCCGCCTT	0,71875	....((((((((((....))))).)))))..	-9,4
BTX 165901 (SEQ ID NO.	ATGATTTCTGGCGCTGGGCAGGCGGCGTACTG	0,71875	..........((((((......)))))))....	-8,7

ID	Sequência (5'->3')	Identidade	mfeCode	Valor mfe (kcal/mol)
87903)				
BTX45567 (SEQ ID NO. 200103)	GATATTTTGGCGCTGGGGT ACTAACGGGGGCT	0,71875	.....(((.((.(.....).)).)))	-7,9
BTX102652 (SEQ ID NO. 24654)	CCTCGTTGGAGAAGGGGTG CCGGGTATTGGCT	0,71875	((((.....)))).(((....)))).	-7,6
BTX139961 (SEQ ID NO. 61963)	TCAGCTCAGGTCGGGGCCT CGAGTAGGGTCGT	0,71875	...(((((((....)))).))).....	-7,6
BTX168333 (SEQ ID NO. 90335)	ATTTTTGGAGGCGTCGGCC ACTTAGGCGGCCT	0,71875	.....(((....(((....))).))))	-7,2
BTX164283 (SEQ ID NO, 86285)	ATATCTTGTCTGCATGGAG GGCAATGGTGGCG	0,71875	.(((((((((.....)))))).)))...	-6,8
BTX118000 (SEQ ID NO.40002)	GATGGGCGCAGGAGGGGGC AGAGCTTCACCTA	0,71875	.....(((..(((((...))))).))).	-6,5
BTX56414 (SEQ ID NO. 210950)	TTTTGGTTGTAAGCATGCG ATGGCGATATGCT	0,71875	.....(((((((....)).))))))	-6,3
BTX143000 (SEQ ID NO. 65002)	TCGGTGCACGGGAGTGAGC AGGTAGGGGCTCG	0,71875	(((.....)))...((((.....))))	-6
BTX183604 (SEQ ID NO. 105605)	CGTTGGTTTTGGCGAGTTG GGCGCGTGTGCGT	0,71875	((((.....)))).....(((....))))	-5,9
BTX90485 (SEQ ID NO. 12487)	ATTTTGGCTCAATAGAGAC TCAGAGTGCGGCC	0,71875	((((((((((....))).).))))).....	-5,8
BTX151550 (SEQ ID NO. 73552)	TTTGGGCTATGGGGTGCGC GAATGAGGCATTG	0,71875	((((.((.....)).))))....	-5,4

[00452] No total, 548 sequências tinham uma pontuação de identidade de 0,65 ou maior em comparação ao Oligo6. As SEQ ID NOs. dessas sequências ordenadas por identidade para o Oligo6 de modo decrescente são 153288, 230810, 72324, 28200, 53868, 181518, 42357, 57489, 73227, 172055, 2952, 44405, 75929, 71429, 20006, 184108, 47784, 92897, 220240, 57283, 52420, 140995, 146820, 169084, 39855, 146442, 147185, 181215, 56691, 75368, 53201,

146451, 147211, 63615, 228278, 173786, 46890, 75306, 107324, 221968, 14758, 47455, 135584, 30860, 33832, 43355, 120959, 131982, 146257, 229669, 52947, 140895, 37532, 161060, 167186, 115635, 199581, 32146, 152683, 56718, 147067, 220159, 49808, 50500, 176682, 154788, 201850, 3316, 146032, 147160, 155055, 48737, 139597, 72670, 207849, 170684, 54938, 3636, 128263, 156447, 145935, 51375, 116222, 119142, 127442, 142254, 153286, 155023, 22541, 46005, 182785, 205662, 61165, 144596, 51275, 177954, 48823, 219645, 3084, 8721, 146275, 17565, 57305, 118912, 146989, 206013, 128221, 40437, 55270, 192802, 92525, 183937, 220230, 43550, 46880, 56462, 193987, 152961, 162432, 43249, 157821, 56686, 103350, 57509, 147179, 204595, 144580, 91355, 155573, 50702, 96578, 229726, 33377, 146294, 144529, 38645, 53968, 174050, 42652, 107918, 209673, 131257, 175795, 182083, 39709, 51680, 145326, 202876, 139743, 133866, 221057, 47843, 135884, 194660, 80602, 5151, 69290, 49106, 41372, 50054, 119798, 201995, 27833, 213489, 2552, 103757, 139126, 205965, 21565, 109594, 139143, 95213, 168594, 8295, 107746, 48633, 51565, 121759, 124806, 165297, 8858, 168415, 205374, 36291, 38832, 188342, 65224, 51894, 136891, 182808, 50398, 134134, 161741, 214580, 52534, 88648, 111909, 130891, 144347, 145899, 33191, 35279, 125042, 178432, 1128, 15284, 28047, 62081, 72359, 144383, 166893, 177544, 27186, 33119, 53848, 56247, 10318, 13463, 112272, 138972, 15079, 24082, 36118, 55252, 127295, 144690, 10788, 14263, 74803, 179469, 221824, 52269, 136543, 72810, 108106, 134688, 13605, 34744, 107781, 183957, 195805, 14823, 17943, 20827, 35634, 40892, 51368, 54007, 117928, 179645, 205008, 223768, 15354, 40102, 48730, 103308, 213735, 13491, 36202, 39617, 54305, 55719, 79126, 144251, 181386, 199426, 24145, 48970, 85613, 108868, 126137, 160451, 182602, 196198, 202593, 205100, 205178, 221276,

120234, 5534, 15236, 50585, 84864, 129328, 219741, 156356, 86591, 11670, 29721, 54364, 71545, 74815, 131589, 139261, 146096, 50285, 71392, 114854, 152931, 169999, 8242, 57478, 62417, 111260, 182506, 17688, 34796, 43260, 146362, 157911, 175343, 5282, 45570, 52948, 56261, 57527, 79678, 128070, 170101, 85036, 103923, 106792, 146449, 156276, 195604, 196920, 3796, 40839, 50916, 51342, 52751, 116864, 135801, 140220, 193642, 196275, 220855, 226649, 1694, 11775, 43184, 107072, 151999, 184762, 6175, 150549, 182543, 200143, 203039, 98018, 112499, 134073, 136233, 147188, 182640, 206111, 22684, 34862, 53055, 72815, 181471, 197260, 203774, 14892, 23173, 49134, 55035, 55769, 130459, 131392, 214574, 223101, 36256, 51551, 51755, 137626, 143652, 146917, 219821, 69499, 143367, 34770, 105892, 122539, 128264, 144806, 152945, 181300, 204421, 204755, 42340, 56630, 147194, 170809, 188435, 209724, 213559, 23949, 54193, 67388, 179249, 211115, 31368, 34502, 51837, 57080, 94239, 133863, 178270, 216886, 131090, 139144, 205199, 40207, 54308, 55444, 56625, 56828, 90681, 126395, 128352, 146092, 146416, 161065, 200089, 53369, 56071, 127939, 178282, 37651, 39118, 39693, 47389, 61289, 73185, 132055, 145917, 181354, 199583, 218281, 10820, 133779, 141303, 200009, 54698, 70129, 91825, 168148, 202370, 213819, 220132, 93335, 145481, 199400, 54628, 178071, 202831, 57710, 73719, 143175, 146419, 161948, 180016, 14543, 66627, 57374, 89825, 124215, 155543, 181422, 205448, 205630, 49108, 55482, 57015, 98225, 146453, 218426, 103338, 179980, 207727, 178323, 27665, 55329, 96775, 136240, 144944, 180598, 93933, 146163, 183627, 13029, 103967, 127930, 147087, 176958, 54661, 122836, 183775, 193643, 205616, 48939, 102882, 157197, 17752, 28989, 74331, 154261, 39112, 43618, 140934, 185185, 138825, 138909, 143865, 147257, 67515, 205974, 24649, 55488, 75948, 122503, 23338, 39818, 89053,

90410, 137944, 158565, 53667, 110669, 41983, 155574, 199831, 7910, 183865, 52679, 54099, 157927, 42198, 220071, 223787, 54235, 98792, 146366, 178495, 146625, 78716, 121036.

[00453] Os aptâmeros com motivos similares são escolhidos e fabricados com o uso do sintetizador de oligo. A afinidade de candidatos promissores é determinada com o suo de SPR como no Exemplo 3.

EXEMPLO 5: ENSAIO DE SUBTRAÇÃO DE APTÂMERO COM BASE EM MICROVESÍCULA

[00454] Esse Exemplo apresenta um processo de depletar um conjunto de aptâmeros dos aptâmeros que reconhecem os biomarcadores encontrados em uma amostra biológica. O método pode ser usado para depletar os aptâmeros que reconhecem as microvesículas de indivíduos saudáveis. Os aptâmeros depletados fornecem um conjunto de aptâmeros que pode ser avaliado contra microvesículas de indivíduos doentes, identificando assim os aptâmeros que reconhecem, de preferência, doente versus saudável.

SUBTRAÇÃO DE CONJUNTO DE APTÂMERO

[00455] As microvesículas circulantes são isoladas do plasma normal (por exemplo, de indivíduos sem câncer) com o uso de um dos métodos a seguir: 1) Isolação com o uso do reagente ExoQuick de acordo com o protocolo do fabricante; 2) Ultracentrifugação que compreende rotação a 50.000 a 150.000 g por 1 a 20 horas, ressuspendendo, então, o pélete em PBS; 3) Isolação com o uso o reagente TEXIS junto à Life Technologies de acordo com protocolo do fabricante; e 4) metodologia de filtração. O método de filtração é descrito em mais detalhes conforme segue:

[00456] Colocar a seringa e o filtro (Membrana Versapor de Filtro de Seringa Acrodisc de 1,2 µm Não Pirogênica Referência: 4190, Pall Life Sciences) na coluna aberta MWCO 150K de 7 ml (Pierce concentrators, 150K MWCO (corte de peso molecular) 7 ml. Número de peça:

89922). Preencher a extremidade aberta da seringa com 5,2 ml de PBS filtrado 1X preparado em água de grau molecular estéril.

[00457] Pipetar o plasma de paciente (900 a 1.000 µl) no PBS na seringa, pipetar a mistura duas vezes

[00458] Filtrar o plasma na coluna de 150K MWCO de 7 ml.

[00459] Centrifugar as colunas de 150K MWCO de 7 ml a 2000 x g a 20 ℃ (16 ℃ a 24 ℃) por 1 hora.

[00460] Após 1 hora de rotação, verter o fluxo passante em 10% de alvejante a ser descartado.

[00461] Inspecionar visualmente o volume de amostra. Se o concentrado de plasma estiver acima da graduação de 8,5 ml no tubo de concentrador, continuar a girar a amostra de plasma a incrementos de 10 minutos a 2.000 x g a 20 ℃ (16 ℃ a 24 ℃) veri ficando o volume após cada rotação até o concentrado de plasma estar entre 8,0 e 8,5 mls.

[00462] Pipetar a mistura lentamente na coluna um mínimo de 6 vezes e ajustar a pipeta para determinar o volume de concentrado de plasma. Se o volume estiver entre 100 µl e o Volume Alvo, transferir o concentrado de para um tubo de 1,5 ml de copolímero anteriormente identificado. Se o volume estiver ainda maior do que o Volume Alvo, repetir a etapa de centrifugação acima.

[00463] Verter ~45 mls de PBS filtrado 1X preparado em água de grau molecular estéril em um tubo cônico de 50 ml para o uso na próxima etapa.

[00464] Adicionar a quantidade apropriada de PBS filtrado 1X para reconstituir a amostra ao Volume Alvo.

[00465] As microvesículas produzidas com o uso de quaisquer métodos de isolamento compreenderão uma mistura de tipos de vesícula e terão vários tamanhos com exceção dos métodos de ultracentrifugação, que tendem a isolar exossomas.

[00466] Os oligonucleotídeos gerados aleatoriamente (produzidos conforme descrito no **Exemplo 1** acima) são incubados com as vesículas normais isoladas em PBS de um dia para o outro à temperatura ambiente ou a 4 graus Celsius.

[00467] Os aptâmeros que não se ligam a essas vesículas são isolados girando-se as vesículas a 50.000 a 150.000 X g por 1 a 20 horas e coletando o sobrenadante.

[00468] Os oligonucleotídeos de aptâmero são coletados do sobrenadante executando-se a mistura sobre uma coluna que contém esferas revestidas com estreptavidina. Esses aptâmeros são, então, adicionados às vesículas isoladas de pacientes doentes (com o uso dos mesmos métodos acima) e incubados de um dia para o outro em PBS à temperatura ambiente ou 4 graus Celsius.

[00469] As vesículas são, então, giradas a 50.000 a 150.000 X g por 1 a 20 horas e o sobrenadante é descartado. As vesículas são ressuspensas em PBS e lisadas com o uso de SDS ou algum detergente similar.

[00470] Os aptâmeros são, então, capturados executando-se a mistura de lise sobre uma coluna de esferas revestidas com estreptavidina. Os aptâmeros isolados são, então, submetidos a um ciclo de PCR para amplificar os produtos.

[00471] O processo é, então, repetido por um número definido de vezes, por exemplo, cinco ou mais vezes. O conjunto de aptâmeros restantes foi depletado de aptâmeros que reconhecem as microvesículas encontradas no plasma "normal". Consequentemente, esse método pode ser usado para enriquecer o conjunto nos aptâmeros que reconhecem vesículas de câncer. Consulte a **Figura 6.**

EXEMPLO 6: IDENTIFICAÇÃO DE ALVO DE APTÂMERO

[00472] O Exemplo acima apresenta um método para identificar os aptâmeros específicos para doença. O Exemplo apresenta adicional-

mente métodos para identificar os alvos dos aptâmeros específicos para doença.

[00473] Um aptâmero identificado de acordo com o método no **Exemplo 5** é ancorado a uma microesfera. O aptâmero mostrou a capacidade de reconhecer, de preferência, vesículas de câncer versus controles. A microesfera é incubada com uma amostra biológica que compreende vesículas de câncer sob condições de modo que o aptâmero possa se ligar ao antígeno que o mesmo reconhece na superfície de microvesícula de câncer. Uma vez que o complexo se formou, o aptâmero é fotorreticulado ao antígeno. A vesícula é, então, rompida com o uso de um tensoativo, deixando, assim, o complexo de aptâmero-alvo ancorado à microesfera. As microesferas são lavadas e recuperadas. As reticulações são rompidas, liberando, assim, o alvo na solução. As esferas são giradas a partir da solução e o alvo é adicionalmente concentrado e isolado com o uso de cromatografia de exclusão de tamanho. O alvo purificado é submetido à espectrometria de massa para a identificação. Consulte a **Figura 14** para o esquema ilustrativo.

EXEMPLO 7: SEQUÊNCIAS DE APTÂMERO ILUSTRATIVAS

[00474] As Tabelas a seguir compreendem aptâmeros ilustrativos da invenção. Os aptâmeros eram parte do conjunto de aptâmeros aleatórios descritos no **Exemplo 1.** Entende-se que as sequências de nucleotídeos que são reveladas na **Tabela 8** podem ser modificadas na medida em que as modificações resultantes resultem em um aptâmero que tem cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 e 99 por cento de homologia à sequência revelada e retenham a funcionalidade de se ligar ao antígeno de EpCAM ou fragmentos funcionais do mesmo. Conforme usado no contexto de qualquer unidade numérica definida, o termo "cerca de" significa variância de 10% acima ou abaixo dessa unidade numérica e todas as unidades no meio. As modifica-

ções indicadas na **Tabela 8** foram feitas aos conjuntos de aptâmeros a fim de permitir a conjugação da sequência de aptâmero. Uma pessoa versada na técnica apreciará que a cauda de timina ou porção química similar pode ser conjugada com ambas as extremidades do aptâmero.

TABELA 8: APTÂMEROS de EPCAM ILUSTRATIVOS

ID DE Aptâmero	Sequência	Modificações	SEQ ID NO.
BTX176881	5' -CCG CGC AGA TAT ACA ACG TAC CTC TGT GCG CA	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	98883
BTX187269	5' -CTG TGA GGC GTA CTG CGG TGA GCC TCT CAT TA	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	109271
BTX221708	5' -TGC AAG CTG CTA ATC AGC GAT GCT CTT TGG AG	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	143710
APTÂMERO 4	5' -CCC CCC GAA TCA CAT GAC TTG GGC GGG GGT CG	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	1
BTX222490	5' -TGC GCG TCT ATA AGT GCG CGA GCG GGC TTC CC	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	144492
BTX196339	5' -GCG AGC CTA TGC ACC ATC TAG GTG TTG TGG CA	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	118341
BTX214537	5' -TAT CGA TCG CAT	Cauda 3'	136539

ID DE Aptâmero	Sequência	Modificações	SEQ ID NO.
	CTA TGT GAT CGC TTA ACC GT	que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	
Aptâmero 8	5' -AAT CGT TAG TCA CTA TTC GTC CAT AGT AGT GAC A	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	230811
BTX201159	5' -GGC GGC GAC CAT TGT TGG TTT GGT GTC GCT GG	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	123161
BTX219183	5' -TCG TGG CAA AGG CCG ATT CAC CCA TGC CGG GT	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	141185
BTX80419	5' -ACA CGG GCC TTC TTG GCA CGA GCC ATG GGG CT	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	2421
BTX145792	5' -TGC GTC ACT CTC GCG ATC AAG ATC ATT GAT CT	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	67794
BTX135844	5' -GTT GCT GTC TAG CAA CGA CGC AAA CTG CAA CG	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	57846
BTX85875	5' -AGC GGG GCA TCG GCG TTG GCG AAC CGA CGG CG	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma	7877

ID DE Aptâmero	Sequência	Modificações	SEQ ID NO.
		porção química de biotina	
BTX120273	5' -GCC AGG CGT ATC CGC ATC CGA TGG GCT CGG GC	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	42275
Aptâmero 16	5' -TTT CAA GGC ACT CGT GT T CCC GAC ATG AGT G	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	230812
BTX119687	5' -GCA TCG ATG CGT CCC CGC GGC GGC CAG CCG AT	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	41689
BTX111579	5' -CTC GGT GCT GGA GTT TTG TAA CTC GCG TAC CG	Cauda 3' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	33581
Oligo6	5' -GGC GCA GGG GGG GGC CCA GAG TAT GGG GCC TG	Cauda 5' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	230810
BTX28596 (também referido como Oligo4B)	5' -GGC CGC GCA TTC TCT GCC GGC TGG TGT ACG GT	Cauda 5' que compreende 6 timinas e uma porção química de biotina	183132

EXEMPLO 8: DETECÇÃO DE MICROVESÍCULAS COM O USO DE APTÂMEROS ANTI-EPCAM

[00475] Os aptâmeros podem ser usados como agentes de ligação

para detectar um biomarcador. Nesse Exemplo, os aptâmeros são usados como agentes de ligação para detectar a proteína de EPCAM associada às microvesículas.

[00476] As Figuras 18A a 18D ilustra o uso de um aptâmero anti-EpCAM (Aptâmero 4; SEQ ID NO. 1) para detectar uma população de microvesícula em amostras de plasma. As amostras de plasma foram obtidas a partir de três homens com câncer de próstata e três homens sem câncer de próstata (referidos como controles ou normais). Os anticorpos para os antígenos de proteína de superfície de microvesícula de interesse a seguir foram conjugados com as microesferas (Luminex Corp, Austin, TX): A) EGFR (receptor de fator de crescimento epidérmico); B) PBP (proteína de ligação prostática; também conhecida como PEBP1 (proteína de ligação de fosfatidiletanolamina 1)); C) EpCAM (molécula de adesão de célula epitelial); e D) KLK2 (peptidase relacionada à calicreína 2). As microvesículas nas amostras de plasma foram capturadas com o uso de anticorpos conjugados com esferas. O Aptâmero 4 identificado fluorescentemente foi usado como um detector no ensaio de microesfera. As Figuras 18A a 18D mostram os valores de fluorescência mediana média (valores MFI) detectados para as microvesículas detectadas por Aptâmero 4 e capturadas por esfera. Cada plotagem mostra individualmente as três amostras de câncer (C1-C3) e as três normais (N1- N3). Esses dados mostram que, em média, as amostras de câncer de próstata têm níveis maiores de microvesículas que contêm as proteínas alvo do que as normais.

EXEMPLO 9: SELEÇÃO NEGATIVA E POSITIVA DE APTÂMEROS

[00477] Os aptâmeros podem ser usados em vários ensaios biológicos, incluindo inúmeros tipos de ensaios que dependem de um agente de ligação. Por exemplo, os aptâmeros podem ser usados ao invés de anticorpos em ensaios com base imunológica. Esse Exemplo for-

nece um método de avaliação de aptâmero que identifica os aptâmeros que não se ligam a quaisquer superfícies (substratos, tubos, filtros, esferas, outros antígenos, etc.) por todas as etapas de ensaio e se ligam especificamente a um antígeno de interesse. O ensaio dependente da seleção negativa para remover aptâmeros que ligam componentes de antígeno não alvo do ensaio final. A seleção negativa é seguida pela seleção positiva para identificar os aptâmeros que se ligam ao antígeno desejado.

[00478] Experimentos preliminares foram feitos com cinco bibliotecas de aptâmero de DNA com 10^{15} sequências cada e os comprimentos variáveis (60, 65, 70, 75, 80-mers) foram pré-amplificados e o filamento separado de modo que o filamento direto (não biotinilado) sirva como um aptâmero. Múltiplos ciclos da seleção negativa e seleção positiva foram realizados. Antes de cada ciclo, os produtos de aptâmero recuperados foram amplificados por PCR e o filamento separado com o uso da metodologia padrão.

[00479] A biblioteca de aptâmero e os iniciadores usados para amplificar os aptâmeros recuperados após cada ciclo da seleção são mostrados na Tabela 9. Nas sequências de biblioteca de aptâmero, 20N-40N referem-se ao número de nucleotídeos aleatórios na sequência de biblioteca.

TABELA 9: BIBLIOTECA DE APTÂMERO E INICIADORES DE PCR

Identidade	Sequência (5' -> 3')	SEQ ID NO.
Iniciador direto	5 ' -ATCCAGAGTGACGCAGCA	230813
Iniciador direto	5 ' -ACTAAGCCACCGTGTCCA	230814
Iniciador inverso	5 ' -biotin -ATCCAGAGTGACGCAGCA	230815
Iniciador inverso	5 ' -biotin -ACTAAGCCACCGTGTCCA	230816
Biblioteca de aptâmero de 60-mer	5 ' -ATCCAGAGTGACGCAGCA- 20 n- TGGACACGGTGGCT TAGT	230817

Identidade	Sequência (5' -> 3')	SEQ ID NO.
Biblioteca de aptâmero de 65-mer	5 ' -ATCCAGAGTGACGCAGCA- 25n- TGGACACGGTGGCT TAGT	230818
Biblioteca de aptâmero de 70-mer	5 ' -ATCCAGAGTGACGCAGCA- 30 n- TGGACACGGTGGCT TAGT	230819
Biblioteca de aptâmero de 75-mer	5 ' -ATCCAGAGTGACGCAGCA- 35n- TGGACACGGTGGCT TAGT	230820
Biblioteca de aptâmero de 80-mer	5 ' -ATCCAGAGTGACGCAGCA- 40 n- TGGACACGGTGGCT TAGT	230821

SELEÇÕES FORAM REALIZADAS CONFORME SEGUE:

SELEÇÃO NEGATIVA

[00480] 1. Preparar a Mistura de seleção negativa de esferas: Incubar 1.200 esferas não magnéticas com agente de bloqueio padrão por 20 min.

[00481] 2. Adicionar 50 µl de biblioteca de aptâmero (5 bibliotecas no total) a um tubo de extirpação por PCR com 4,5 µl de cada mistura de esferas. Incubar por 2 horas a 37 ℃ com agitaçã o a 550 rpm.

[00482] 3. Pré-umedecer a placa de filtro (1,2 µm, Millipore) com tampão PBS-BN. Adicionar 150 µl de PBS-BN.

[00483] 4. Transferir as amostras dos tubos de extirpação por PCR para a placa de filtro, incubar por 1 hora à temperatura ambiente com agitação a 550 rpm.

[00484] 5. Coletar o fluxo passante da placa de filtro em uma placa de coleta (NBS) com o uso de um coletor a vácuo.

[00485] 6. Concentrar e limpar amostras para remover materiais em excesso conforme desejado.

O PROCESSO DE SELEÇÃO NEGATIVA É REPETIDO ATÉ 6 A 7 VEZES.

SELEÇÃO POSITIVA

[00486] Antes de começar, conjugar os biomarcadores de proteína de interesse (SSX4, SSX2, PBP, KLK2, SPDEF) com microesferas

não magnéticas desejadas com o uso de condições conhecidas na técnica. O material de partida purificada recombinante incluía: proteína recombinante SPDEF junto à Novus Biologicals (Littleton, CO, EUA), número de catálogo H00025803-P01; proteína recombinante KLK2 junto à Novus, número de catálogo H00003817-P02; proteína recombinante SSX2 junto à Novus, número de catálogo H00006757-P01; proteína recombinante PBP junto à Fitzgerald Industries International (Action, MA, EUA), número de catálogo 30R-1382; proteína recombinante SSX4 junto à GenWay Biotech, Inc. (San Diego, CA, EUA), número de catálogo GWB-E219AC.

[00487] 1. Bloqueio de esfera: Incubar um número desejado de cada esfera (8.400 x número de bibliotecas de aptâmero (5) x um fator excedente de (1,2)) com um bloco de partida por 20 min.

[00488] 2. Misturar 50 µl de cada amostra de biblioteca de aptâmero para tubos de extirpação por PCR adicionar 2,3 µl da amostra de esfera com antígeno particular. Incubar por 2 horas a 37 ℃ com agitação a 550 rpm.

[00489] 3. Pré-umedecer a placa de filtro (1,2 µm, Millipore) com tampão PBS-BN. Adicionar 150 µl de PBS-BN.

[00490] 4. Transferir as amostras dos tubos de extirpação por PCR para a placa de filtro, incubar por 1 hora à temperatura ambiente com agitação a 550 rpm.

[00491] 5. Lavar 3x com PBS-BN, adicionar 50 µl de PBS e coletar as amostras do topo do filtro para os tubos de 1,5 ml.

[00492] A seleção positiva é repetida até 16 vezes. Determinados ciclos da seleção positiva têm etapas adicionais para tratar o RNA recuperado (isto é, candidatos de aptâmero restantes) conforme segue:

O CICLO 8 DA SELEÇÃO POSITIVA FOI MODIFICADO CONFORME SEGUE:

[00493] 1. Após a terceira lavagem (PBS-BN), 25 µl da amostra fo-

ram coletados do topo do filtro para os tubos de 1,5 ml.

[00494] 2. A placa de filtro foi incubada a 45 ℃ p or ~10 min e lavada imediatamente com o uso de vácuo. A placa foi lavada mais três vezes com PBS-BN.

[00495] 3. 50 µl de PBS foram adicionados à placa e a etapa 2 foi repetida.

[00496] 4. Após a última lavagem, 25 µl de PBS foram adicionados aos poços. As amostras foram bem misturadas e coletadas do topo do filtro para tubos de 1,5 ml.

O CICLO 9 DA SELEÇÃO POSITIVA FOI MODIFICADO CONFORME SEGUE:

[00497] 1. Após a lavagem final na etapa 5), 5 µg/ml de Estreptavidina-PE foram adicionados à mistura de aptâmero e incubados por 30 min à temperatura ambiente com agitação a 550 rpm.

[00498] 2. As amostras na placa de filtro foram lavadas 3x com PBS-BN (+ NaCl a 500 mM adicional).

[00499] 3. Uma lavagem adicional com PBS-BN regular foi realizada.

[00500] 4. 50 µl de PBS foram adicionados às amostras seguidos pela coleta conforme acima para tubos de 1,5 ml.

[00501] 5. Amostras armazenadas a -20 ℃.

O CICLO 14 DA SELEÇÃO POSITIVA FOI MODIFICADO CONFORME SEGUE:

[00502] Antes de começar esse ciclo, os antígenos de interesse (SSX4, SSX2, PBP, KLK2, SPDEF) foram conjugados com esferas magnéticas carboxiladas com o uso de métodos conhecido na técnica.

[00503] 1. Bloqueio de esfera: retirar o número desejado de cada esfera não magnética (3000 x número de bibliotecas de aptâmero (5) x um fator excedente de 1,2), adicionar bloco de partida (3:1, bloqueio por 1200 esferas), fazer 5 misturas de 4 antígenos e suplementar cada

um com um antígeno alvo diferente conjugado com esferas magnéticas (consulte a Tabela 10 abaixo, em que os antígenos são conjugados com esferas não magnéticas exceto quando indicado), incubar por 20 min.

TABELA 10: MISTURAS DE BLOQUEIO DE ESFERA

Mistura de Bloqueio	Antígenos de esfera não magnética	Antígenos de esfera magnética
1	SSX4 + PBP + KLK2 + SPDEF	SSX2
2	SSX2 + PBP + KLK2 + SPDEF	SSX4
3	SSX2 + SSX4 + KLK2 + SPDEF	PBP
4	SSX2 + SSX4 + PBP + SPDEF	KLK2
5	SSX2 + SSX4 + PBP + KLK2	SPDEF

[00504] 2. Adicionar 50 µl de bibliotecas de aptâmero a tubos de extirpação por PCR, adicionar misturas de esfera com antígeno alvo em esferas magnéticas aos tubos com biblioteca de aptâmero correspondente pré-selecionada e incubar por 2 horas a 37 ℃ com agitação a 550 rpm.

[00505] 3. Pré-umedecer a placa de filtro com tampão de PBS-BN, adicionar 150 µl de PBS-BN.

[00506] 4. Transferir as amostras dos tubos de extirpação por PCR para a placa de filtro, incubar 1 hora à temperatura ambiente com agitação a 550 rpm.

[00507] 5. Após a última lavagem (padrão), adicionar 5 µg/ml de Estreptavidina-PE, incubar por 30 min à temperatura ambiente com agitação a 550 rpm;

[00508] 6. Lavar 3x com PBS-BN (+ NaCl a 500 mM adicional).

[00509] 7. Realizar uma lavagem adicional com PBS-BN regular.

[00510] 8. 50 µl de PBS foram adicionados às amostras seguidos pela coleta conforme acima para tubos de 1,5 ml.

[00511] 9. Remover as esferas magnéticas com o uso de um apoio magnético e substituir por um tampão de PBS novo.

[00512] 10. Amostras armazenadas a -20 ℃ para a extração de

DNA subsequente e separação de filamento.

[00513] As etapas opcionais implantadas no último ciclo da seleção positiva destinam-se a aumentar a severidade da ligação de aptâmero (por exemplo, calor aumentado ou concentração de sal).

[00514] As **Figuras 19A** a **19E** ilustram a seleção dos aptâmeros para antígenos de interesse durante a seleção positiva. Três ciclos de seleção negativa foram realizados anteriormente. As Figuras 19A a 19C ilustram cinco bibliotecas de aptâmero de DNA (identificadas 1M a 5M) selecionadas para se ligar a SPDEF. Após a seleção negativa, as bibliotecas foram incubadas com a mistura de 4 antígenos (SSX2, SSX4, PBP, KLK2) conjugados com microesferas e suplementadas com antígeno de SPDEF conjugado com as esferas magnéticas. As amostras foram processadas de acordo com o protocolo de seção positiva acima. Após coletar as esferas magnéticas, os aptâmeros de DNA ligados foram extraídos das esferas e reamplificados. As Figuras 19A a 19C ilustram aptâmeros recuperados de cada biblioteca de partida após um (Figura 19A), dois (Figura 19B) e três ciclos (Figura 19C) da seleção positiva.

[00515] As Figuras 19D a 19E ilustram a avaliação de 25 bibliotecas de aptâmero após o 13º ciclo da seleção positiva contra antígeno específico (5 bibliotecas por cada um dentre os antígenos SSX2, SSX4, PBP, KLK2 e SPDEF). A seleção de aptâmero após esse ciclo foi modificada com a inclusão de antígenos de confusão pelas modificações do ciclo 13 descritas acima. Os aptâmeros de DNA ligados a esferas magnéticas conjugados com os aptâmeros de interesse foram extraídos das esferas e reamplificados. As bibliotecas recuperadas são mostradas na Figura 19D. A Figura 19E mostra as bibliotecas após um ciclo de adição da seleção e lavagem rigorosa.

EXEMPLO 10: SEPARAÇÃO DE FILAMENTO

[00516] Após cada ciclo de seleção no Exemplo acima, o conjunto

de aptâmeros recuperado foi amplificado com o uso de PCR com protocolos padrão. Os produtos de PCR foram capturados e o filamento separado com o uso da metodologia apresentada nesse Exemplo.

SEPARAÇÃO DE FILAMENTO DE SELEÇÃO NEGATIVA

[00517] Preparar 20 µl/PCR de esferas magnéticas de Estreptavidina (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) colocando em ímã por 1 min. Remover o tampão de armazenamento completamente. Lavar 3 vezes com PBS-T. Ressuspender em volume equivalente de PBS-T como no início. Aliquotar 20 µl/poço em todos os poços de aptâmero relevantes (25/placa) em uma placa de 96 poços.

[00518] Adicionar 80 µl adicionais de PBS-T/poço.

[00519] Adicionar os teores de PCR restantes para cada aptâmero respectivo no poço apropriado. Incubar à temperatura ambiente por 15 minutos com agitação moderada. Colocar as placas no ímã. Remover o sobrenadante e descartar. Lavar 3X com 150 µl de PBS.

[00520] Após a lavagem final, colocar no ímã e remover PBS. Adicionar 50 µl de NaOH a 0,1 M e incubar por 5 minutos à temperatura ambiente. Seguir a incubação, remover o aptâmero separado por filamento na solução e colocar em 96 poços novos deixando o filamento complementar imobilizado nas esferas. Neutralizar a solução com a adição de 5 µl de HC1 a 1 M. Levar o volume até 100 µl com 45 µl de água.

[00521] Precipitado de etanol adicionando 1/10 volume de acetato de sódio a 3 M pH 5,2 e 3X volumes de etanol 95%.

[00522] Adicionar 1,25 µl de glicogênio (Roche 20 µg/µl) e girar à temperatura ambiente por 15 minutos. Descartar o sobrenadante e permitir que o pélete seque.

[00523] Ressuspender em tampão apropriado para o próximo ciclo da seleção.

SEPARAÇÃO DE FILAMENTO DE SELEÇÃO POSITIVA

1. Aliquotar cada amostra em um tubo de 1,7 ml Eppendorf.

2. Pré-aliquotar em tubos identificados 5 µl de HC1 a 1M. Deve haver um tubo/amostra.

3. Se o volume de amostra for ~38 µl, adicionar 420 µl de Tween 0,05% em PBS 1X (para preparar, adicionar 250 de Tween em 500 ml de Hyclone PBS e misturar bem- pipetar tween lentamente- o material é viscoso).

4. Preparar esferas de estreptavidina, 40 µl por amostra são necessários (manter as esferas agrupadas em um tubo para lavagens). Se forem realizadas 25 separações de filamento- aliquotar 540 µl de esferas x2 tubos (inclui excedente). Centrifugar as esferas bem antes de preparar as mesmas, não deve haver nenhum conglomerado evidente.

5. Colocar as esferas no ímã e esperar a solução clarear.

6. Remover sobrenadante sem perturbar as esferas.

7. Adicionar 1 ml de Tween 0,05% em PBS 1X às esferas e misturar o ímã. Substituir no ímã após a mistura e esperar a solução clarear.

8. Remover sobrenadante sem perturbar as esferas.

9. Repetir as etapas 7 e 8. Ressuspender as esferas em solução de tween-PBS no mesmo volume aliquotado

10. Centrifugar as esferas bem para fora do ímã e adicionar 40 µl a cada uma das amostras.

11. Tampar as amostras firmemente e colocar no rotador por 15 minutos à temperatura ambiente.

12. Colocar as amostras de volta no ímã para lavar a amostra não ligada.

13. Adicionar 1 ml de Tween 0,05% em PBS 1X a cada tubo, dirigindo-se para a parede magnética. Esperar a solução clarear.

14. Remover sobrenadante sem perturbar as esferas.

15. Repetir as etapas 12 e 13. Certificar-se de que nenhuma solução restante permanece no tubo.

16. Fora do ímã, adicionar 50 µl de NaOH a 0,1M a cada amostra.

17. Colocar os tubos em Mix Mate por 5 minutos a 350 RPM à temperatura ambiente.

18. Após 5 minutos, colocar os tubos no ímã.

19. Após as esferas clarearem e serem presas ao ímã, remover o sobrenadante e adicionar a tubos de 5 µl de HC1 apropriadamente identificados (os mesmos devem ter sido aliquotados e identificados antes do início da separação de filamento). Isso deve neutralizar a solução. A solução deve ser levemente turva.

20. Levar o volume até 100 µl em cada tubo adicionando-se 45 µl de água livre de RNase/DNase de grau molecular. Colocar as amostras brevemente em gelo.

21. Adicionar 11 µl de acetato de sódio a 3M a cada tubo. Isso pode clarear alguma parte da solução.

22. Adicionar 350 µl de etanol 95% a cada tubo.

23. Adicionar 1,25 µl de glicogênio a cada tubo, deve haver um rastro esbranquiçado fraco que pode ser visto.

24. Misturar por inversão 10x.

25. Centrifugar os tubos de etanol por um mínimo de 16 minutos em velocidade máxima à temperatura ambiente.

26. Quando a centrifugação for concluída, remover o etanol dos tubos, cuidado para não perturbar o pélete. Usar um p1000 primeiro, seguido por um p200.

27. Deixar as amostrar secar ao ar por ~5 minutos ou até o resíduo de etanol ter desaparecido. Não deixar secar ao ar por muito tempo.

28. Ressuspender as amostras em 55 µl de HEPES a

25mM em PBS-BN.

29. Deixar assentar por ~2 minutos e centrifugar a amostra e girar a mesma.

30. Aliquotar 5 µl em tubos identificados com seleção positiva, o número de ciclo, data, número de amostra e pós-Amp'. Congelar a -20 ℃.

31. Os 50 µl restantes são usados para o próprio ciclo de seleção.

EXEMPLO 11: REVELAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS ANTI-EPCAM

[00524] Nesse Exemplo, um aptâmero para EpCAM identificado com o uso da técnica nos Exemplos 9 e 10 acima é caracterizado. Após a seleção para um conjunto de aptâmeros de ligação de EpCAM conforme descrito acima, a biblioteca de aptâmero foi sequenciada com o uso do protocolo padrão Ion Torrent (Life Technologies, Carlsbad, CA). Os candidatos principais foram selecionados como aqueles que têm (a) motivos abundantes elevados através de todas as sequências de leitura com produto de comprimento esperado total e (b) estrutura secundária forte (Figura 20B).

[00525] Os aptâmeros foram selecionados para proteína de EPCAM conjugada com esferas MicroPlex em competição com as proteínas recombinantes SSX4, SSX2, PBP, KLK2 e SPDEF. Uma porção dos aptâmeros foi selecionada em ciclos iniciais contra EpCAM que foi ligado a uma etiqueta de Fc e, após o ciclo 8, a seleção foi comutada para EPCAM com uma etiqueta de Histidina. Outra porção dos aptâmeros foi selecionada em ciclos iniciais contra EpCAM que foi ligado a uma etiqueta de Histidina e, após o ciclo 8, a seleção foi comutada para EPCAM com uma etiqueta de Fc. Os métodos para usar etiquetas de Fc e histidina para a captura e purificação de proteína são conhecidos por aqueles versados na técnica. Várias sequências representati-

vas obtidas a partir desses procedimentos são mostradas na **Tabela 11.** Na **Tabela 11,** as sequências são mostradas 5' a 3' da esquerda para a direita, em que cada sequência completa consiste na sequência 5' líder indicada seguida pela Sequência Variável indicada seguida pela sequência de cauda 3'. Cada sequência é derivada a partir de uma biblioteca que tem uma líder e cauda (consulte a **Tabela 9)** com uma sequência variável entre os mesmos. A tabela indica se a sequência identificada compreende uma porção química de biotina na extremidade 5' ou 3'. Entende-se que as sequências de nucleotídeos que são reveladas na **Tabela 11** podem também ser modificadas na medida em que as modificações resultantes resultem em um aptâmero que tem cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 e 99 por cento de homologia à sequência revelada e retenham a funcionalidade de se ligar ao antígeno de EpCAM ou fragmentos funcionais do mesmo.

TABELA 11: SEQUÊNCIAS CANDIDATAS DE APTÂMERO DE EPCAM

ID	SEQ NO ID	5'-Líder	Sequência Variável	Cauda-3'
CAR003.2_5[1]-B	230822	Biotina-ATCCAGAGTGACGCAGCA	GTCTTTTCTGATGGACACGTGG-TGGTCTAGTATC	TGGACACGGTGGCTTAGT
CAR003.2_3'-B	230823	ATCCAGAGTGACGCAGCA	GTCTTTTCTGATGGACACGTGG-TGGTCTAGTATC	TGGACACGGTGGCTTAGT-Biotina
CAR008.25'-B	230824	Biotina-ATCCAGAGTGACGCAGCA	TCCCCCCCGATCCCCGACCATA-CCATGAATGTATTATCTT	TGGACACGGTGGCTTAGT
CAR008.2_3'-B	230825	ATCCAGAGTGACGCAGCA	TCCCCCCCGATCCCCGACCATA-CCATGAATGTATTATCTT	TGGACACGGTGGCTTAGT-Biotina
CAR009.25'-B	230826	Biotina-ATCCAGAGTGACGCAGCA	TAACCCGCAACCACCCATCAC-TGCCTGCTACTATA	TGGACACGGTGGCTTAGT
CAR009.2_3'-B	230827	ATCCAGAGTGACGCAGCA	TAACCCGCAACCACCCATCAC-TGCCTGCTACTATA	TGGACACGGTGGCTTAGT-Biotina
CAR010.25'-B	230828	Biotina-ATCCAGAGTGACGCAGCA	TGTGATGAGGGGGGTTTTCGA-TAGG	TGGACACGGTGGCTTAGT
CAR010.2_3'-B	230829	ATCCAGAGTGACGCAGCA	TGTGATGAGGGGGGTTTTCGA-TAGG	TGGACACGGTGGCTTAGT-Biotina
CAR0115[1]-B	230830	Biotina-ATCCAGAGTGACGCAGCA	CCACCACCCGCCTACTGCTAGT-TACTTGGGTAGTT	TGGACACGGTGGCTTAGT
CAR011_3'-B	230831	ATCCAGAGTGACGCAGCA	CCACCACCCGCCTACTGCTAGT-TACTTGGGTAGTT	TGGACACGGTGGCTTAGT-Biotina
CAR0125'-B	230832	Biotina-ATCCAGAGTGACGCAGCA	TTGGACCGGGGGCTTGGCAA-TTTCGACCTAACATC	TGGACACGGTGGCTTAGT
CAR012_3'-B	230833	ATCCAGAGTGACGCAGCA	TTGGACCGGGGGCTTGGCAA-TTTCGACCTA ACATC	TGGACACGGTGGCTTAGT-Biotina
CAR0135'-B	230834	Biotina-ATCCAGAGTGACGCAGCA	GGAGAGGGTGGCTTAGGGAGG-TGCAAGAAGGTAGA	TGGACACGGTGGCTTAGT

ID	SEQ NO ID	5'-Líder	Sequência Variável	Cauda-3'
CAR013_3'-B	230835	ATCCAGAGTGACGCAGCA	GGAGAGGGTGGCTTAGGGAGG-TGCAAGAAGGTAGA	TGGACACGGTGGCTTAGT-Biotina
CAR0145'-B	230836	Biotina-ATCCAGAGTGACGCAGCA	CATGCGGCATTCTGAGTCTGG-TGCGACTTTCTGGT	TGGACACGGTGGCTTAGT
CAR014_3'-B	230837	ATCCAGAGTGACGCAGCA	CATGCGGCATTCTGAGTCTGG-TGCGACTTTCTGGT	TGGACACGGTGGCTTAGT-Biotina
CAR015_5[1]-B	230838	Biotina-ATCCAGAGTGACGCAGCA	GATGAATTTGTATTTGGACG-CGGTGGTGGTAATCA	TGGACACGGTGGCTTAGT
CAR015_3'-B	230839	ATCCAGAGTGACGCAGCA	GATGAATTTGTATTTGGACG-CGGTGGTGGTAATCA	TGGACACGGTGGCTTAGT-Biotina
CAR016	230840	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR017	230841	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	AACATCAGCTTTTATCTTAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR018	230842	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TGTTATAACCTACCATTAAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR019	230843	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACCGTATGGTTATGTGCTCA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR020	230844	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	CCATACGTCACACTTCTTTA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR021	230845	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	GGTCCATCTCCTTACATTTT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR022	230846	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	CTATGTACCAACTATTTATA	TGCTGCGTCACTCTGGAT

[00526] Os candidatos de aptâmero adicionais foram escolhidos na avaliação clonal inicial e validados adicionalmente em ambos os alvos Fc-EpCAM e Histag EpCAM pela titulação do aptâmero e proteína de EPCAM alvo. Várias sequências representativas obtidas a partir desses procedimentos são mostradas na Tabela 12. CAR027 e CAR028 foram inicialmente identificados contra o alvo Fc-EpCAM enquanto que CAR029 e CARON foram inicialmente identificados contra o alvo His-tag EpCAM. Na Tabela 12, as sequências são mostradas 5' a 3' da esquerda para a direita, em que cada sequência completa consiste na sequência 5' líder indicada seguida pela Sequência Variável indicada seguida pela sequência de cauda 3' indicada. Cada sequência é derivada a partir de uma biblioteca que tem uma líder e cauda (consulte a Tabela 9) com uma sequência variável entre os mesmos. A tabela indica se a sequência identificada compreende uma porção química de biotina na extremidade 5' ou 3'. A Tabela 13 apresenta os candidatos de aptâmero com base nas sequências completas na Tabela 12. O racional para as modificações é listado na tabela. As sequências são encurtadas na medida em que as mesmas retêm a estrutura secundária esperada. Entende-se que as sequências de nucleotídeos que são reveladas nas Tabelas 12 e 13 podem ser modificadas na medida em

que as modificações resultantes resultem em um aptâmero que tem cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 e 99 por cento de homologia à sequência revelada e retenham a funcionalidade de se ligar ao antígeno de EpCAM ou fragmentos do mesmo.

TABELA 12: SEQUÊNCIAS CANDIDATAS DE APTÂMERO DE EPCAM ADICIONAIS

ID	SEQ NO ID	5'-Líder	Sequência Variável	Cauda-3'
CAR027	230904	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	GTGTCCCCTCCTATAGCTGC	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR028	230905	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	GCGTTCCCCTACTATTTAAC	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR029	230906	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TCCTGGTTATACTCCCCTTC	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR030	230907	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TATCGCTGTTTCCTGTTATC	TGCTGCGTCACTCTGGAT

TABELA 13: OTIMIZAÇÃO DE APTÂMERO DE EPCAM

ID	SEQ NO ID	5'-Sequência-3'	Racional
CAR032	230909	Biotina-TATCGCTGTTTCCTGTTATCTGCTGCG	Encurtar a sequência CAR030 de acordo com a estrutura secundária
CAR033	230910	Biotina-TCCAGTGTCCCCTCCTATAGCTGCTGCTGCGT-CACTCTGG	Encurtar a sequência CAR029 de acordo com a estrutura secundária
CAR034	230911	Biotina-CCAGCGTTCCCCTACTATTTAACTGCTG	Encurtar a sequência CAR028 de acordo com a estrutura secundária

DESENVOLVIMENTO DE APTÂMERO

[00527] Como um aptâmero de RNA, CAR003 com a sequência de cauda alternativa tem a sequência de RNA a seguir (SEQ ID NO. 230847):

[00528] 5' -auccagagug acgcagcagu cuuuucugau ggacacgugg ug-gucuagua ucacuaagcc accgugucca-3'

[00529] CAR003 (CAR003.2_5'-B, CAR003.2_3'-B) foi adicionalmente caracterizado. O aptâmero de EpCAM CAR003 é modificado conforme desejado na extremidade 3' pela ligação de uma porção química de biotina (CAR003.2_3'-B). A biotina pode ser usada para ligar o aptâmero com o uso de um sistema de estreptavidina-biotina, por exemplo, para identificação, captura e/ou ancoragem. A **Figura 20B** ilustra a estrutura secundária ideal de CAR003 com uma energia livre mínima (AG) de -30,00 kcal/mol. Na ilustração, o aptâmero é mostrado como um aptâmero de RNA (SEQ ID NO. 230847) que corres-

ponde à sequência de DNA CAR003 (SEQ ID NOs. 230822 a 230823).

[00530] Síntese e purificação. O aptâmero CAR003 selecionado foi ressintetizado com o uso do Sintetizador AKTA OligoPilot 100 (GE Healthcare Life Sciences Corp., Piscataway, NJ) com uma 3'Biotina e destritilação final. O produto foi purificado com cromatografia de troca de ânions por FPLC. Diversas frações após FPLC foram combinadas conforme mostrado como os Conjuntos indicados 1 a 3 na **Figura 20C.** A figura compreende um cromatograma de FPLC com todos os produtos e frações designados em conjuntos após verificar a qualidade em gel. A **Figura 20D** ilustra um gel manchado por SYBR GOLD com frações de FPLC diferentes do aptâmero CAR003 após a síntese. Diferentes frações foram combinadas em conjuntos com base na quantidade de cadeias não finalizadas na ordem decrescente (conjunto 1 a conjunto 3). Os conjuntos 1 a 3 correspondem àqueles indicados na **Figura 20C.**

[00531] Caracterização de aptâmero CAR003. O aptâmero CAR003 purificado foi testado para se ligar à proteína de EPCAM recombinante com uma etiqueta de poliistidina ("etiquetado com His") com o uso do ensaio internamente desenvolvido a seguir. As esferas conjugadas com etiqueta anti-His foram misturadas com proteína etiquetada com EPCAM-His. O aptâmero a ser testado foi etiquetado com estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE). As esferas de EpCAM e aptâmeros etiquetados com SA-PE foram misturados. A ligação foi determinada como um valor fluorescente médio em um ensaio de esfera conforme descrito no presente documento. Os valores de MFI **(Figura 20E-F)** aumentam com ligação aumentada do aptâmero etiquetado com SA-PE à EpCAM recombinante. As **Figuras 20E-F** ilustram a ligação de CAR003 à proteína de EPCAM em HEPES a 25 mM com PBS-BN (PBS, BSA 1%, Azida 0,05%, pH 7,4) **(Figura 20E)** ou em HEPES a 25 mM com $MgCl_2$ a 1 mM (Figura **20F).** O aptâmero de EPCAM Aptâmero 4 (consulte

acima) foi usado para comparação. Conforme mostrado nas figuras, o conjunto CAR003 3 liga de modo mais eficaz seu alvo na presença de $MgCl_2$ (Figura **20F)** do que na presença de BSA **(Figura 20E).**

[00532] Para entender seu desempenho adicional, a ligação de CAR003 foi testada na presença tendo de BSA quanto de $MgCl_2$ em vários tampões. A **Figura 20G** ilustra a ligação de CAR003 à EpCAM nos sais indicados com ou sem a adição de albumina sérica bovina (BSA). Novamente, a ligação de CAR003 à EpCAM é mais eficaz quando BSA não está presente. Adicionalmente, NaCl a 150 mM foi testado, mas não pareceu melhorar o desempenho de CAR003 sobre $MgCl_2$.

[00533] Outro fator que pode influenciar o desempenho do aptâmero é a desnaturação com diferentes composições de sal. A **Figura 2011** ilustra o efeito da desnaturação na ligação de CAR003 à proteína de EPCAM. Conforme visto a partir do gráfico, a desnaturação do aptâmero tem um efeito positivo na ligação de CAR003 à EpCAM similar ao efeito no CAR003 de $MgCl_2$. Entretanto, a desnaturação na presença de $MgCl_2$ pode não melhorar sinergicamente a ligação de CAR003 à EpCAM. Curiosamente, CAR003 pareceu mais estável em comparação ao Aptâmero 4 de controle nas condições testadas.

[00534] A afinidade de CAR003 para EpCAM no ambiente de ensaio de esfera foi avaliada do mesmo modo que acima com o aptâmero titulado através de uma entrada constante de antígeno. A **Figura 201** ilustra a titulação dos aptâmeros contra a proteína recombinante de EPCAM (entrada constante 5 µg). Sob as condições testadas, o Aptâmero 4 tinha uma afinidade maior para a proteína de EPCAM em comparação a CAR003 conforme sugerido a partir do nível de saturação a 5 µg da entrada de aptâmero. A fim de avaliar a especificidade de CAR003, o mesmo foi testado com o uso de Western Blot contra a proteína recombinante de EPCAM e controles que compreendem al-

bumina sérica bovina (BSA) e albumina sérica humana (HSA). A **Figura 20J** ilustra um Western blot com aptâmero CAR003 versus proteína etiquetada com his de EPCAM, BSA e HSA (5 µg cada). O gel foi bloqueado com F127 0,5% e sondado com ~50 µg/ml de aptâmero biotinilado CAR003, fração 3. A mancha foi visualizada com NeutrAvidin-HRP seguido pelo Substrato Quimioluminescente SuperSignal West Femto. O Western blot sondado com o aptâmero CAR003 mostrou uma preferência clara do aptâmero para proteína de EPCAM em relação às albuminas.

[00535] Teste de CAR003 com amostras de plasma. As amostras de plasma de cinco indivíduos com câncer de próstata e cinco indivíduos normais foram testadas com CAR003 para detectar as microvesículas com o uso de proteínas conjugadas com esferas para capturar as microvesículas e aptâmero identificado com SA-PE para detectar as vesículas conforme descrito no **Exemplo 8.** O detector de Aptâmero 4 identificado com SA-PE foi usado como controle. As alterações de dobra de Câncer sobre Normal são mostradas na **Tabela 14.** As alterações de dobra são mostradas sem normalização ("Brutas") ou com normalização para um controle negativo. As vesículas foram capturadas com anticorpos conjugados com esferas para SSX4, PBP, SPDEF, EPCAM, KLK2 e SSX2 conforme indicado.

TABELA 14: CAR003 PARA DETECTAR MICROVESÍCULAS

		SSX4	PBP	SPDEF	EPCAM	KLK2	SSX2
Bruto	Protocolo padrão	0,87	0,39	0,71	0,63	0,93	0,87
	Incubação na presença de $MgCl_2$ a 1 mM e ausência de PBS-BN	0,77	0,39	0,69	0,6	0,91	0,81
	Controle de Aptâmero 4 (Protocolo padrão)	0,78	0,67	0,81	0,72	1,19	0,79

		SSX4	PBP	SPDEF	EPCAM	KLK2	SSX2
Normalizado para Controle negativo	Protocolo padrão	1,49	0,84	1,13	1,17	1,5	1,38
	Incubação na presença de $MgCl_2$ a 1 mM e ausência de PBS-BN	1,27	0,83	1,08	1,1	1,46	1,29
	Controle de Aptâmero 4 (Protocolo padrão)	1,18	0,96	1,11	1,04	1,82	1,1

[00536] Sob as condições testadas, as amostras detectadas com CAR003 tinham valores MFI menores em comparação à detecção com o Aptâmero 4, enquanto que CAR003 tinha uma razão entre sinal e ruído melhor e mostrou uma melhor separação entre amostras de câncer e normais com marcadores de captura SSX4, SPDEF, EPCAM e SSX2.

[00537] Aptâmero de Controle

[00538] As características dos aptâmeros (tamanho, estabilidade, afinidade de ligação e especificidade, etc.) podem ser comparadas contra aptâmeros de controle específicos para EpCAM ou outros alvos. Por exemplo, os aptâmeros são comparados ao aptâmero anti-VEGF 5' biotina-CA ATT GGG CCC GTC CGT ATG GTG GGT (SEQ. ID NO. 230912) conforme descrito em Kaur e Yung, 2012.

[00539] Referências:

[00540] 1. Müller, J., et al. "Selection of high affinity DNA-aptamer for activated protein C using capillary electrophoresis." *Research in Pharmaceutical Sciences* 7.5 (2012): S987.

[00541] 2. Cerebia, L e V. de Franciscis. "Nucleic Acid Aptamers Against Protein Kinases", *Current medicinal chemistry* 18.27 (2011): 4.152 a 4.158.

[00542] 3. Wu Jie, et al. "Identification, Characterization and Application of a G-Quadruplex Structured DNA Aptamer against Cancer Biomarcador Protein Anterior Gradient Homolog 2." *PloS ONE* 7.9

(2012): e46393

[00543] 4. Mitkevich, Olga V., et al. "DNA aptamers detecting generic amyloid epitopes." *Prio*• 6.4 (2012): 400 a 406.

[00544] 5. Kaur H, Yung L-YL (2012) Probing High Affinity Sequences of DNA Aptamer against $VEGF_{165}$. PLoS ONE 7(2): e31196. doi:10.1371/journal.pone.0031196.

EXEMPLO 12: OTIMIZAÇÃO DE APTÂMEROS ANTI-EPCAM

[00545] Esse Exemplo demonstra a otimização do aptâmero CAR016 (SEQ ID NO. 230840), que é apresentado acima. CAR016 foi o aptâmero mais prevalente identificado em diversos ciclos da seleção de aptâmero de EpCAM conforme descrito acima (consulte a Exemplo 9). Sua sequência variável conforme mostrada acima e as sequências com motivos comuns representaram mais de 50% dos conjuntos de aptâmeros selecionados. A Tabela 15 mostra as variantes relacionadas a CAR016 mais comuns de duas execuções de sequenciamento independentes (Execução de Seq 1 e 2) com o uso de uma plataforma Ion Torrent após 9 ciclos de seleção.

TABELA 15: SEQUÊNCIAS REPRESENTATIVAS DE AVALIAÇÃO DE APTÂMERO DE EPCAM

ID	SEQ ID NO.	Região Variável 5'->3'	nº de ocorrências Execução de Seq 1	nº de ocorrências Execução de Seq 2
CAR016_VAR1	230848	ACGTAAGTATATCTGTACAA	92084	64506
CAR016_VAR2	230849	ACCGTATGGTTATGTGCTCA	11104	8023
CAR016_VAR3	230850	ACGTAAGTATATCTGCACAA	16	10
CAR016_VAR4	230851	ACCGTATGTTTATGTGCTCA	14	4
CAR016_VAR5	230852	ACGTAAGTATATCTGTACAG	12	11
CAR016_VAR6	230853	ACCGTAAGTATATCTGTACA	10	8
CAR016_VAR7	230854	CCGTAAGTATATCTGTACAA	8	0
CAR016_VAR8	230855	ACGTAAGTATATCTGTACAC	7	0
CAR016 VAR9	230856	ATCGTAAGTATATCTGTACA	5	3
CAR016 VAR10	230857	ACGTATGTATATCTGTACAA	4	1
CAR016 VAR11	230858	ACGTAAGTATATGTGTACAA	4	1
CAR016 VAR12	230859	AACGTAAGTATATCTGTACA	4	9

ID	SEQ ID NO.	Região Variável 5'->3'	nº de ocorrências Execução de Seq 1	nº de ocorrências Execução de Seq 2
CAR016 VAR13	230860	GCGTAAGTATATCTGTACAA	3	1
CAR016 VAR14	230861	TCGTAAGTATATCTGTACAA	2	1
CAR016 VAR15	230862	ACGTAAGTATATCTGTACAT	2	9
CAR016_VAR16	230863	ACGTATGGTTATGTGCTCAA	1	0
CAR016_VAR17	230864	ACGTAAGTATATCTGTTCAA	1	1
CAR016_VAR18	230865	ACCGTATGGTTATCTGCTCA	1	0
CAR016_VAR19	230866	AACGTATGGTTATGTGCTCA	1	0
CAR016_VAR20	230867	GCCGTATGGTTATGTGCTCA	0	2
CAR016_VAR21	230868	ACCGTATGGTTATGTGTTCA	0	2
CAR016_VAR22	230869	ACGTAAGTATATCTGTTCAA	0	1

[00546] Em conjunto, as sequências na Tabela 15 podem ser representadas pela sequência a seguir, em que [AT] especifica que ou uma adenina (A) ou timina (T) está presente: 5 ' -CGTA [AT] G [TG] [AT] TAT [CG] TG [TC] [AT] CA (ID CAR016_CAN; SEQ ID NO. 230870).

[00547] A realizações de testes por meio de ELISA demonstrou que CAR016 ligado a EpCAM-Fc em placas de ELISA padrão e à proteína etiquetada com EPCAM-His em placas de ELISA revestidas com níquel. Em ensaios de ligação de microesfera com microesferas revestidas com microvesícula, CAR016 tinha os maiores valores de fluorescência médios entre todos os candidatos de aptâmero testados, incluindo o Aptâmero 4. Assim, uma variedade de variantes de CAR016 foi feita para o teste para desempenho aprimorado. As variantes de sequência são mostradas na Tabela 16 e o racional atrás de cada variante é descrito na Tabela 17. "n/a" na Tabela 16 indica que a seção do aptâmero não está presente. Os nucleotídeos sublinhados na Tabela 16 indicam os nucleotídeos modificados em comparação a CAR016. Consulte a Tabela 17 para a descrição adicional. Determinadas mutações são feitas para examinar os efeitos da estabilidade de aptâmero conforme estimado pelos cálculos ΔG. A estabilidade estimada de CAR016 é ΔG= -10,89 kcal/mol. ΔG menor indica maior estabilidade

estimada. Consulte, particularmente, CAR016_M23 a CAR016_M27.

TABELA 16: SEQUÊNCIAS MUTANTES DE APTÂMERO DE EPCAM CAR016

ID	SEQ NO. ID	5'-Líder	Sequência Variável	Cauda-3'
CAR016M1	230871	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACACAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M2	230872	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAATATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M3	230873	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAGTAGCGCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M4	230874	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAGTATATCCATACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M5	230875	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAGTATATCTGTATCA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M6	230876	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACACAAATAGCGCCATATCA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M7	230877	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAGTATATCTGTACAA	n/a
CAR016M8	230878	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	AAAAAAGGGTCTTCTACGGT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M9	230879	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTACGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M10	230880	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAGACTATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M11	230881	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAGTATATATGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M12	230882	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAGTATATCTGGCCAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M13	230883	n/a	Biotina-ACGTAAGTATATCTGTACAA	n/a
CAR016M14	230884	Biotina-CCGTGTCCA	ACGTAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTC
CAR016_M15	230885	ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGA-Biotina
CAR016M16	230886	n/a	Biotina-ACGTAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016_M17	230887	n/a	ACGTAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT-Biotina
CAR016_M18	230888	Biotina-AC(dT-Biotina)AAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016_M19	230889	Biotina-AC(dT-Biotina)AAGCCACCG(dT-Biotina)GTCCA	ACGTAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT

ID	SEQ NO. ID	5'-Líder	Sequência Variável	Cauda-3'
CAR016_M20	230890	Biotina-AC(dT-Biotina)AAGCCACCG(dT-Biotina)GTCCA	ACGTAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCG(dT-Biotina)CACTCTGGAT
CAR016_M21	230891	Biotina-AC(dT-Biotina)AAGCCACCG(dT-Biotina)GTCCA	ACGTAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCG(dT-Biotina)CACTCTGGAT-Biotina
CAR016M22	230892	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M23	230893	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACGTAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M24	230894	Biotina-ACTAAGCCACCGTG	ACGTAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M25	230895	Biotina-ACTAATCCACCGTG	ACGTAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M26	230896	Biotina-ACTAATCCAGAGTG	ACGTAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M27	230897	Biotina-ACTAATCCAGAGTG	ACGTAGTATATCTGTACTA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR016M28	230898	Biotina-G	ACGTAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGTC
CAR016M29	230899	n/a	Biotina-ACGTAAGTATATCTGTACAA	TGCTGCGT

TABELA 17: RACIONAL DE SEQUÊNCIA MUTANTE DE APTÂMERO DE EPCAM CAR016

ID	Explicação	Racional
CAR016_M1	3º e 4º GT -> AC	Projetado com substituições na sequência de motivo constante para desafiar a afinidade a fim de examinar a sequência eficaz mínima e assistir no projeto de aptâmeros de controle negativo apropriado (por exemplo, similar a CAR016, mas não liga EpCAM).
CAR016_M2	7º G -> A	
CAR016_M3	10, 11 e 12º TAT -> GCG	
CAR016_M4	14 e 15º TG -> CA	
CAR016_M5	18 e 19º CA -> TC	
CAR016_M6	Mutações 1 a 5 combinadas	
CAR016_M7	Truncado, sem iniciador inverso	Projetado para examinar o papel de iniciador inverso na afinidade de aptâmero
CAR016_M8	Sem motivo abundante	Projetado como o controle negativo sem nenhuma homologia para a sequência abundante
CAR016_M9	6º A -> C	Projetado com substituições na sequência de motivo variável (consulte a SEQ ID NO. 230870 acima) para melhorar potencialmente a afinidade ao aptâmero.
CAR016_M10	8º e 9º TA -> AC	
CAR016_M11	13º C -> A	
CAR016M12	15º e 16º TA -> GC	
CAR016_M13	Truncado, sem iniciadores	Projetado para examinar o papel da região variável na afinidade de aptâmero. ΔGestimado = -0,7 kcal/mol
CAR016_M14	Truncado, menos 9 bases de ambos 5' e 3'	Projetado para examinar o papel de ambos os iniciadores direto e inverso na afinidade de aptâmero. ΔGestimado = -5,6 kcal/mol.

ID	Explicação	Racional
CAR016_M15	3'-Biotina	Projetado para examinar o impacto da biotinilação 3' na afinidade de aptâmero.
CAR016_M16	Truncado, sem iniciador direto	Projetado para examinar o papel do iniciador direto na afinidade de aptâmero.
CAR016_M17	Truncado, sem iniciador direto, 3'-Biotina	Projetado como um controle para M16 com biotinilação 3'
CAR016_M18	5' + biotinilação interna no 3º T	Projetado a fim de aumentar a sensibilidade da detecção que permitirá minimizar a entrada de aptâmero no ensaio e aumentar potencialmente a capacidade de informações dos dados de saída reunidos com a detecção de aptâmero nas amostras de plasma.
CAR016_M19	5' + 2 biotinilação interna no 3º e 13º T	
CAR016_M20	5' + 3 biotinilação interna no 3º, 13º e 46º T	
CAR016_M21	5' , 3" + 3 biotinilação interna no 3º, 13º e 46º T	
CAR016_M22	Sem espaçador entre a Biotina e a sequência de núcleo	Projetado como o controle negativo para a biotinilação padrão sem braço espaçador entre a Biotina e a sequência de núcleo.
CAR016_M23	5º A deletado na região variável de CAR016	Projetado a fim de sondar maior estabilidade da estrutura secundária. ΔGestimado = -14 kcal/mol
CAR016_M24	15, 16, 17 e 18º TCCA deletado no iniciador direto de M23	Projetado a fim de sondar maior estabilidade da estrutura secundária. ΔGestimado = -20,5 kcal/mol
CAR016_M25	6º G substituído por T no iniciador direto de M24	Projetado a fim de sondar maior estabilidade da estrutura secundária. ΔGestimado = -22,4 kcal/mol
CAR016_M26	10,11º substituído por GA no iniciador direto de M25	Projetado a fim de sondar maior estabilidade da estrutura secundária. ΔGestimado = -30,1 kcal/mol
CAR016_M27	19º A substituído por T na região variável de M26	Projetado a fim de sondar maior estabilidade da estrutura secundária. ΔGestimado = -32,4 kcal/mol
CAR016_M28	13 bases (5'->) truncado em FP, 9 bases (<-3') truncado em RP em M24	2º menor aptâmero estável. ΔGestimado = -11,3 kcal/mol
CAR016_M29	CAR016 truncado : em FP; menos 9 bases em 3' em RP	O menor aptâmero estável que inclui a região variável completa. ΔGestimado = -4.6 kcal/mol

[00548] Conforme observado nas Tabelas 16 e 17, várias modificações são feitas através do comprimento dos aptâmeros, incluindo as sequências de iniciador de 5'-líder e 3'-cauda. As variantes de aptâmero são sintetizadas e a ligação a EpCAM é assegurada com o uso de ELISA e ensaio de microesferas conforme descrito acima para CAR016. Os resultados revelam as regiões da sequência de aptâmero que aprimoram ou degradam a capacidade do aptâmero para se ligar especificamente à proteína EpCAM e microvesículas de EpCAM+. As Figuras 21A a 21J mostram as estruturas secundárias previstas de CAR016 e as variantes de CAR016 indicadas nas Tabelas 16 e 17.

EXEMPLO 13: APTÂMEROS PARA MICROVESÍCULAS VCAP

[00549] Nesse Exemplo, os aptâmeros foram identificados que reconhecem as microvesículas dispersas pela linhagem celular VCAP de câncer de próstata. As microvesículas VCAP foram revestidas em uma placa ELISA padrão com uma superfície de ligação alta. Após lavar o excesso de microvesículas não ligadas dos poços, os poços foram bloqueados com Pluronict F-127 (Sigma Aldrich). Uma biblioteca de aptâmero 20n (consulte a Tabela 9) foi incubada com as microvesículas ligadas ao poço. Os poços foram lavados para remover os aptâmeros não ligados. Os aptâmeros de microvesículas VCAP restantes foram eluídos, purificados, amplificados e separados por filamento e limpos antes do próximo ciclo. Consulte a metodologia detalhada acima. As etapas anteriores foram repetidas por 8 ciclos. Após o ciclo 8, o conjunto de aptâmero selecionado foi submetido ao sequenciamento IonTorrent.

[00550] Os aptâmeros que têm a frequência superior entre as leituras totais são mostrados na Tabela 18. Na Tabela 18, as sequências são mostradas 5' a 3' da esquerda para a direita, em que cada sequência completa consiste na sequência 5' líder indicada seguida pela Sequência Variável indicada seguida pela sequência de cauda 3' indicada. Cada sequência é derivada a partir de uma biblioteca que tem um líder e cauda (consulte a Tabela 9) com uma sequência variável entre os mesmos. A tabela indica se a sequência identificada compreende uma porção química de biotina na extremidade 5' ou 3'. Entende-se que as sequências de nucleotídeos que são reveladas na Tabela 18 podem também ser modificadas na medida em que as modificações resultantes resultem em um aptâmero que tem cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 e 99 por cento de homologia à sequência revelada e retenham a funcionalidade de se ligar aos antígenos de vesículas ou fragmentos funcionais dos mesmos.

TABELA 18: SEQUÊNCIAS DE APTÂMERO DE MICRO-

VESÍCULA VCAP

ID	SEQ NO ID	5'-Líder	Sequência Variável	Cauda-3'
CAR023	230900	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TCTTTCGTCTTGTTATGTAT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR024	230901	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TGTTTTCCTTCTTACCTTTA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR025	230902	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACCTACTATCCATTAATTTT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR026	230903	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ATGTTTTCCCTGTTATTTTT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR031	230908	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	CCTATTATTAGCTTTTCTTT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR035	230913	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TAACACTATGTCAGTTAGTA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR036	230914	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	CTTGAAATGTGATTCTTTAT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR037	230915	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TTCCTTGTCTCCTATTCATT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR038	230916	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TCTCTATATTACATGCTTCT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR039	230917	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	CCCTTTTTGCGATTTCTTTA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR040	230918	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	GAAGTAAGATCCTTCTGA-TA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR041	230919	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	ACCTTGTTGTATCCGTTATA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR042	230920	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TTGCCTTTTCAAAGTAATAT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR043	230921	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TATTCCCATGTCATATACCT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR044	230922	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TTGCATAGCATATTATCTTC	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR045	230923	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TTGTTACTCTGTATCTTTAT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR046	230924	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TTCTTTACTCTTTTCTTTTT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR047	230925	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TCGTTTCTTCTTCACTTTAT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR048	230926	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TGTTTCCTTCTGTTATCTTA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR049	230927	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	TTCTCTTGCTCTCTTTCTCT	TGCTGCGTCACTCTGGAT

[00551] As sequências na **Tabela 18** foram as mais comumente representadas no conjunto de sequenciamento com duas execuções de sequenciamento independentes. As maiores frequências foram: 1) CAR023, 18,3%; 2) CAR024, 12,7%; 3) CAR025, 9,8%; e 4) CAR026, 8,8%. CAR031 foi a 5ª sequência mais comum. As sequências foram adicionalmente validades pela titulação dos e exossomas VCap alvo.

[00552] Os aptâmeros na **Tabela 18** são também diretamente modificados com uma identificação em vez da porção química de biotina 5'. Por exemplo, a biotina pode ser substituída por uma digoxigenina 5' (Éster de NHS) (abreviada como "/5DigN/"). O grupo de digoxigenina fornece uma identificação fluorescente. A digoxigenina 5' pode ser separada da sequência de nucleotídeos com um espaçador, por exemplo, Espaçador Int 18 (abreviado como "/Int18/"), que é um espaçador de hexa-etilenoglicol com 18 átomos e é disponível junto à Integrated DNA Technologies (IDT). Os espaçadores similares também disponíveis junto à IDT que podem ser usados incluem: 1) Espaçador C3, uma fosforamidita que pode ser incorporada internamente ou na extremidade 5' no oligo. Os múltiplos espaçadores C3 podem ser adicionados ou na extremidade de um oligo para introduzir um braço espaçador hidrofílico longo da ligação de fluoroforos ou outros grupos pendentes; 2) Espaçador PC (FotoClivagem) pode ser colocado entre as bases de DNA ou entre o oligo e um grupo modificador 5’. O mesmo oferece um braço espaçador de 10 átomos que pode ser clivado com exposição à luz UV na faixa espectral de 300 a 350 nm. A clivagem libera o oligo com um grupo de fosfato 5’; 3) Hexanodiol é um espaçador de glicol de seis carbonos que tem a capacidade de bloquear a extensão por DNA polimerases. Essa modificação 3' tem a capacidade de suportar a síntese de oligos mais longos; 4) O Espaçador 9 é um espaçador de trietileno glicol que pode ser incorporado na extremidade 5' ou extremidade 3' de um oligo ou internamente. Múltiplas inserções podem ser usadas para criar braços espaçadores longos; e 5) A modificação de 1',2'-Didesoxirribose (dSpacer) é usada para introduzir um sítio abásico estável dentro de um oligonucleotídeo.

EXEMPLO 14: IDENTIFICAÇÃO DE ALVO DE APTÂMERO

[00553] Nesse Exemplo, os aptâmeros conjugados com microesfe-

ras são usados para auxiliar a determinação do alvo de dois aptâmeros identificados por métodos de avaliação de biblioteca conforme descrito acima. A abordagem geral é mostrada na **Figura 14.** A abordagem é usada para verificar os alvos de CAR029, um aptâmero identificado pela avaliação de biblioteca para reconhecer EpCAM e CAR024, um aptâmero identificado pela avaliação de biblioteca para um alvo desconhecido na superfície de microvesículas VCAP. Consulte a descrição acima tanto para CAR029 quanto para CAR024. Nessa abordagem, as sequências de CAR029 e CAR024 são aleatoriamente redispostas antes da ligação às microesferas. As microesferas são usadas como controles para se ligar a alvos que são similares, mas não idênticos à molécula alvo pretendida.

[00554] Os controles de aptâmero exemplificativos usados nesse estudo são mostrados na **Tabela 19.** Na **Tabela 19,** as sequências são mostradas 5' a 3' da esquerda para a direita. Cada sequência é derivada da redisposição aleatória de CAR029 ou CAR024 conforme indicado no aptâmero ID na tabela. Entende-se que as sequências de nucleotídeos que são reveladas na **Tabela 19** podem também ser modificadas na medida em que as modificações resultantes resultem em um aptâmero que tem cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 e 99 por cento de homologia à sequência revelada e retenham a funcionalidade desejada.

TABELA 19: SEQUÊNCIAS DE APTÂMERO DE CONTROLE NEGATIVO

ID	SEQNO. ID	Sequência 5' -> 3'
CAR029-Negl	230928	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCACCTTCACTCCGTTATTCCTGTGCTGCGTCACTCTG-GAT
CAR029-Neg2	230929	Biotina-TGCTGCGTCACTCTGGATCCTTCACTCCGTTATTCCTGACTAAGCCACCGTG-TCCA
CAR024-Negl	230930	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCACTTTACTTACTCCTTTGTTTTGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR024-Neg2	230931	Biotina-TGCTGCGTCACTCTGGATCTTTACTTACTCCTTTGTTTACTAAGCCACCGTGTCCA

[00555] O protocolo usado é conforme segue:

[00556] 1) Os candidatos de aptâmeros (aqui, CAR029 e CAR024) e aptâmeros de controle (aqui, CAR029-Negl, CAR029-Neg2, CAR024-Negl, CAR024-Neg2) são sintetizados com modificações para permitir a captura (aqui, os aptâmeros são biotinilados) e reticulação (aqui, com o uso do Kit e Reagente de Transferência de Identificação de Biotina Sulfo-SBED, Número de catálogo 33073 junto à Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, para permitir a fotorreticulação)

[00557] 2) Cada um dos aptâmeros é individualmente misturado com microvesículas que têm o alvo de interesse (aqui, as microvesículas VCAP).

[00558] 3) Após a incubação para permitir que os aptâmeros se liguem ao alvo, a luz ultravioleta é aplicada às misturas para ativar a reticulação dos aptâmeros com os alvos de microvesícula.

[00559] 4) As microvesículas são lisadas, liberando assim o complexo de aptâmero-alvo reticulado na solução.

[00560] 5) Os complexos de aptâmero-alvo reticulados são capturados a partir da solução com o uso de um substrato revestido por estreptavidina.

[00561] 6) Os complexos de aptâmero-alvo reticulados para cada aptâmero são executados individualmente em eletroforese em gel SDS-PAGE. Os alvos de proteína capturados são visualizados com manchamento de Azul de Coomassie.

[00562] 7) As etapas de reticulação e ligação podem ser misturadas de modo que múltiplas faixas que incluem o alvo pretendido, mas também proteínas aleatórias apareçam em cada um dos géis. O alvo pretendido será encontrado em uma faixa que aparece no gel com o aptâmero candidato (aqui, CAR029 e CAR024), mas não os aptâmeros de controle negativo relacionados (aqui, CAR029-Negl, CAR029-Neg2; ou CAR024-Negl, CAR024-Neg2; respectivamente). As faixas que correspondem ao alvo são extirpadas do gel.

[00563] 8) A espectrometria de massa (MS) é usada para identificar o alvo de aptâmero das bantas extirpadas.

EXEMPLO 15: APTÂMEROS ANTI-PSMA

[00564] Nesse Exemplo, uma biblioteca de aptâmero é avaliada para aptâmeros para a proteína de antígeno de membrana específico para próstata (PSMA/FOLH1/NAALADase I) identificada com o uso de 6 ciclos da seleção positiva como nos Exemplos acima. Após a seleção para um conjunto de aptâmeros de ligação de PSMA conforme descrito acima, a biblioteca de aptâmero foi sequenciada com o uso do protocolo padrão Ion Torrent (Life Technologies, Carlsbad, CA). Os principais candidatos foram selecionados para as propriedades tais como as seguintes: ocorrência comum na biblioteca avaliada, afinidade ao alvo, especificidade ao alvo, estrutura molecular definida, presença de conformação favorita, estabilidade de tal conformação, nenhuma ou pouca taxa de agregação em concentrações de trabalho, síntese reproduzível e direta e purificação.

[00565] Um protocolo experimental detalhado é apresentado no Exemplo 17 abaixo. Uma visão geral dos parâmetros e protocolo de avaliação incluía o seguinte:

[00566] 1. Uma biblioteca de ssDNA de "6 aptâmeros" gerada a partir da biblioteca de DNA sintetizado de filamento direto por AS PCR foi usada. A biblioteca de 6 aptâmeros compreendia as sequências variáveis de 10n, 20n, 25n, 30n, 35n e 40n com as sequências líder e de cauda mostradas na Tabela 20.

[00567] 2. Histag de PSMA conjugada com Dynabeads.

[00568] 3. Múltiplos ciclos da seleção positiva foram realizados pela mistura das esferas conjugadas com PSMA com biblioteca de aptâmero diluída em F127/PEG4000 em cerca de 2e12 cópias/seleção.

[00569] 4. Após cada ciclo, as esferas ressuspensas foram adicionadas diretamente na reação PCR para amplificação, nenhuma elui-

ção envolvida.

[00570] 5. Após a amplificação por PCR, a PCR foi, então, digerida com lambda nuclease por 2 horas e o ssDNA foi purificado pelo kit zymo ssDNA purification.

[00571] 6. 9 ciclos totais da seleção realizados. Para biblioteca de 35n e 40n somente 6 ciclos foram realizados já que as bibliotecas não realizaram.

[00572] 7. A recuperação de seleção de Ciclo 6 e Ciclo 9 foi usada na clonagem por PCR e 30 clones do Ciclo 6 e Ciclo 9 de cada biblioteca foram selecionados e os plasmídeos foram amplificados e purificados.

[00573] 8. Para o Ciclo 6, 180 clones foram usados na avaliação inicial. Para o Ciclo 9, há 120 clones totais que foram usados na avaliação inicial contra o alvo.

[00574] 9. Os clones de ssDNA individuais foram amplificados em miniescala e testados na avaliação inicial contra proteína alvo (proteína Histag PSMA) assim como proteínas não alvo BSA e Ig de camundongo. A razão entre sinal/ruído foi calculada.

[00575] 10. De acordo com a avaliação acima, os clones individuais foram selecionados e o ssDNA foi amplificado em uma escala média e titulado adicionalmente no formato ELISA contra o alvo.

[00576] 11. O sequenciamento de Sanger foi realizado para os clones finais e os dados de sequenciamento foram analisados.

[00577] Os resultados mais reproduzíveis foram observados na biblioteca de aptâmero de 30n. As sequências representativas obtidas a partir desses procedimentos são mostradas na **Tabela 20**. Na **Tabela 20**, as sequências são mostradas 5' a 3' da esquerda para a direita, em que cada sequência completa consiste na sequência 5' líder indicada seguida pela Sequência Variável indicada seguida pela sequência de cauda 3' indicada. Cada sequência é derivada a partir de uma

biblioteca que tem um líder e cauda com uma sequência variável entre os mesmos. A tabela indica se a sequência identificada compreende uma porção química de biotina na extremidade 5' ou 3'. Entende-se que as sequências de nucleotídeos que são reveladas na **Tabela 20** podem também ser modificadas na medida em que as modificações resultantes resultem em um aptâmero que tem cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 e 99 por cento de homologia à sequência revelada e retenham a funcionalidade de se ligar ao antígeno de PSMA ou fragmentos funcionais do mesmo.

TABELA 20: SEQUÊNCIAS CANDIDATAS DE APTÂMERO DE PSMA

ID	SEQ NO ID	5'-Líder	Sequência Variável	Cauda-3'
CAR050	230932	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	CCCCCCTCTGTCTCTTGTTT-CTCTTTTCTA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR051	230933	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	GCCCTATTCCCTCGCT TTCTCCCCTTTTGT	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR052	230934	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	CCCGCCTGATCCAAA GTAC-TGACTCTGTTA	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CAR053	230935	Biotina-ACTAAGCCACCGTGTCCA	CTTCTCTATCCAGATTGCCCCTT-TATTCTT	TGCTGCGTCACTCTGGAT

[00578] CAR050 e CAR051 foram identificados por clonagem. A afinidade de ligação desses dois aptâmeros foi testada contra a proteína recombinante PSMA/FOLH1/NAALADase I por ELISA. Consulte a **Figura 22.** CAR052 e CAR053 foram identificados por sequenciamento com o uso do sistema Ion Torrent após nove ciclos de seleção. CAR052 foi a sequência mais comum no torrent com 5,91% das contagens de leitura totais. CAR053, a segunda sequência mais comum, representou 3,34% das contagens de leitura totais.

EXEMPLO 16: ISOLAMENTO COMPETITIVO DOS APTÂMEROS

[00579] Conforme descrito no presente documento, os aptâmeros podem ser identificados contra um alvo de interesse. Nesse Exemplo, um esquema de ligação competitivo é usado para identificar os aptâmeros contra um alvo de interesse.

[00580] O método de identificação de aptâmero **30** é descrito na **Figura 3.** Um analito de interesse, por exemplo, uma entidade biológica tal como uma proteína ou microvesícula é capturada para um substrato **31.** O substrato pode ser, por exemplo, um substrato plano ou esfera. O analito pode ser capturado covalentemente ou não covalentemente, por exemplo, o analito pode ser capturado com o uso de um anticorpo, aptâmero ou ligação de estreptavidina-biotina. O analito capturado é contatado com uma biblioteca de candidatos de aptâmero de oligonucleotídeo **32.** Os oligonucleotídeos se ligam a vários componentes na mistura, incluindo o analito, o substrato, o agente de captura (por exemplo, anticorpo (Ab), aptâmero, etc.), tubo ou poço de reação, detritos biológicos, etc. **33.** Os oligonucleotídeos que ligam o analito compreendem candidatos de aptâmero para o alvo de interesse **34.** Os oligonucleotídeos não ligados são removidos por meio da lavagem **35.** Após essa etapa, a mistura de reação compreende o analito de captura ligado por candidatos de aptâmero. Um ligante que reconhece um epítopo específico, por exemplo, um anticorpo, é contatado com a mistura de reação **37.** O ligante dissocia os candidatos de aptâmero ligados ao mesmo epítopo que o ligante por meio da competição para o epítopo **38.** Os candidatos de aptâmero dissociados são coletados e amplificados **39.** As Etapas **32** a **39** são repetidas um número definido de vezes, n, por exemplo, 1 a 20 vezes, para enriquecer adicionalmente os candidatos de aptâmero com aqueles que se ligam ao mesmo epítopo que o ligante. Após os ciclos repetidos, os aptâmeros restantes são avaliados por sequenciamento e outras caracterizações **310** conforme descrito no presente documento.

[00581] A avaliação de controle é realizada em paralelo com o método acima. Qualquer aptâmero identificado por meio da avaliação de controle é descartado. Os analitos de controles incluem, sem limitação, substrato bruto incubado com o analito, substrato bruto sem o analito e

o método realizado com um ligante de controle, tal como um anticorpo que não liga um alvo de interesse.

EXEMPLO 17: PROTOCOLO DE SELEÇÃO DE APTÂMERO

[00582] Esse Exemplo fornece um protocolo para avaliar uma biblioteca de aptâmero contra uma proteína para identificar o aptâmero candidato que liga a proteína. O protocolo pode ser usado para identificar os candidatos de aptâmero que ligam as microvesículas substituindo a proteína alvo pelas microvesículas alvo. Os ajustes no protocolo para considerar as microvesículas são registrados quando apropriado.

PROJETO EXPERIMENTAL:

[00583] 1. Conjugar a proteína purificada nas Dynabeads.

[00584] 2. Seleção positiva (SELEX) para o número de ciclo desejado

[00585] 3. Sequenciamento de alto rendimento após os ciclos selecionados (por exemplo, Next Generation com o uso de Ion Torrent)

[00586] 4. Clonagem e validação dos clones selecionados após os ciclos desejados

[00587] O protocolo de Seleção de Afinidade de Aptâmero detalhado conforme segue:

REAGENTES:

[00588] 1. Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid ("esferas") (Life Tech, 14305D)

[00589] 2. Água, Molecular Biology Reagent Grade (Sigma, W4502)

[00590] 3. Sulfo-NHS (Fisher Scientific, PI-24510)

[00591] 4. EDC (Fisher Scientific, PI-77149)

[00592] 5. Tampão de Acoplamento de MES: MES a 0.05 M, pH 5,0 (pH pode depender do ponto isoelétrico da proteína alvo, pI)

[00593] a. MES (ácido 2[N-Morfolino] etanossulfônico) (Sigma,

M2933)

[00594] b. NaOH a 5N (Diluído para NaOH a 1N) (Fisher, SS256-500)

[00595] 6. Tampão de Lavagem de Conjugação de Esfera e Tampão de Armazenamento: PBS-Tween 20 0,01%

[00596] a. PBS, pH 7,5 (Sigma, P3813)

[00597] b. TWEEN® 20 (Sigma, 9416)

[00598] 7. Proteína alvo

[00599] a. Por exemplo, Histag-EpCAM, C-ter EpCAM, Histag-PSMA, FYN sem etiqueta, AMACR sem etiqueta, DBF4B sem etiqueta

[00600] 8. Tampão de Lavagem de ELISA: PBS-Triton 0,05%

[00601] 9. Anticorpos primários diluídos em PBS-B 1%

[00602] 10. Anticorpos secundários diluídos em PBS-B 1%

[00603] 11. Biblioteca de aptâmero, biblioteca inversa de 10n, 20n, 25n, 30n, 35n, 40n (lambda digerida e purificada). Consulte a **Tabela 21,** em que n significa um nucleotídeo aleatoriamente selecionado.

TABELA 21: BIBLIOTECA DE APTÂMERO E INICIADORES DE PCR

Identidade	Sequência (5' -> 3')	SEQ ID NO.
Biblioteca de aptâmero de 50-mer	5' -actaagccaccgtgtcca-10n-tgctgcgtcactctggat	231009
Biblioteca de aptâmero de 60-mer	5' -actaagccaccgtgtcca-20n-tgctgcgtcactctggat	231010
Biblioteca de aptâmero de 65-mer	5' -actaagccaccgtgtcca-25n-tgctgcgtcactctggat	231011
Biblioteca de aptâmero de 70-mer	5' -actaagccaccgtgtcca-30n-tgctgcgtcactctggat	231012
Biblioteca de aptâmero de 75-mer	5' -actaagccaccgtgtcca-35n-tgctgcgtcactctggat	231013
Biblioteca de aptâmero de 80-mer	5' -actaagccaccgtgtcca-40n-tgctgcgtcactctggat	231014

[00604] 12. E-Gel de Alta Resolução 4%

[00605] 13. Tampão de bloqueio e diluição de aptâmero (F127 0,5% PEG4000 0,5% em PBS (Hyclone))

[00606] 14. Tampão de lavagem (PBS+1%BSA)

[00607] 15. Reagentes de Phusion PCR (New England Biolabs, Inc

(NEB), Ipswich, MA)

[00608] 16. AptamerPCR-F-SPhos/Aptamer-R-bio

[00609] 17. Placa de 96 poços branca de não ligação. (consulte os consumíveis)

[00610] 18. Nanodrop.

[00611] 19. Kit Lambda exonuclease (NEB, 5 unit/ul).

[00612] 20. Reagentes de sequenciamento de Sanger

[00613] 21. Iniciador Direto M13 (-20): 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT (SEQ ID NO. 231015)

[00614] 22. Iniciador Inverso M13 (-27): 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC (SEQ ID NO. 231016)

[00615] 23. PEG4000, PEG8000

CONSUMÍVEIS:

[00616] 1. Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml de copolímero de polipropileno USA Scientific (USA Scientific, 1415- 2500)

[00617] 2. Frascos Vi-cell (Beckman Coulter, 723908)

[00618] 3. Placas brancas de fundo plano de não ligação com 96 poços (Corning® Costar® nº 3600)

[00619] 4. Placas brancas de fundo redondo de não ligação com 96 poços (Corning® Costar® nº 3605)

[00620] 5. Placa clara de fundo plano de ligação média com 96 poços (Corning® Costar® nº 9017)

EQUIPAMENTO:

[00621] 1. Ímã: DynaMag™ — Spin Ímã ("ÍMÃ") (Life Tech, 12320D)

[00622] 2. Vi-Cell XR – Analisador de Viabilidade de Célula

[00623] 3. Veriti

[00624] 4. Nanodrop

[00625] 5. Centrífuga (Eppendorf, 5415)

[00626] 6. Ímã de Placa: Separador de Placa Magnético ("ímã de placa") (Luminex, CN-0269-01)

[00627] 7. MixMate

[00628] 8. Leitor de Placa BioTek Synergy 2

[00629] Procedimento:

ETAPA 1: CONJUGAÇÃO DE PROTEÍNA ALVO

[00630] Propósito: Coconjugar as esferas magnéticas com a proteína alvo e MA-PEG para bloquear sítios não ocupados ativados e evitar a ligação de aptâmero não específica durante a seleção

[00631] 1. Ressuspender o estoque de esferas por vórtice por 2 minutos.

[00632] 2. Pipetar o volume desejado de esferas no tubo de copolímero e levar a 100 ul com MES a 25 mM, pH 5 (Tampão de Acoplamento diluído 1:1 com água).

[00633] 3. Peletizar as esferas transferidas colocando o tubo no ímã por 2 minutos e remover o sobrenadante.

[00634] 4. Adicionar 100 ul de MES a 25 mM (Tampão de acoplamento) e agitar a 800 rpm por 10 minutos.

[00635] 5. Colocar no ímã por 1 minuto e remover o sobrenadante.

[00636] 6. Repetir por um total de lavagens de 2 a 10 minutos com MES.

[00637] 7. Imediatamente antes do uso, diluir Sulfo-NHS com MES a 25 mM frio para alcançar uma concentração final de 50 mg/ml (multiplicar mg x 20 para alcançar o volume de água em ul).

[00638] 8. Imediatamente antes do uso, diluir EDC com MES a 25 mM frio adicionando-se 200 ul por frasco a uma concentração final de 50 mg/ml.

[00639] 9. Adicionar 200 ul de Sulfo-NHS a 50 mg/ml e 200 ul de EDC a 50 mg/ml às esferas e misturar gentilmente por vórtice (800 rpm) por pelo menos 30 minutos à TA ou 2 horas a 4 ℃.

[00640] 10. Peletizar as esferas ativadas pela colocação no ímã por 1 minuto e remover o sobrenadante.

[00641] 11. Ressuspender as esferas em 400 ul de Tampão de acoplamento de MES a 25 mM e misturar gentilmente por vórtice (800 rpm).

[00642] 12. Peletizar as esferas pela colocação no ímã por 1 minuto e remover o sobrenadante.

[00643] 13. Repetir as etapas 11 e 12 por um total de duas lavagens com Tampão de acoplamento de MES a 25 mM.

[00644] 14. Ressuspender o ativado e lavado com a proteína alvo e misturar gentilmente por vórtice.

[00645] 15. Incubar por pelo menos 30 minutos com mistura (por rotação) à temperatura ambiente.

[00646] 16. Peletizar as esferas acopladas pela colocação no ímã por 1 minuto e remover o sobrenadante.

[00647] 17. Lavar as esferas quatro vezes com PBS-Tween 20 0,01%.

[00648] 18. Peletizar o sobrenadante e ressuspender as esferas acopladas e lavadas em 200 ul de Tampão de Armazenamento e armazenar em 500K esferas/alíquotas de tubo a -80 ℃.

[00649] 19. Contar a suspensão de esfera com o uso do contador Vi-Cell.

[00650] a. Preparar uma diluição de 1:100 de esferas: Tampão de Armazenamento adicionando 14 ul de esferas a 1.386 ul de Tampão de Armazenamento em um frasco Vi-Cell.

[00651] b. Misturar as esferas diluídas bem pipetando para cima e para baixo diversas vezes.

[00652] c. Transferir 700 ul de esferas diluídas para um novo frasco Vi-Cell.

[00653] d. Ler os frascos duplicados para as Células Totais.

[00654] e. Determinar a concentração de esferas/ul multiplicando-se a Contagem de Células Total pelo Fator de Diluição na etapa 19a (isto

é, 100).

[00655] f. Determinar o rendimento total de esferas seguindo a conjugação multiplicando a concentração pelo volume de ressuspenção na etapa 18 (isto é, 200 ul).

ETAPA 2A: AVALIAR A CONJUGAÇÃO DE ESFERA POR ELISA

[00656] 1. Adicionar 200 ul de PBS-B 1% aos poços da placa de não ligação, fundo plano Costar.

[00657] 2. Adicionar 50.000 esferas conjugadas, vedar a placa e incubar por 1 hora à temperatura ambiente (RT) com agitação a 800 rpm.

[00658] 3. Colocar no ímã de placa por 30 segundos com agitação de 800 rpm. Remover o sobrenadante.

[00659] 4. Remover a placa do ímã de placa.

[00660] 5. Lavar 3x com 200 ul de PBS-Triton 0,05%, 3 min cada com agitação de 800 rpm.

[00661] 6. Colocar no ímã de placa por 30 segundos com agitação de 800 rpm. Remover o sobrenadante.

[00662] 7. Adicionar 100 ul de anticorpo primário diluído (AB) em PBS-B 1% aos poços apropriados.

[00663] 8. Vedar o poço de placa, incubar 1 hora a 37 ℃ com agitação, 800 rpm (em Jitterbug. Alterar Jitterbug para a velocidade original seguindo incubação de uma hora).

[00664] 9. Girar a placa para coletar a condensação.

[00665] 10. Colocar no ímã de placa por 3 min, remover AB primário e tampão.

[00666] 11. Remover a placa do ímã de placa.

[00667] 12. Lavar 3x com 200 ul de PBS-Triton 0,05%, 3 min cada com agitação de 800 rpm à TA.

[00668] 13. Colocar no ímã de placa por 30 segundos com agitação

de 800 rpm. Remover o sobrenadante.

[00669] 14. Adicionar 100 ul de AB secundário diluído em PBS-B 1% aos poços apropriados.

[00670] 15. Vedar o poço de placa, incubar TEMPO –até uma hora—à TA com agitação, 800 rpm. NOTA: proteger da luz.

[00671] 16. Colocar no ímã de placa por 3 min, remover AB secundário e tampão.

[00672] 17. Remover a placa do ímã de placa.

[00673] 18. Lavar 3x com 200 ul de PBS-Triton 0,05%, 3 min cada com agitação de 800 rpm à TA.

[00674] 19. Colocar no ímã de placa por 30 segundos com agitação de 800 rpm. Remover o sobrenadante.

[00675] 20. Adicionar 100 ul do substrato (TMB), pipetar a mistura, vedar e incubar TEMPO –até 30 min—com agitação de 800 rpm à TA. NOTA: proteger da luz.

[00676] 21. Adicionar 100 ul de solução de parada (ácido sulfúrico a 2N), vedar e incubar por 1 min com agitação de 800 rpm à TA.

[00677] 22. Colocar a placa no ímã de placa por 3 min, então, transferir o sobrenadante para uma nova placa de ligação média de placa clara e ler a 450 a 630 nm com o uso de um leitor de placa micro.

ETAPA 3: SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE APTÂMERO COM BASE EM ESFERA

[00678] Propósito: maturação de afinidade

[00679] Usar a biblioteca de aptâmero inversa sintética diretamente (a entrada será 10^{13} a 10^{15}, se necessário)

[00680] 1. Diluir as esferas no tampão de F127 0,5%/PEG4000 PBS (sem $MgCl_2$) a 100.000 esferas/50 ul (usar 100.000 esferas para o primeiro ciclo e usar uma quantidade tão menor quanto desejado de esferas posteriormente para mais rigor), vórtice a 800 rpm por 1 hora.

[00681] 2. Aliquotar 50 ul com 100.000 esferas em cada poço na

placa branca de fundo plano de não ligação.

[00682] 3. Em um tubo de copolímero separado (USA Scientific), diluir a biblioteca de aptâmero em F127 0,5%/PEG4000 PBS apropriado com $MgCl_2$ a 2mM para alcançar o número apropriado de cópias de aptâmero em um volume total de 50 ul por poço (quantidade de aptâmero de entrada poderia ser até 10^14 para o formato de esferas)

[00683] 4. Adicionar 50 ul de biblioteca de aptâmero diluída a cada 50 ul de amostra de esfera + tampão da placa de ligação e incubar à TA com vórtice a 800 rpm por 30 min.

[00684] 5. Colocar a placa com esferas no ímã de placa por 2 min com agitação de 800 rpm (as esferas irão se concentrar no centro do poço).

[00685] 6. Remover completamente o tampão; deixar a placa no ímã de placa e inclinar a placa para coletar o líquido no canto sem perturbar as esferas.

[00686] 7. Remover a placa do ímã de placa e lavar as esferas com 200 ul de tampão de lavagem (com o uso do tampão de incubação de aptâmero para as primeiras 3 lavagens, então, o tampão de lavagem geral é PBS-B, pode aumentar a concentração de sal até NaCl a 500 mM conforme necessário nos últimos ciclos) e vórtice a 700 rpm por 1 min.

[00687] 8. Colocar a placa no ímã de placa por 2 min com agitação de 700 rpm. Repetir as lavagens 10 vezes, um minuto por lavagem com tampão de bloqueio para as primeiras 3 vezes, então, usar PBS-B (ou PBS-B com tampão de sal aumentado) para o repouso. 9. Após a última lavagem, colocar a placa no ímã de placa por 3 min com agitação de 700 rpm e, então, remover completamente o tampão.

[00688] 10. Ressuspender a esfera com 52 ul de água livre de DNase, misturar bem por pipetagem.

[00689] 11. Transferir as esferas ressuspensas para um novo tubo

de 1,5 ml (para o primeiro ciclo, usar tubo na reação PCR)

[00690] 12. Preparar a reação PCR. Usar 4 (5 para o primeiro ciclo) reações para cada amostra. Usar l0 ul de esferas ressuspensas em 1 reação PCR, 4 reações totais para 1 amostra (guardar 10 ul para clonagem).

[00691] 13. Amplificação por PCR de recuperação de aptâmero: Para todas as bibliotecas, a PCR pode ser realizada com a polimerase Phusion: com aditivo de PEG8000, 98'C 30 segundos, ciclo a 98'C por 10 segundos, 60'C por 30 segundos e 68'C por 1 min. Para bibliotecas de aptâmero de 10n a 30n, usar tanto quanto 30 ciclos de PCR. Para as bibliotecas de 35n e 40n, usar abaixo de 25 ciclos.

[00692] 14. Após a amplificação por PCR, adicionar 10 ul da lambda exonuclease diretamente à reação PCR, centrifugar e incubar a 37 ℃ por 2 horas, terminar por aquecimento até 80'C p or 10 min e, então, de volta a 4'C. Antes de terminar a digestão, executar 2 ul em um E-Gel de Alta Resolução 4%. Se ainda houver faixa de dsDNA, continuar a digestão, se apenas a faixa de ssDNA aparece, terminar a digestão.

[00693] 15. Purificação de ssDNA Zymo do produto digerido lambda.

[00694] 16. Nanodrop (somente se purificado por Zymo) para quantificar 2e12 cópias ajustadas a estimadas para o próximo ciclo. (Se a leitura de nanodrop for baixa, qPCR é necessária para calcular a concentração do ssDNA)

[00695] 17. Repetir o número desejado de ciclos da seleção

ETAPA 4: CLONAGEM E PRODUÇÃO DE SSDNA E AMPLIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO DE CLONE

[00696] Propósito: separar as colônias de aptâmero individuais e obter o plasmídeo purificado

[00697] 1. Preparar a reação PCR de clonagem Phusion com iniciadores de biblioteca de aptâmero diretos e inversos sem modificação

5' ou 3'.

[00698] 2. A partir do aptâmero de recuperação (nas esferas acima), adicionar 5 ul das esferas ressuspensas na reação PCR.

[00699] 3. Os ciclos de PCR, para todas as bibliotecas, devem ser menos do que 25 ciclos.

[00700] 4. Adicionar 5 ul de tampão de E-gel diretamente na reação PCR, misturar e carregar a amostra para o E-gel 4%, 2 poços, 20 ul/poço. Executar até o corante amarelo fechar para a extremidade do gel.

[00701] 5. Tirar uma imagem do gel no dispositivo de imagem.

[00702] 6. Abrir o gel com o abridor de E-gel, não romper o próprio gel. Colocar o gel no topo da caixa de UV dentro da máquina de imagem.

[00703] 7. Dividir o gel com base na borda estimada da faixa verticalmente, ativar a luz UV e cortar rapidamente a faixa de DNA tão rápido quanto possível (usar a UV de 365 nm), colocar o gel com a faixa de DNA em um tubo de 1,5 ml.

[00704] 8. Estimar o tamanho de gel, (cerca de 100 ul a 200 ul), purificar o DNA do gel com o uso do kit Zymo Gel extraction de acordo com a instrução.

[00705] 9. Eluir finalmente o DNA com l0 ul de água livre de DNase/RNase

[00706] 10. De acordo com o kit TOPO blunt-end cloning junto à Invitrogen: misturar 2 ul do produto eluído por PCR de aptâmero, 1 ul de solução salina e 1 ul do vetor e 2 ul de água. Misturar por pipetagem. Incubar à TA por 15 a 30 min.

[00707] 1. Descongelar o meio SOC e as células quimicamente competentes TOP10 no gelo; adicionar a solução de ligação TOPO acima diretamente às células, misturar por pipetagem. Incubar em gelo por 30 min.

[00708] 2. Colocar o tubo em banho de água de 42'C por exatamente 30 segundos, então, resfriar imediatamente o mesmo em gelo por alguns minutos.

[00709] 3. Adicionar 250 ul do meio SOC no tubo; agitar horizontalmente o tubo a 200 rpm a 37'C por 1 hora.

[00710] 4. Transferir 125 ul da cultura em uma placa de ágar LB preaquecida com 100 ug/ml de Ampicilina. Incubar a 37'C de um dia para o outro.

[00711] 5. Produzir meio líquido LB suficiente e adicionar 100 ug/ml de estoque de Ampicilina para produzir 100 ug/ml de meio LB. Transferir para o tubo de cultura, 1 ml/tubo.

[00712] 6. Usar a ponta de 20 ul esterilizada para coletar colônias individuais nos respectivos tubos de cultura. Agitar a 300 rpm de um dia para o outro a 37'C.

[00713] 7. Extração de plasmídeo com 700 ul da cultura bacteriana de acordo com o protocolo de minipreparação de plasmídeo Pure-Link. Eluição final a 75 ul de TE (a extração de plasmídeo poderia usar também o kit Promega plasmid minipre Vacuume ou o kit Genescript centrifuge plate, mas deve incluir uma rotação de velocidade máxima final por 10 min para remover quaisquer produtos químicos residuais).

[00714] 8. Usar 2 ul em Egel 1%, tirar a imagem para registro.

[00715] 9. Estimar a concentração da preparação de plasmídeo com o uso do Nanodrop. Ajustar toda a preparação de plasmídeo a 2,5 ng/ul em água de acordo com a folha de cálculo (cerca de 5e8 cp/ul).

ETAPA 5: MINIPREPARAÇÃO DE SSDNA CLONAL PARA TESTE DE AVALIAÇÃO INICIAL

[00716] Propósito: preparar uma quantidade limitada de ssDNA de clone único e pronto para o teste de avaliação.

[00717] 1. Para a produção de aptâmero (filamento inverso), definir a reação PCR com iniciadores de biblioteca de aptâmero diretos fosfo-

rilados e inversos biotinilados. Usar 10 ul da solução de plasmídeo de 2,5 ng/ul acima em um volume de reação PCR de 40 ul. PCR para 30 ciclos.

[00718] 2. Após a PCR, adicionar 10 ul de Lambda exonuclease diretamente à reação PCR, centrifugar e girar para baixo, incubar a 37'C por 2 horas seguido por 80'C por 10 min, então, resfriar a 4'C. usar 2 ul da execução em E-gel 4% para verificar se a digestão está concluída. Uma vez que confirmado que a digestão está concluída, parar a digestão e continuar para a purificação

[00719] 3. Purificar o ssDNA de acordo com a instrução de kit zymo ssDNA purification (para propósito de alto rendimento, poderia usar o kit Zymo Oligo em formato de placa, alterar a velocidade de rotação para 5.000 para todas as etapas e máxima para a rotação seca final por 10 min na grande centrífuga de 2.000 no manual). Em ambos os casos, eluir o ssDNA com 30 ul de água livre de DNase/RNase.

[00720] 4. Estimar a concentração do ssDNA com o uso do Nano-drop.

ETAPA 6: TESTE DE AVALIAÇÃO DE CLONE

[00721] Propósito: testar a afinidade (positiva ou negativa com base nos critérios) de clones de aptâmero individuais (ssDNA) contra o alvo assim como a proteína de controle.

[00722] 1. De acordo com a folha de trabalho de teste de avaliação inicial, no dia antes do teste, revestir a proteína alvo e controlar a proteína na concentração desejada, 100 ul/poço na placa de ELISA de Alta Ligação, à TA por 3 a 5 horas.

[00723] 2. Bloquear a placa com 250 ul de F127 0,5%/PEG4000 (sem $MgCl_2$) PBS de um dia para o outro a 4'C.

[00724] 3. De acordo com os dados de Nanodrop, escolher o volume para todas as amostras que poderiam alcançar o nível de ssDNA a cerca de 10e11 a 10e12/poço.

[00725] 4. Diluir o ssDNA em F127 0,5%/ PEG4000 PBS mais a concentração final de $MgCl_2$ a 2mM.

[00726] 5. Remover a solução de bloqueio da placa; lavar duas vezes com PBS, 1 min para cada lavagem. Bater levemente na toalha de papel para remover o líquido residual.

[00727] 6. Adicionar 100 ul de diluição de ssDNA (10e11 a 10e13/poço. 100 ul), incubar à TA com agitação a 800 rpm por 4 horas.

[00728] 7. Lavar a placa com PBS+1%BSA por 3 vezes, 1 min/lavagem em agitação de 400 a 800 rpm. Remover o líquido e bater levemente na toalha de papel após cada lavagem.

[00729] 8. Diluir estreptavidina-poliHRP a 1:1.000 em tampão de PBS+1%BSA, adicionar 100 ul em cada poço. Incubar à TA por 1 hora com agitação

[00730] 9. Lavar a placa 3 vezes com PBS-1%BSA, bater levemente na toalha de papel para remover o líquido residual após cada lavagem, 1 min/lavagem.

[00731] 10. Preaquecer o substrato de Ultra ELISA à TA, adicionar 100 ul do substrato em cada poço e incubar no escuro com agitação por 30 min.

[00732] 11. Parar a reação adicionando 100 ul de H_250_4 a 2N e ler OD450-630 pelo leitor de microplaca.

[00733] 12. De acordo com um critério definido, (por exemplo, OD acima de determinado nível nesse protocolo padronizado ou acima da proteína de controle), para fazer o julgamento de qual clone é positivo ou negativo.

ETAPA 7: PRODUÇÃO DE ESCALA MÉDIA DE SSDNA DE APTÂMERO DO CLONE CANDIDATO PARA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA ADICIONAL

[00734] Propósito: preparar uma quantidade maior de ssDNA a par-

tir do clone candidato de aptâmero para confirmação adicional da afinidade para o alvo.

[00735] 1. Para a produção de aptâmero (filamento inverso), definir a reação PCR com iniciadores de biblioteca de aptâmero diretos fosforilados e inversos biotinilados. Usar 5 ul da solução de plasmídeo de 2,5 ng/ul acima em um volume de reação PCR de 40 ul, 12 reações por amostra. Executar a amplificação por PCR por 30 ciclos.

[00736] 2. Após a amplificação por PCR, adicionar 10 ul de Lambda exonuclease diretamente para a reação PCR, centrifugar e girar para baixo, incubar a 37 ℃ de um dia para o outro por 2 horas. Usar 2 ul da reação para executar em um Egel 4% para verificar a digestão conforme descrito acima.

[00737] 3. Purificar o ssDNA de acordo com a instrução de kit zymo ssDNA purification (4 reações através de 1 coluna de purificação zymo). NOTA: Essa etapa usa o kit ssDNA purification, NÃO o kit plate oligo purification kit usado acima.

[00738] 4. Combinar a eluição diferente da mesma amostra, usar Nanodrop para quantificar a concentração de ssDNA.

[00739] 5. Armazenar o aptâmero purificado a -80 ℃

ETAPA 8: ENSAIO DE VALIDAÇÃO DE CLONES DE APTÂMERO INDIVIDUAIS

[00740] Propósito: avaliar adicionalmente os clones selecionados de uma maneira quantitativa.

[00741] 1. Para o teste de validação adicional, tanto o alvo quanto o aptâmero são titulados entre si. Pelo menos 1 proteína não alvo (em 1 concentração de revestimento) é titulada contra o aptâmero a fim de avaliar a ligação não específica.

[00742] 2. Revestir os poços de placa de ELISA com três concentrações diferentes da proteína alvo (por exemplo, 1 ug, 0,5 ug e 0,25 ug/ml, a 100 ul/poço) assim como a proteína não alvo (geralmente 0,5

ug/ml e 100 ul/poço) em PBS por 3 a 5 horas. Bloquear a placa de um dia para o outro com F127 0,5%/PEG4000 0,5% (sem $MgCl_2$) em PBS.

[00743] 3. Diluir o aptâmero ao longo de pelo menos 4 ordens de magnitude (por exemplo, de 10e13 a 10e10/ poço ou 10e12 a 10e9/poço dependendo da recuperação) no PBS com F127 0,5%/ PEG4000. Adicionar 100 ul da diluição de aptâmero aos respectivos poços. Incubar a placa à TA a 800 rpm por 4 horas. NOTA: Se usar as microvesículas em vez da proteína purificada para avaliar a ligação de aptâmero, incubar a 300 rpm ao invés de 800 rpm.

[00744] 4. Lavar a placa com 250 ul de PBS-1%BSA, bater levemente na toalha de papel após cada lavagem para remover o líquido residual.

[00745] 5. Diluir estreptavidina-poliHRP a 1:1.000 em PBS-1%BSA, adicionar 100 ul da solução a cada poço, incubar à TA com 800 rpm por 1 hora. NOTA: Se usar as microvesículas em vez da proteína purificada para avaliar a ligação de aptâmero, incubar a 300 rpm ao invés de 800 rpm.

[00746] 6. Lavar a placa 3 vezes com PBS-1%BSA, bater levemente na toalha de papel para remover o líquido residual.

[00747] 7. Adicionar 100 ul do UltraSubstrato (preaquecido à TA pelo menos 2 horas antes do uso) a cada poço, cobrir o topo com folha metálica. Agitar a 300 a 400 rpm por 30 min à TA. Adicionar 100 ul do H_2SO_4 a 2N para parar a reação.

[00748] 8. Ler OD450-630.

ETAPA 9: SEQUENCIAMENTO DE SANGER

[00749] Propósito: Obter as informações de sequência a partir dos clones selecionados.

[00750] 1. Iniciadores de sequenciamento: Direto M13 (-20) e Inverso M13 (-27)

[00751] 2. De acordo com o protocolo de sequenciamento de San-

ger, produzir a mistura mestre de sequenciamento e aliquotar a 8 ul/poço.

[00752] 3. O plasmídeo de minipreparação dos clones selecionados será usado diretamente para o sequenciamento (a concentração de plasmídeo deve ser pelo menos l0 ng/ul).

[00753] 4. Adicionar 2 ul da amostra de minipreparação de plasmídeo ao respectivo poço. Ciclos conforme a reação padrão BDT.

[00754] 5. Limpar a amostra de acordo com o protocolo estabelecido.

[00755] 6. Realizar a execução de sequenciamento de Sanger.

[00756] 7. No software FinchTV, abrir o arquivo de sequenciamento desejado (F primeiro, se o arquivo F não for legível ou a qualidade for pobre, usar o arquivo R).

[00757] 8. Em cada barra de pesquisa, inserir EcoRI (GAATTC) e clicar pesquisar.

[00758] 9. O sítio EcoRI está 6 bases à frente do início do sequenciamento de iniciador de aptâmero se o produto de PCR de aptâmero tiver sido clonado de modo bem sucedido no vetor. Clicar inverter a exibição de sequência, da última base no sítio EcoR1 (C), as próximas 6 bases do vetor devem ser GCCCTT, a sequência seguinte deve coincidir ou com padrão direto de aptâmero (ATCCAGA...) ou com o modelo de filamento inverso (ACTAA...).

[00759] 10. Já que a direção de clonagem de aptâmero é aleatória, portanto, o início da sequência de aptâmero poderia ser direto (iniciando como ATCCAGA...GCAGCA) ou inverso (iniciando em ACTAA...GTCCA). Ao verificar a sequência, identificar a direção do aptâmero (direção direta ou inversa).

[00760] 11. Ler base por base no grama de sequenciamento para verificar se a chamada está correta.

[00761] 12. Gravar a sequência tanto na direção direta quanto na

inversa.

EXEMPLO 18: PROTOCOLO DE SELEÇÃO DE APTÂMERO DE BIBLIOTECA

[00762] Esse Exemplo fornece o protocolo para a seleção de biblioteca de RNA SUL 1 realizada no Exemplo acima. O protocolo pode ser seguido para outras bibliotecas de aptâmero e entrada de amostra conforme desejado.

PREPARAÇÃO

[00763] O espaço de trabalho é limpo com EtOH 80% antes do trabalho.

[00764] As esferas são esferas MagPlex (Luminex Corp., Austin, TX). Outras esferas podem ser substituídas conforme desejado.

[00765] Tampões/Reagentes para Preparar:

[00766] • água MilliQ

[00767] • $MgCl_2$ a 100 mM

[00768] • Tampão de Transcrição 5x (Tris a 200 mM pH 7,9)

[00769] • PBS 1x

[00770] • PBS 1x com $MgCl_2$ a 3 mM

[00771] • PBS 10x

[00772] • Tampão de seleção (PBS 1x com BSA 0,1% e $MgCl_2$ a 3 mM)

[00773] Antes de começar com a seleção, remover o tampão de armazenamento de esfera e lavar as esferas PBS 1x com $MgCl_2$ a 3 mM 1 vez (total de 200 ul em todos os 4 tubos). 200.000 esferas por seleção são usadas.

LIGAR O CONJUNTO DE RNA 2'F SUL1 A ESFERAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS COM MICROVESÍCULA

[00774] Abreviações: TK- Transcrição; NTC- Sem controle de modelo.

ETAPAS:

[00775] 1. **1º Ciclo:** Misturar 1 nmol de RNA 2'F SUL1 purificado com 20 µl de esferas ressuspensas (conjugadas com microvesícula). 10 µl de PBS 10x + BSA 1%, 3 µl $MgCl_2$ a 100 mM e 47 µl de H_2O. Isso gera uma concentração final de PBS 1x, BSA 0,1%, $MgCl_2$ a 3 mM.

[00776] 1.1 A adição de $MgCl_2$ nessa etapa gera uma concentração de $MgCl_2$ a 3 mM. Isso é a concentração de ligação para o processo inteiro.

[00777] 1.2 **Ciclos Seguintes:** Misturar 20 µl do produto de transcrição ($MgCl_2$ a 15 mM dentro) com 20 µl das esferas revestidas com microvesícula lavadas, mais 9 µl de PBS 10x com BSA 1%, 5 µl de H_2O. Nenhum $MgCl_2$ adicional é necessário por que o $MgCl_2$ no produto de transcrição diluído (TK) fornece uma concentração final de $MgCl_2$ a 3 mM.

[00778] 2. Incubar por 30 min a 37 ℃, agitar a 1.000 rpm e pipetar a mistura a cada 10 minutos.

[00779] 3. Lavar as esferas:

[00780] 3.1 Um ciclo de lavagem compreende:

[00781] 3.1.1 Remover as esferas do ímã

[00782] 3.1.2 Ressuspender as esferas em 100 µl de PBS 1x + $MgCl_2$ a 3mM fora do ímã.

[00783] 3.1.3 Incubar a amostra por 30 segundos fora do ímã.

[00784] 3.1.4 Colocar a amostra de volta para o ímã e esperar até as esferas estiverem no lado.

[00785] 3.1.5 Remover e descartar o sobrenadante.

[00786] 3.1.6 Ressuspender em 100 µl de PBS 1x + $MgCl_2$ a 3mM + BSA 0,1% fora do ímã.

[00787] 3.1.7 Incubar a amostra por 3 minutos fora do ímã.

[00788] 3.1.8 Colocar a amostra de volta para o ímã e esperar até as esferas estiverem no lado.

[00789] 3.1.9 Remover e descartar o sobrenadante.

[00790] 3.2 **1º Ciclo**: Colocar a mistura de esfera em um ímã e remover o sobrenadante. Lavar uma vez com 100 µl de PBS 1x + $MgCl_2$ 3 mM + BSA 0,1% (misturando por pipeta as esferas) e descartar o tampão.

[00791] 3.3 **Ciclos Seguintes:** Aumentar as etapas de lavagem cada segundo ciclo por uma mais etapa de lavagem até 3 etapas de lavagem.

[00792] 4. Adicionar 55 µl de água MilliQ à amostra de esfera.

[00793] 5. Eluir o RNA incubando a amostra de esfera por 5 min a 80 ℃

[00794] 5.1 Verificar se há 50 µl, se não, girar a amostra para girar a água condensada para fora do topo.

[00795] 5.2 Transferir o sobrenadante para um novo frasco. Trabalhar rapidamente para evitar que os filamentos se religuem às esferas.

[00796] 5.2.1 Usar 50 µl de eluato para a RT-PCR a seguir e armazenar o resto a -20 ℃

RT-PCR DE CANDIDATOS DE APTÂMERO RECUPERADOS

[00797] Guias de Prática

[00798] • O resto da amostra de RT-PCR e da amostra de TK-PCR é armazenado a -20 ℃

[00799] • RNA pode ser armazenado a 4℃ por ~1 hora

[00800] • O produto de RT-PCR pode ser armazenado de um dia para o outro a 4 ℃

[00801] • Proceder para o próximo ciclo de seleção para a qualidade de RNA ideal após a transcrição.

[00802] • Evitar a centrifugação de RNA

[00803] • Misturar em gelo

[00804] • Usar tubos de PCR de 0,5 ml

[00805] • Cada RT-PCR deve ter um controle sem modelo (NTC)

com água ao invés de modelo

[00806] • Não congelar-descongelar DTT mais do que uma vez

[00807] 6. Preparar uma Mistura Mestre (consulte a Tabela 21) antes do primeiro ciclo, verifique o mesmo com RNA a 0,5 pmol e armazenar as alíquotas de 48 µl a -20 ℃ até o uso.

TABELA 21: MISTURA MESTRE DE RT-PCR

Reagente	Volume (µl)/reação	Concentração final
5x Colorless GoTaq Flexi Buffer Promega nº de catálogo M890A	20	1 x
5x first strand buffer (Invitrogen) nº de lote 1300427	4	0,2 x
DTT a 100 mM	2	2 mM
Iniciador SUL1 F a 100 uM	1	1 µM
Iniciador SUL1 R a 100 uM	1	1 µM
$MgCl_2$ a 100 mM	1,5	1,5 mM
dNTPs a 25 mM (cada)	1,2	300 µM
Água MilliQ	17,3	
Total	48	

[00808] 7. Adicionar 50 µl de água MilliQ como o controle negativo (NTC) (pipetar isso primeiro) ou 50 µl de eluato de seleção. Pipetar a mistura.

[00809] 8. Incubar a 65 ℃ por 5 min.

[00810] 9. Após o resfriamento a 4 ℃, adicionar:

[00811] 9.1 1 µl de Superscript **II** Reverse Transcriptase (Invitrogen, nº de catálogo 18064) (200 U/µl)

[00812] 9.2 1 µl de GoTaqFlexi DNA polimerase (5 unidades/µl) Promega nº de catálogo M8305.

PCR —PROGRAMA (SARTPCR)

[00813] a) 10 min 54 ℃ (Essa etapa é apenas para t ranscriptase inversa, se mais ciclos forem necessários, não repetir a etapa A.)

[00814] b) 1 min 95 ℃

[00815] c) 1 min 60 ℃

[00816] d) 1 min 72 ℃

[00817] 10. Ciclizar as etapas b-d para

[00818] 10.1 **1º ciclo** 4 ciclos de b-d. Executar 5 µl de produtos de

PCR em um gel de agarose 4%.

[00819] 10.1.1 Ciclos subsequentes: A quantidade de RNA é diminuída após o primeiro ciclo, levando a um aumento nos ciclos de PCr exigidos. Para determinar o número de ciclos necessários cada vez, verificar a intensidade de faixa do gel de agarose do ciclo anterior da seleção. Usar esse número de ciclos para iniciar o próximo ciclo de RT-PCR. Nota: Sempre verificar os resultados em um gel de agarose.

[00820] 10.1.1.1 Resultados de gel de agarose: a faixa de produto deve ser vista no comprimento de alvo. A intensidade de faixa deve ser quase igual à faixa de escada de 50 bp (se não um pouco menos intensa). Se a faixa não for intensa o suficiente (pouco visível), ciclizar mais uma quantidade apropriada e reverificar em um gel de agarose.

TRANSCRIÇÃO

[00821] Toda mistura realizada em gelo. Preparar a Mistura Mestre de transcrição **(Tabela 22)** e armazenar as alíquotas de 85,7 µl a -20 ℃ até o uso.

[00822] 11. Verificar o pH de Tris a 200 mM de estoque pH 7,9 antes do uso. Uma alteração no pH ao longo do tempo pode causar problemas com a transcrição.

TABELA 22: MISTURA MESTRE DE TRANSCRIÇÃO (TK) PARA BIBLIOTECA SUL1

Reagente	Volume (µl) para uma reação	Volume (µl) para 20 reações	Concentração final
Tampão de transcrição 5x (Tris a 200 mM, pH 7,9)	20	400	1x
DTT a 100 mM	5	100	5 mM
ATP a 100 mM	1	20	1 mM
GTP a 100 mM	1	20	1 mM
2'F-dUTP a 100 mM	3	60	3 mM
2'F-dCTP a 100 mM	3	60	3 mM
$MgCl_2$ a 100 mM	15	300	15 mM
Água MilliQ	37	740	
Total volume	85	1700µl	

[00823] 12. Adicionar 10 µl de produto de RT-PCR à mistura mestre.

[00824] 13. Adicionar 1 µl de RNasina (40 unidades/µl)

[00825] 13.1 Inibidor de RNasina Ribonuclease Recombinante Promega nº de catálogo N2515/N2511

[00826] 14. Adicionar 4 µl de polimerase mutante T7 Y639F (25U/µl uso: 100U total por reação)

[00827] 15. Realizar a reação por 30 min a 37 ℃

[00828] 16. Usar o produto de transcrição diretamente para o próximo ciclo de seleção. Se a próxima etapa não for possível, congelar o produto de transcrição a -20 ℃.

CICLOS SUBSEQUENTES

[00829] Repetir a incubação de esfera, a RT-PCR e transcrição tão frequentemente quanto necessário. Tentar ter uma intensidade de faixa similar do produto de RT-PCR para a amostra em todos os ciclos conforme notado acima.

ENSAIO DE LIGAÇÃO

[00830] Um ensaio de ligação é realizado após os ciclos desejados da seleção para determinar e para avaliar a ligação não específica de aptâmeros selecionados de câncer a esferas de controle (conjugadas com sobrenadante da ultracentrifugação de plasma, consulte acima) e igualmente para amostras de controle de não câncer. Os ensaios de ligação podem também ser realizados para avaliar a ligação de aptâmeros selecionados contra as microvesículas alvo pretendidas.

[00831] Protocolo Cherenkov: Realizado com o uso da biblioteca de aptâmero radioativamente etiquetado ^{32}P.

[00832] Concentração final do tampão de seleção: PBS 1x + $MgCl_2$ a 3mM + BSA 0,01% pH 7,4

[00833] Tampão de lavagem: PBS 1x + $MgCl_2$ a 3mM pH 7,4

[00834] 1. Remover as amostras de microvesícula do congelador a

-80 ℃ e descongelar.

[00835] 2. Colocar as esferas no ímã (200.000 por experimento de amostra), remover o tampão de armazenamento de esfera.

[00836] 3. Lavar 1x 200 µl por 1 minuto cada com tampão de PBS 1x, $MgCl_2$ a 3mM. Agrupar as esferas para fazer 200.000 em um tubo.

[00837] 4. Ressuspender as esferas em 70 µl do tampão de seleção. (10 µl de PBS 10x, BSA 1% + 31 µl de $MgCl_2$ a 100 mM + 57 µl de H_2O por amostra).

[00838] 5. Adicionar 30 µl de biblioteca de aptâmero de RNA radioativamente etiquetado a sua respectiva amostra.

[00839] 6. Incubar agitando a 1.000 rpm a 37 ℃ por 30 min.

[00840] 7. Colocar as amostras em um ímã.

[00841] 8. Remover e guardar o sobrenadante.

[00842] 9. Lavar as esferas com 200 µl de tampão de lavagem PBS 1x $MgCl_2$ a 3mM pH 7,4, incubando o ímã por 3 minutos.

[00843] 10. Colocar as amostras no ímã, remover e guardar a solução de lavagem.

[00844] 11. Repetir as etapas 9, 10.

[00845] 12. Adicionar 100 µl de água à amostra, pipetar a mistura.

[00846] 13. Aquecer a 80 ℃ por 5 minutos.

[00847] 14. Colocar as amostras em um ímã, remover o sobrenadante e guardar.

[00848] 15. Ressuspender as esferas em 100 µl de água.

[00849] 16. Medir a radioatividade de cada fração com o uso do contador de cintilação.

[00850] 17. Analisar a quantidade de ligação de fundo presente.

SELEÇÃO NEGATIVA

[00851] Conforme desejado, uma etapa de seleção negativa é adicionada antes da incubação da biblioteca de aptâmero com as esferas conjugadas com as microvesículas alvo (isto é, o procedimento "Ligar

o conjunto de RNA 2'F SUL1 a esferas magnéticas revestidas com microvesícula" acima). A seleção negativa pode ser realizada com o uso de esferas conjugadas com o sobrenadante ou as amostras de entrada (por exemplo, plasma) após as microvesículas serem filtradas ou sedimentadas da amostra (referida como "sem esferas revestidas com microvesícula", "amostras depletadas de microvesícula" ou similar). As etapas são:

[00852] 1) Iniciar com o produto de biblioteca de aptâmero do ciclo desejado após a transcrição conforme descrito acima. Lavar as esferas antes do início: remover o tampão de armazenamento, lavar as esferas com 200 µl de tampão de lavagem, então, substituir o tampão conforme declarado abaixo:

[00853] 2) Etapa de seleção negativa: Adicionar e misturar com pipeta 20 µl do produto de transcrição ($MgCl_2$ a 15 mM) com esferas revestidas ‘sem microvesícula’ recentemente lavadas com 10 µl de PBS 10x com BSA 1%, 70 µl de H_2O. Nenhum $MgCl_2$ adicional é necessário por que o $MgCl_2$ no produto de transcrição diluído (TK) fornece uma concentração final de $MgCl_2$ a 3 mM.

[00854] 3) Incubar por 30 min a 37 ℃, agitar a 1.0 00 rpm.

[00855] 4) Remover o sobrenadante e adicionar o mesmo às esferas de seleção positiva (diretamente), que são esferas revestidas com microvesícula lavadas.

[00856] Continuar com a incubação de seleção positiva. Consulte Ligar o conjunto de RNA 2'F SUL1 a esferas magnéticas revestidas com microvesícula, iniciando na etapa 2. As etapas adicionais através da transcrição são conforme detalhadas acima.

EXEMPLO 19: APTÂMEROS PARA MICROVESÍCULAS DERIVADAS DE CÂNCER DE MAMA (BRCA)

[00857] Nesse Exemplo, uma biblioteca de aptâmero é avaliada para identificar os aptâmeros que se distinguem entre as microvesículas

que circulam no sangue de pacientes com câncer de mama e microvesículas que circulam no sangue de indivíduos de controle saudáveis (isto é, sem câncer de mama).

[00858] As microvesículas foram isoladas do plasma de um conjunto de 60 pacientes com câncer de mama (BrCa+). As microvesículas foram também isoladas do conjunto de 60 amostras de não câncer (BrCa-). As microvesículas foram isoladas do plasma com o uso de ultracentrifugação (120.000 x g). As microvesículas estavam na forma de pélete a partir da ultracentrifugação. O sobrenadante da ultracentrifugação foi guardado para o uso como um controle. As microvesículas de ambos os tipos de amostra foram conjugadas com esferas MagPlex (Luminex Corp, Austin TX). Opcionalmente, as microvesículas isoladas são incubadas com esferas anti-HSA/IgG/Fibrinogênio para remover essas proteínas do sangue altamente abundantes. Entretanto, a etapa de conjugação pode ser otimizada para favorecer a conjugação das microvesículas de modo que a remoção das proteínas altamente abundantes não seja estritamente necessária.

[00859] A biblioteca de aptâmero usada consistiu em uma biblioteca de aptâmero de RNA 2'F SUL1. A sequência é 5'-GGGAGGACGAUGCGG-N40-CAGACGACUCGCUGAGGAUCCGAGA-3' (SEQ ID NO. 231017). A biblioteca de aptâmero consiste em três seções: Iniciador direto — 15 nucleotídeos, região variável — 40 nucleotídeos; iniciador inverso — 25 nucleotídeos. Todas as pirimidinas (C e U) eram modificadas por 2'Fluoro.

[00860] A biblioteca de aptâmero foi incubada ou com esferas conjugadas com microvesícula de controle ou câncer. Treze ciclos de seleção positiva para aptâmeros que ligam as microvesículas foram realizados em paralelo para ambos os tipos de amostras. Consulte o Exemplo 18 acima para o protocolo detalhado das etapas de seleção

positiva. A seleção negativa não foi realizada.

[00861] Os aptâmeros que foram retidos a partir da seleção positiva acima foram sequenciados com o uso da tecnologia de sequenciamento Next Generation que consiste em Ion Torrent NGS (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). O sistema MiSeq pode ser usado também (Illumina, Inc., San Diego, CA). As sequências são comparadas para identificar os aptâmeros que são encontrados nas amostras de câncer e não nas amostras de controle e vice-versa. Tais aptâmeros fornecem candidatos que podem ser usados para distinguir entre amostras de BrCa e não BrCa.

[00862] Várias sequências representativas obtidas a partir desses procedimentos são mostradas na Tabela 23. As sequências na tabela foram identificadas nos conjuntos de aptâmeros a partir da seleção contra microvesículas BrCa, mas não estavam nos conjuntos de aptâmero selecionados contra amostras de não câncer. Na Tabela 23, as sequências são mostradas 5' a 3' da esquerda para a direita, em que cada sequência completa consiste na sequência 5' líder indicada seguida pela Sequência Variável indicada seguida pela sequência de cauda 3' indicada. Cada sequência é derivada de uma biblioteca que tem um líder e cauda (consulte a descrição acima) com uma sequência variável entre os mesmos. Entende-se que as sequências de nucleotídeos que são reveladas na **Tabela 23** podem também ser modificadas na medida em que as modificações resultantes resultem em um aptâmero que tem cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 e 99 por cento de homologia à sequência revelada e retenham a funcionalidade de se ligar ao antígeno de microvesícula ou fragmentos funcionais do mesmo.

TABELA 23: SEQUÊNCIAS CANDIDATAS DE APTÂMERO DE MICROVESÍCULA BRCA

ID	SEQ ID NO.	5'-Líder	Sequência Variável	Cauda-3'
BRCA_APT1_RNA	231018	GGGAGGACGAUGCGG	CGCGUCUUCCCCGCAUUGCCG-CAAUUGCCAUACAUUAAUA	CAGACGACUCGCU-GAGGAUCCGAGA
BRCA_APT2_RNA	231020	GGGAGGACGAUGCGG	GUCCGGAACGCCUCGAUCCUCG-CAUAAUAUGAUACGUCUG	CAGACGACUCGCU-GAGGAUCCGAGA
BRCA_APT3_RNA	231022	GGGAGGACGAUGCGG	GUCCAUGGUACGCCUCGAUUCCG-CCCAUACAUGCAUGUAA	CAGACGACUCGCU-GAGGAUCCGAGA
BRCA_APT4_RNA	231024	GGGAGGACGAUGCGG	CACUAUCCGUUUGUCCGUCCUCUU-GUGGUAUUGCGCAUGC	CAGACGACUCGCU-GAGGAUCCGAGA
BRCA_APT5_RNA	231026	GGGAGGACGAUGCGG	UCUUCCAUCUGGUCGCGAUACA-GAAUACGAUUAACAUAAA	CAGACGACUCGCU-GAGGAUCCGAGA
BRCA_APT6_RNA	231028	GGGAGGACGAUGCGG	GAUCACGCUGCCCUUUGUUUAAGG-CCUUUAUACAAACGCA	CAGACGACUCGCU-GAGGAUCCGAGA
BRCA_APT7_RNA	231030	GGGAGGACGAUGCGG	UAUUCGCCAGUCACAUCAACUAUGAU-GACGCUUGACUGGA	CAGACGACUCGCU-GAGGAUCCGAGA

[00863] Cada sequência na **Tabela 23** é sintetizada em duas variantes para a investigação adicional: 5' biotinilada e 3' biotinilada. Isso fornece variantes de aptâmero que podem ser capturadas na extremidade 5' ou na extremidade 3' conforme desejado. Os aptâmeros são adicionalmente sintetizados com cada pirimidina (C e U) modificada por 2'Fluoro.

[00864] A sequência de DNA que corresponde a cada sequência de RNA na **Tabela 23** é fornecida na listagem de sequência, em que a sequência de DNA segue diretamente sua sequência de RNA correspondente. Por exemplo, a SEQ ID NO. 231019 é a sequência de DNA que corresponde à sequência de RNA SEQ ID NO. 231018, etc. As formas de DNA dos aptâmeros são sintetizadas para a caracterização adicional também.

[00865] Os aptâmeros acima foram identificados com o uso da seleção positiva para aptâmeros que reconhecem microvesículas BrCa e não BrCa conjugadas com as microesferas.

EXEMPLO 20: APTÂMEROS ADICIONAIS PARA MICROVESÍCULAS DERIVADAS DE CÂNCER DE MAMA (BRCA)

[00866] Nesse Exemplo, uma biblioteca de aptâmero é avaliada para identificar os aptâmeros que se distinguem entre as microvesículas

que circulam no sangue de pacientes com câncer de mama e microvesículas que circulam no sangue de indivíduos de controle saudáveis (isto é, sem câncer de mama). O procedimento usa as mesmas amostras e a biblioteca de aptâmero que nos **Exemplos 17** a **19** acima. A seleção negativa é realizada antes de cada seleção positiva iniciando após o terceiro ciclo da seleção positiva.

[00867] A seleção negativa serve para remover os aptâmeros que ligam proteínas solúveis/abundante/não informativas e comuns para proteínas de câncer e não câncer. A seleção negativa inclui realizar a seleção negativa nos candidatos de aptâmero selecionados contra microvesículas derivadas de câncer conforme segue: (i) com o uso de microesferas conjugadas com o sobrenadante da etapa de ultracentrifugação de plasma derivado de câncer (que não deve conter microvesículas); (ii) com o uso de microesferas conjugadas com o sobrenadante da etapa de ultracentrifugação de plasma negativo para câncer (que não deve conter microvesículas); (iii) o uso de microesferas conjugadas com microvesículas negativas para câncer. A seleção negativa pode também ser realizada nos candidatos de aptâmero selecionados contra as microvesículas negativas para câncer conforme segue: (i) com o uso de microesferas conjugadas com o sobrenadante da etapa de ultracentrifugação de plasma positivo para câncer (que não deve conter microvesículas); (ii) com o uso de microesferas conjugadas com o sobrenadante da etapa de ultracentrifugação de plasma negativo para câncer (que não deve conter microvesículas); (iii) o uso de microesferas conjugadas com microvesículas negativas para câncer. Os ciclos da seleção negativa são realizados entre os ciclos da seleção positiva conforme descrito no presente documento.

[00868] As microvesículas são isoladas do plasma de um conjunto de 60 pacientes positivos para câncer e de um conjunto de 60 amostras de não câncer com o uso de ultracentrifugação (120.000 x g). As

microvesículas são encontradas na forma de pélete a partir da ultracentrifugação. O sobrenadante da ultracentrifugação é guardado para o uso como um controle. As microvesículas de ambos os tipos de amostra são conjugadas com esferas MagPlex (Luminex Corp, Austin TX).

[00869] A biblioteca de aptâmero usada consiste em uma biblioteca de aptâmero de RNA 2'F SUL1. A sequência é 5'-GGGAGGACGAUGCGG-N40-CAGACGACUCGCUGAGGAUCCGAGA-3' (SEQ ID NO. 231017), em que o N40 significa 40 nucleotídeos aleatórios. A biblioteca de aptâmero consiste em três seções: Iniciador direto — 15 nucleotídeos, região variável — 40 nucleotídeos; iniciador inverso — 25 nucleotídeos. Todas as pirimidinas (C e U) eram modificadas por 2'Fluoro.

[00870] A biblioteca de aptâmero foi incubada ou com esferas conjugadas com microvesícula de controle ou câncer. Nove ciclos de seleção positiva para aptâmeros que ligam as microvesículas são realizados em paralelo para ambos os tipos de amostras. A seleção negativa é realizada contra as esferas conjugadas ao sobrenadante de plasma de entrada após a ultracentrifugação antes da seleção positiva nos ciclos 4 a 9. Consulte os Exemplos acima para o protocolo detalhado das etapas de seleção positiva e seleção negativa.

[00871] Os aptâmeros que são retidos a partir da seleção positiva acima são sequenciados com o uso da tecnologia de sequenciamento Next Generation que consiste em Ion Torrent NGS (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Qualquer plataforma sequenciamento de alto rendimento apropriada tal como o sistema MiSeq pode ser usada para essa etapa (Illumina, Inc., San Diego, CA). As sequências são comparadas para identificar os aptâmeros que são encontrados nas amostras de câncer e não nas amostras de controle e vice-versa. Tais aptâmeros fornecem candidatos que podem ser usados para distinguir entre

amostras de câncer e não câncer.

[00872] Os dados de sequenciamento são analisados de acordo com o procedimento a seguir:

[00873] Etapa 1: As sequências são classificadas de acordo com as frequências no conjunto de aptâmeros inteiro recuperado no ciclo 9 após a seleção negativa contra esferas conjugadas com plasma de câncer depletado de microvesícula seguida pela seleção positiva contra esferas conjugadas com microvesículas de câncer.

[00874] Etapa 2: As alterações de dobra são calculadas entre a amostra notada na Etapa 1 e: (i) a mesma amostra após a seleção negativa adicional contra o plasma de câncer depletado de microvesícula; (ii) a mesma amostra após a seleção negativa adicional contra as microvesículas de não câncer; (iii) a mesma amostra após a seleção adicional contra o plasma de não câncer depletado de microvesículas.

[00875] Etapa 3: As sequências são classificadas com base nas alterações de dobra calculadas na Etapa 2 para identificar as sequências que são abundantes ou deficientes no conjunto de aptâmeros selecionado para microvesículas derivadas de câncer de mama.

[00876] Etapa 4: As sequências mutantes possíveis (por exemplo, devido à PCR ou outros erros) são removidas com base nos resultados da análise de consolidação.

[00877] Etapa 5: As sequências são identificadas com alterações de dobra maiores do que 3 e frequência mínima 50 em todas as três variantes (i, ii e iii na etapa 2).

[00878] Os mesmos esquemas de seleção que nas etapas 1 a 5 são realizados para os aptâmeros selecionados contra as esferas conjugadas a microvesículas de não câncer.

[00879] As sequências resultantes são sintetizadas em duas variantes para a investigação adicional: 5' biotinilada e 3' biotinilada. Isso fornece variantes de aptâmero que podem ser capturadas na extremi-

dade 5' ou na extremidade 3' conforme desejado. Os aptâmeros são adicionalmente sintetizados com cada pirimidina (C e U) modificada por 2'Fluoro. Os aptâmeros podem também ser sintetizados como a sequência de DNA que corresponde a cada sequência de RNA. As bibliotecas de aptâmero podem também ser filtradas com base na sequência secundária prevista, energia livre e outros parâmetros conforme descrito no presente documento. As sequências identificadas são comumente sobrerrepresentadas em conjuntos positivos para câncer em comparação aos controles. Entretanto, as sequências identificadas sobrerrepresentadas nos conjuntos de não câncer são também observadas.

[00880] Várias sequências representativas obtidas a partir desses procedimentos são mostradas na **Tabela 24**. As sequências na tabela foram identificadas nos conjuntos de aptâmeros a partir da seleção contra microvesículas obtidas a partir do plasma de pacientes com câncer de mama, mas não estavam nos conjuntos de aptâmero selecionados contra amostras de plasma de não câncer. Na **Tabela 24**, as sequências são mostradas 5' a 3' da esquerda para a direita, em que cada sequência completa consiste na sequência 5' líder indicada seguida pela Sequência Variável indicada seguida pela sequência de cauda 3' indicada. Cada sequência é derivada de uma biblioteca que tem um líder e cauda (consulte a descrição acima) com uma sequência variável entre os mesmos. Entende-se que as sequências de nucleotídeos que são reveladas na **Tabela 24** podem também ser modificadas na medida em que as modificações resultantes resultem em um aptâmero que tem cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 e 99 por cento de homologia à sequência revelada e retenham a funcionalidade de se ligar ao antígeno de microvesícula ou fragmentos funcionais do mesmo.

TABELA 24: SEQUÊNCIAS CANDIDATAS DE APTÂME-

RO DE MICROVESÍCULA BRCA

ID	SEQ ID NO.	5'-Líder	Sequência Variável	Cauda-3'
BCE8	231032	GGGAGGACGAUGCGG	UACCGCCUCAUCAUCGGACACGACGUGUAUCA-GUUGGCUG	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE9	231033	GGGAGGACGAUGCGG	GUUCUCGCCUCUGUCCUCAUGGUUCGAAC-CGGUAUGCAUG	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE10	231034	GGGAGGACGAUGCGG	GCGGUUUCUUCUCCUGACUACAUGA-GAUUAAUAAACGCGC	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE11	231035	GGGAGGACGAUGCGG	CCGCCUCGAACACUGACGUCGUGGAAC-CUUCGAUUGCUAG	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE12	231036	GGGAGGACGAUGCGG	AAUCACAGUAAUUCUGCCCCUCUGAUGAAAC-CGGUUACUU	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE13	231037	GGGAGGACGAUGCGG	CUUAGUGAUUUCGCCGCCCCUCUGUUUAGUG-GCCAUUGGA	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE14	231038	GGGAGGACGAUGCGG	ACACUAUUCCGGUAAGUCAUCGUUUAAC-CGUUUGUUGCAA	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE15	231039	GGGAGGACGAUGCGG	UGCGCAACGCCUUGAUUCACUCCUACAGUGU-GUCUAUAGA	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE16	231040	GGGAGGACGAUGCGG	AAUGUUAAGCUUACAUACGCCUGGGUCACU-CUUUGUUCUG	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE17	231041	GGGAGGACGAUGCGG	GUAAAUAUUCACGUUGAAUCGCCUUGCUCCU-CUUAGUCUG	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE18	231042	GGGAGGACGAUGCGG	CCGCCUCGGAUCGUUCCCAAUGGUGGUAC-CCCUAUUAAUG	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE19	231043	GGGAGGACGAUGCGG	UGUAGAUCGUUCUUAUCCGCCUCGGUCUUC-CCCAGGUUAA	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE20	231044	GGGAGGACGAUGCGG	AUCGUCGGGCCCCUUUUAUGAAACUUACAU-GAAAGCGCAC	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE21	231045	GGGAGGACGAUGCGG	UAAGAGUGCACAGUACUGCCUCGAUCCUC-CAUGGCUUAAG	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE22	231046	GGGAGGACGAUGCGG	GAAUUAGUACUGACGGCCGCCUUGAUCCUC-CGUUAGUCUG	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE23	231047	GGGAGGACGAUGCGG	GCCCGCCUCCGAAGCCCUCCUAAGUGCA-CUUUAAACCGCG	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE24	231048	GGGAGGACGAUGCGG	CCGCCUGGGAUCACUCUCUACG-CGUAUAAAUGCUCUGUCA	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE25	231049	GGGAGGACGAUGCGG	AGUCUGACCCUGUUAUGGACUACCAUAUCA-GAAAGGUACU	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE26	231050	GGGAGGACGAUGCGG	GGUGAUCCUCCCCCCCGCCUCGAAGAUUU-GUGCACAUAUC	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA
BCE27	231051	GGGAGGACGAUGCGG	GCUACCAUCGUCUAGUGAGUCACCCUUAGUU-CAUCAAGGC	CAGACGACUCGCUGAGGA-UCCGAGA

[00881] As **Figuras 23A** a **C** mostram a ligação dos aptâmeros indicados na **Tabela 24** contra as microesferas conjugadas a várias amostras de entrada. O aptâmero é indicado acima de cada plotagem. Consulte a **Tabela 24.** A amostra de entrada é indicada no eixo geométrico X da esquerda para a direita conforme segue: 1) Exossoma de Câncer: ligação de aptâmero a microesferas conjugadas com microvesículas isoladas das amostras de plasma de pacientes com câncer de

mama; 2) Não Exossoma de Câncer: ligação de aptâmero a microesferas conjugadas com amostras de plasma de pacientes com câncer de mama após a remoção das microvesículas por ultracentrifugação; 3) Exossoma de Não Câncer: ligação de aptâmero a microesferas conjugadas com microvesículas isoladas das amostras de plasma de pacientes normais (isto é, sem câncer de mama); 4) Não Exossoma de Não Câncer: ligação de aptâmero a microesferas conjugadas com amostras de plasma de pacientes com câncer de mama após a remoção das microvesículas por ultracentrifugação. Conforme mostrado nas **Figuras 23A** a **C,** os aptâmeros tinham, cada um, a capacidade de distinguir entre as amostras de microvesícula de câncer versus as amostras de controle de sobrenadante e as microvesículas de não câncer. Ademais, todas as sequências na **Tabela 24** foram observadas como se ligando mais abundantemente a microvesículas derivadas de câncer em comparação a microvesículas derivadas de não câncer com a exceção de BCE10 e BCE14, que foram observados como se ligando mais abundantemente a microvesículas derivadas de não câncer em comparação a microvesículas derivadas de câncer.

[00882] Com base nas comparações realizadas nesse Exemplo, os aptâmeros que ligam a uma entrada de partida diferente são obtidos, incluindo: 1) aptâmeros que ligam, de preferência, microvesículas derivadas de câncer em vez de microvesículas derivadas de não câncer; 2) aptâmeros que ligam, de preferência, microvesículas derivadas de não câncer em vez de microvesículas derivadas de câncer; 3) aptâmeros que ligam, de preferência, tanto microvesículas derivadas de não câncer quanto microvesículas derivadas de câncer (por exemplo, aglutinantes "universais"); e 4) aptâmeros que ligam componentes de plasma que foram depletados de microvesículas.

[00883] As bibliotecas de aptâmero nesse Exemplo são adicionalmente submetidas a quatro ciclos de seleção negativa e positiva adici-

onal. A seleção positiva é realizada conforme descrito nesse Exemplo. Os ciclos de seleção negativa são realizados com o uso das esferas conjugadas com microvesículas de não câncer como a seleção negativa para aptâmeros obtidos pela seleção positiva contra esferas conjugadas com microvesículas de câncer. Similarmente, os ciclos de seleção negativa são realizados com o uso das esferas conjugadas com microvesículas de câncer como a seleção negativa para aptâmeros obtidos pela seleção positiva contra esferas conjugadas com microvesículas de não câncer.

EXEMPLO 21: DIAGNÓSTICO DE DOENÇA

[00884] Esse Exemplo ilustra o uso dos aptâmeros da presente invenção para diagnosticar a doença proliferativa.

[00885] Uma quantidade adequada de um aptâmero que liga uma microvesícula derivada de câncer é sintetizada por meios químicos conhecidos na técnica. Os aptâmeros são conjugados com um agente de diagnóstico para a detecção, tal como uma porção química fluorescente, com o uso de um método de conjugação conhecido na técnica.

[00886] A composição é aplicada a microvesículas isoladas das amostras de sangue retiradas de uma coorte de teste de pacientes que sofrem de uma doença proliferativa associada à superexpressão de microvesículas, por exemplo, câncer de próstata, mama ou pulmão. A composição é igualmente aplicada a microvesículas isoladas de amostras de sangue retiradas de uma coorte de controle negativo que não sofre de uma doença proliferativa.

[00887] O uso de técnicas de detecção apropriadas (por exemplo, o ensaio de microesferas ou citometria de fluxo) nas amostras de coorte de teste indica a presença da doença, enquanto que as mesmas técnicas aplicadas às amostras de coorte de controle indicam a ausência da doença.

[00888] Os resultados mostram que os aptâmeros da presente in-

venção são úteis no diagnóstico de doenças proliferativas.

EXEMPLO 22: APTÂMEROS TERAPÊUTICOS

[00889] Esse Exemplo ilustra o uso dos aptâmeros da presente invenção para tratar a doença proliferativa em um camundongo.

[00890] Uma quantidade adequada de um aptâmero que liga uma microvesícula derivada de câncer é sintetizada por meios químicos conhecidos na técnica. Os aptâmeros são conjugados com um agente quimioterapêutico com o uso de um método de conjugação conhecido na técnica. O conjugado é formulado em uma composição aquosa.

[00891] A composição é administrada de modo intravenoso, em uma ou mais doses, a uma coorte de teste de camundongos que sofrem de uma doença proliferativa associada à superexpressão das microvesículas, por exemplo, modelo de câncer de próstata, mama ou pulmão. Uma coorte de controle que não sofre de uma doença proliferativa é administrada a composição idêntica de modo intravenoso de acordo com um regime de dosagem correspondente.

[00892] A análise patológica de amostras de tumor e/ou sobrevida de camundongo indicam que a mortalidade e/ou morbidez são melhoradas na coorte de teste em relação à coorte de controle.

[00893] Os resultados mostram que os aptâmeros da presente invenção são úteis no tratamento de doenças proliferativas.

[00894] Os aptâmeros úteis podem ser usados para tratar o câncer em outros organismos, por exemplo, um humano.

EXEMPLO 23: APTÂMERO — MÉTODO DE DETECÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

[00895] Esse Exemplo ilustra o uso de um conjunto de aptâmero para detectar as microvesículas que são indicativas de um fenótipo de interesse. O método faz uso de um conjunto de aptâmero que foi enriquecido contra um alvo de interesse que é indicativo de um fenótipo de interesse. O método nesse Exemplo permite o uso eficaz de uma bibli-

oteca de aptâmeros para reconhecer, de preferência, uma entidade alvo.

[00896] Para propósitos de ilustração, o método é descrito no Exemplo com um alvo de microvesícula de uma amostra de fluido corporal. Um versado na técnica apreciará que o método pode ser estendido para outros tipos de entidade alvo (por exemplo, células, proteínas, vários outros complexos biológicos), amostra (por exemplo, tecido, cultura celular, biópsia, outros fluidos corporais) e outros fenótipos (outros canceres, outras doenças, etc.) enriquecendo uma biblioteca de aptâmero contra as amostras de entrada desejadas.

FLUXO DE TRABALHO GERAL:

[00897] 1) Obter a amostra (plasma, soro, urina ou qualquer outra amostra biológica) de pacientes com etimologia médica desconhecida e pré-tratar os mesmos correspondentemente para garantir a disponibilidade do alvo de interesse (consulte abaixo). Quando o alvo de interesse é uma população de microvesícula, as microvesículas podem ser isoladas e opcionalmente ancoradas a um suporte sólido tal como uma microesfera.

[00898] 2) Expor a amostra a um conjunto de aptâmero que carrega determinada especificidade contra o alvo de interesse. Conforme descrito no presente documento, um conjunto de aptâmeros que carrega determinada especificidade contra o alvo de interesse pode ser enriquecido com o uso de vários esquemas de seleção, por exemplo, com o uso de microvesículas de não câncer para a seleção negativa e microvesículas de câncer para a seleção positiva conforme descrito acima. Os aptâmeros de DNA ou RNA podem ser usados conforme desejado.

[00899] 3) Contatar a biblioteca de aptâmero com a amostra.

[00900] 4) Eluir quaisquer aptâmeros ligados ao alvo.

[00901] 5) Sequenciar o aptâmero eluído. Os métodos de sequen-

ciamento Next generation podem ser usados.

[00902] 6) Analisar o perfil de aptâmero a partir do sequenciamento. Um perfil de aptâmeros conhecidos por ligar o alvo de interesse indica a presença do alvo dentro da amostra de entrada. O perfil pode ser usado para caracterizar a amostra, por exemplo, como câncer ou não câncer.

VARIAÇÕES DE PROTOCOLO:

[00903] Há atualmente quatro protocolos básicos que servem o propósito do ensaio de sequenciamento de aptâmero. As amostras podem ser qualquer amostra biológica.

PROTOCOLO 1:

[00904] Ultracentrifugação de amostras de fluido corporal de 1 a 5 ml (por exemplo, plasma/soro/urina) (120K x g, sem sacarose) com duas lavagens do precipitado para isolar as microvesículas.

[00905] Medir a concentração de proteína total da amostra recuperada que contém as microvesículas isoladas.

[00906] Conjugar as microvesículas isoladas com esferas magnéticas (por exemplo, esferas MagPlex (Luminex Corp. Austin TX)).

[00907] Incubar as microvesículas conjugadas com o conjunto de aptâmeros de interesse.

[00908] Lavar os aptâmeros não ligados retendo as esferas com o uso do ímã.

[00909] Eluir os aptâmeros ligados às microvesículas.

[00910] Amplificar e purificar os aptâmeros eluídos.

[00911] Sequenciamento de aptâmero (por exemplo, métodos Next generation; Ion Torrent: PCR de fusão, PCR de emulsão, sequenciamento).

[00912] Avaliar o perfil de aptâmero.

PROTOCOLO 2:

[00913] Esse protocolo alternativo não inclui uma etapa de isola-

mento de microvesícula, a conjugação de microvesículas com as esferas ou etapa de divisão separada. Isso pode apresentar a ligação não específica dos aptâmeros contra a amostra de entrada.

[00914] Remover as células/detritos da amostra de fluido corporal e diluir a amostra com PBS que contém $MgCl_2$ (2 mM).

[00915] Pré-misturar a amostra preparada acima com a biblioteca de aptâmero.

[00916] Ultracentrifugação da mistura de aptâmero/amostra (120K x g, sem sacarose). Lavar as microvesículas precipitadas.

[00917] Recuperar o precipitado e eluir os aptâmeros ligados às microvesículas.

[00918] Amplificar e purificar os aptâmeros eluídos.

[00919] Sequenciamento de aptâmero (por exemplo, métodos Next generation; Ion Torrent: PCR de fusão, PCR de emulsão, sequenciamento).

[00920] Avaliar o perfil de aptâmero.

PROTOCOLO 3:

[00921] Esse protocolo usa a filtração em vez da ultracentrifugação e pode exigir menos tempo e volume de amostra.

[00922] Remover as células/detritos da amostra de fluido corporal e diluir a mesma com PBS que contém $MgCl_2$ (2 mM).

[00923] Pré-misturar a amostra preparada acima com a biblioteca de aptâmero.

[00924] Carregar a amostra no filtro (isto é, filtro MWCO de 150K ou 300K ou qualquer outro que pode eliminar os aptâmeros não ligados ou indesejados). Centrifugar a amostra para concentrar. A amostra concentrada deve conter microvesículas.

[00925] Lavar o concentrado. Variante 1: Diluir o concentrado com tampão especificado acima para o volume original e repetir a centrifugação. Variante 2: Diluir o concentrado com tampão especificado aci-

ma para o volume original e transferir o concentrado para uma nova unidade de filtro e centrífuga. Repetir duas vezes.

[00926] Recuperar o concentrado e eluir os aptâmeros ligados às microvesículas.

[00927] Amplificar e purificar os aptâmeros eluídos.

[00928] Sequenciamento de aptâmero (por exemplo, métodos Next generation; Ion Torrent: PCR de fusão, PCR de emulsão, sequenciamento).

[00929] Avaliar o perfil de aptâmero.

PROTOCOLO 4:

[00930] Ultracentrifugação de amostra de fluido corporal de 1 a 5 ml (120K x g, sem sacarose) com duas lavagens do precipitado para isolar as microvesículas.

[00931] Pré-misturar as microvesículas com conjunto de aptâmeros.

[00932] Carregar a amostra na unidade de filtro MWCO de 300K e centrífuga (2000xg). A taxa de concentração é ~3x.

[00933] Lavar o concentrado. Variante 1: Diluir o concentrado com tampão especificado acima para o volume original e centrifugar. Repetir duas vezes. Variante 2: Diluir o concentrado com tampão especificado acima para o volume original e transferir o concentrado para uma nova unidade de filtro e centrífuga. Repetir duas vezes

[00934] Recuperar o concentrado e eluir os aptâmeros ligados às microvesículas.

[00935] Amplificar e purificar os aptâmeros eluídos.

[00936] Sequenciamento de aptâmero (por exemplo, métodos Next generation; Ion Torrent: PCR de fusão, PCR de emulsão, sequenciamento).

[00937] Avaliar o perfil de aptâmero.

EXEMPLO 24: DETECÇÃO DE MICROVESÍCULA DERIVADA DE CÂNCER COM O USO DO SEQUENCIAMENTO DE AP-

TÂMERO

[00938] O método no **Exemplo 23** acima é usado para detectar as microvesículas em uma amostra de fluido corporal que são derivadas de células de câncer. As microvesículas podem ser dispersas a partir das células de câncer. A biblioteca de aptâmero compreende um subconjunto de aptâmeros descrito nos **Exemplos 18** a **20** acima que liga, de preferência, a microvesículas de pacientes com câncer versus indivíduos sem câncer. As sequências são listadas aqui como SEQ ID NOs. 231032 a 241535. O método é usado para detectar a presença ou ausência de microvesículas que são indicativas de câncer.

[00939] A amostra de teste compreende as amostras de plasma que são coletadas dos pacientes que têm ou suspeitos de ter um câncer. Uma amostra de teste é uma amostra a ser caracterizada pelos métodos da invenção. O método é realizado para determinar a presença ou ausência de microvesículas derivadas de câncer na circulação do paciente.

[00940] O método é adicionalmente usado para detectar a evidência de câncer antes da biópsia. A amostra de teste compreende amostras de plasma que são coletadas de pacientes a serem submetidos a uma biópsia. A amostra de teste é uma amostra a ser caracterizada pelos métodos da invenção. O método é realizado para determinar a presença ou ausência de microvesículas derivadas de câncer na circulação do paciente antes da biópsia. Se as microvesículas derivadas de câncer não forem detectadas, uma decisão pode ser feita para deixar de fazer a biópsia.

EXEMPLO 25: SELEÇÃO DE APTÂMERO PARA MICROVESÍCULAS

[00941] As técnicas de seleção de aptâmero clássicas (isto é, SELEX) são tipicamente realizadas para enriquecer os aptâmeros para o alvo particular em condições "limpas" quando a interferência com mo-

léculas não alvo (competidores) é minimizada. Entretanto, várias aplicações para os aptâmeros selecionados exigem que os aptâmeros trabalhem para ligar seu alvo em diversos ambientes, por exemplo, em uma amostra biológica ou meio de cultura de tecido com uma abundância de moléculas potencialmente interferentes. Nesse caso, tais moléculas interferentes que não estavam presentes durante o processo de seleção podem interferir com o reconhecimento de alvo pelos aptâmeros selecionados em condições ideais. Esse Exemplo fornece um processo de seleção de aptâmero para avaliar uma biblioteca de aptâmero a fim de selecionar os aptâmeros altamente específicos para os alvos e também que podem atuar em uma amostra biológica que compreende as moléculas potencialmente interferentes.

[00942] Nesse Exemplo, o alvo compreende uma microvesícula de modo que uma biblioteca de aptâmero seja avaliada para os membros que ligam as microvesículas derivadas de câncer em comparação às microvesículas normais (controles de não câncer). Um versado na técnica apreciará que o método pode ser estendido para outros tipos de entidade alvo (por exemplo, células, proteínas, vários outros complexos biológicos). O método pode empregar os vários tipos de amostra (por exemplo, tecido, cultura celular, biópsia, outros fluidos corporais) e pode ser direcionado a moléculas alvos que podem ser usadas para caracterizar os vários fenótipos (vários cânceres, outras doenças, etc.) enriquecendo uma biblioteca de aptâmero contra as amostras de entrada desejadas. Adicionalmente, as amostras de câncer e normais podem ser comutadas para avaliação para aptâmeros que ligam, de preferência, as amostras normais.

[00943] Variante 1: seleção de aptâmero com base em microvesícula em competição com plasma depletado de microvesículas. Fluxo de trabalho:

[00944] -> As microvesículas são isoladas de amostras de plasma

de câncer e normais com o uso de ultracentrifugação. O sobrenadante que compreende a amostra depletada de microvesícula é armazenado como uma amostra de controle negativo.

[00945] -> Capturar/conjugar as microvesículas isoladas com esferas magnéticas.

[00946] -> Iniciar o processo de seleção e avaliação de aptâmero com o uso das esferas conjugadas com microvesícula misturadas com sobrenadante de cima (isto é, plasma depletado de microvesícula). Suplementar o sobrenadante com $MgCl_2$. A avaliação e a seleção de aptâmero para microvesículas derivadas de câncer e normais (derivadas de não câncer) podem ser feitas em paralelo. Cada ciclo consiste em seleções negativas e positivas conforme desejado.

[00947] Já que a biblioteca de aptâmero inicial é exposta simultaneamente aos alvos de microvesícula assim como competidores (proteínas solúveis) do plasma, os aptâmeros recuperados das microvesículas/esferas podem ser mais específicos para os alvos na membrana de microvesícula. Tais aptâmeros podem atuar eficazmente em amostras biológicas sem exigir a purificação extensiva do alvo antes da ligação/detecção de alvo.

[00948] Variante 2: Seleção de aptâmero para microvesículas derivadas de câncer (por exemplo, dispersas a partir de células de câncer) em competição com microvesículas isoladas de amostras normais. Fluxo de trabalho:

[00949] -> As microvesículas são isoladas de amostras de plasma de câncer e normais com o uso de ultracentrifugação.

[00950] -> Capturar/conjugar as microvesículas isoladas derivadas de câncer com esferas magnéticas.

[00951] -> Iniciar o processo de seleção e avaliação de aptâmero com o uso de esferas conjugadas com microvesículas de câncer misturadas com microvesículas normais (não conjugadas) suplementadas

com $MgCl_2$. A seleção e a avaliação de aptâmero são realizadas para as microvesículas derivadas de câncer somente retendo apenas os aptâmeros que são retidos com as esferas magnéticas.

[00952] Já que a biblioteca de aptâmero será exposta simultaneamente a ambos os tipos de microvesículas (câncer e normal), o método seleciona aptâmeros que ligam, de preferência, as microvesículas derivadas de câncer na presença de microvesículas de não câncer.

[00953] Variante 3: Seleção de aptâmero para microvesículas derivadas de câncer (por exemplo, dispersas a partir de células de câncer) em competição com o plasma normal (depletado de não microvesículas). Fluxo de trabalho:

[00954] -> As microvesículas são isoladas de amostras de plasma de câncer com o uso de ultracentrifugação.

[00955] -> Capturar/conjugar as microvesículas isoladas derivadas de câncer com esferas magnéticas.

[00956] -> Iniciar o processo de seleção e avaliação de aptâmero com o uso de esferas conjugadas com microvesículas de câncer misturadas com plasma normal (não conjugado) suplementado com $MgCl_2$. A seleção e a avaliação de aptâmero são realizadas para as microvesículas de câncer somente retendo apenas os aptâmeros que são retidos com as esferas magnéticas.

[00957] Essa abordagem combina as vantagens das Variantes 1 e 2 acima. Cada ciclo inclui a competição com o plasma normal. Os aptâmeros devem ser mais seletivos para o alvo na presença de proteínas de plasma interferente e outras entidades biológicas.

[00958] Variante 4: Seleção de aptâmero de Câncer/Normal paralela em esferas misturas. Fluxo de trabalho:

[00959] -> Capturar/conjugar as microvesículas derivadas de câncer com esferas magnéticas.

[00960] -> Capturar/conjugar as microvesículas normais (não cân-

cer) com esferas não magnéticas

[00961] -> Misturar ambos os conjuntos de esferas e realizar o processo de seleção e avaliação de aptâmero com a biblioteca de aptâmero inicial

[00962] -> Separar as esferas magnéticas e não magnéticas após a incubação com a biblioteca de aptâmero. Usar um ímã para capturar as esferas magnéticas, então centrifugar para separar as esferas não magnéticas.

[00963] -> Lavar as esferas separadas magnéticas e não magnéticas separadamente.

[00964] -> Eluir e reamplificar os aptâmeros de ambos os tipos de esferas separadamente.

[00965] -> Ciclo 2: misturar os conjuntos de aptâmeros amplificados de ambos os tipos de esferas e adicionar as esferas misturadas

[00966] -> Repetir a partir de cima

[00967] As vantagens da variante 4 incluem: (i) usar a mesma alíquota da biblioteca de aptâmero para iniciar o processo de seleção e avaliação de aptâmero para ambas as microvesículas de câncer e não câncer; (ii) usar a competição entre as microvesículas de câncer e não câncer diretamente em uma mistura em cada ciclo; (iii) o sobrenadante pode ser adicionado como um competidor adicional para aumentar o rigor de seleção; (iv) enriquecimento paralelo para aptâmeros específicos para câncer e não câncer em competição para resultar em aptâmeros que identificam apenas normais ou apenas câncer (já que há uma escolha de ligar um ou outro).

EXEMPLO 26: SELEÇÃO DE APTÂMEROS DE DNA DE BLOQUEIO UNIVERSAL PARA GRUPOS CARBOXILA

[00968] Os tampões de bloqueio conhecidos na técnica compreendem geralmente uma mistura de peptídeos sintéticos, BSA, proteínas tripsinizadas ou conjuntos de DNA aleatórios (sintéticos ou naturais,

por exemplo, DNA de esperma de salmão). Essas misturas complexas podem conter moléculas que além de bloquear o efeito podem fornecer alvos falsos adicionais em um ensaio, gerando assim falsos positivos.

[00969] Nesse Exemplo, um reagente de bloqueio foi desenvolvido para servir como um bloqueador específico para um substrato carboxilado. O reagente de bloqueio compreende um aptâmero com reatividade cruzada minimizada para qualquer outro alvo diferente dos grupos carboxila no substrato.

[00970] Experimentos preliminares foram feitos com cinco bibliotecas de aptâmero de DNA com 10^{15} sequências cada e os comprimentos variáveis (60, 65, 70, 75, 80-mers) foram pré-amplificados e o filamento separado de modo que o filamento direto (não biotinilado) sirva como um aptâmero. Múltiplos ciclos da seleção negativa e seleção positiva foram realizados conforme descrito no **Exemplo 9** acima.

[00971] Para identificar os aptâmeros de bloqueio potenciais, as sequências comumente observadas nos processos de seleção com diferentes alvos de proteína foram identificadas. Uma sequência de aptâmero que foi identificada como uma das mais abundantes recuperada do processo de seleção acima foi também identificada no conjunto final de aptâmeros para cada uma das diferentes proteínas alvo. Esse aptâmero foi selecionado como o candidato de bloqueio de aptâmero:

[00972] 5'-GGTGTGGTTGGGGGTGGTGGAGGTGGGGTTTGTGGTGGGA (SEQ ID NO. 230938).

[00973] Sem ater-se à teoria, são essas sequências que são ricas em grupos carboxila de ligação de guanina nas esferas de substrato por meio de ligações de hidrogênio. Consulte a **Figura 16A** e **16B.** A **Figura 16A** ilustra a ligação de hidrogênio entre uma porção de um aptâmero **1601** a grupos carboxila **1602** ligados a um substrato plano

1603. A **Figura 16B** ilustra a ligação de hidrogênio entre uma porção de um aptâmero **1601** a grupos carboxila **1602** ligados a um substrato de microesfera **1604**. Os grupos carboxila **1602** são adicionalmente ligados a um anticorpo **1605**. Guanina é o único nucleotídeo que pode formar duas ligações de hidrogênio**.**

REALIZAÇÃO DE TESTES

[00974] A fim de testar as propriedades de bloqueio do candidato de bloqueio de aptâmero, o experimento a seguir foi realizado:

[00975] Para obter o aptâmero, o conjunto de PBP de 40-mer após a seleção positiva, que continha a maior parte da sequência apresentada acima, foi reamplificado por PCR, separado por filamento e precipitado por etanol. Algumas sequências relacionadas foram também amplificadas, mas não foram consideradas como afetando os resultados em suas concentrações menores.

[00976] As microesferas conjugadas com anticorpos contra os biomarcadores de proteína desejados (SSX4, PBP, SPDEF, EPCAM, KLK2, SSX2) para um anticorpo anti-IgG2B de controle negativo e para aptâmeros de controle negativo (isto é, aptâmeros que não se ligam a qualquer um dos biomarcadores de proteína, referidos como NegS e Neg9) foram bloqueadas com uma solução que compreende o aptâmero de bloqueio candidato acima por 20 min. Após a incubação da microesfera conjugada com anticorpo com o candidato de bloqueio de aptâmero, a solução de bloqueio de microesfera padrão foi adicionada e as esferas foram incubadas por 20 min adicionais. As esferas foram, então, rompidas em tubos de extirpação por PCR e misturadas com amostras de plasma de pacientes com câncer de próstata ou distúrbios de próstata benignos. A mistura foi incubada por 2 horas a 37 ℃. As amostras foram transferidas para as placas de filtro e misturadas com um aptâmero anti-EpCAM biotinilado que deve reconhecer as microvesículas capturadas pelas microesferas conjugadas com anticor-

po. As esferas foram incubadas com o aptâmero anti-EpCAM por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e Estreptavidina-PE foi adicionada e as amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e a fluorescência do PE em complexo com as microesferas foi medida com 100 µl de solução da amostra. Cada amostra foi testada em poços triplicados e os resultados tiveram a média calculada. Os controles negativos que usam um anticorpo anti-IgG2b e dois aptâmeros de não ligação foram também executados. Os resultados são mostrados para os dois aptâmeros de não ligação, NegS e Neg9, são mostrados nas **Figuras 24A** a **24B,** respectivamente. Os resultados conforme mostrados nas **Figuras 24A a 24B** revelaram níveis de fundo menores quando as esferas foram pré-bloqueadas com condições de bloqueio padrão (StartingBlock Blocking Buffers, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, **IL,** EUA), bloqueio padrão com aptâmero de bloqueio candidato 1X (-34 ng/ml) e para bloqueio padrão com bloqueio de aptâmero 0,5X.

[00977] Como os aptâmeros de bloqueio são ticos em guanina, os experimentos foram repetidos com uma solução que compreende um único nucleotídeo guanina somente seguido pelo bloqueio de partida padrão. Nenhuma melhora foi observada com o uso apenas do único nucleotídeo.

EXEMPLO 27: SEQUÊNCIAS APTÂMERO DE BLOQUEIO ILUSTRATIVAS

[00978] A **Tabela 25** a seguir compreende aptâmeros ilustrativos da invenção. Os aptâmeros eram parte do conjunto de aptâmeros descrito no **Exemplo 26** e eram parte do conjunto comum dos aptâmeros de bloqueio identificados. Entende-se que as sequências de nucleotídeos que são reveladas na **Tabela 25** podem ser modificadas na medida em que as modificações resultantes resultem em um aptâmero que tem cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 e 99 por

cento de homologia à sequência revelada e retenham a funcionalidade de se ligar a grupos funcionais carboxila. Conforme usado no contexto de qualquer unidade numérica definida no presente documento, o termo "cerca de" significa variância de 10% acima ou abaixo dessa unidade numérica e todas as unidades no meio.

TABELA 25: APTÂMEROS ILUSTRATIVOS

Sequência 5'->3'	SEQ ID NO.
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AGGTGGGGTT TGTGGTGGGA	230938
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGGGT TTGTGGTGGG A	230939
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AGGTGGGTTT GTGGTGGGA	230940
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGGGT TTGTGGTGGG AG	230941
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGGGT TTGTGGTGGG	230942
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGGGT	230943
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAGG	230944
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAG	230945
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AGGTGGGGTT TGTGGTGGGA G	230946
GTGGAGGTGG GGTTTGTGGT GGGA	230947
GGGTGGTGGA GGTGGGTTTG TGGTGGGA	230948
GGTGGTGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGGGT TTGTGGTGGG A	230949
GTGGAGGTGG GTTTGTGGTG GGA	230950
GGGTGGTGGA GGTGGGGTTT GTGGTGGGA	230951
CGTTGAAGGT TGGGCGGTTG GGGTGTGTGG GATTGGTGGG	230952
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AGGTGGGGT	230953
GTGGGGTTTG TGGTGGGA	230954
CGCCTAGAGG TCGGGTGGTT GGGGTTGTGG GATGGGGGGT	230955
TGGTGTTGTC CTGTTGGCCT TTTGTTGTCG CACCCTCGCA	230956
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AGGTGGGGTT TGTGGTGGG	230957
GGTGGAGGTG GGGTTTGTGG TGGGA	230958
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AGG	230959
GGTGTGGTTG GGGTGGTGGA GGTGGGTTTG TGGTGGGA	230960
CTGCCTGGCA CGTCGCGTTT GTGTTCGTTG GTCGGTCAGG	230961
TGAGGGTGGG TGGTGGGTTG ATGTTGGTTG ATGGGGGTGG	230962
GGTGGAGGTG GGTTTGTGGT GGGA	230963
GGTGTGGGTT GGGGTGGTGG AGG	230964
GGTGTGGGTT GGGGGTGG	230965
GGTGTTGTGG GGGTGTTTGT CG	230966
CGGTCTTGCT GGGTGGTCGT GCGGTGTTCG TGGTGGTGGT	230967
GGTGTGGTTG GGGTGGTGGA GGTGGGGTTT GTGGTGGGA	230968
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AGGTGGGTTG TGGTGGGA	230969

Sequência 5'->3'	SEQ ID NO.
TGGTTGGGGG TGGTGGAGGT GGGGTTTGTG GTGGGA	230970
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG	230971
GGTTGGGGGT GGTGGAGGTG GGGTTTGTGG TGGGA	230972
GGTGTGGGTT GGGGTGGTGG AG	230973
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGGGT TTG	230974
GGTGTGGTTG GGGTGGTGGA GGTGGGTTGT GGTGGGA	230975
GGTTTGTGGT GGGA	230976
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGGGT TTGTGG	230977
GTGGAGGTGG GTTGTGGTGG GA	230978
TCACGTGCTT CATTTTTGTG TTCCCTCCTC CTGCTGCGCA	230979
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGG	230980
GTGGTGGAGG TGGGTTTGTG GTGGGA	230981
GTGGTGGAGG TGGGGTTTGT GGTGGGA	230982
GGTGTTGGTG GGGGTGTTTG TCG	230983
GGGTGGTGGA GGTGGGTTGT GGTGGGA	230984
GTGTGGTTGG GGGTGGTGGA GGTGGGGTTT GTGGTGGGA	230985
TGGTGGGA	230986
AGGTGTGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGGGT TTGTGGTGGG A	230987
GTGGGTTGTG GTGGA	230988
GTGGGTTTGT GGTGGGA	230989
ACACGAACGC GCATTGTTTT CGCATCCTTC CTCCTTTCCA	230990
TGGGCGGGGG TGGTTGTATC TTCTATGGGA GGGGGTTGGC	230991
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGGGT T	230992
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AGGTGGGGTT GTGGTGGGA	230993
CGTGATGTGG GTGGGTGGTG GGCTTGGTGT GTGGGGGTGG	230994
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGGGT TGTGGTGGGA G	230995
GGTGTGGGTT GGGGTGGTGG AGGTGGGGTT TGTGGTGGGA	230996
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AG	230997
GGTGTGGGTT GGGGTGGTGG AGGTGGGGT	230998
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AGGTGGG	230999
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AGGTGGGGTT TGTGG	231000
TGTGGTGGGA	231001
GGTGTGGGTT GGGGGTGGTG GAGGTGGGGT TTGGTGGTGG GAG	231002
GGTGTGGTTG GGGTGGTGGA GGTGGGTTGT GGTGGA	231003
GGGGTGGTGG AGGTGGGGTT TGTGGTGGGA	231004
GGTGTGGGTT GGGG	231005
GGTGTGGTTG GGGGTGGTG	231006
GCGGTCTTCG TTCGTCGTCG TGACCTCGTA TCTTTGGCTT	231007
GGTGTGGTTG GGGGTGGTGG AGGTGGGGTT TGTGGTGGA	231008

EXEMPLO 28: MICROVESÍCULAS LIGADAS POR MICROESFERA

[00979] As microvesículas podem ser ligadas a um substrato com o uso de vários métodos. Nesse Exemplo, três métodos são usados para ligar as microvesículas a um substrato: 1) conjugação direta; 2) ancoragem de lipídeo; 3) ligação de anticorpo; e 4) ligação de aptâmero. Consulte os esquemas nas Figuras 7A a D. A **Figura 7A** ilustra a conjugação direta de uma microesfera carboxilada a um antígeno de superfície de vesícula. A **Figura 7B** ilustra a fixação de uma microvesícula a uma microesfera por meio de uma fixação de lipídeo funcionalizada por biotina. A **Figura 7C** ilustra a ligação de anticorpo a um antígeno de superfície de vesícula, em que o anticorpo é conjugado com uma microesfera carboxilada. A **Figura 7D** ilustra a ligação de aptâmero a um antígeno de superfície de vesícula, em que o aptâmero é conjugado com uma microesfera carboxilada. As microvesículas ligadas por microesfera produzidas pelos métodos nesse Exemplo podem ser usadas para avaliar uma biblioteca de aptâmero conforme descrito nos Exemplos acima.

[00980] Conjugação direta: A conjugação direta das microvesículas a microesferas foi testada com o uso de microvesículas liberadas da linhagem celular de câncer de próstata VCAP. Protocolo: As microvesículas VCAP foram conjugadas com esferas MagPlex (Luminex Corp, Austin TX) de acordo com o protocolo estabelecido para anticorpos (5 milhões de esferas, 20 µg de microvesículas). Consulte o **Exemplo 29** abaixo para o protocolo detalhado. As microvesículas isoladas foram conjugadas com esferas carboxiladas com o uso da química de carbodiimida de duas etapas padrão conforme conhecido na técnica. O ensaio de MagPlex foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante com 1.200 esferas por poço. As esferas foram testadas com três tampões de bloqueio assim como sem bloqueio para eluir quaisquer sinais

acionados por esfera possíveis. Para identificar as microvesículas, as esferas foram incubadas com 5 µg/ml de anticorpos detectores anti-tetraspanina etiquetados com PE (anti-CD9-PE e anti-CD63-PE) por 1 hora à temperatura ambiente. Os resultados são mostrados nas **Figuras 8A** a **8B.** Conforme é visto a partir das figuras, as microvesículas VCAP conjugadas com esferas foram especificamente detectadas com ambos os anticorpos detectores. Ademais, a resposta a anticorpos específicos refletiu a prevalência natural de proteínas de superfície CD9 e CD63 em microvesículas (isto é, CD9 é mais prevalente do que CD63, que é refletida nos valores MFI maiores ao usar anticorpos detectores anti-CD9 **(Figura 8A)** versus anticorpos detectores anti-CD63 **(Figura 8B)).**

[00981] Ligação de anticorpo: As esferas MagPlex foram conjugadas com anticorpos a EpCAM, CD63 ou CD81 de acordo com o protocolo do fabricante (Luminex Corp., Austin TX). As microvesículas foram detectadas com anticorpos etiquetados com ficoeritrina (PE) para CD9, uma proteína de superfície de microvesícula comum. O eixo geométrico Y nas figuras mostra a intensidade fluorescente média (MFI) das microvesículas detectadas. Os resultados são mostrados nas **Figuras 9A** a **9E**. Conforme mostrado nas **Figuras 9A** e **9C,** quantidades crescentes de vesículas de células VCap **(Figura 9A)** ou amostras de plasma de paciente **(Figura 9C)** resultaram no sinal MFI crescente. A preparação de amostra pareceu efetuar o sinal detectado, conforme as vesículas isoladas ExoQuick renderam um sinal maior do que aquelas isoladas com ultracentrifugação ou ultracentrifugação. Consulte a **Figura 9B.** Finalmente, as vesículas capturadas por anticorpo pareceram ser estavelmente ancoradas às microesferas, conforme mostrado pelo sinal estável após a incubação prolongada. Consulte a **Figura 9D.**

[00982] Fixação de lipídeo: As microvesículas VCAP foram conjugadas com microesferas com o uso da membrana de lipídeo de micro-

vesícula como um alvo de conjugação. Um reticulador heterobifuncional com um grupo funcional de lipídeo foi usado conforme mostrado na **Figura 10A.** A ligação entre a microesfera e microvesícula com o uso do reticulador heterobifuncional é conforme mostrado na **Figura 10B.** As esferas revestidas com estreptavidina são incubadas com lipídeo funcionalizado por biotina (a "fixação de lipídeo"), lavadas e incubadas com as microvesículas desejadas. Conforme mostrado na **Figura 10B,** a ligação da fixação de lipídeo com a microesfera é realizada por afinidade de estreptavidina-biotina e a captura das microvesículas é facilitada por incorporação de análogo de fosfolipídeo na membrana de bicamada de lipídeo de vesícula. O protocolo é conforme segue:

[00983] 1. Lavar 600 µl de esferas magnéticas revestidas com Estreptavidina (Pierce nº de catálogo 88817) duas vezes com soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS).

[00984] 2. Ressuspender as esferas em 500 µl de PBS apenas (como um controle) ou 500 µl de PBS com 1 µl de porção química de lipídeo funcionalizado [1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(cap biotinila)] (Avanti Polar Lipids, Alabaster AL, nº de catálogo 870277X; diluição de 1:1.000 em água). Incubar por 30 min a 37 ℃ com rotação.

[00985] 3. Lavar as esferas com água UltraPure (Invitrogen nº de catálogo 10977), então, duas vezes com PBS (HyClone nº de catálogo SH30256).

[00986] 4. Adicionar 100 µg de microvesículas VCAP ou plasma humano às esferas com ou sem a fixação de lipídeo. Elevar o volume para 500 µl com PBS. Incubar por 1 hora a 37 ℃ com rotação. Armazenar de um dia para o outro a 4 ℃.

[00987] 5. Pipetar uma alíquota das esferas necessárias para o experimento a seguir, lavar duas vezes com PBS.

[00988] 6. Testar a presença das microvesículas capturadas com

citometria de fluxo (MoFloTm XDP instrument, Beckman Coulter, Inc., Indianapolis IN) com o uso de anticorpos específicos para microvesícula etiquetados com PE anti-humanos CD9 (BD Pharmingen nº de catálogo 555372) e etiquetados com PE anti-humanos CD63 (BD Pharmingen nº de catálogo 556020) ou uma IgG1 kappa de camundongo de PE de controle de isótipo (eBioscience nº de catálogo 12-4714-42).

[00989] 7. As amostras foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente em um Eppendorf MixMate no escuro. As esferas foram, então, lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS e analisadas em MoFlo XDP ou Luminex 200.

[00990] Seguindo esse protocolo, as microvesículas VCaP foram capturadas pela porção química de lipídeo biotinilada [1,2- dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(cap biotinila)] ligada a esferas de estreptavidina magnéticas. Quando essas microvesículas foram manchadas com anticorpos etiquetados com PE contra as tetraspaninas CD9 e CD63, a MFI do sinal de PE detectada por MoFlo titulado ao juntamente com a quantidade de entrada de microvesículas VCaP. Ademais, as esferas foram saturadas com microvesículas nas maiores concentrações da entrada VCaP. Consulte as **Figuras 10C** a **10F** para os resultados que demonstram o enriquecimento de microvesículas conjugadas com esfera na presença da fixação de lipídeo. O sinal derivado das vesículas fixadas por lipídeo foi correlacionado à quantidade de vesículas, conforme mostrado na **Figura 10G** e **Figura 10H.**

[00991] A porção química de lipídeo biotinilada foi também ligada a esferas LumAvidin e usada para capturar as microvesículas VCaP, que poderiam, então, ser analisadas com o uso ou de citometria de fluxo tradicional **(Figura 10I)** ou Luminex **(Figura 10J).** O sinal de tetraspanina foi somente detectado em amostras que contêm esferas ligadas com a porção química de lipídeo e incubado com microvesícu-

las; as amostras de controle que não contêm nenhuma microvesícula ou nas quais as esferas não foram ligadas à porção química de lipídeo foram negativas para o sinal anti-CD9.

[00992] Ligação de lectina: As lectinas são proteína de ligação de carboidrato. Várias lectinas podem ser usadas para ligar porções químicas de açúcar na superfície de microvesículas. Por exemplo, a concanavalina A (ConA) é uma lectina que se liga especificamente a determinadas estruturas encontradas em vários açúcares, glicoproteínas e glicolipídeos, principalmente grupos α-D-manosila e α-D-glucosila terminais internos e não redutores. As esferas revestidas com estreptavidina são incubadas com ConA funcionalizado por biotina, lavadas e incubadas com as microvesículas desejadas.

[00993] As microvesículas conjugadas com microesfera produzidas por ambos os métodos acima podem ser usadas para avaliar uma biblioteca de aptâmero conforme descrito nos Exemplos no presente documento.

[00994] Efeitos da preparação de amostra: A preparação de amostra pode ser otimizada para a captura e/ou detecção de microvesículas ancoradas por substrato. Conforme mostrado na **Figura 10K** e **Figura 10L,** algumas vesículas fixadas por lipídeo foram encontradas ao fixar as vesículas isoladas das amostras de plasma com o uso de ultracentrifugação. Resultados similares foram observados quando as vesículas derivadas de plasma foram isoladas com o uso de ExoQuick (não mostrado). Além disso, resultados similares foram também observados com o uso das microvesículas de amostras de plasma diretamente conjugadas com microesferas (não mostradas). Sem ater-se à teoria, foi hipotetizado que proteínas altamente abundantes nas amostras de plasma podem interferir com a fixação de lipídeo de microvesícula ou conjugação direta de substrato. Para testar essa teoria, as microvesículas Vcap foram detectadas com **(Figura 10N)** ou sem **(Figura 10M)**

30 mg/ml de albumina sérica humana (HSA) adicionados às amostras antes da detecção. Essas figuras mostram que o sinal das vesículas detectadas foi diminuído na presença de HSA.

[00995] Vários métodos para melhorar a preparação de amostra de microvesículas derivadas de sangue incluem a depleção d proteínas altamente abundantes (por exemplo, HSA/IgG/Fibrinogênio), a remoção de lipídeos com base em sangue, concentração de plasma com filtros MWCO de 150k, 300K e 1.000K para remover as proteínas e outros materiais interferentes e/ou isolamento de afinidade (por exemplo, imunoprecipitação ou cromatografia de afinidade) com o uso de agentes de ligação contra antígenos de superfície de vesícula. Essas abordagens são, então, seguidas pelo isolamento de vesícula (por exemplo, ultracentrifugação, ultrafiltração, Exoquick).

[00996] Estabilidade: Devido ao fato de que as microvesículas são ligadas covalentemente às microesferas, deve haver "sangria" mínima de microvesículas conjugadas das esferas uma vez que a conjugação é feita e as esferas são apropriadamente lavadas. Um experimento foi realizado para testar a estabilidade das microvesículas conjugadas por esfera. As microvesículas purificadas com o uso de vários métodos foram conjugadas diretamente com microesferas conforme descrito acima. O sinal das esferas conjugadas com microvesícula foi determinado após armazenamento das esferas conjugadas por 2 a 3 dias a 4 ℃ e novamente após as mesmas esferas serem armazenadas por 11 a 12 dias a -80 ℃. As microvesículas foram identificadas com anticorpo anti-CD9 conjugado com PE ou anticorpo anti-CD63 conjugado dom PR. Os valores de MFI para cada uma das muitas esferas foram determinados. As **Figuras 10O** a **10P** mostram que degradação mínima de sinal foi observada após 12 dias de armazenamento a -80 ℃ com o uso do detector de anti-CD9. As vesículas isoladas com o uso de diferentes métodos foram testadas conforme indicado pelas condi-

ções ao longo do eixo geométrico X. 1) Kit ExoQuick™ (System Biosciences, Inc., Mountain View, CA) seguido por ultrafiltração; 2) ultracentrifugação; 3) ultracentrifugação seguida por Exoquick; 4) Kit ExoQuick a ExoMir™ (Bioo Scientific Corp., Austin TX); 5) vesícula VCAP ultrafiltrada preparação nº 1; 6) vesícula VCAP ultrafiltrada preparação nº 2; e 7) ultrafiltração seguida por ultracentrifugação. Os resultados ideais foram observados com o detector de anti-CD63.

[00997] Imageamento de microvesículas ancoradas: Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (FE-SEM) foi usado para a avaliação dos protocolos alternativos para ancorar microvesículas isoladas do plasma à superfície de microesferas. As **Figuras 11A** a **11N** mostram imagens de FE-SEM. A **Figura 11A** mostra uma microesfera que não foi funcionalizada ou conjugada. A **Figura 11B** mostra a conjugação direta de microvesículas plasmáticas isoladas com o uso de ultracentrifugação para esferas não magnéticas. A **Figura 11C** mostra uma explosão da região indicada da **Figura 11B.** As setas apontam para várias microvesículas. A **Figura 11D** e a **Figura 11E** correspondem à **Figura 11B** e à **Figura 11C,** respectivamente, exceto pelo fato de que as esferas são magnéticas. As **Figuras 11F** a **H** mostram esferas magnéticas funcionalizadas. A **Figura 11F** mostra esferas conjugadas com avidina funcionalizadas com ConA biotinilada. A **Figura 11G** mostra esferas conjugadas com avidina funcionalizadas com fixação de lipídeo biotinilada**.** A **Figura 11H** mostra esferas conjugadas diretamente com anticorpos anti-CD9. A **Figura 11I** mostra a captura de esfera de microvesículas plasmáticas isoladas com o uso de ultracentrifugação para esferas funcionalizadas com ConA. A **Figura 11J** mostra uma explosão da região indicada da **Figura 11I.** As setas apontam para várias microvesículas. A **Figura 11K** mostra a captura de esfera de microvesículas plasmáticas isoladas com o uso de ultracentrifugação para esferas funcionalizadas com fixação de lipídeo**.** A

Figura 11L mostra uma explosão da região indicada da **Figura 11K**. As setas apontam para várias microvesículas. A **Figura 11M** mostra a captura de esfera de microvesículas plasmáticas isoladas com o uso de ultracentrifugação para esferas funcionalizadas com fixação de lipídeo**.** A **Figura 11N** mostra uma explosão da região indicada da **Figura 11M.** As setas apontam para várias microvesículas.

[00998] Sumário: Todas as três plataformas para ancoragem de vesículas às microesferas (conjugação direta, ligação de anticorpo e fixação de lipídeo) foram demonstradas com o uso de microvesículas derivadas de Vcap (linhagem de célula de próstata humana). Com as condições de amostra otimizadas (por exemplo, remoção de proteínas altamente abundantes), resultados similares são observados com o uso de vesículas isoladas de amostras de plasma humano. É surpreendente obter acoplamento suficiente de uma estrutura complexa de microvesícula diretamente a esferas dado o potencial para interferência de entidades moleculares, incluindo, porém, sem limitação, interferência por meio de vesículas com tamanhos diferentes, formação de agregado, bloqueio de proteína solúvel ou interferência de fragmento de vesícula. As microvesículas ligadas a microesfera produzidas pelos métodos nesse Exemplo podem ser usadas para avaliar uma biblioteca de aptâmero conforme descrito nos Exemplos acima.

EXEMPLO 29: PROTOCOLO PARA ACOPLAMENTO POR CARBODIIMIDA EM DUAS ETAPAS DE PROTEÍNA OU MICROVESÍCULAS A MICROESFERAS CARBOXILADAS

[00999] O protocolo abaixo é usado para conjugar proteínas (por exemplo, anticorpos) ou microvesículas a microesferas carboxiladas (microesferas magnéticas MagPlext ou microesferas não magnéticas MicroPlext, Luminex Corporation, Austin, TX).

MATERIAIS:

[001000] Região 15: Catálogo Luminex nº MC10015-01 Lote nº

B28049 Exp: 16/12/2016

[001001] Região 18: Catálogo Luminex nº MC10018-01 Lote nº B29449 Exp: 14/3/2017

PROTOCOLO:

[001002] As microesferas devem ser protegidas de exposição prolongada à luz por todo esse procedimento.

[001003] 1. Suspender novamente a suspensão de microesfera não acoplada de estoque de acordo com as instruções descritas na Ficha de Informações do Produto fornecida com as microesferas.

[001004] 2. Transferir 5,0 x 10^6 das microesferas de estoque para o tubo de microcentrífuga da **USA Scientific**. Razão Proteína/Esferas: 20 µg/5 x 10^6. Pode ser diminuído até 4 µg/10^6.

[001005] 3. Posicionar o tubo em um separador magnético e permitir que a separação ocorra por 60 segundos. Consulte a **Nota Técnica 1** abaixo.

[001006] 4. Com o tubo ainda posicionado no separador magnético, remover o sobrenadante, Tomar cuidado para não perturbar as microesferas.

[001007] 5. Remover o tubo do separador magnético e suspender novamente as microesferas em 100 µl de dH2O por vórtice e sonicação por aproximadamente 20 segundos.

[001008] 6. Posicionar o tubo em um separador magnético e permitir que a separação ocorra por 60 segundos.

[001009] 7. Com o tubo ainda posicionado no separador magnético, remover o sobrenadante, Tomar cuidado para não perturbar as microesferas.

[001010] 8. Remover o tubo do separador magnético e suspender novamente as microesferas lavadas em 80 µl de Fosfato de Sódio Monobásico a 100 m, pH 6,2, por vórtice e sonicação por aproximadamente 20 segundos.

[001011] 9. Adicionar 10 µl de 50 mg/ml de Sulfo-NHS (diluído em dH2O) às microesferas e misturar suavemente por vórtice.

[001012] 10. Adicionar 10 µl de 50 mg/ml de EDC (diluído em dH2O) às microesferas e misturar suavemente por vórtice.

[001013] 11. Incubar por 20 minutos à temperatura ambiente com mistura suave por córtice em intervalos de 10 minutos.

[001014] 12. Posicionar o tubo em um separador magnético e permitir que a separação ocorra por 60 segundos.

[001015] 13. Com o tubo ainda posicionado no separador magnético, remover o sobrenadante, Tomar cuidado para não perturbar as microesferas.

[001016] 14. Remover o tubo do separador magnético e suspender novamente as microesferas em 250 µl de MES a 50 mM, pH 5,0, por vórtice e sonicação por aproximadamente 20 segundos. Consulte a Nota Técnica 2 abaixo.

[001017] 15. Repetir as etapas 12 e 13. Esse é um total de duas lavagens com MES a 50 mM, pH 5,0.

[001018] 16. Remover o tubo do separador magnético e suspender novamente as microesferas ativadas e lavadas em 100 µl de MES a 50 mM, pH 5,0, por vórtice e sonicação por aproximadamente 20 segundos.

[001019] 17. Adicionar 20 µg de proteína ou microvesículas equivalentes às microesferas suspensas novamente.

[001020] 18. Induzir volume total a 500 µl com MES a 50 mM, pH 5,0. Observação: Esse volume pode ser diminuído no caso de conjugação de 10^6 esferas.

[001021] 19. Misturar a reação de acoplamento por vórtice.

[001022] 20. Incubar por 2 horas com mistura (800 rpm em MixMate) à temperatura ambiente.

[001023] 21. Posicionar o tubo em um separador magnético e permi-

tir que a separação ocorra por 60 segundos.

[001024] 22. Com o tubo ainda posicionado no separador magnético, remover o sobrenadante, Tomar cuidado para não perturbar as microesferas.

[001025] 23. Remover o tubo do separador magnético e suspender novamente as microesferas acopladas em 500 µl de PBS-T por vórtice e sonicação por aproximadamente 20 segundos. Consulte a Nota Técnica 3 abaixo.

[001026] 24. Incubar por 30 minutos com mistura (por rotação) à temperatura ambiente. Realizada essa etapa como I, usou as microesferas no mesmo dia.

[001027] 25. Posicionar o tubo em um separador magnético e permitir que a separação ocorra por 30 a 60 segundos.

[001028] 26. Com o tubo ainda posicionado no separador magnético, remover o sobrenadante, Tomar cuidado para não perturbar as microesferas.

[001029] 27. Remover o tubo do separador magnético e suspender novamente as microesferas em 1 ml de PBS-TBN por vórtice e sonicação por aproximadamente 20 segundos. Consulte a Nota Técnica 4 abaixo.

[001030] 28. Repetir as etapas 25 e 26. Esse é um total de duas lavagens com 1 ml de PBS-TBN.

[001031] 29. Remover o tubo do separador magnético e suspender novamente as microesferas acopladas e lavadas em 250 ul de PBS-TBN (150ul para 1 milhão de esferas em PBS-TBN).

[001032] 30. Contar a suspensão de microesfera por vicell.

[001033] **Nota Técnica 1:** Para uma lista de separadores magnéticos, consulte as recomendações do fabricante da esfera. O tempo de separação ideal pode variar com o tipo de separador usado.

[001034] **Nota Técnica 2:** O acoplamento pode ser realizado em

MES a 100 mM, pH 6,0, com resultados similares. Em alguns casos, solubilidade melhor e acoplamento melhor podem ser atingidos em um pH de acoplamento mais alto em um tampão diferente. Se o alvo não acoplar satisfatoriamente sob essas recomendações, tentar PBS, pH 7,4, como um tampão de acoplamento alternativo.

[001035] **Nota Técnica 3:** Ou PBS-TBN (PBS, 0,1% de BSA, 0,02% e Tween-20, 0,05% de Azida, pH 7,4) ou PBS-BN (PBS, 1% de BSA, 0,05% de Azida, pH 7,4) podem ser usados como Tampão de Bloqueio/Armazenamento.

[001036] **Nota Técnica 4:** Ou PBS-TBN ou PBS, 0,05% de Tween-20, podem ser usados como Tampão de lavagem.

EXEMPLO 30: MICROVESÍCULAS CONJUGADAS COM MICROESFERA COMO UMA PLATAFORMA PARA IDENTIFICAR APTÂMEROS CÂNCER-ESPECÍFICOS

[001037] As estratégias para divisão de bibliotecas de aptâmero incluem: (i) alvo fixado a suporte sólido (por exemplo, agarose, metacrilato de polimetila ou esferas paramagnéticas); (ii) mudança de mobilidade de gel; (iii) membrana de nitrocelulose que liga proteínas, mas não DNA; e (iv) eletroforese capilar. A fim de desenvolver um aptâmero para uma proteína específica de câncer, cada uma dessas abordagens tipicamente começa com proteína recombinante já conhecida por estar associada (em pelo menos alguma extensão) ao câncer preso em suporte sólido de uma forma que permita a divisão do conjunto de aptâmeros em populações de "aglutinante" e "não aglutinante". Essas abordagens assumem ainda que: (i) o enovelamento de proteína recombinante refletirá a proteína natural in situ (por exemplo, em um tecido ou um fluido corporal, tal como sangue), embora a imobilização química da proteína possa modificar sua estrutura e conformação; e (ii) não há interação com outros componentes na amostra biológica desejada. Dessa forma, identificar e desenvolver aptâmeros para de-

tectar câncer com o uso de amostras de pacientes com câncer confirmado assim como de indivíduos saudáveis permanece um desafio. Esse Exemplo descreve tal abordagem que permite a seleção de aptâmeros que diferenciam câncer sem conhecimento anterior do alvo de aptâmero e em que os alvos são encontrados em seu ambiente/conformação nativa.

[001038] Microvesículas intactas em vez de proteínas individuais de amostras de paciente são conjugadas diretamente às microesferas. Esferas carboxiladas são usadas para imobilizar microvesículas por meio de grupos amino primários de proteínas de superfície de microvesícula. Alternativamente, as microvesículas podem ser imobilizadas por meio de fixação de lipídeo. Consulte os **Exemplos 28** acima. Microesferas identificadas permitem que a conjugação e o enriquecimento de biblioteca de aptâmero sejam confirmados diretamente em um único ensaio. Esferas magnéticas podem fornecer conveniência adicional para manuseio. Embora as microvesículas possam ser ligadas às microvesículas por meio de ligação não covalente (por exemplo, ligação de anticorpo ou aptâmero, adsorção), tal ligação tipicamente tem estabilidade insuficiente para permitir avaliação de aptâmero eficiente.

[001039] O processo de desenvolvimento de aptâmero é realizado seguindo essas etapas:

[001040] 1) Isolar microvesículas de amostras de sangue de paciente com câncer e normal (plasma ou soro). As amostras são depletadas de proteínas altamente abundantes (por exemplo, IgG, albumina de soro humano (HSA)) antes de isolamento de vesícula.

[001041] 2) Conjugar as microvesículas isoladas às esferas carboxiladas com o uso de química de carbodiimida em duas etapas padrão conforme conhecido na técnica. Alternativamente, as microvesículas são conjugadas por meio de fixação de lipídeo.

[001042] 3) Incubar as esferas conjugadas com vesícula com uma

biblioteca de aptâmero em paralelo para amostras de câncer e normais. A biblioteca de aptâmero é pré-incubada com componentes de ensaio (por exemplo, esferas e esferas revestidas com plasma) para remover quaisquer aptâmeros que ligam tais componentes.

[001043] 4) Descartar o sobrenadante contendo aptâmeros não ligados. Lavar as esferas conjugadas com vesícula aproximadamente 10 vezes com o uso de salina tamponada com fosfato (PBS) com 0,1% de Tween 20.

[001044] 5) Dissociar aptâmeros ligados às microvesículas por tratamento com NaOH, neutralizar a solução, precipitar aptâmeros e amplificar os aptâmeros recuperados com o uso de qPCR. Os produtos de qPCR recuperados são usados como a biblioteca de partida para o próximo ciclo de seleção (isto é, para repetir o processo começando na etapa 3).

[001045] 6) Uma vez que a complexidade da biblioteca de aptâmero é diminuída pelo menos até 10^6 membros (começando a partir de, por exemplo, 10^{15}), os aptâmeros são sequenciados com o uso de tecnologia de sequenciamento de geração seguinte de alto rendimento (Illumina MiSeq® System, Illumina, Inc., San Diego, CA). Após o sequenciamento de conjuntos de aptâmeros especificamente enriquecidos de câncer e normais em paralelo, sequências sobrepostas em ambos os conjuntos de câncer e normal são descartados e aquelas sequências específicas para uma maioria de amostras de câncer são consideradas como candidatas de aptâmero.

EXEMPLO 31: MÉTODO DE SELEÇÃO DE APTÂMERO DE MICROVESÍCULAS

[001046] Esse Exemplo apresenta um método para selecionar aptâmeros que podem ser usados para diferenciar microvesículas de pacientes com câncer e amostras de controle sem câncer (por exemplo, "normais"). O câncer pode ser escolhido como uma linhagem particular

de câncer. Os controles podem ser divididos em vários grupos de patologia (por exemplo, positivo para afecções além do câncer escolhido) para fornecer uma camada adicional de complexidade. O método enriquece uma biblioteca de aptâmero para membros de aptâmero que se ligam às microvesículas derivadas de câncer, mas não às microvesículas de controle.

[001047] No esquema, "seleção positiva" refere-se ao enriquecimento de aptâmeros às microvesículas derivadas de câncer, enquanto "seleção negativa" refere-se à depleção de aptâmeros que ligam microvesículas de controle. Em geral, o esquema alterna entre seleção positiva e negativa, de modo que a seleção negativa seja realizada entre cada seleção positiva. As seleções são realizadas contra microvesículas conjugadas com esfera conforme descrito acima.

[001048] Um coorte de 250 amostras de plasma é obtido. Aproximadamente um terço das amostras é de pacientes com câncer e o restante são controles. As amostras são agrupadas em conjuntos de 5 a 6 amostras, resultando em aproximadamente 16 conjuntos de câncer. As microvesículas das amostras agrupadas são conjugadas com microesferas com o uso de métodos descritos acima.

[001049] A seleção positiva é primeiramente realizada para cada conjunto. Em seguida, a seleção negativa é realizada. Sete seleções positivas/negativas são realizadas em paralelo. Em cada seleção paralela, os conjuntos são ordenados aleatoriamente para evitar indução de seleção. Consulte a **Figura 13B** para representação gráfica. Para cada ciclo, os conjuntos de aptâmeros remanescentes são sequenciados com o uso de tecnologia de sequenciamento de nova geração. O sequenciamento pode identificar qualquer enriquecimento nos ciclos positivos e/ou depleção nos ciclos negativos. Quaisquer sequências consenso (sequência e/ou estrutura) são também identificadas após cada ciclo. Se as sequências consenso identificadas forem perdidas

após certos ciclos em uma minoria dos conjuntos, mas não outros, aqueles conjuntos podem ser analisados para determinar se qualquer erro foi introduzido.

EXEMPLO 32: IDENTIFICAÇÃO COM IMUNO-OURO DE MICROVESÍCULAS CONJUGADAS OU IMUNOPRECIPITADAS EM MICROESFERAS

[001050] Conforme descrito no presente documento, os métodos padrão para detecção e caracterização de microvesículas incluem Western blot, Difusão de Luz Dinâmica, citometria de fluxo e microscópio eletrônico. Conforme descrito acima, as microvesículas podem ser capturadas por anticorpo conjugado com microesferas e detectadas com outro anticorpo identificado em um ensaio de microesfera baseado em fluxo. Consulte o **Exemplo 28.** O microscópio eletrônico pode ser usado para confirmar a presença de microvesículas capturadas nas esferas nesse imunoensaio. Esse Exemplo fornece microscópio eletrônico com identificação com imuno-ouro para imagear microvesículas conjugadas ou imunoprecipitadas em microesferas

[001051] Considerações Gerais: As microvesículas foram isoladas por ultracentrifugação de plasma humano e conjugadas com microesferas carboxiladas não magnéticas (MicroPlext Microesferas, Luminex Corporation, Austin TX). Após a conjugação, as esferas são identificadas com anticorpo monoclonal anti-CD9 murino seguido por Imuno-ouro anticamundongo (partículas de 10 nm), montadas em lamínula revestida com poli-lisina, secas, desidratadas, secas em ponto crítico, revestidas com carbono e imageadas com o uso de Microscópio Eletrônico de Varredura com (a) modo de Elétrons Secundários (SE) — para visualizar as microvesículas e (b) modo de Elétrons de Retrodifusão (BSE) para visualizar as nanopartículas de ouro.

[001052] As etapas envolvidas incluem: (i) identificar microvesículas em esferas com anticorpo específico de proteína de membrana e con-

jugado de Ouro antiespécies correspondente; (ii) etapas de preparação de amostra regulares para microscópio eletrônico de varredura (SEM); (iii) revestimento por pulverização de carbono (no lugar de Ouro-Paládio); (iv) combinação de imageamento SE e BSE.

[001053] A conjugação de microvesículas às esferas pode ser substituída por imunoprecipitação de microvesícula às esferas, por exemplo, com o uso de esferas conjugadas com um anticorpo contra um antígeno de superfície de microvesícula.

PROTOCOLO:

[001054] O material de partida compreende amostra de microvesícula diretamente conjugada com esferas MicroPlex. Consulte o **Exemplo 28** para a metodologia geral.

[001055] 1. Centrifugar uma alíquota de 4 µl de material de partida (em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml) por 1 min a 13.000 rpm para peletizar as esferas. Remover sobrenadante sem perturbar o pélete.

[001056] 2. Adicionar 20 µl de tampão de bloqueio PBS-BSAT (salina tamponada com fosfato com albumina de soro bovino e Tweent-20: (0,1 M de NaPO4 pH 7,2/ 150 mM de NaCl/ 1% de BSA /0,01% de T20)) e suspender novamente o pélete. Incubar por 30 min à temperatura ambiente.

[001057] 3. Centrifugar por 1 min a 13.000 rpm para peletizar as esferas. Remover o sobrenadante.

[001058] 4. Adicionar 20 µl de solução de anticorpo primário (10 ou 100 µg/ml, anticorpo anti-CD9 monoclonal de camundongo (BD Biosciences Catálogo Nº 555370, Lote 2097575) com PBS-BSAT) e suspender novamente o pélete. Incubar por 30 min à temperatura ambiente.

[001059] 5. Lavar 3 vezes com 50 µl de PBS-BSAT (peletizar por centrífuga 1 min a 13,000 rpm, remover sobrenadante) por 5 min à temperatura ambiente.

[001060] 6. Adicionar 20 µl de solução de anticorpo secundário (a 1:100, 0,3 µg/ml, ouro anticamundongo (anticorpo anticamundongo-Ouro de cabra, 10 nm, MP Biomedicals Catálogo Nº 67854)) com PBS-BSAT) e suspender novamente o pélete. Incubar por 20 min à temperatura ambiente.

[001061] 7. Lavar 3 vezes com 50 µl de PBS (1x, HyClone, pH 7,4) por 5 min à temperatura ambiente.

[001062] 8. Após remover o sobrenadante, adicionar 10 µl de PBS e suspender novamente o pélete.

[001063] 9. Tirar 2 µl de esferas identificadas e suspendidas novamente para lamínula pré-revestida com poli-L-lisina e espalhar suavemente para difundir as esferas na superfície.

[001064] 10. Incubar a lamínula em uma câmara umidificada por 10 min, coberta à temperatura ambiente.

[001065] 11. Fixação primária com 3 ml de Glutaldeído a 2% com 1x PBS, em placa de Petri de descarte individual, coberta, por 30 min à temperatura ambiente. Trabalhar com capuz de segurança.

[001066] 12. Lavar a lamínula 3 vezes com 1x PBS. Descartar a solução de fixação primária e lavar em recipiente de refugo perigoso designado.

[001067] 13. Fixação secundária com 0,5% de tetráxido de ósmio em 1x PBS, coberto por 30 min à temperatura ambiente em capuz de segurança.

[001068] 14. Lavar lamínula 3 vezes com água nanopura. Descartar a solução de fixação secundária e lavar em recipiente de refugo perigoso designado.

[001069] 15. Desidratar a lamínula em série de etanol, colocar a lamínula em cesta de rede de aço inoxidável, 5 min cada à temperatura ambiente: 1) 20% de etanol; 2) 50% de etanol; 3) 75% de etanol; 4) 100% de etanol; 5) repetir 100% de etanol mais duas vezes.

[001070] 16. Secagem em ponto crítico (CPD) em dióxido de carbono líquido.

17. Montar lamínula em estágio de alumínio com adesivo.

18. Revestimento por pulverização de carbono.

19. Obter imagens com o uso de SE (focagem) e BSE (detecção de ouro).

RESULTADOS:

[001071] O imageamento de microvesículas conjugadas com esfera de acordo com o protocolo acima é mostrado nas **Figuras 12A** e **12E.**

[001072] Referências: S.L. Erlandsen, P. T. Macechko e C. Frethem. High resolution backscatter electron (bse) imaging of immunogold with in-lens and below-the-lens field emission scanning electron microscopes. Scanning Microscopy 13:43 a 54 (1999).

EXEMPLO 33: ISOLAMENTO COMPETITIVO DE APTÂMEROS A MICROVESÍCULAS

[001073] O método do **Exemplo 31** é realizado para identificar aptâmeros que ligam antígenos de microvesícula de interesse. Os anticorpos antitetraspanina são ancorados às microesferas e incubados com cMVs de amostras de plasma de paciente com câncer de próstata. Os cMVs capturados servem como o analito no método do **Exemplo 31. Os** candidatos de aptâmero são dissociados da microvesícula com o uso dos anticorpos na **Tabela 26.**

TABELA 26: ANTICORPOS

Alvo	**Vendedor**	**nº de catálogo**	**nº de Lote**
14-3-3 zeta/beta	Novus Biologicals	NB100-1964	2230612
Aconitase 2	Novus Biologicals	NBP2-02241	A01
ADAM 9	Novus Biologicals	H00008754-M01	D2041-3E6
ADAM10	R&D systems	MAB1427	HZR0311111
ADE2	Novus Biologicals	NBP2-02817	A01
AFM	Creative Diagnostics	CAB-1089MH	PR78801Z
Ago2			
AGR2	Novus Biologicals	H00010551-M01	11042-1E5
AKT1	Neuoromics	M015107	401484

Alvo	Vendedor	nº de catálogo	nº de Lote
ALDH1A3	Origene	CF502841	A003
ALDH6A1	LifeSpan Biosciences	LS-C156268	45269
ALDOA	Novus Biologicals	H00000226-M03	08123-2E6, 11097-2E6
ALIX	Thermo scientific	MA1-83977	NL1643884, NL1640867
ANGPTL4	Novus Biologicals	H00051129-M01	D3151-1F7
ANXA1	Millipore	MAB3773	2148887
ANXA2	Millipore	MAB3774	2148886, 2140018
ANXA3	Novus Biologicals	H00000306-M12	11258-4F1
ANXA3	Novus Biologicals	H00000306-M12	D5231-4F1
ANXA4	LIFESPAN BIOSCI-ENCES	LS-B4279	32117
AP1G1	LIFESPAN BIOSCI-ENCES	LS-C171339	45239
APAF1	Lifespan Biosciences Inc.	LS-C3755	44521
APE1	Novus	NB100-116PUR	32813
APLP2	Novus Biologicals	H00000334-M04	11326-4B5
APLP2	Novus Biologicals	H00000334-M04	06363-4B5, 11326-4B5
ARF6	LIFESPAN BIOSCI-ENCES	LS-C87646	44235, 44199
Aspartil Amino-peptidase /Dnpep	Novus Biologicals	H00023549-M01	08263-s3
Ataxina 1	Novus Biologicals	H00006310-MO2	D4291-4C5, D5071-4C5
ATP5A1	Proteintech	66037-1-Ig	10000914- número de código de barras
ATPase Na+/K+ alfa 3/ATP1A3	Novus Biologicals	NB300-540	NJ175778
ATPase Na+/K+ beta 3/ATP 1B3	Novus Biologicals	H00000483-M03	6125-1E9-011b4by6
ATPase Na+/K+ beta 3/ATP 1B3	Novus Biologicals	H00000483-M03	D5311-1E9
ATPB	Novus Biologicals	NB600-1171	MJ163306
AZGP1	BD	612354	80749, 3086574, 3121936
B4GALT1	Sino Biological	11220-MMO1	HBO6JL0607
B7H3	R&D systems	MAB1027	HPA0411031
BCHE	Lifespan biosciences	LS-C35215-100	42885
Bc1G	Novus Biologicals	H00079370-M01	12108-1F2
BDKRB2	Novus Biologicals	H00000624-M01	11209-3F6
BDNF	R&D systems	MAB848	BBL1512091
BDNF	R&D systems	MAB848	BBL1211091
beta 2 Microglo-bulina	Novus Biologicals	NB500-317	515273

Alvo	Vendedor	nº de catálogo	nº de Lote
beta catenina	Novus Biologicals	H00001499-MO2	D2011-1C9
BRG1	Millipore	MABE60	NRG1782322, 2207807
CALM2	Novus Biologicals	H00000805-M01	D5311-S2
Calmodulina 2 /CALM2	Novus Biologicals	H00000805-M01	10337-S2
Calnexina	Novus Biologicals	H00000821-M08	11132-1D4, 08179-1D4
Calpaína 1	LIFESPAN BIOSCI-ENCES	LS-B4768	45956
Catenina Alfa 1	Novus Biologicals	NB100-74356	OB183849
CAV1	Novus Biologicals	NBP1-74036	A1120901
CCR2 / CD192	Novus Biologicals	NB120-10396	061M1621
CCR5	Novus Biologicals	NBP1-43335	E022691
CCT2 (TCP1-beta)	Novus Biologicals	H00010576-M01	12108-2G6
CD10	BD Pharmingen	555373	32631
CD151	R&D systems	MAB1884	JFUO210121
CD166/ALCAM	R&D Systems	MAB6561	DXM0312051
CD24	BD Pharmingen	555426	25844
CD276	Novus Biologicals	NBP2-12048	2013032102
CD41	Mybiosource	MBS210248	1003
CD46	Novus Biologicals	NB500-301	512525
CD49d	Novus Biologicals	H00003676-M01	11039-2C11
CD63	BD pharmingen	556019	2244712
CD71 / TRFR	Novus Biologicals	NB100-73092	709/08-TR26-E4
CD81	BD pharmingen	555675	25099
CD9	Novus Biologicals	NB500-327	517304
CD9	Novus Biologicals	NB500-327	517304
CD90/THY1	Novus Biologicals	NBP1-43379	E03908-1630
CDH1	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00051343-M09	11139-3E12
CDH2	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00001000-M06	1137-5E6
CDKN1A	Thermo scientific	MA1-19271	OB1661535
CGA	Novus Biologicals	NB100-62251	030311
CgA	Novus Biologicals	NBP1-23022	A1113601
CHRDL2	R&D Systems	MAB24481	WJU015101
CIB1	Novus Biologicals	NBP1-04279	A088401
CIB1	Novus Biologicals	NBP1-04279	D5301-51
Claudina 4 /CLDN4	Novus Biologicals	H00001364-MO2	08092-4A11
Claudina 5	Novus Biologicals	H00007122-M01	11291-3d8, 10334-3d8, 7149-3d8-00bcy6
CLDN3	NOVUS BIOLOGI-	H00001365-M09	D5311-2F2

Alvo	Vendedor	nº de catálogo	nº de Lote
	CALS		
CLDN3- Claudina 3	NOVUS BIOLOGICALS	H00001365-M09	D1281-2F2, 11256-2F2
CLDN4	Novus Biologicals	H00001364-MO2	D5311-4A11
CLDN7	Lifespan Biosciences Inc.	LS-B2918	44272
CNDP2	Novus Biologicals	NBP2-01281	A01
Coatômero Subunidade Delta	Novus Biologicals	NBP2-01790	A01
Cofflin 2 /cfL2	Novus Biologicals	H00001073-M03	11238-6G9, 10106-6G9
CORO1B	Novus Biologicals	H00057175-M01	07345-1E7, 10236-1E7
Cortactina/CTTN	Novus Biologicals	H00002017-M01	08312-2B5
COX2 / PTGS2	Life Technologies	358200	1251212A
COX5b	Novus Biologicals	H00001329-M03	12241-1E, 11088-1E8
CSE1L	Lifespan biosciences	LS-C104925	41780
CTH	Novus Biologicals	H00001491-M03	10292-S51, 12167-S51
CTNND1 / delta 1-catenina / p120-catenina	Origene	CF800968	W001
CTNND2	Novus Biologicals	H00001501-M01	D5071-6E11
CXCR3	R&D systems	MAB160	AOUL01121
CYCS	Novus Biologicals	NB100-78345	B152009
Cistatina C	Novus Biologicals	NBP1-05763	10/09-cc1-13
Citocromo C	Novus Biologicals	NB100-78345	B152009
Citoqueratina 18	Novus Biologicals	NB500-353	L41K
Citoqueratina 8	Novus Biologicals	NB500-350	515894
Citoqueratina básica	ACRIS	AM10030PU-L	2620
DBF4B /DRF1	Novus Biologicals	H00080174-M01	08361-1a7
DBl*	Abcam	ab16775-100	374264, GR122424-1
DCTN-50 / DCTN2	Novus Biologicals	H00010540-M01	12143-2G7, 11312-2G7
DDAH1	Novus Biologicals	H00023576-M01	D3151-3F7
DDAH1	Novus Biologicals	H00023576-M01	D3151-3f7
DDX1	Novus Biologicals	H00001653-MO2	09226-4F6
Destrina	Novus Biologicals	NBP2-00560	A01
DIP13B /appl2	Novus Biologicals	H00055198-M06	08183-1C10
DIP13B /appl2	Novus Biologicals	H00055198-M06	D5311-1 C10
DLG1	Novus Biologicals	NBP1-48054	1007
Dnpep	Novus Biologicals	H00023549-M01	D5311-S3
E-Caderina	Novus	NB110-61005	2013022601
ECH1	Novus Biologicals	H00001891-M01	09198-5G8, 09020-5G8
ECHS1	Novus Biologicals	H00001892-M05	07355-3C6

Alvo	Vendedor	nº de catálogo	nº de Lote
ECHS1	Novus Biologicals	H00001892-M05	D5311-3C6
EDIL3 (del-1)	Novus Biologicals	H00010085-M01	11074-4C9
EDN-3	Millipore	ST1513-10OUG	11287-S1
EDNRB/EDN3	Novus Biologicals	H00001908-M01	11287-S1, 11053-S1
EGFR	Novus Biologicals	H00001956-MO2	CA091-4H2
EIF4A3	Creative Biomart	CAB-3210MH	ML7809Z
ENTPD4	Novus Biologicals	H00009583-M01	08141-4H7
EpoR	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00002057-MO2	08088-3F6
EpoR	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00002057-MO2	D5311-3F6
ERAB	Novus Biologicals	NBP2-02118	A01
ESD	Novus Biologicals	H00002098-M01	12080-1E1
ESD	Novus Biologicals	H00002098-M01	12080-1E1
ETS1	Novus Biologicals	H00002113-MO2	09174-2G10
ETS1	Novus Biologicals	H00002113-MO2	09174-2G10
ETS-2	Origene	CF505365	?
EZH2	Novus Biologicals	H00002146-M07	D5031-1D11
EZH2 / KMT6	Novus Biologicals	H00002146-M07	11263-1D11
EZR	LIFESPAN BIOSCI-ENCES	LS-C88343	44198, 44201
FABPS	Novus Biologicals	NBP1-50810	10/12-F29-31
FARSLA	Novus Biologicals	H00002193-M01	D3151-2D8
FASN	MYBIOSOURCE	MBS850333	NA
FKBP5/FKBP51	Novus Biologicals	NB110-96873	802
FLNB	MyBioSource	MBS531705	5534
FTL (leve e pesado)	Novus biologicals	H00002512-M16	10061-X1
FUS	Millipore	MABE465	QVP1212055, VP1309301
GAL3	R&D systems	MAB11541	CAVJO210011
gama-catenina	Novus Biologicals	H00003728-M01	D5271-2G9
GDF15	R&D SYSTEMS	MAB957	UDCO512091
GDI2	Prolab Marketing PVT LTD Proteintech	60078-1-1g	lot1
GGPS1	Abcam	ab56579	GR939546-1
GGPS1	Abgent	AT2196a	D5211
GITRL	Novus Biologicals	H00008995-M01	11340-6F7, 08143-6F7
GloI	NOVUS BIOLOGI-CALS	NBP1-19015	A-2
GLUD2	Novus Biologicals	H00002747-M01	CB231-3C2, 12124-3C2
GM2A	Novus Biologicals	H00002760-MO2	08246-2c8
GM-CSF	Invitrogen	AHC2012	1188352A

Alvo	Vendedor	nº de catálogo	nº de Lote
GOLM1/GOLPH 2 Mab; clone 3B10	Novus Biologicals	H00051280-M04	D5301-3B10
GOLPH2	Abgent	AT2239a	12227
GOLPH2	Abgent	AT2239a	12227
GPC6	MyBioSource	MBS601169	Sem nº de lote
GRP94	Novus Biologicals	NB110-61640	811
GSTP1	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00002950-M01	12174-S2
GSTP1	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00002950-M01	D5092-52
H3F3A	Novus Biologicals	NB120-12179	079K4862, 083K4870
HADH/HADHSC	Novus Biologicals	H00003033-M01	11039-4b5
HGF	R&D Systems	MAB694	AWW0411061
HIST1H3A	Creative Diagnostics	DMABT-H12861	AB04011Z
Histona H4	Novus Biologicals	NBP1-78445-50ul	1040711
hK2 / Kif2a	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00003796-M01	D2041-2D4
hnRNP Al	Novus Biologicals	NB100-672	101M4762
hnRNP A2B1	Novus Biologicals	NB120-6102	044K4766
hnRNP Cl + C2	Novus Biologicals	NB600-585	064K4808, 6414808
hnRNP K (F45)*	Novus Biologicals	NB100-74524	ul51623
hnRNP L	Novus Biologicals	NB120-6106	1051108
hnRNP Ml-M4	Novus	NB 200-314PUR	32813
HOXB13	Novus Biologicals	H00010481-M07	08109-1E9
Hsp10 / HSPE1	Novus Biologicals	H00003336-M01	D3151-S1
Hsp4O/DNAJB1	Novus Biologicals	NBP1-04302	A077301
Hsp60	Novus Biologicals	NB120-5479	048-106, 0C186263
HSP9OAA1	Lifespan biosciences	LS-C36617-50	21937
Hsp9OB	Novus Biologicals	NB110-96871	803
HSPA1A	LIFESPAN BIOSCI-ENCES	LS-059523	44127
HSPB1	Sigma-Aldrich	WH0003315-M4	08115-3G3
IDH2	Novus Biologicals	H00003418-M01	ca0515f11, D30815f11, D2061-5f11
IDH3B	Novus Biologicals	H00003420-M01	082003a10
IDH3B	Novus Biologicals	H00003420-M01	D5311-3A10
IGFBP-2	R&D systems	MAB6741	EYP0211041
IGFBP-3	Lifespan biosciences	LS-C45037	45268
IgG1	R&D Systems	MABOO2	IX2612061
IgG2A	R&D Systems	MAB003	MV0912111
IgG2B	R&D Systems	MABOO4	NZ1012041
IgM	Thermo Scientific Pier-	31778	

Alvo	Vendedor	nº de catálogo	nº de Lote
	ce		
IL1 alfa	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00003552-M03	09209-4C6
IL1 alfa	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00003552-M03	D5031-4C6
Integrina beta 7	Novus Biologicals	NB100-78036	B165318
IQGAP1	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00008826-M01	12181-2C5
ITGAL	LIFESPAN BIOSCI-ENCES	LS-C140412-100	41655
KLHL12/C3IP1	Novus Biologicals	NBP2-22359	100803
KLK1	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00003816-M01	11074-3G2
KLK10	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00005655-M01	D3011-1G8, 08344-1G8, 09233-1G8
KLK11	R&D Systems	MAB1595	ITM0310091
KLK12	R&D SYSTEMS	MAB4034	YHJ016101
KLK13	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00026085-M01	08186-1G9
KLK14	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00043847-M05	08284-2A7
KLK15	R&D Systems	MAB2540	KTL025041
KLK4	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00009622-M09	08172-2A4
KLK5	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00025818-M01	08270-3H3
KLK6	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00005653-M01	11067-4A10
KLK7	NOVUS BIOLOGI-CALS	NBP2-11753	20130110801
KLK8	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00011202-M01	11109-2F11
KLK9	Lifespan biosciences	LS-C37111	42449
Ku70 (XRCC6)	Novus Biologicals	H00002547-M01	D4291-S1
Lamina BI	LIFESPAN BIOSCI-ENCES	LS-C25124	45298
LAMP1	Novus Biologicals	NB100-1952-10Oug	711
Lamp-2	Novus Biologicals	H00003920-M01	11062-2G10
LDH-A	NOVUS BIOLOGI-CALS	NBP1-74023-100ul	A119401
LGALS3BP	proteintech	60066-2-Ig	1
LGALS8	Abgent	AT2702a	11125
Lipoamida Desi-drogenase	Novus Biologicals	NBP2-01109	A01
LLGL2	Novus Biologicals	H00003993-M06	cc211-4g2
LSP1	NOVUS BIOLOGI-	H00004046-M07	08179-1C4

Alvo	Vendedor	nº de catálogo	nº de Lote
	CALS		
LSP1	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00004046-M07	D5311-1C4
LTBP2	Novus Biologicals	H00004053-M01	D4011-5D7
MATR3	Lifespan Biosciences Inc.	LC-C137527	44577
MBD5	Novus Biologicals	H00055777-M01	08179-S1
MDH2	Novus Biologicals	H00004191-M06	D4081-2A7, 07283-2a7
MDM4	Origene	TA505712	A001
ME1	Novus Biologicals	H00004199-M03	12171-3H5, 11182-3H5
MKI67/Ki67	Novus Biologicals	H00004288-M01	11195-7B8
MMP 1	Novus Biologicals	NBP1-28604	H0205-R931
MMP 2	Thermo scientific	MA1-12892	OB1661361
MMP 25	R&D SYSTEMS	MAB11421	GTT013111
MMP10	R&D systems	MAB9103	EWCO310041
MMP-14/MT1-MMP	Novus	NB 110-60993	2013052204
MMP3	Novus Biologicals	NB100-78555	B114136
MMP7*	milipore	MAB3315	1957964
Mortalina	Novus Biologicals	NBP1-47800	A01
MTA1	Novus Biologicals	H00009112-M10	08057-1C3, 07317-1C3
nAnS	Novus Biologicals	H00054187-M01	09015-3G6
nAnS	Novus Biologicals	H00054187-M01	D5311-3 G6
Nav1.7/SCN9A	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00006335-M01	12157-5A11
NCL	Lifespan Biosciences Inc.	LC-C85348	35642
NDRG1	Novus Biologicals	H00010397-M03	12094-2D7
NKX3-1	Novus Biologicals	H00004824-MO2	10328-1C7, 12215-1C7
NONO	Novus Biologicals	NBP2-02060	A001
Notchl	R&D systems	MAB5317	CCGKO110031
NOTCH4	Biolegend	349002	B 165966
NRP1 / CD304	Novus Biologicals	H00008829-M05	D2041-1B3
Nucleobindina-1	Novus Biologicals	NBP2-01446	A01
Nucleofosmina	Novus Biologicals	NBP1-04323	A065101
p130 /RBL2	Novus Biologicals	H00005934-M03	D3151-1E2
p97 / VCP	Novus Biologicals	H00007415-M03	12178-4A8
PAP – igual a ACPP	US biological	P9054-67H	L11092257C13020764
PHGDH	Novus Biologicals	H00026227-M01	D2191-52
PhIP	Novus Biologicals	H00055023-M01	D1281-4D7, 12178-4D7
PIP3 / BPNT1	Novus Biologicals	H00010380-M01	08297-2E1

Alvo	Vendedor	nº de catálogo	nº de Lote
PKA R2	Novus Biologicals	NBP2-02520	A01
PKM2	My Biosource	MBS200150	
PKM2	My Biosource	MBS200150	A1018601
PKP1	Novus Biologicals	NB110-13474	130202618
PKP3	Novus Biologicals	NBP1-97675	1123
PLEKHC1 / Kindlin-2	Novus Biologicals	H00010979-M09	D4161-2G11
PRDX2	Novus Biologicals	H00007001-M01	CA081-S1
PRKCSH	Novus Biologicals	H00005589-M01	08297-3H7, 09114-3H7
Proibitina	Novus Biologicals	H00005245-M01	D3191-S3
Proteassoma 19S lOB	Novus Biologicals	NBP2-01028	A01
Proteassoma 20S beta 7	Novus Biologicals	NBP2-01832	A01
PSAP	Novus Biologicals	H00005660-M01	12265-S1
PSMA	Novus Biologicals	NBP1-45057	516937
PSMA1	Novus Biologicals	H00005682-M01	11280-S3
PSMA1	Novus Biologicals	H00005682-M01	D5031-53, D5311-53
PSMD7	Novus Biologicals	H00005713-M01	08130-2G5
PSMD7	Novus Biologicals	H00005713-M01	D5311-2G5
PSME3	My Biosource	MBS850788	Sem nº de lote
PSP94 / MSP / IGBF	Novus Biologicals	H00004477-M08	12118-3B11
PTBP1	Novus Biologicals	H00005725-M01	D3151-3H8
PTEN	Novus Biologicals	H00005728-M01	12055-2G9
PTPN13/PTPL1	R&D SYSTEMS	MAB3577	XXI0109051
Rab lA	Novus Biologicals	H00005861-M07A	08231-3f10, 11258-3f10
RAB3B	Novus Biologicals	H00005865-M01	D3191-3F12
Rab5a	Novus Biologicals	NBP1-04340	A088001
Rad5lb	Genetex	GTX11050	12257
RPL10	Novus Biologicals	H00006134-M01	07295-3H7
RPL10	Novus Biologicals	H00006134-M01	D5311-3H7
RPL14	Novus Biologicals	H00009045-M01	09244-1B4
RPL14	Novus Biologicals	H00009045-M01	09233-1B4, 09244-1B4
RPL19	Novus Biologicals	H00006143-M01	12115-3H4
RUVBL2	Novus Biologicals	NBP2-01764	A01
SCARB2	Novus biologicals	H00000950-M01	08312-1c8
seprase/FAP	R&D systems	MAB3715	CCHZ0212041
Serpina B6	Novus Biologicals	NBP2-01650	A01, A001 (conc. igual)
SET	Novus Biologicals	H00006418-M01	D2041-S1
SH3PX1	z	NBP2-02609	A01, A001 (conc. igual)

Alvo	Vendedor	nº de catálogo	nº de Lote
SLC20A2	Novus Biologicals	H00006575-M04	08153-4b1
SLC3A2 / CD98	Novus Biologicals	NB600-772	0610
SLC9A3R2	abcam	ab151443	GR121588-1
SMARCA4	life technologies	730011	1139083A1
Sorbitol Desi-drogenase	Novus Biologicals	NBP2-02126	A01
SPEN/ RBM15	Novus Biologicals	H00064783-M19	08295-2C1
SPOCK1	R&D	MAB2327	XCX0108121
SPR	Novus Biologicals	NBP2-03257	A01
SRVN	Novus Biologicals	H00000332-M01	12101-5B10
Estaniocalcina 2 /STC2	Novus Biologicals	H00008614-M08	11252-2B11
STEAP1	Novus Biologicals	NBP1-07094	A0912501
Sinaptogirina 2 /SYNGR2	Novus Biologicals	H00009144-M01	08312-5C3, 08318-5C3, 6286-5C3-00LcY5
Sindecano	NOVUS BIOLOGI-CALS	NBP1-43351	E04056-1632
SYNGR2	Novus Biologicals	H00009144-M01	D5311-5C3
SYT9	NeuroMab	75-306	449-3AK-64
TAF1B / GRHL1	MYBIOSOURCE	MBS120474	no lot given
TBXS	Novus Biologicals	H00006910-M01	12250-1G10
TGFB	Novus Biologicals	NBP2-00426	E05980-1630
TGM2	Sigma Aldrich	WH0007052M10	11294-2F4
TGN46 /TGOLN2	Novus Biologicals	H00010618-MO2	11350-2f11
TIMP-1	Sigma-Aldrich	WH0007076M1	11025-4D12, 11097-4D12
TLR3	Abcam	ab13915	GR123770-1,
			GR117728-1
TLR4 (CD284)	Novus Biologicals	H00007099-MO2	12250-3B6
TLR9 / CD289	Novus Biologicals	H00054106-M03	D1111-1E8
TM9SF2	Novus Biologicals	H00009375-M12	09247-1C2
TMBIM6	ACRIS	AM20308PU-N	AB090612A-01
TMPRSS1	NOVUS BIOLOGI-CALS	H00003249-MO2	10341-2D5
TMPRSS2	Millipore/Calbiochem	ST1676-100UG	08162-2F4, 11027-2F4
TNFR1	US biological	T9162-51	L13020614C13020614
TNFRI	R&D systems	MAB225	IP0912041
TNFRII	R&D Systems	MAB2261	BQH0310061
TNFSF18 / GI-TRL	Novus Biologicals	H00008995-M01	D5311-6F7
TNFα	Novus Biologicals	H00007124-M04	07254-S1
TNFα	Novus Biologicals	H00007124-M04	D5311-S1

Alvo	Vendedor	nº de catálogo	nº de Lote
Tollip	Novus Biologicals	NBP1-28621	L5505-T719C, L5505-T719D
TOM1	Novus Biologicals	H00010043 -M01	D3131-5A3
TOMM22	Novus Biologicals	H00056993 -M01	D2251-4g4, D3011-4g4
Trop2 / TACSTD2	eBioscience	14-6024-82	E13280-103
TSNAXIP1	Novus Biologicals	H00055815-MO2	07205-1D6
TWEAK	R&D systems	MAB1090	VIV0110091
U2AF2	Novus Biologicals	H00011338-M03	11305-5G8
uPA	Novus Biologicals	NBP1-05160	U 16-0109-001
uPAR / CD87	BD pharmingen	555767	2104802
USP14	Novus Biologicals	H00009097-M04	12195-6D6
USP14	Novus Biologicals	H00009097-M04	12195-6D6
VAMP8	Novus Biologicals	NBP1-40484	YJ032819CS
VASP	Novus Biologicals	NBP2-00555	A01
VDAC2	Novus Biologicals	H00007417-M01	12194-3D2
VEGFA	Novus Biologicals	NB110-60975	2012081301
VEGFR1/FLT1	US biological	V2110-16N	L13053059 C13053059
VEGFR2	Novus Biologicals	NBP1-18646	0511R07-3
VPS28	Origene	CF505691	
XRCC5 / Ku80	Novus Biologicals	H00007520-MO2	11350-3D8, 10096-3D8
XRCC5 / Ku80	Novus Biologicals	H00007520-MO2	D5311-3D8

[001074] O método é usado para desenvolver o aptâmero para substituir os anticorpos na Tabela 26. Os aptâmeros são usados para captura e/ou detecção das microvesículas de interesse. O método é usado para desenvolver aptâmeros para EGFR, TOMM22, NDRG1, VDAC2, KLK6, MMP7, EDIL3 (del-1), CCR5, BDNF, Hsp10, GOLPH2, Hsp4O/DNAJBE KLK4, LGALS3BP, p130 /RBL2, SCARB2, Estaniocalcina 2 /STC2, TGN46 /TGOLN2, ANXA2, TMPRSS1, KLK14, SPEN/ RBM15, ME1, PhIP, ALDOA, MMP25, NCL, EDNRB/EDN3, MTA1, CDH1, KLK15, CHRDL2, CXCR3. O método é usado para desenvolver aptâmeros para CD81, EDN-3, Citocromo C, CD10, CD151, seprase/FAP, HGF, PAP, CD41, IGFBP-2, TWEAK, MMP 2, H3F3A, DDX1, 99-14-3-3 zeta/beta, IDH2, CD49d, KLK12, DCTN2-50, Histona H4, EDIL3 (del-1), CD9, COX2, hnRNP M1-M4, CDH2, SPEN/ RBM15,

81-Proibitina, SYT9. Esses aptâmeros são usados com um anticorpo ou aptâmero anti-E Caderina (CDH1) para um par de captura/detector para detectar as microvesículas de interesse. As microvesículas são identificadas para distinguir as amostras de câncer de próstata das amostras de câncer de não próstata.

[001075] Embora as modalidades preferenciais da presente invenção tenham sido mostradas e descritas no presente documento, será óbvio para aqueles versados na técnica que tais modalidades são fornecidas a título de exemplo apenas. Inúmeras variações, alterações e substituições ocorrerão agora àqueles versados na técnica sem se afastar da invenção. Deve ser entendido que várias alternativas para as modalidades da invenção descritas no presente documento podem ser empregadas na prática da invenção. Pretende-se que as reivindicações a seguir definam o escopo da invenção e que os métodos e as estruturas dentro do escopo dessas reivindicações e seus equivalentes sejam cobertos pelas mesmas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para caracterizar um câncer, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) colocar em contato uma amostra de teste biológico compreendendo microvesículas com uma pluralidade de oligonucleotídeos em que os oligonucleotídeos são escolhidos para se ligar a microvesículas;

(b) detectar uma presença ou nível de um complexo formado na etapa (a) entre cada um dos membros da pluralidade de oligonucleotídeos e das microvesículas da amostra de teste biológico; e

(c) comparar a presença ou nível detectado na etapa (b) a um nível de referência caracterizando, desse modo, o câncer.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de oligonucleotídeos é pré-selecionada através de pelo menos uma etapa de seleção positiva e/ou negativa, em que a seleção positiva compreende a seleção de oligonucleotídeos contra uma amostra que tem características substancialmente similares em comparação à amostra de teste, e em que a seleção negativa compreende a seleção de oligonucleotídeos contra uma amostra que tem características substancialmente diferentes em comparação à amostra de teste.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a etapa (a) compreende identificar os membros da pluralidade de oligonucleotídeos, em que a identificação é realizada por sequenciamento de alto rendimento, amplificação ou hibridização.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica é proveniente de um indivíduo suspeito de ter ou predisposto a ter um câncer.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica compreende uma amostra de te-

cido, uma cultura de células ou um fluido biológico.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o fluido biológico compreende um fluido corporal, opcionalmente em que o fluido corporal compreende sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebroespinhal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem broncoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de Cowper ou fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido cístico, fluido pleural e peritoneal, fluido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bile, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreção vaginal, secreção mucosa, fezes aquosas, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades do seio, aspirações broncopulmonares, fluido de cavidade blastocística, ou sangue do cordão umbilical.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a amostra de teste biológico é colocada em contato com uma pluralidade de oligonucleotídeos antes de isolar as microvesículas.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a amostra de biológica compreende microvesículas isoladas.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que pelo menos um membro da pluralidade de oligonucleotídeos se liga a um polipeptídeo ou fragmento do mesmo, em que, opcionalmente, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo é solúvel ou ligado à membrana, e em que, opcionalmente, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo compreende um biomarcador na Tabela 3 ou Tabela 4.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que pelo menos um membro da

pluralidade de oligonucleotídeos se liga um antígeno de superfície de microvesícula.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o câncer compreende uma leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cânceres relacionados à AIDS; linfoma relacionado à AIDS; câncer anal; câncer do apêndice; astrocitomas; tumor teratoide/rabdoide atípico; carcinoma basocelular; câncer de bexiga; glioma de tronco cerebral; tumor cerebral (inclusive glioma de tronco cerebral, tumor teratoide/rabdoide atípico do sistema nervoso central, tumores embrionários do sistema nervoso central, astrocitomas, craniofaringioma, ependimoblastoma, ependimoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais e pineoblastoma); câncer de mama; tumores brônquicos; linfoma de Burkitt; câncer de sítio primário desconhecido; tumor carcinoide; carcinoma de sítio primário desconhecido; tumor teratoide/rabdoide atípico do sistema nervoso central; tumores embrionários do sistema nervoso central; câncer cervical; cânceres infantis; cordoma; leucemia linfocítica crônica; leucemia mieloide crônica; distúrbios mieloproliferativos crônicos; câncer de cólon; câncer colorretal; craniofaringioma; linfoma cutâneo de células T; tumores endócrinos de células das ilhotas pancreáticas; câncer endometrial; ependimoblastoma; ependimoma; câncer esofágico; estesioneuroblastoma; sarcoma de Ewing; tumor de células germinativas extracraniano; tumor de células germinativas extragonadal; câncer de ducto biliar extra-hepático; câncer de vesícula biliar; câncer gástrico (estômago); tumor carcinoide gastrointestinal; tumor de célula estromal gastrointestinal; tumor estromal gastrointestinal (GIST); tumor trofoblástico gestacional; glioma; leucemia de células pilosas; câncer de cabeça e pescoço; câncer de coração; linfoma de Hodgkin; câncer

de hipofaringe; melanoma intraocular; tumores de células da ilhota; sarcoma de Kaposi; câncer de rim; histiocitose de células de Langerhans; câncer de laringe; câncer de lábio; câncer de fígado; câncer de pulmão; câncer ósseo histiocitoma fibroso maligno; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; carcinoma de células de Merkel; carcinoma de células epiteliais de Merkel; mesotelioma; câncer cervical escamoso metastático primário oculto; câncer de boca; síndromes neoplásicas endócrinas múltiplas; mieloma múltiplo; mieloma múltiplo/neoplasia de células plasmáticas; micose fungoide; síndromes mielodisplásicas; neoplasias mieloproliferativas; câncer de cavidade nasal; câncer de nasofaringe; neuroblastoma; linfoma não Hodgkin; câncer de pele não melanoma; câncer de pulmão de células não pequenas; câncer oral; câncer da cavidade oral; câncer de orofaringe; osteosarcoma; outros tumores cerebrais e da medula espinhal; câncer de ovário; câncer epitelial de ovário; tumor de células germinativas do ovário; tumor de ovário de baixo potencial de malignidade; câncer pancreático; papilomatose; câncer de seios paranasais; câncer de paratireoide; câncer pélvico; câncer de pênis; câncer de faringe; tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária; pineoblastoma; tumor pituitário; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiplo; blastoma pleuropulmonar; linfoma do sistema nervoso central (CNS) primário; câncer de fígado hepatocelular primário; câncer de próstata; câncer retal; câncer renal; câncer de células renais (rim); câncer de células renais; câncer do trato respiratório; retinoblastoma; rabdomiossarcoma; câncer das glândulas salivares; síndrome de Sezary; câncer de pulmão de pequenas células; câncer de intestino delgado; sarcoma de tecidos moles; carcinoma de células escamosas; câncer cervical escamoso; câncer de estômago (gástrico); tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais; linfoma de células T; câncer de testículo; câncer de garganta; carcinoma tímico; timoma; câncer de tireoide;

câncer de células de transição; câncer de células de transição da pelve renal e ureter; tumor trofoblástico; câncer de ureter; câncer de uretra; câncer uterino; sarcoma uterino; câncer vaginal; câncer vulvar; macroglobulinemia de Waldenstrom; ou tumor de Wilms.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 5 oligonucleotídeos, em que opcionalmente a pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 10 ou pelo menos 20 oligonucleotídeos.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que as microvesículas são isoladas utilizando, cromatografia, filtração, ultrafiltração, centrifugação, ultracentrifugação, citometria de fluxo, captura por afinidade e/ou microfluidos.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a presença ou nível alterado(a) de alguns ou todos os da pluralidade de oligonucleotídeos que formaram um complexo com as microvesículas como comparado com a referência indica que a amostra é cancerosa ou predisposta a ser cancerosa.

15. Invenção, em quaisquer formas de suas concretizações ou em qualquer categoria aplicável de reivindicação, por exemplo, de produto ou de processo ou uso englobadas pela matéria inicialmente descrita, revelada ou ilustrada no pedido de patente.

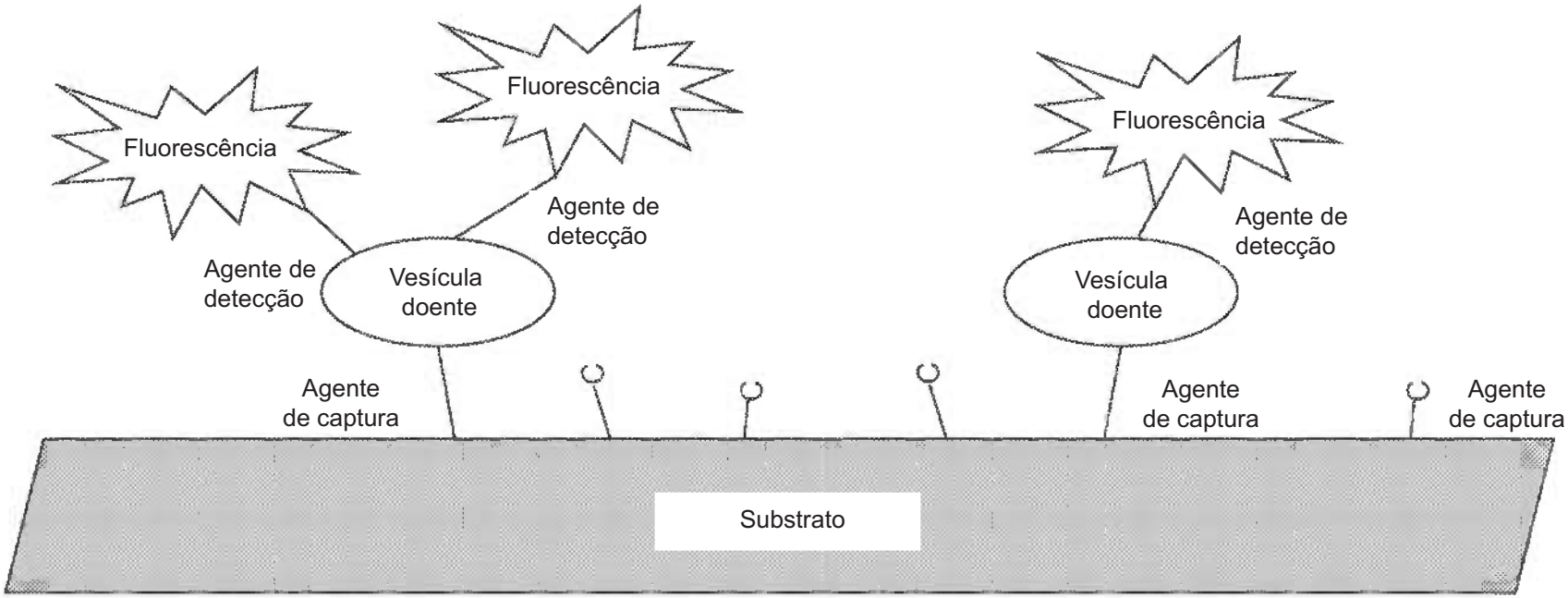

Fluorescência
Fluorescência
Fluorescência
Agente de detecção
Agente de detecção
Agente de detecção
Vesícula doente
Vesícula doente
Agente de captura
Agente de captura
Agente de captura
Substrato

FIG. 1A

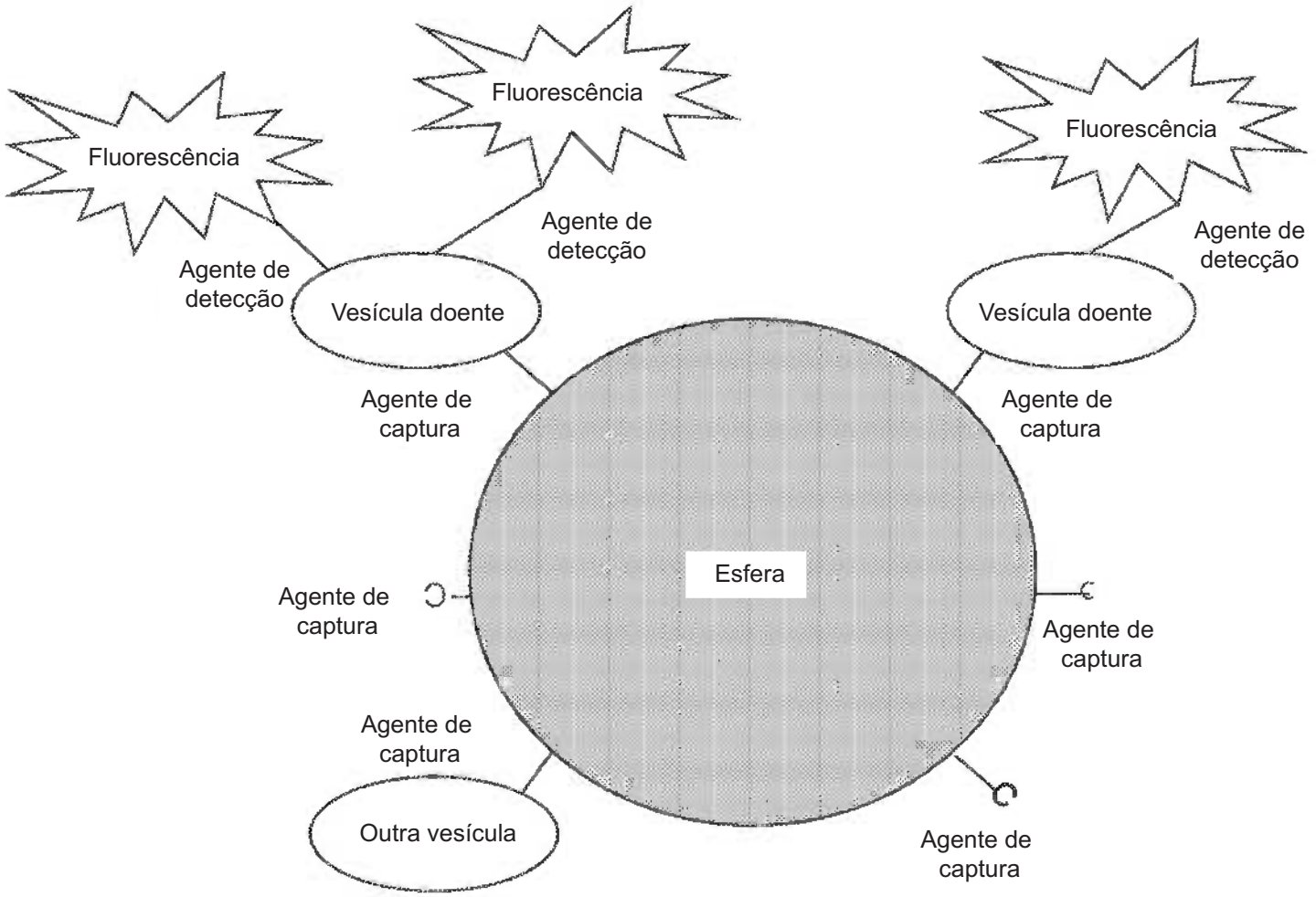

Fluorescência
Fluorescência
Fluorescência
Agente de detecção
Agente de detecção
Agente de detecção
Vesícula doente
Vesícula doente
Agente de captura
Agente de captura
Esfera
Agente de captura
Agente de captura
Agente de captura
Outra vesícula
Agente de captura

FIG. 1B

Esquema de avaliação

5	X	20	=	100
Agentes de detecção		Agente de captura		Combinações avaliadas

CD63	CD9	Rab
CD9	PSCA	IgG
CD81	TNFR	CD81
B7H3	CD63 2X	STEAP
EpCam	B7H3	PCSA
	Rab IgG	PSMA
	MFG-E8	5T4
	EpCam 2X	CD24
	CD63	TMEM211

Biomarcadores de vesícula gerais : **CD9, CD63, CD81**
Biomarcadores de célula de origem: **PSCA, MFG-E8, Rab, STEAP, PCSA, PSMA, 5T4, TMEM211**
Biomarcadores de câncer: **EpCam, B7H3, CD24**
Biomarcadores de controle: **Rab IgG, IgG**

FIG. 1C

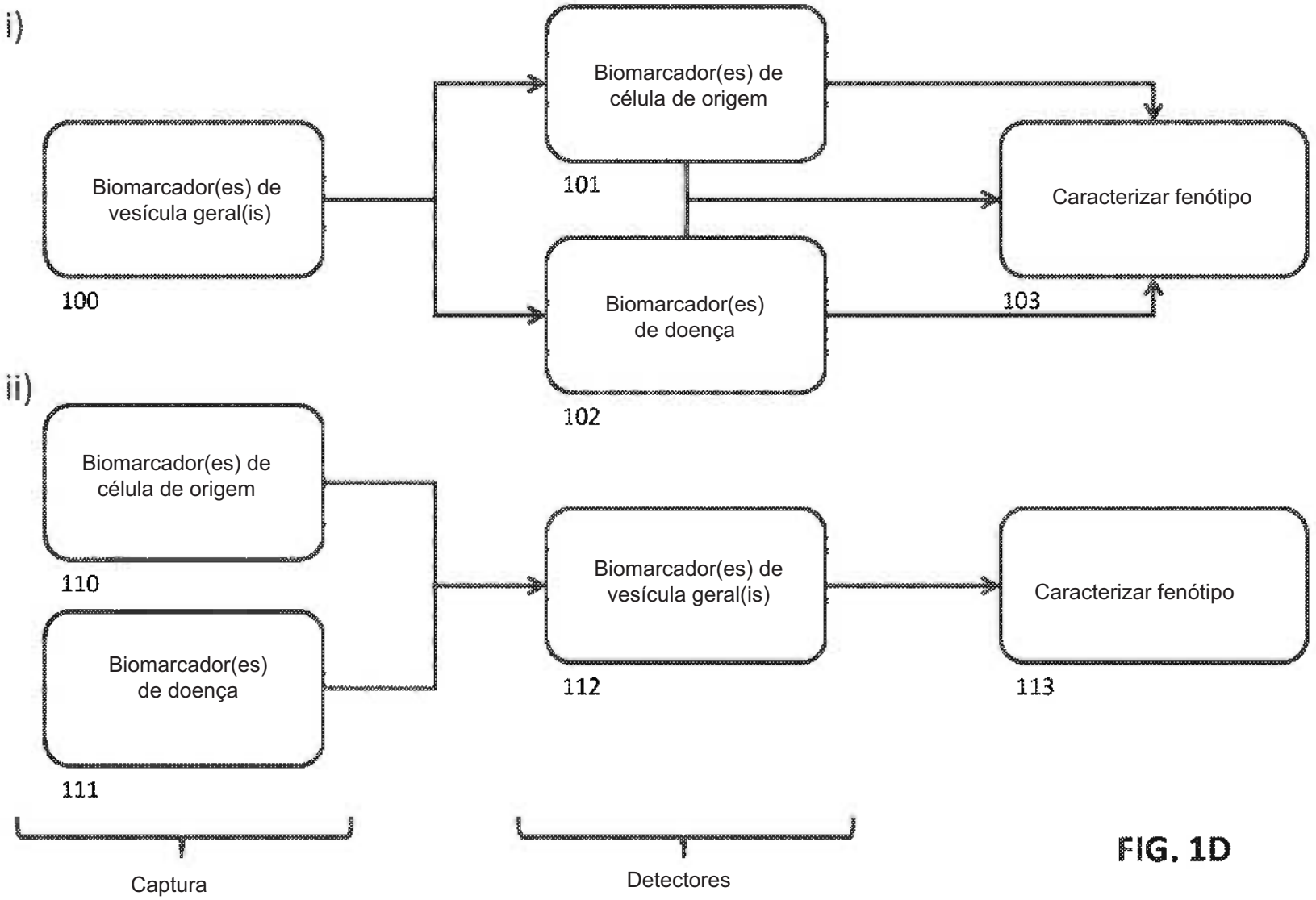

i)
Biomarcador(es) de célula de origem
101
Biomarcador(es) de vesícula geral(is)
100
Caracterizar fenótipo
Biomarcador(es) de doença
102
103
ii)
Biomarcador(es) de célula de origem
110
Biomarcador(es) de doença
111
Biomarcador(es) de vesícula geral(is)
112
Caracterizar fenótipo
113
Captura
Detectores

FIG. 1D

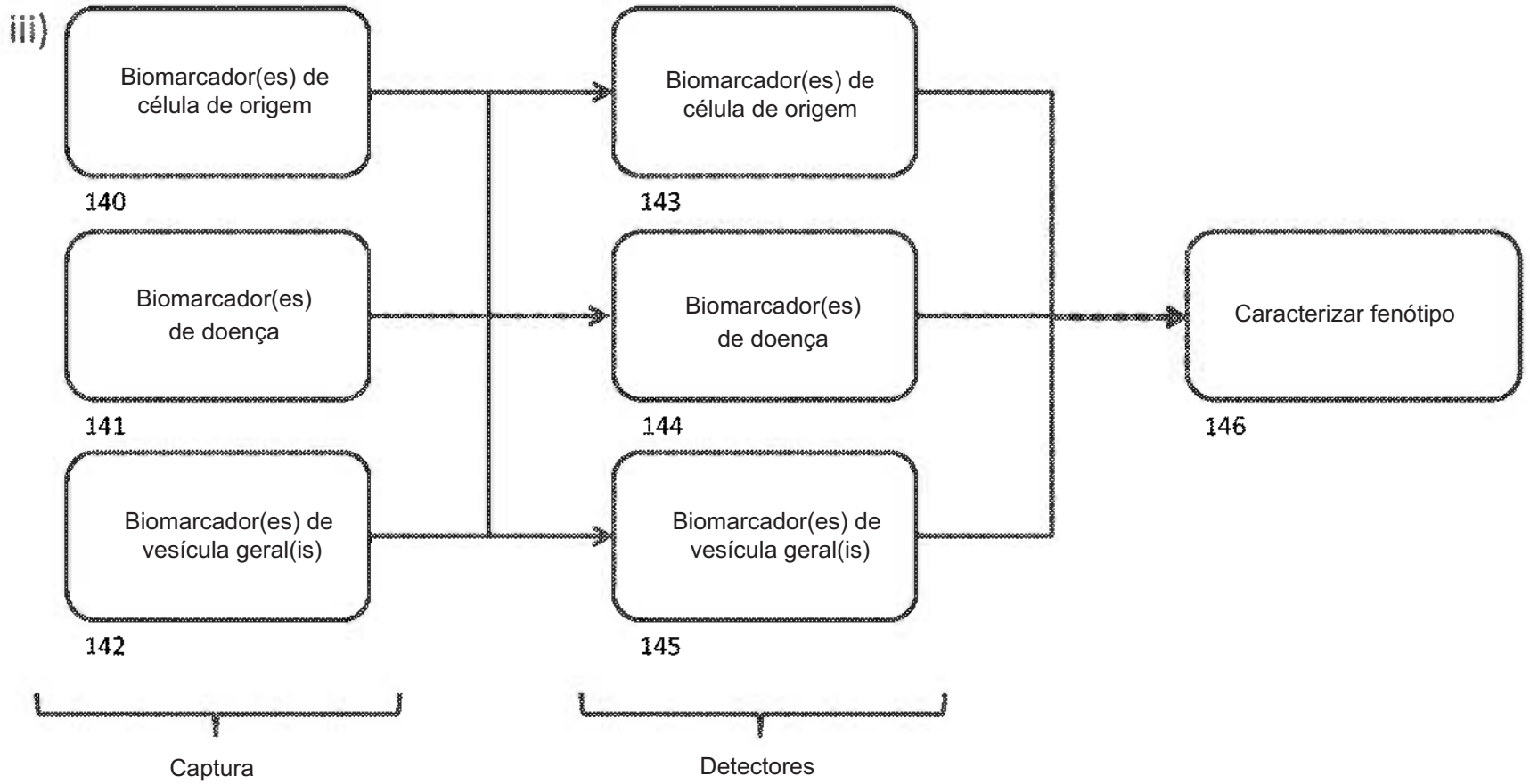

iii)
Biomarcador(es) de célula de origem
140
Biomarcador(es) de célula de origem
143
Biomarcador(es) de doença
141
Biomarcador(es) de doença
144
Caracterizar fenótipo
146
Biomarcador(es) de vesícula geral(is)
142
Biomarcador(es) de vesícula geral(is)
145
Captura
Detectores

FIG. 1E

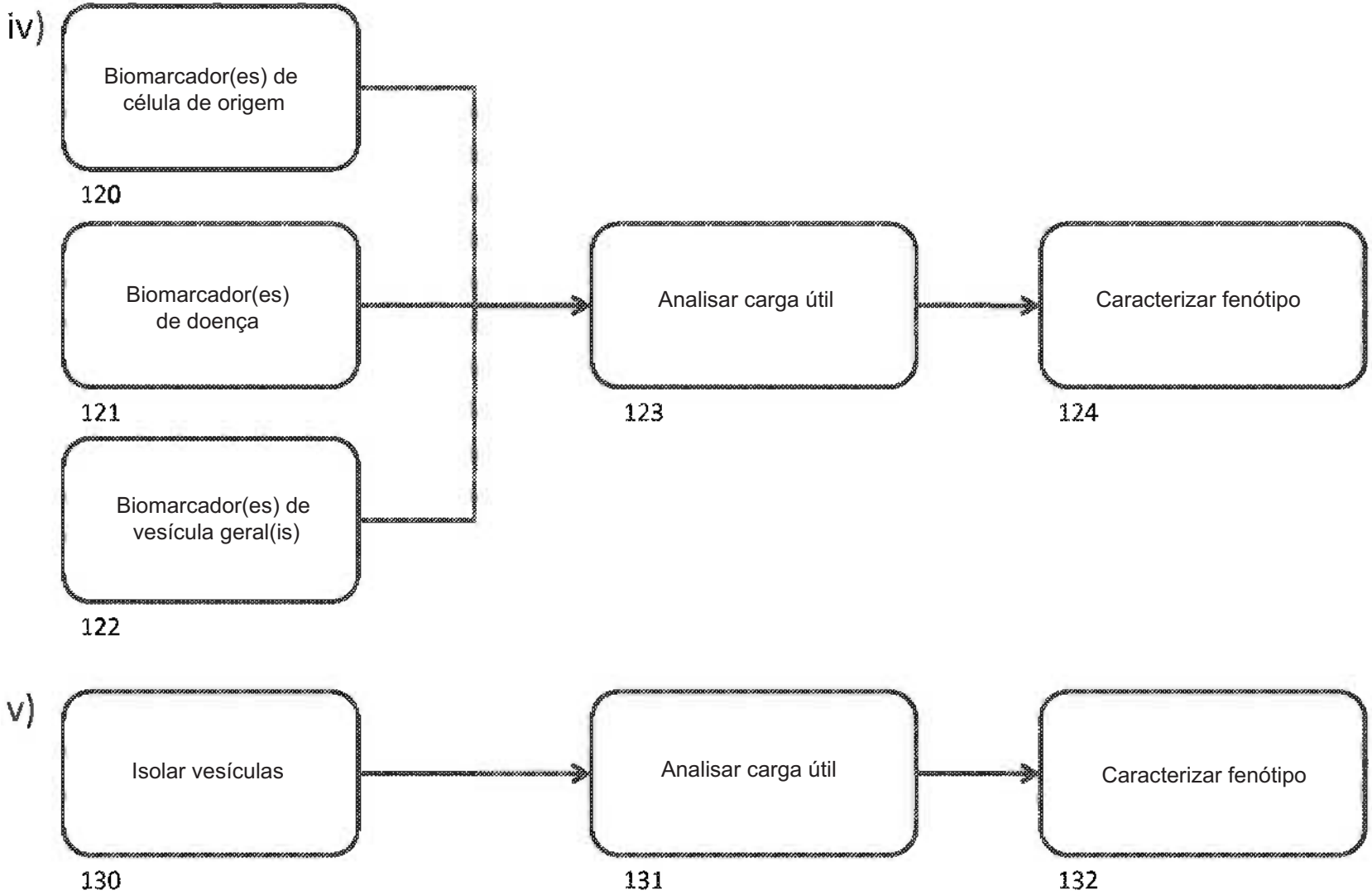
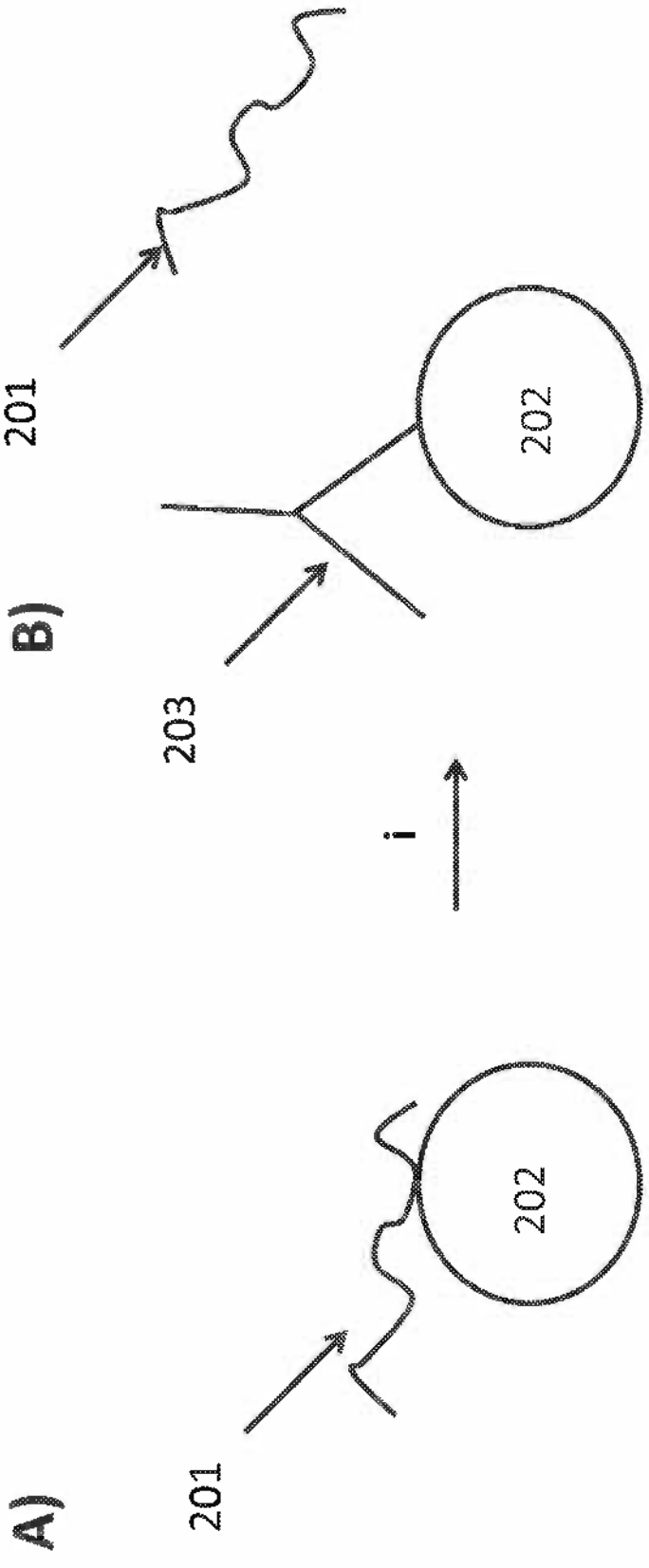

iv)
Biomarcador(es) de célula de origem
120
Biomarcador(es) de doença
121
Biomarcador(es) de vesícula geral(is)
122
Analisar carga útil
123
Caracterizar fenótipo
124
v)
Isolar vesículas
130
Analisar carga útil
131
Caracterizar fenótipo
132

FIG. 1F



FIGs. 2A-2B

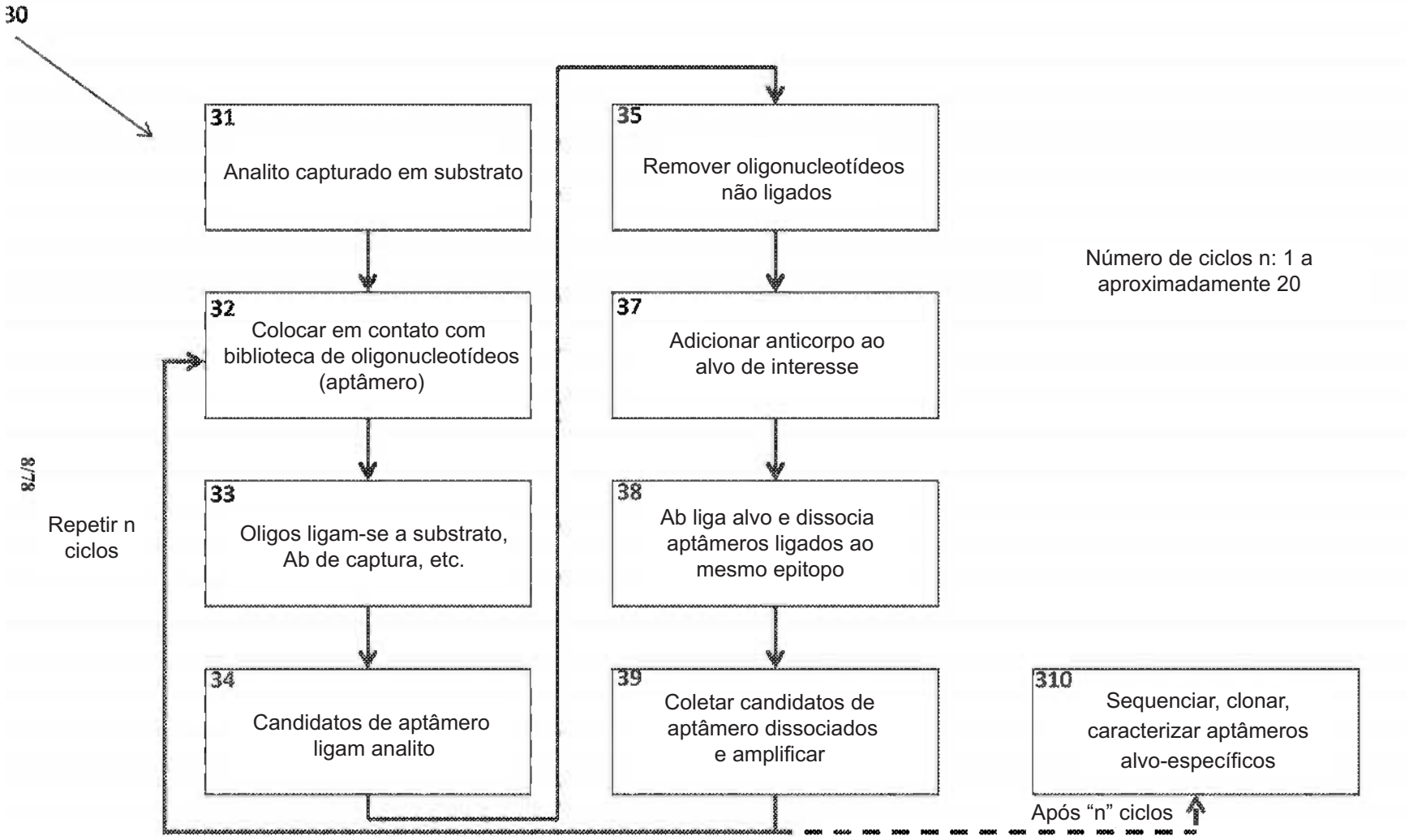

30
31
Analito capturado em substrato
32
Colocar em contato com biblioteca de oligonucleotídeos (aptâmero)
33
Oligos ligam-se a substrato, Ab de captura, etc.
34
Candidatos de aptâmero ligam analito
35
Remover oligonucleotídeos não ligados
37
Adicionar anticorpo ao alvo de interesse
38
Ab liga alvo e dissocia aptâmeros ligados ao mesmo epitopo
39
Coletar candidatos de aptâmero dissociados e amplificar
310
Sequenciar, clonar, caracterizar aptâmeros alvo-específicos
Repetir n ciclos
Número de ciclos n: 1 a aproximadamente 20
Após "n" ciclos

FIG. 3

8/78

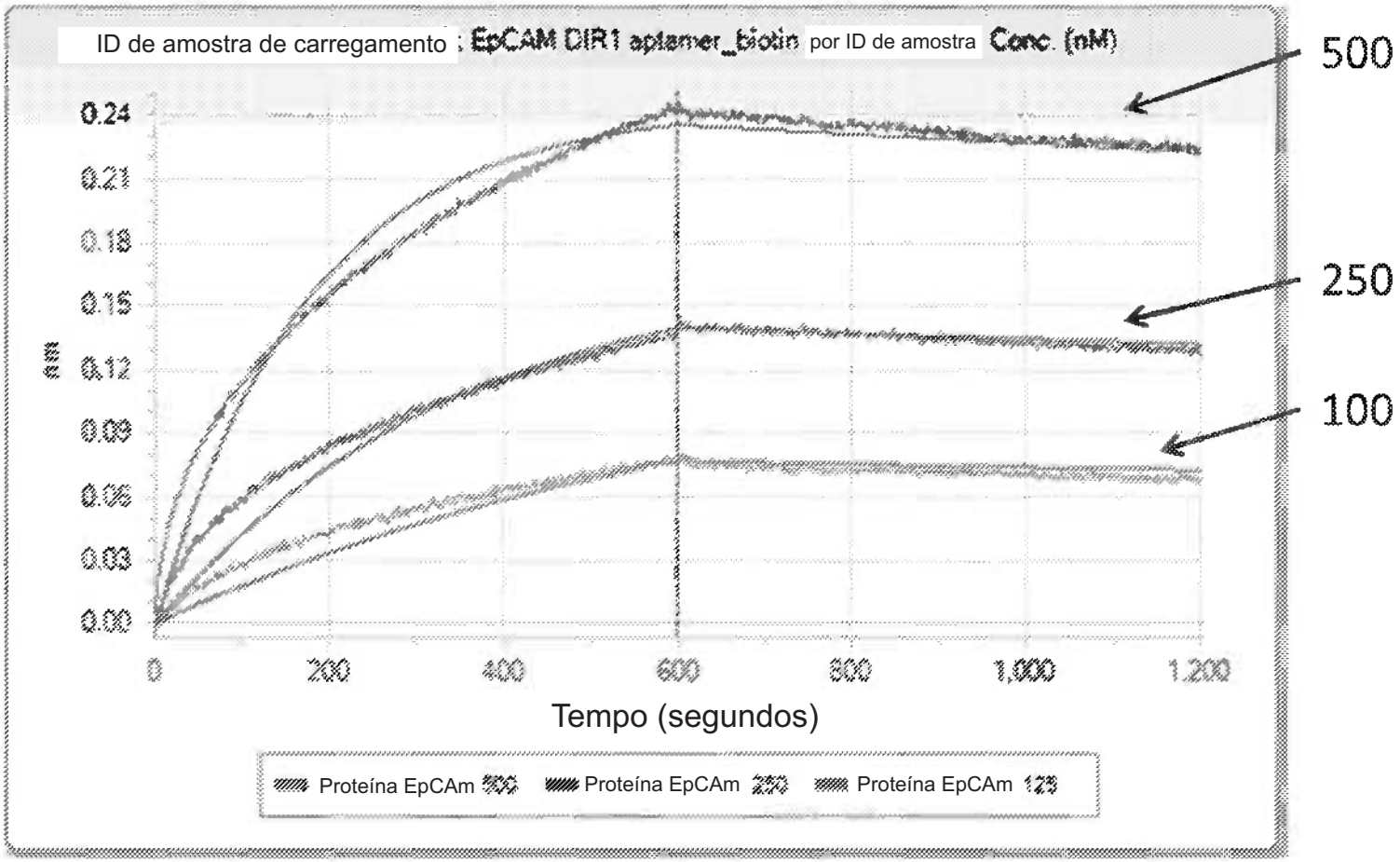
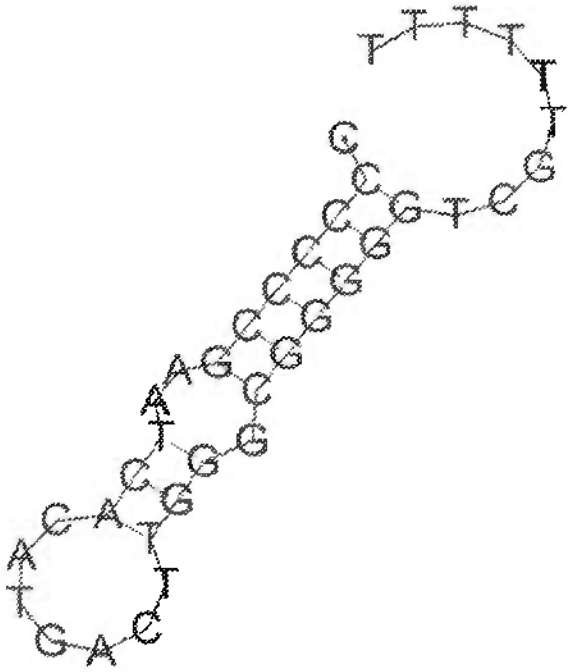
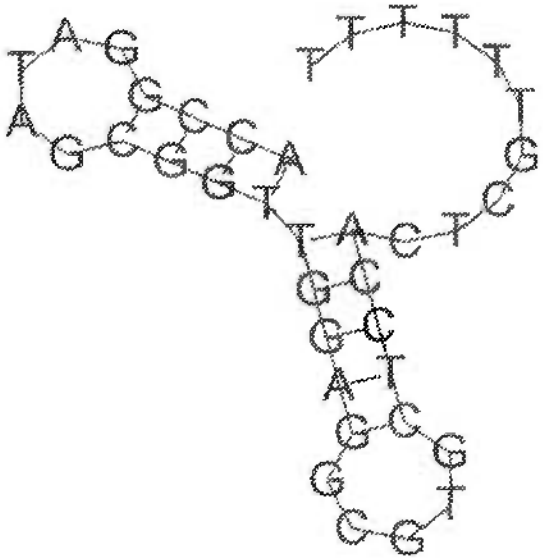

ID de amostra de carregamento : EpCAM DIR1 aptamer_biotin por ID de amostra Conc. (nM)
0.24
0.21
0.18
0.15
0.12
0.09
0.06
0.03
0.00
0
200
400
600
800
1,000
1,200
Tempo (segundos)
Proteína EpCAm 500
Proteína EpCAm 250
Proteína EpCAm 125
500
250
100

FIG. 4



SEQ ID NO. 1

FIG. 5A



SEQ ID NO. 3840

FIG. 5B

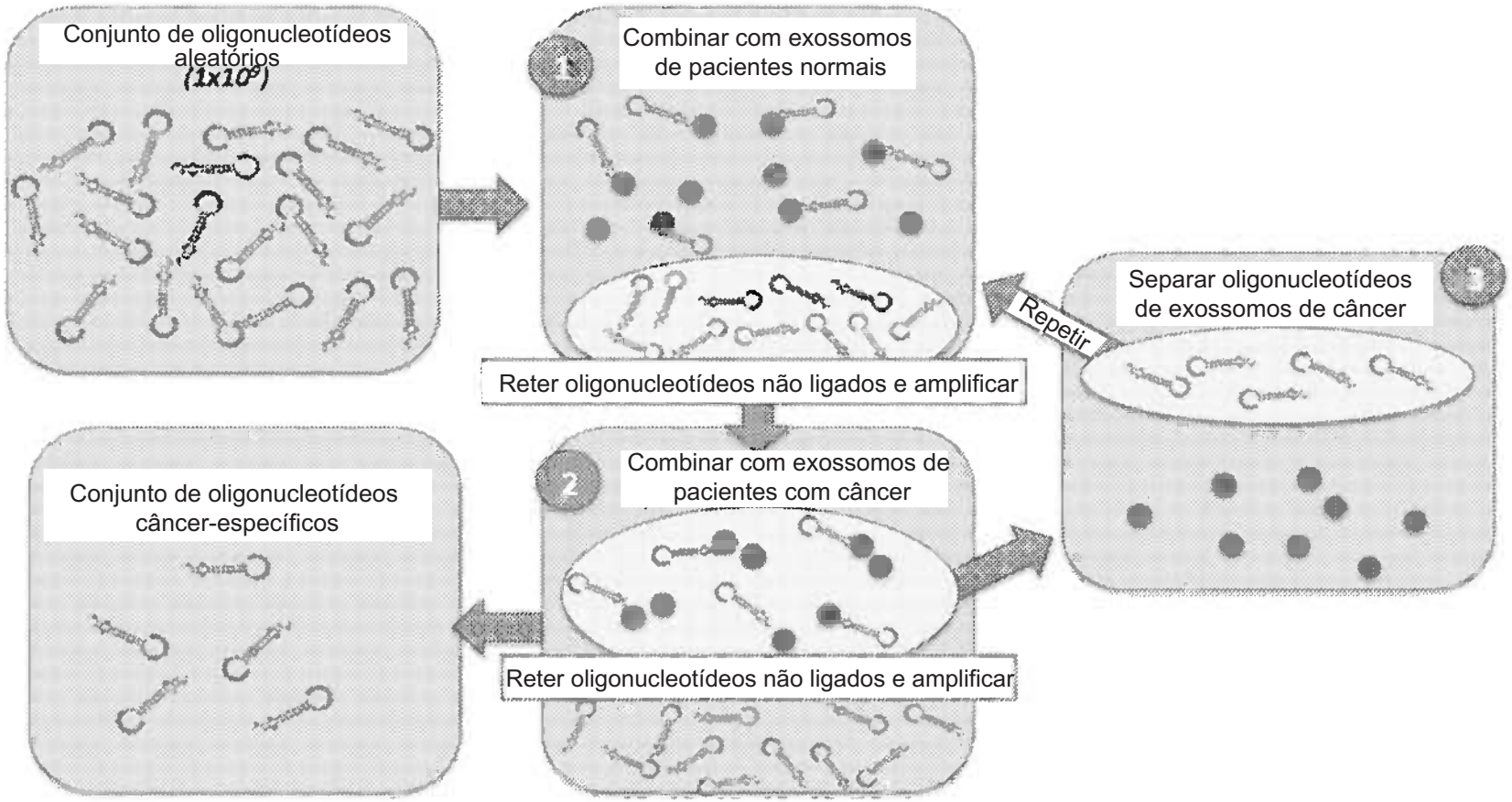
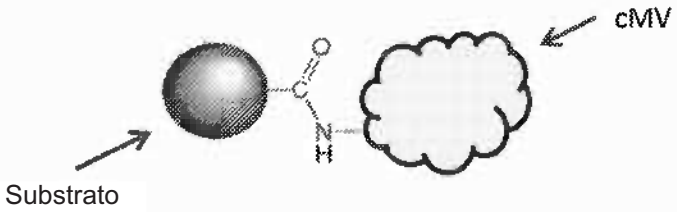
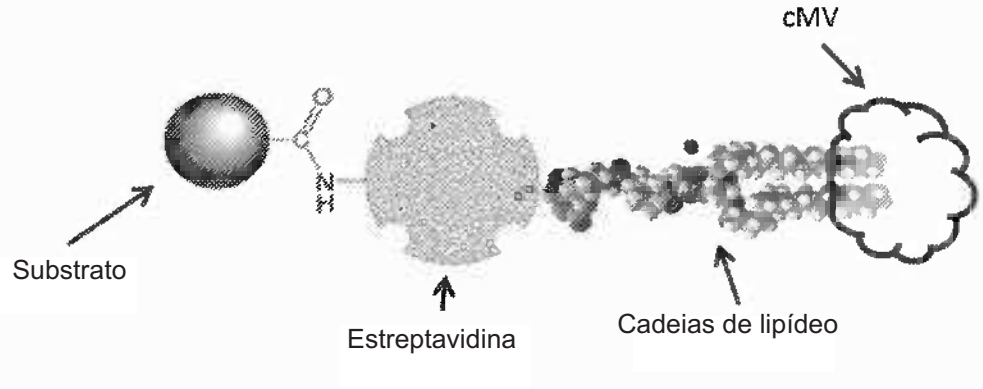

Conjunto de oligonucleotídeos aleatórios
(1x10^9)
1
Combinar com exossomos de pacientes normais
Reter oligonucleotídeos não ligados e amplificar
2
Combinar com exossomos de pacientes com câncer
Reter oligonucleotídeos não ligados e amplificar
Conjunto de oligonucleotídeos câncer-específicos
3
Separar oligonucleotídeos de exossomos de câncer
Repetir

FIG. 6

A) Conjugação direta de CMVs a um substrato

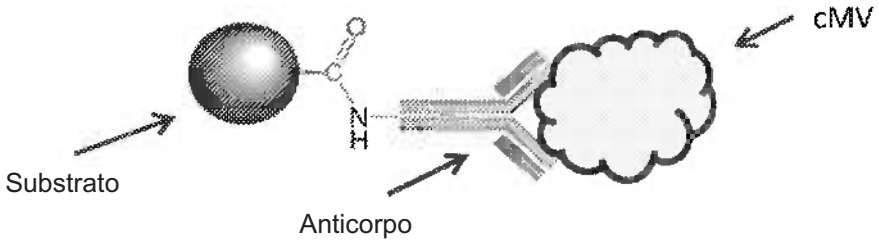


B) Reticulação de lipídeo funcionalizada por biotina de CMVs a um substrato

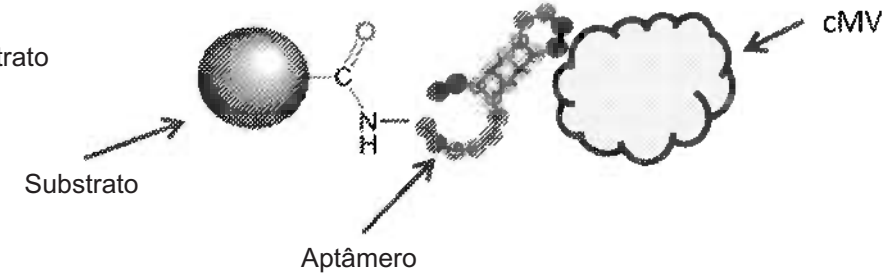


FIGs. 7A-B

C) Imunoprecipitação de cMVs com anticorpos cMV-específicos imobilizados a um substrato



D) Imunoprecipitação de cMVs com aptâmero cMV-específicos imobilizado a um substrato



FIGs. 7C-D

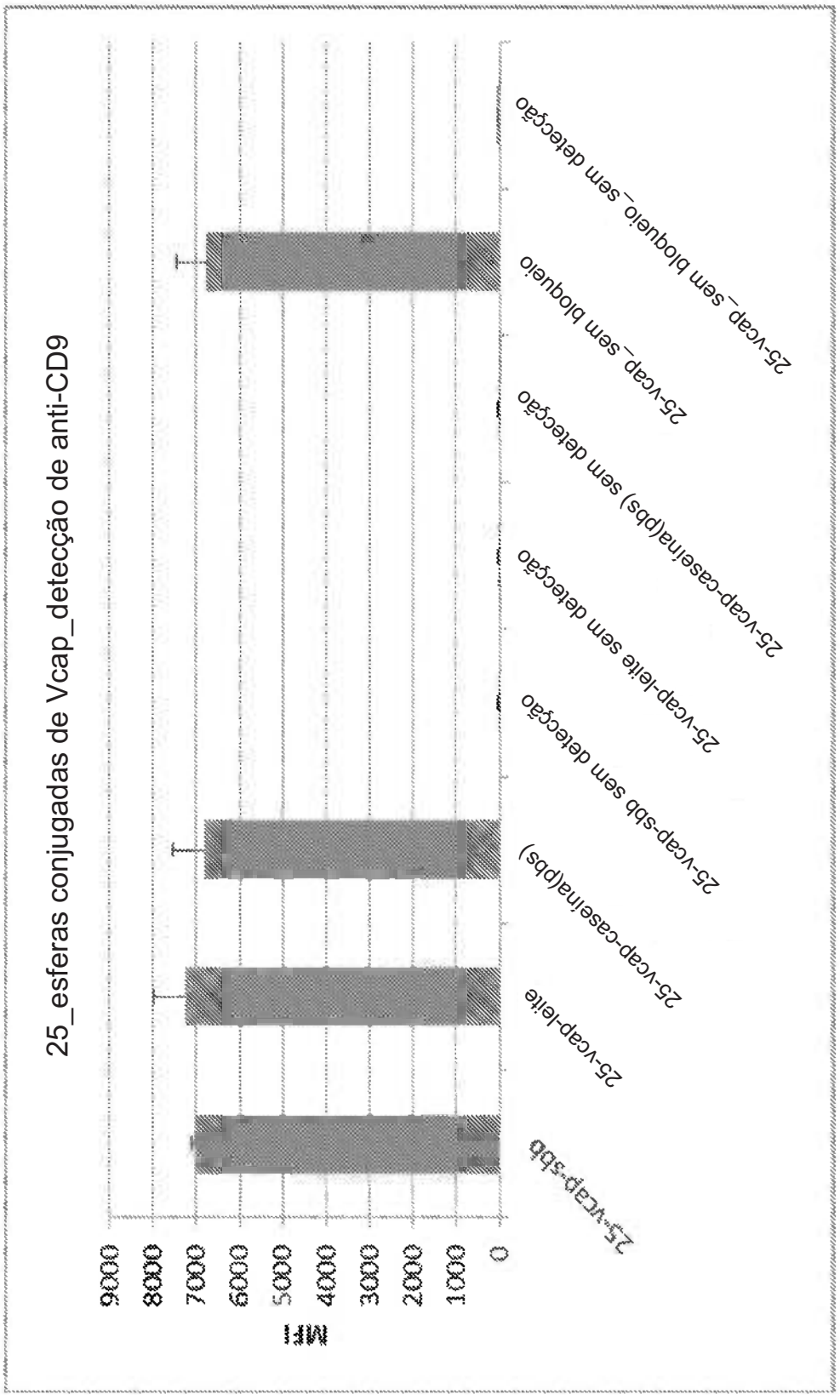

25_esferas conjugadas de Vcap_detecção de anti-CD9
MFI
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
25-Vcap-sbb
25-Vcap-leite
25-Vcap-caseína(pbs)
25-Vcap-sbb sem detecção
25-Vcap-leite sem detecção
25-Vcap-caseína(pbs) sem detecção
25-Vcap_sem bloqueio
25-Vcap_sem bloqueio_sem detecção

FIG. 8A

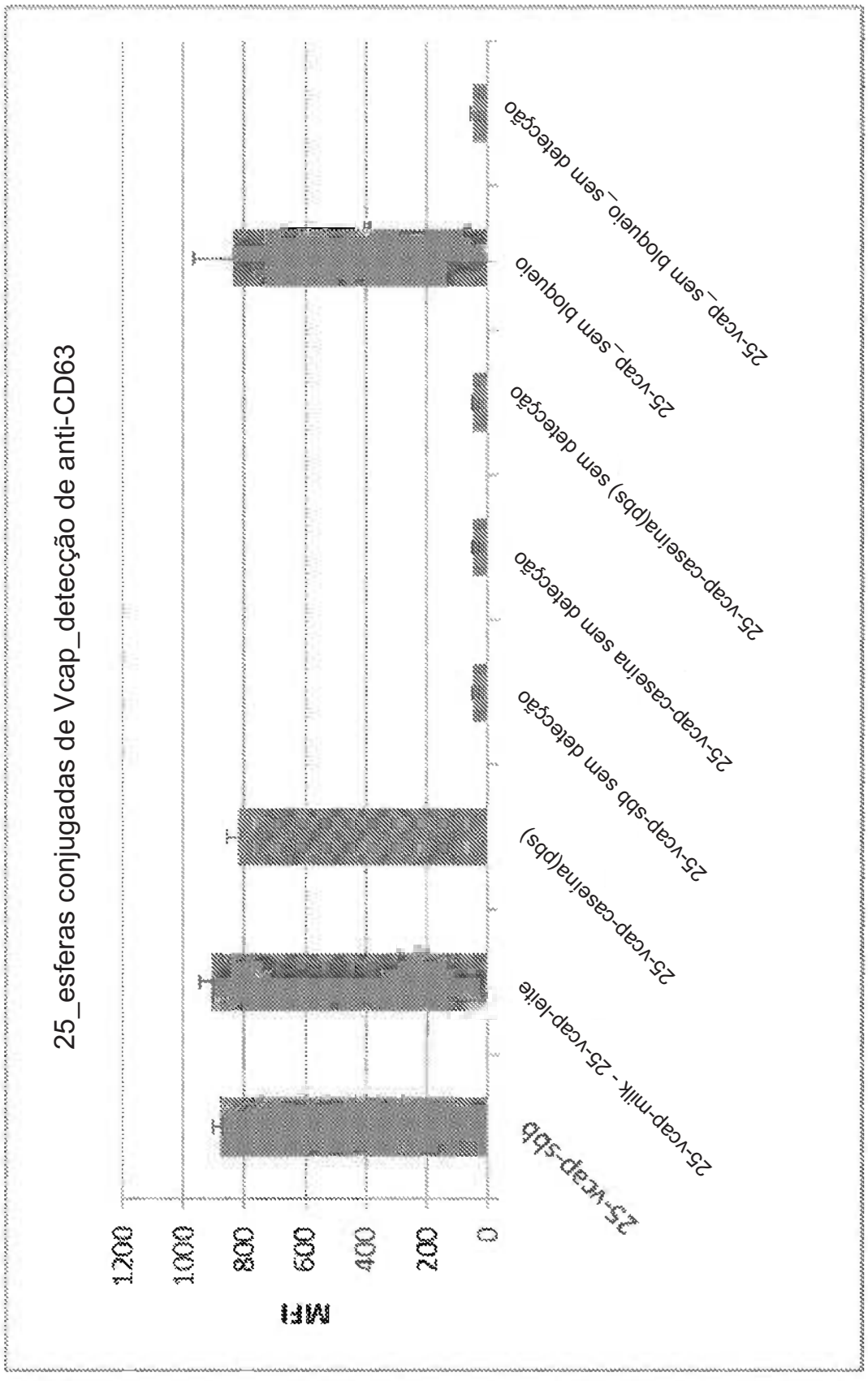

25_esferas conjugadas de Vcap_detecção de anti-CD63
MFI
0
200
400
600
800
1000
1200
25-vcap-sdb
25-vcap-milk - 25-vcap-leite
25-vcap-caseína(pbs)
25-vcap-sdb sem detecção
25-vcap-caseína sem detecção
25-vcap-caseína(pbs) sem detecção
25-vcap_sem bloqueio
25-vcap_sem bloqueio_sem detecção

FIG. 8B

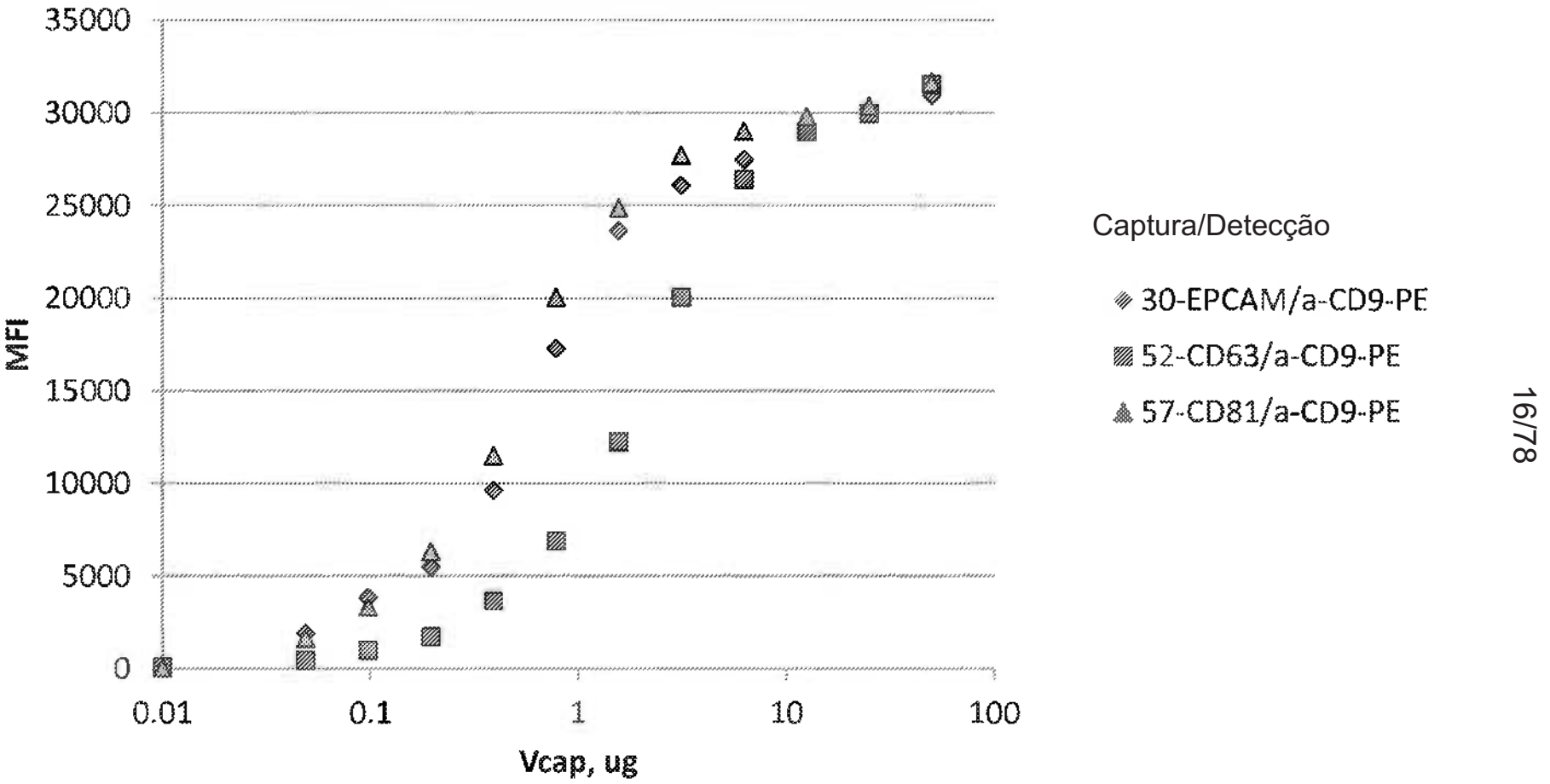

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
MFI
0.01
0.1
1
10
100
Vcap, ug
Captura/Detecção
30-EPCAM/a-CD9-PE
52-CD63/a-CD9-PE
57-CD81/a-CD9-PE

FIG. 9A

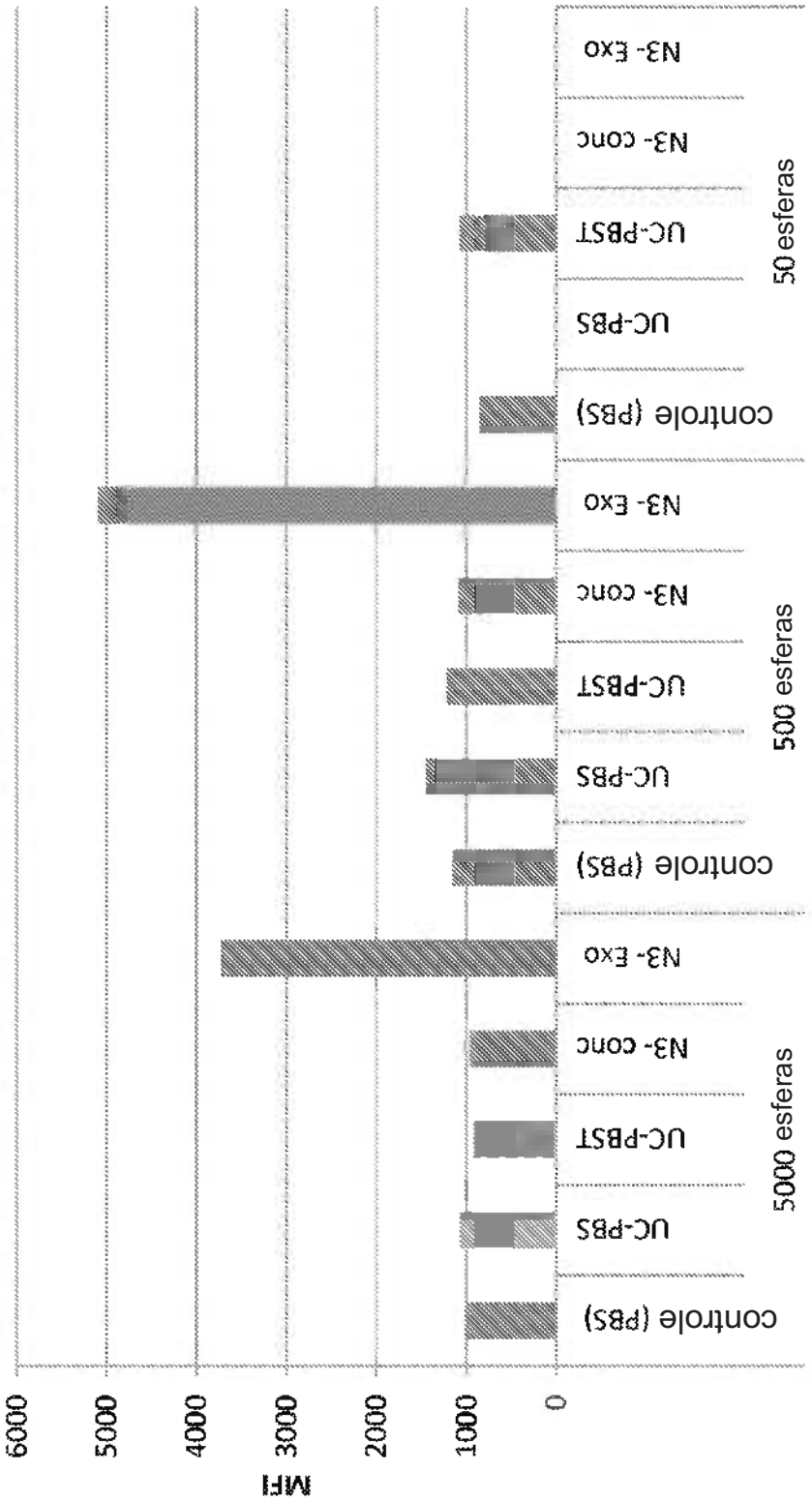
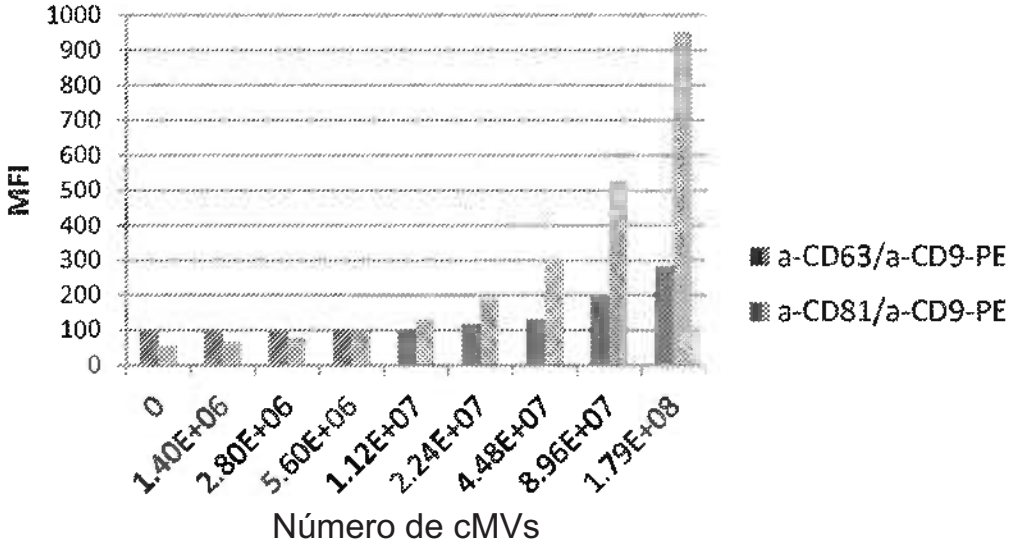

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
MFI
controle (PBS)
UC-PBS
UC-PBST
N3- conc
N3- Exo
5000 esferas
controle (PBS)
UC-PBS
UC-PBST
N3- conc
N3- Exo
500 esferas
controle (PBS)
UC-PBS
UC-PBST
N3- conc
N3- Exo
50 esferas

FIG. 9B

Paciente 1



Paciente 2

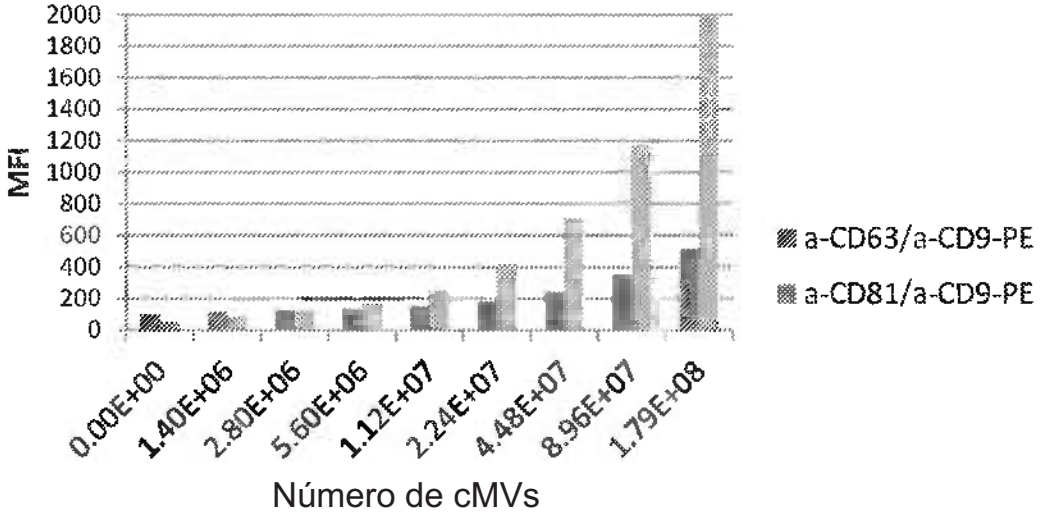


FIG. 9C

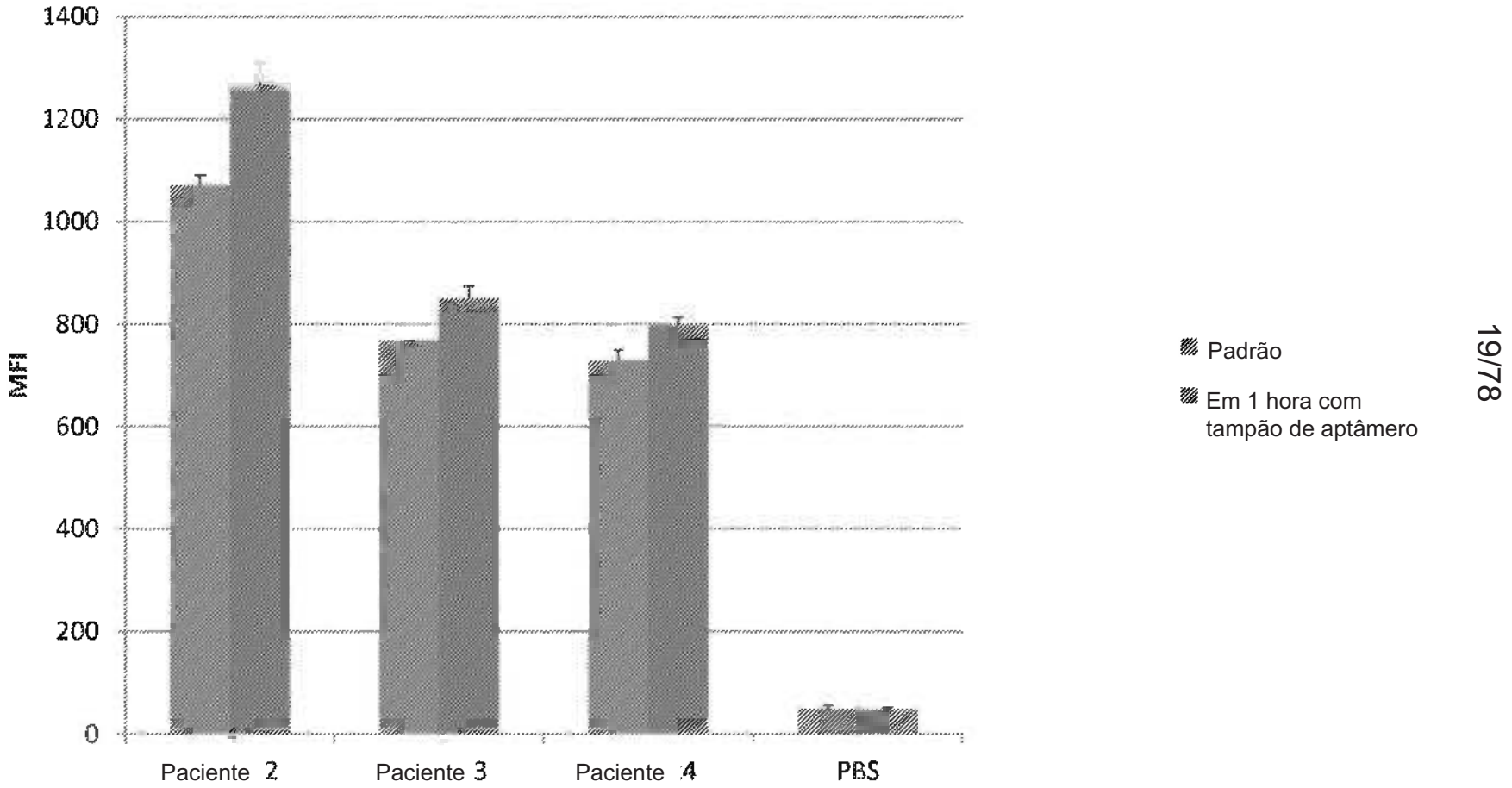

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
MFI
Paciente 2
Paciente 3
Paciente 4
PBS
Padrão
Em 1 hora com tampão de aptâmero

FIG. 9D

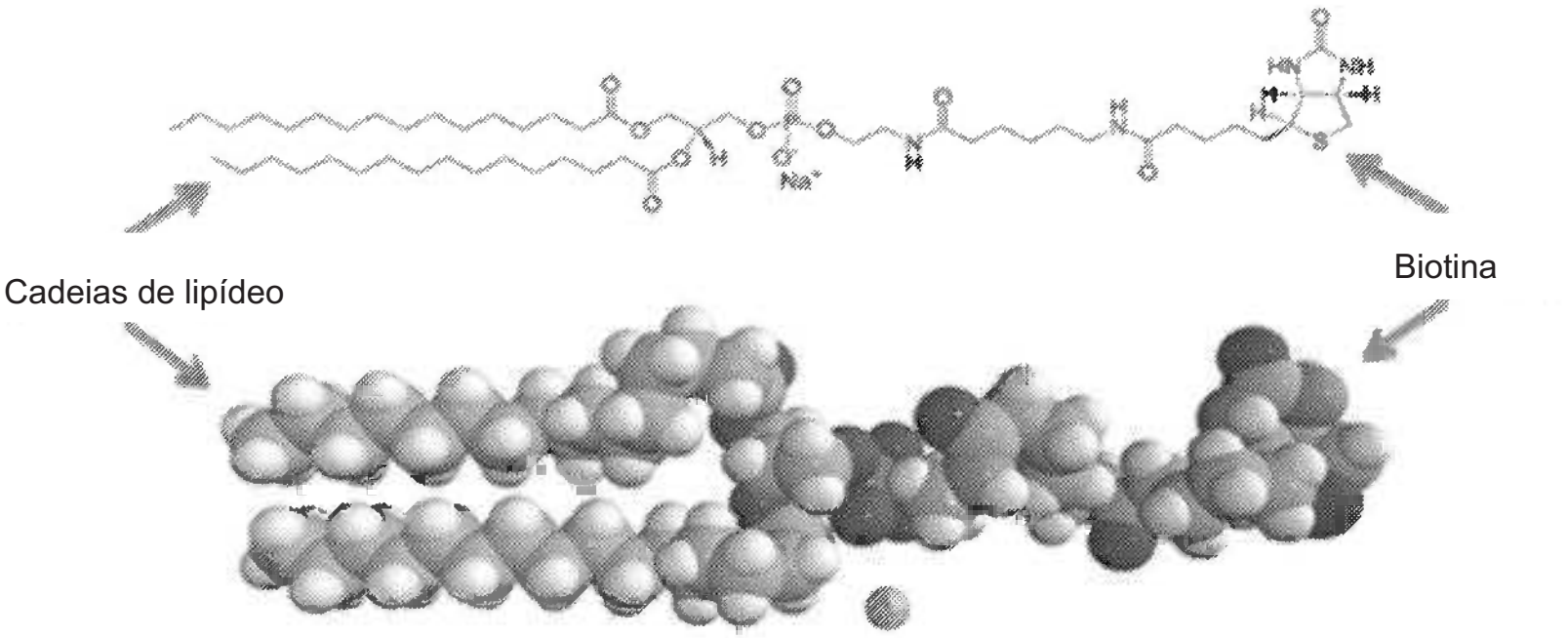


FIG. 10A

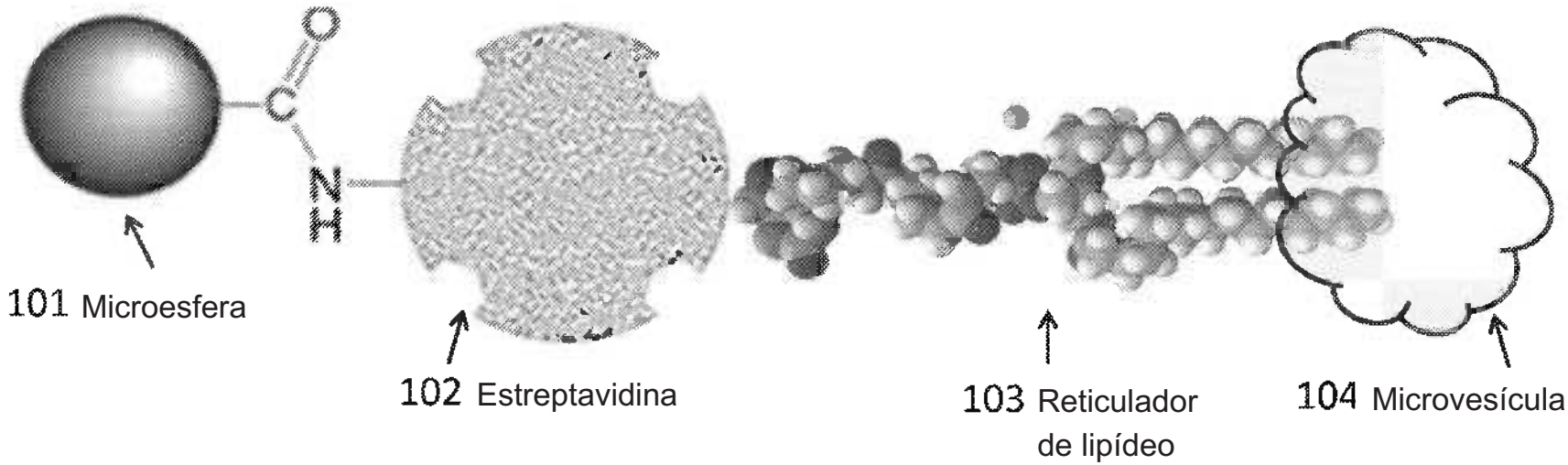
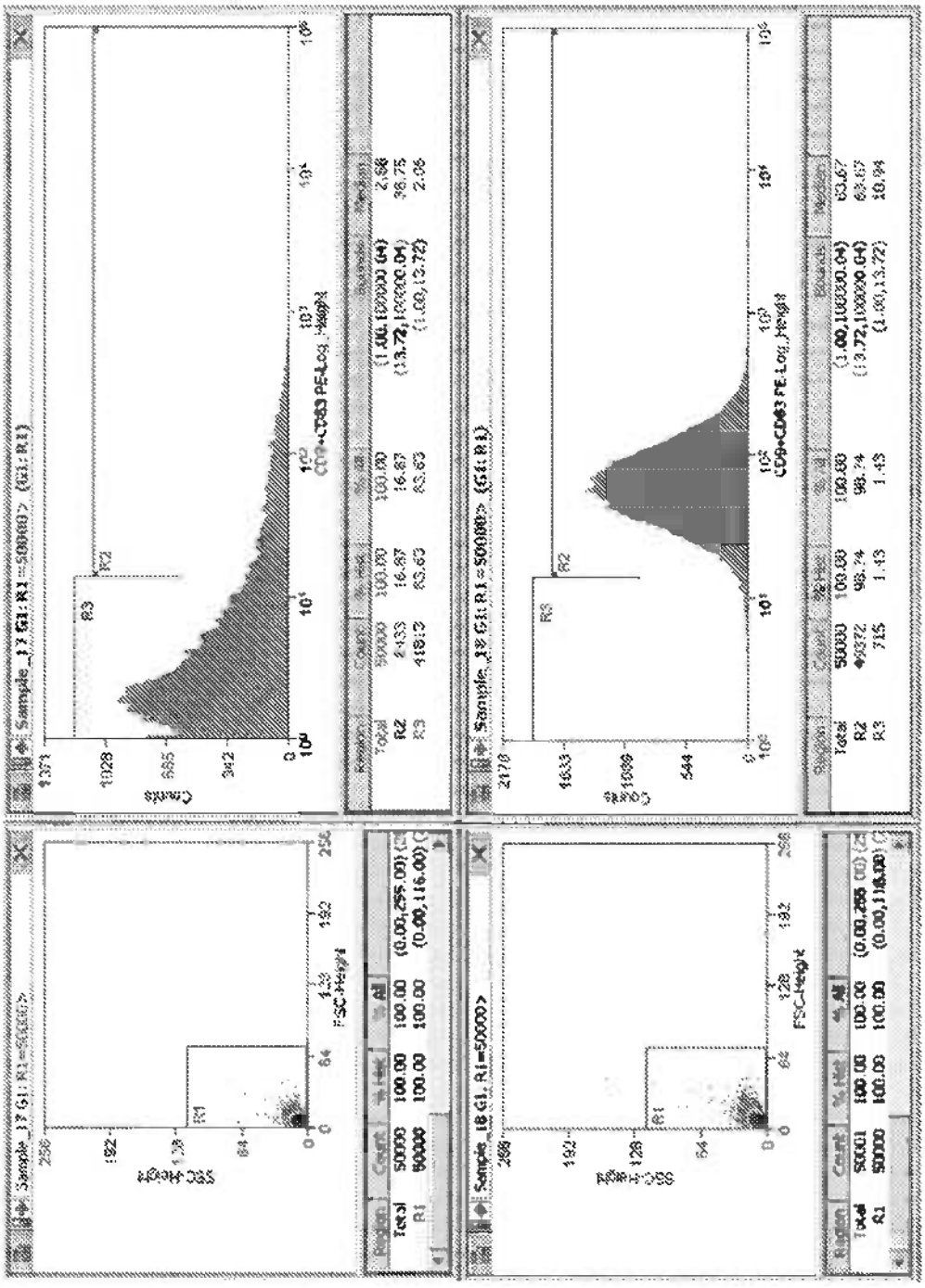
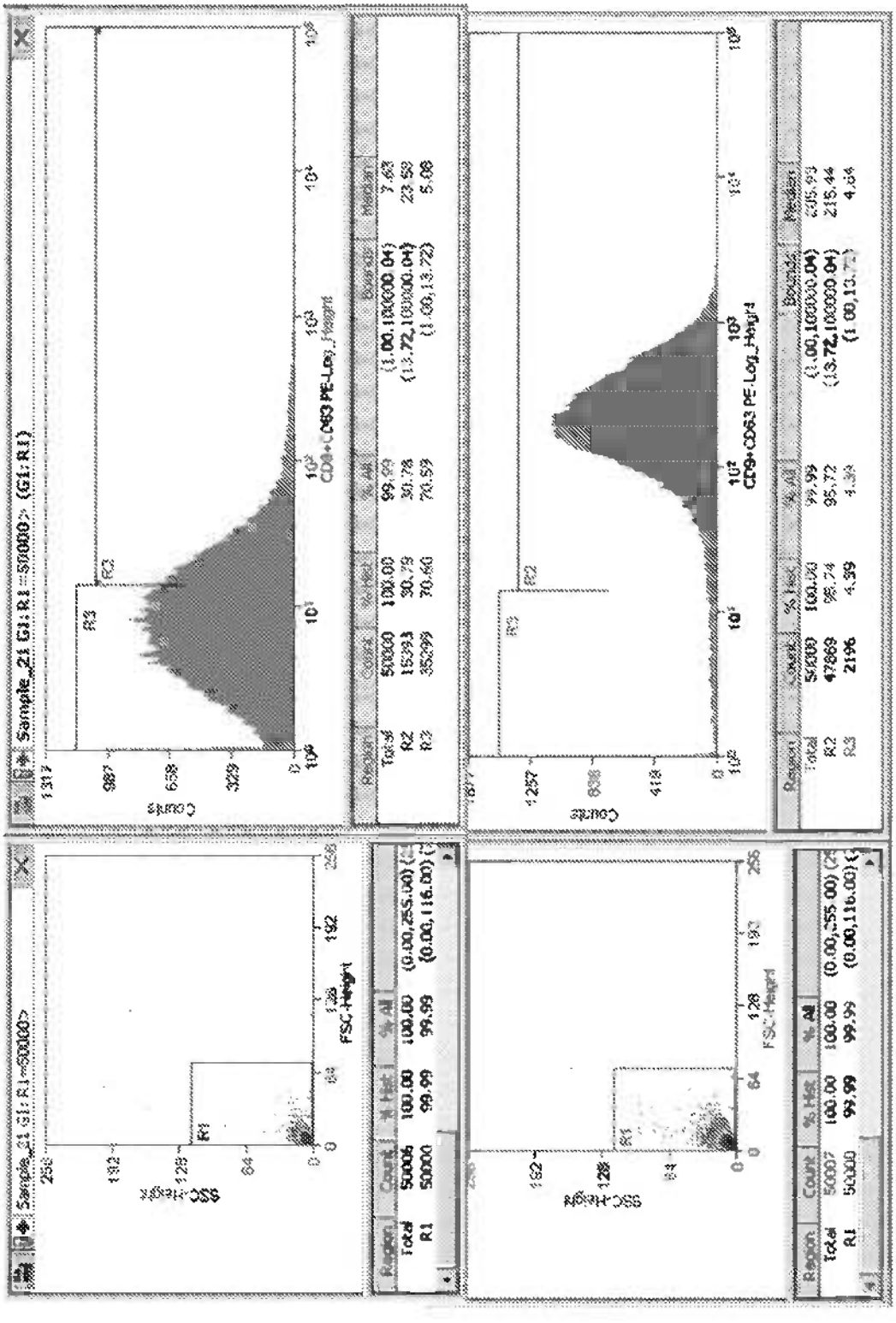

O
C
N
H
101 Microesfera
102 Estreptavidina
103 Reticulador de lipídeo
104 Microvesícula

FIG. 10B


C)
D)
Sample_17 G1; R1=50000> (G1; R1)
Sample_18 G1; R1=50000> (G1; R1)
R1
R2
R3
FSC-Height
CD9+CD63 PE-Log_Height
Region
Count
% Parent
% All
Total
50000
100.00
100.00
(0.00,255.00)
(0.00,116.00)
4433
16.87
8.87
(13.72,100000.04)
41812
83.63
83.63
(1.00,13.72)
9372
98.74
18.74
715
1.43
1.43
(1.00,100000.04)
(13.72,100000.04)
(1.00,13.72)

FIGs. 10C-D


E)
F)
Sample_21 (G1: R1=50000) (G1: R1)
R1
R2
R3
SSC-Height
FSC-Height
Counts
CD9+CD63 PE-Log_Height
Region
Count
% Gated
% All
Events
Median
Total
50000
100.00
99.99
(0.00,255.00)
(0.00,116.00)
47869
95.74
95.72
(13.72,100000.04)
2196
4.39
4.39
(1.00,13.72)
7.63
23.59
5.08
218.44
4.64

FIGs. 10E-F

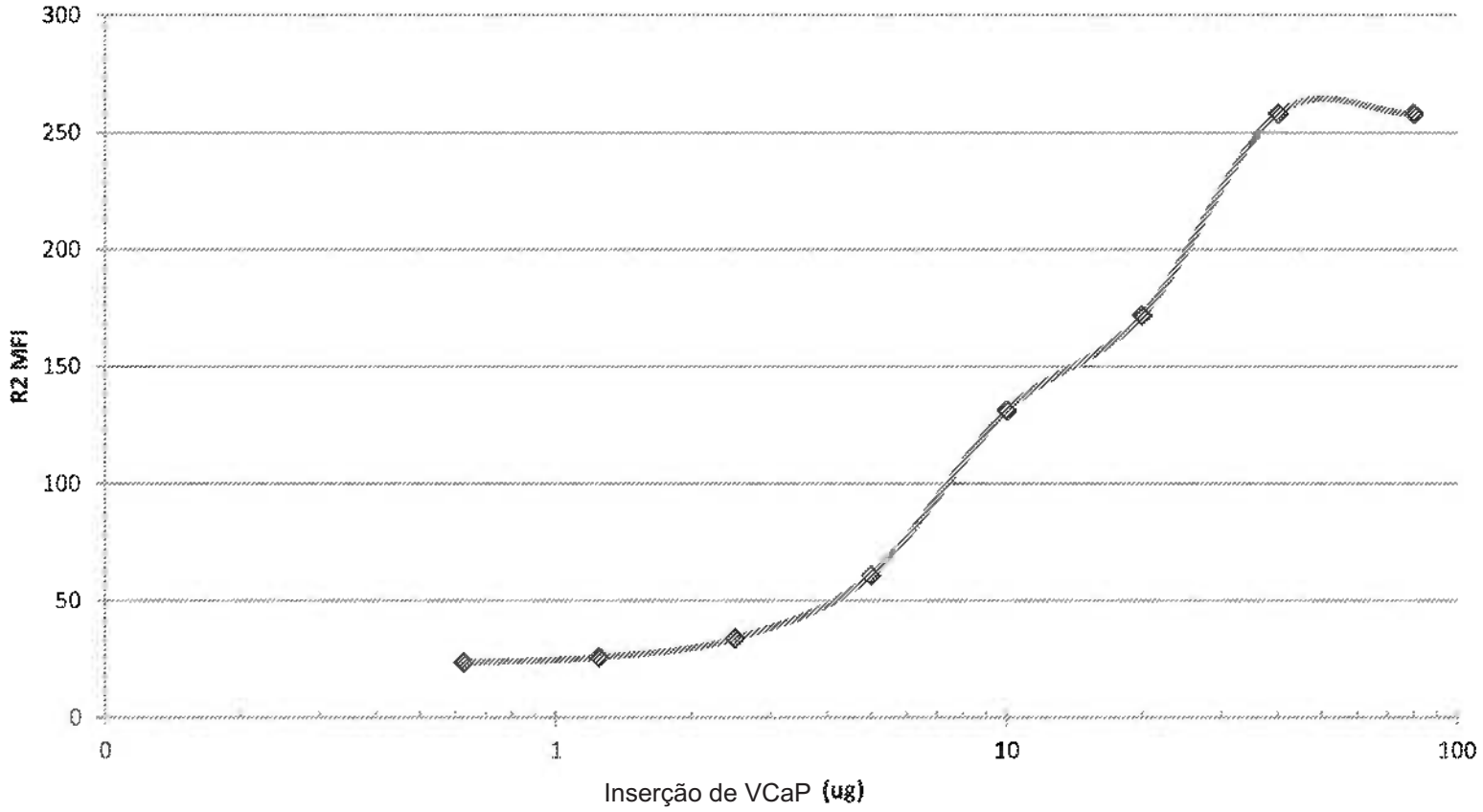
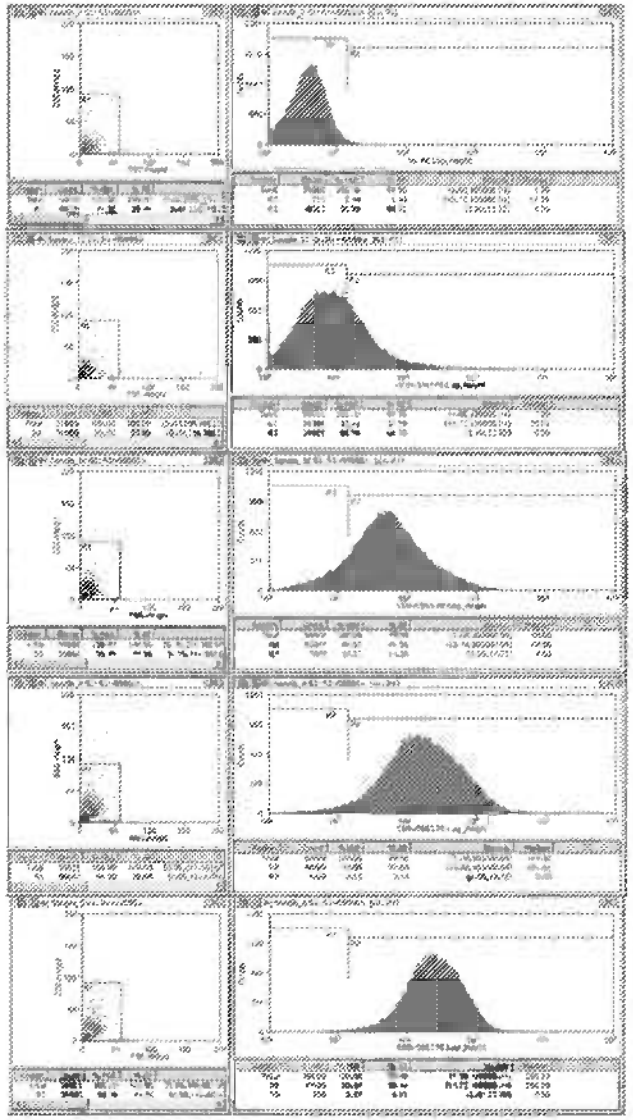


FIG. 10G



Detector de controle anti-isotipo
80 µg de Vcap cMVs

Detectores de anti-CD9 e anti-CD63
1,25 µg de Vcap cMVs

Detectores de anti-CD9 e anti-CD63
5 µg de Vcap cMVs

Detectores de anti-CD9 e anti-CD63
20 µg de Vcap cMVs

Detectores de anti-CD9 e anti-CD63
80 µg de Vcap cMVs

FIG. 10H

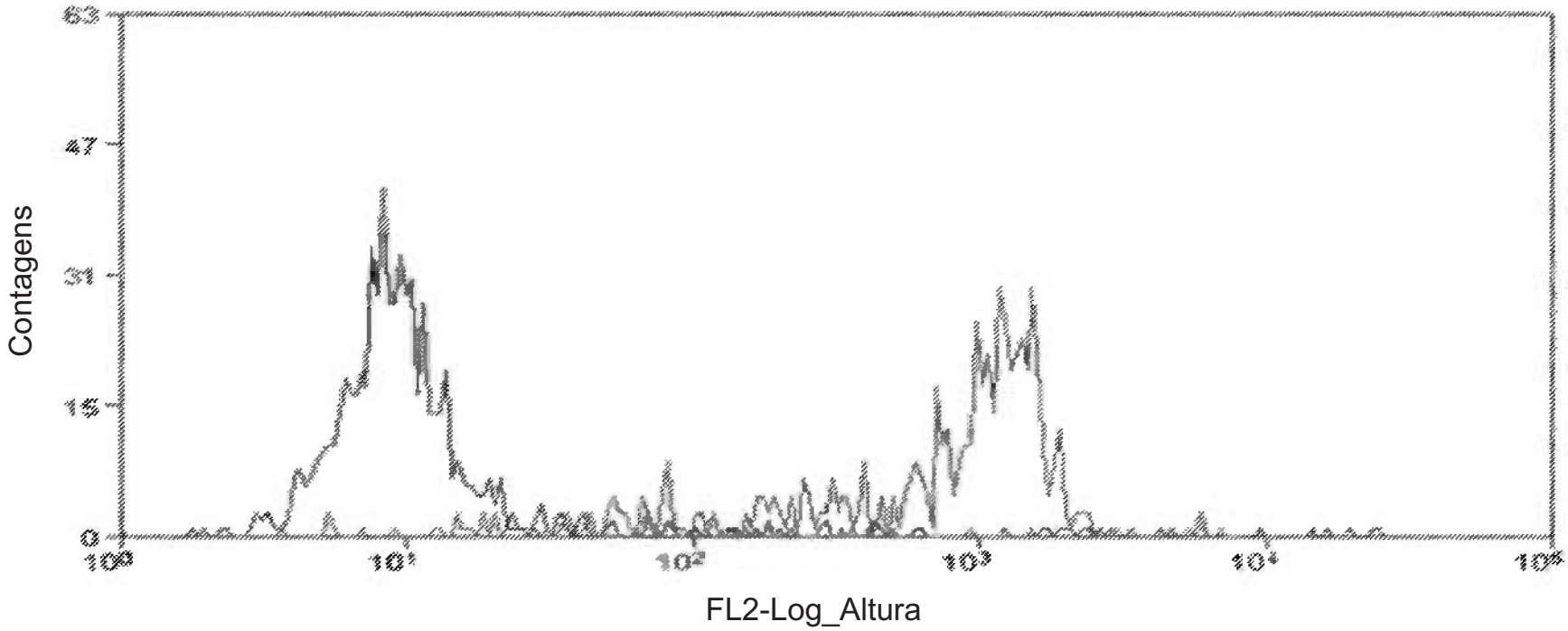


FIG. 10I

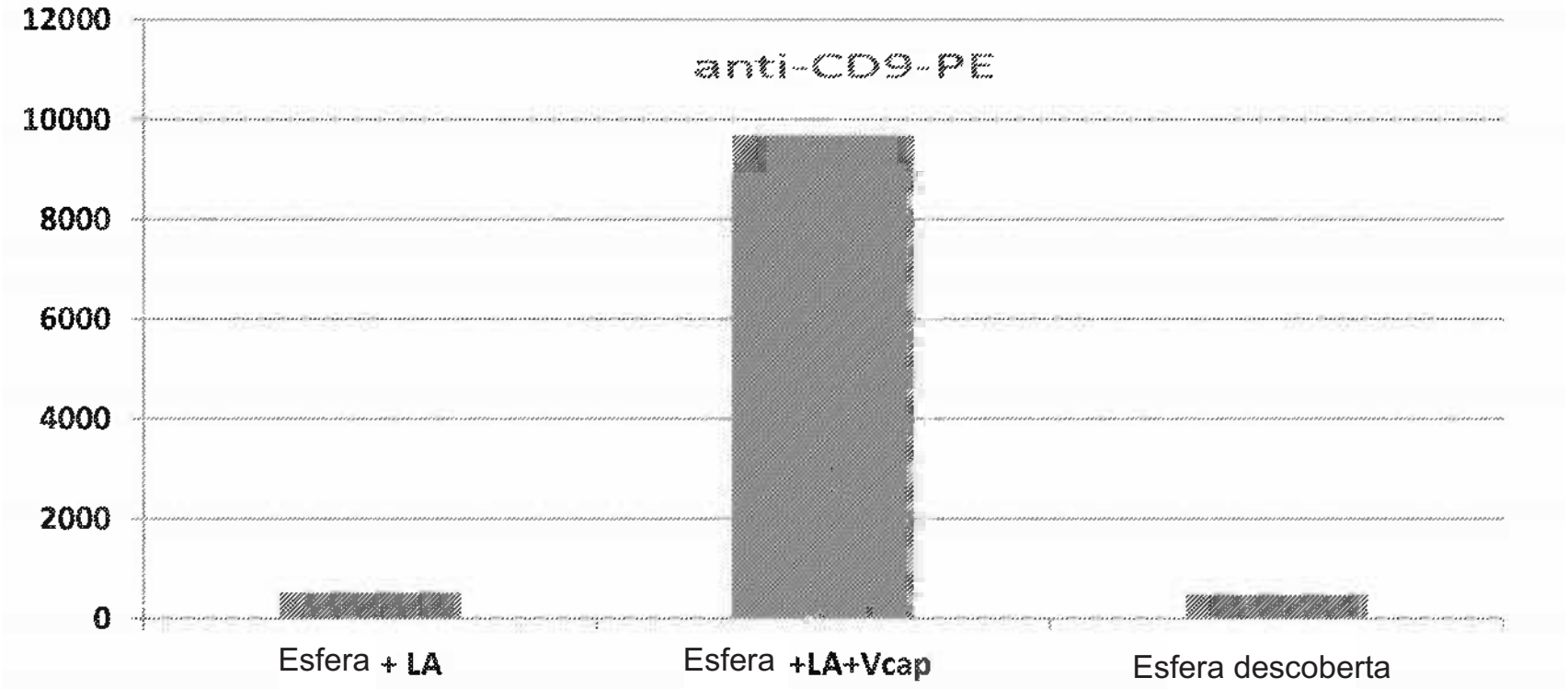
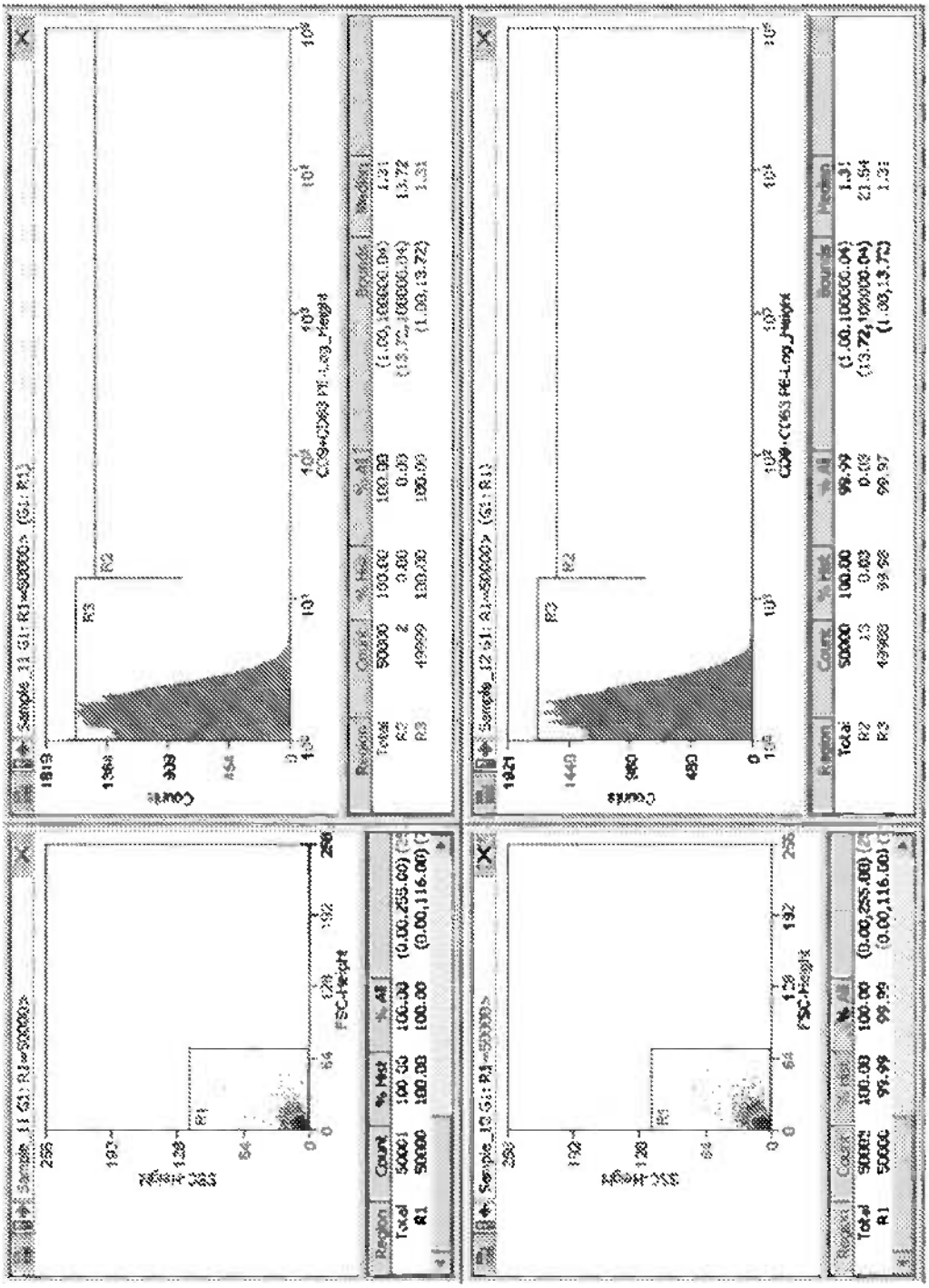
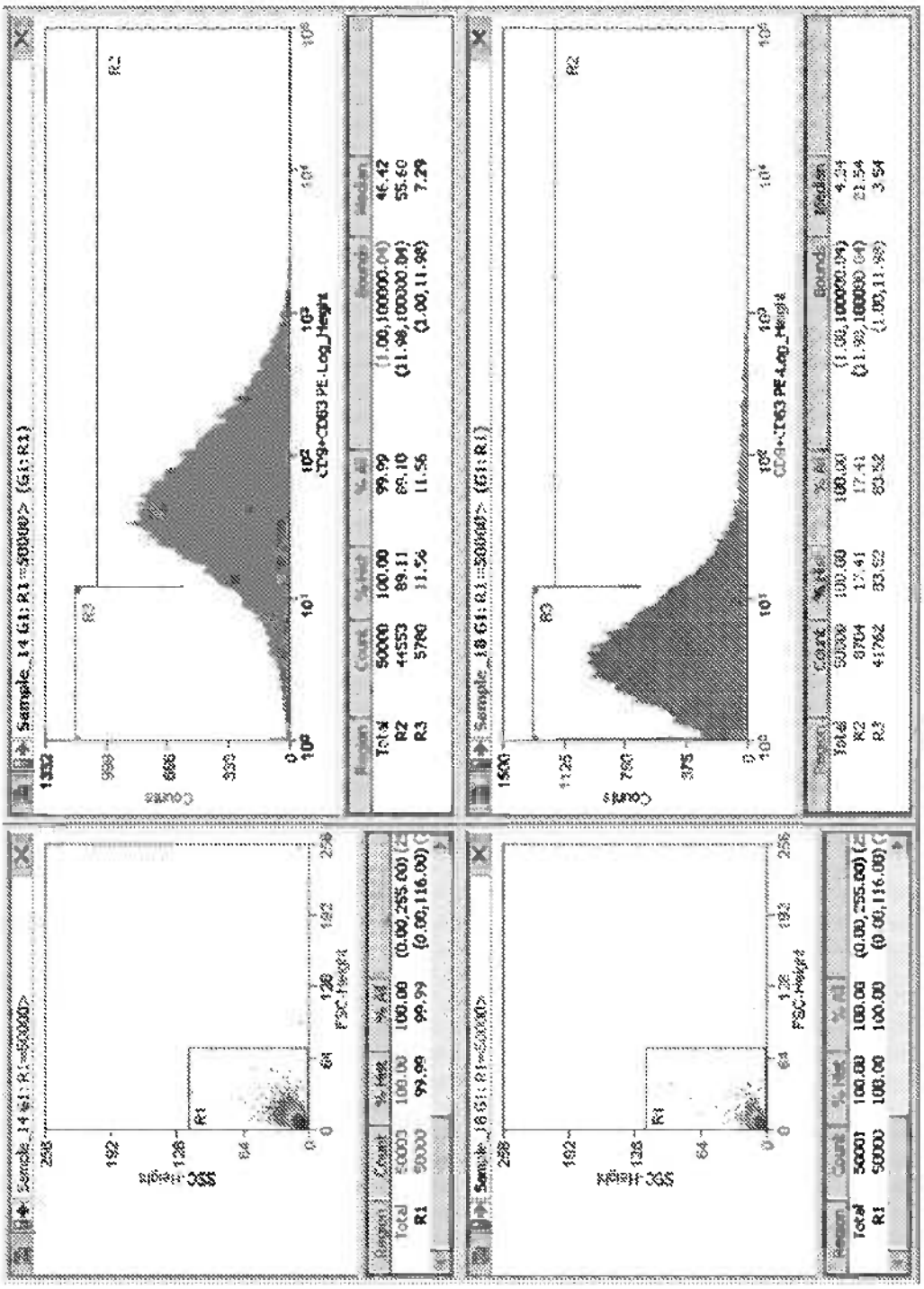

anti-CD9-PE
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Esfera + LA
Esfera +LA+Vcap
Esfera descoberta

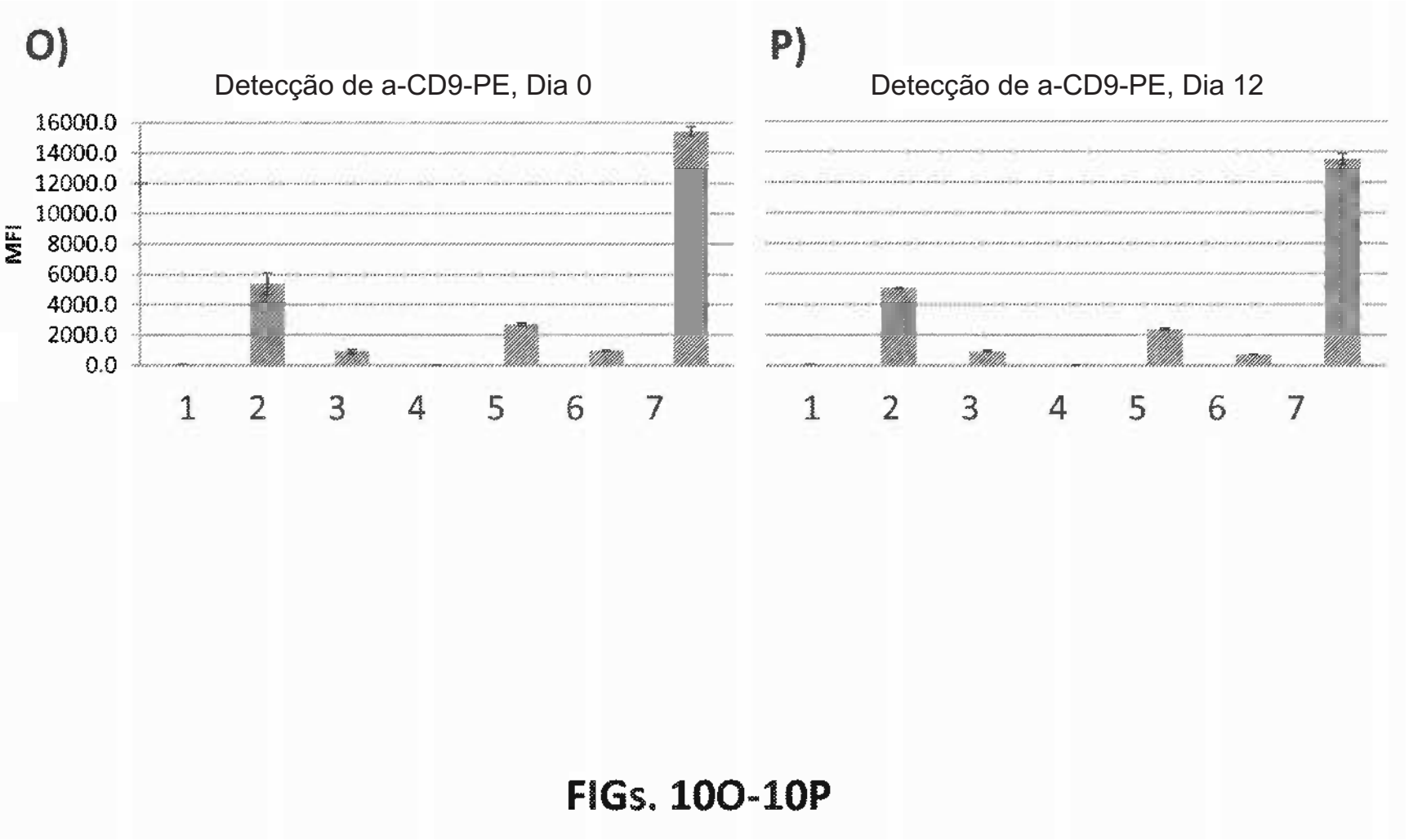
FIG. 10J


K)
L)
Sample_11.G1: R1=500000>
Sample_12.G1: R1=500000>
FSC-Height
CD9-CD63 PE-Log_Height
Counts
R1
R2
R3
Region
Count
% Gate
% All
Total
50000
100.00
100.00
R2
2
0.00
0.00
(1.00,1000000.04)
R3
49999
100.00
99.99
(13.72,1000000.04)
(1.00,13.72)

FIGs. 10K-L


M)
N)
Sample_14 G1; R1=500000> (G1; R1)
Sample_18 G1; R1=500000> (G1; R1)
R1
R2
R3
Count
CD9+CD63 PE-Log_Height
CD9+CD63 PE4-Log_Height
FSC-Height
Region
Total
Bounds
Median

FIGs. 10M-N


O)
Detecção de a-CD9-PE, Dia 0
MFI
16000.0
14000.0
12000.0
10000.0
8000.0
6000.0
4000.0
2000.0
0.0
1 2 3 4 5 6 7
P)
Detecção de a-CD9-PE, Dia 12
1 2 3 4 5 6 7

FIGs. 10O-10P

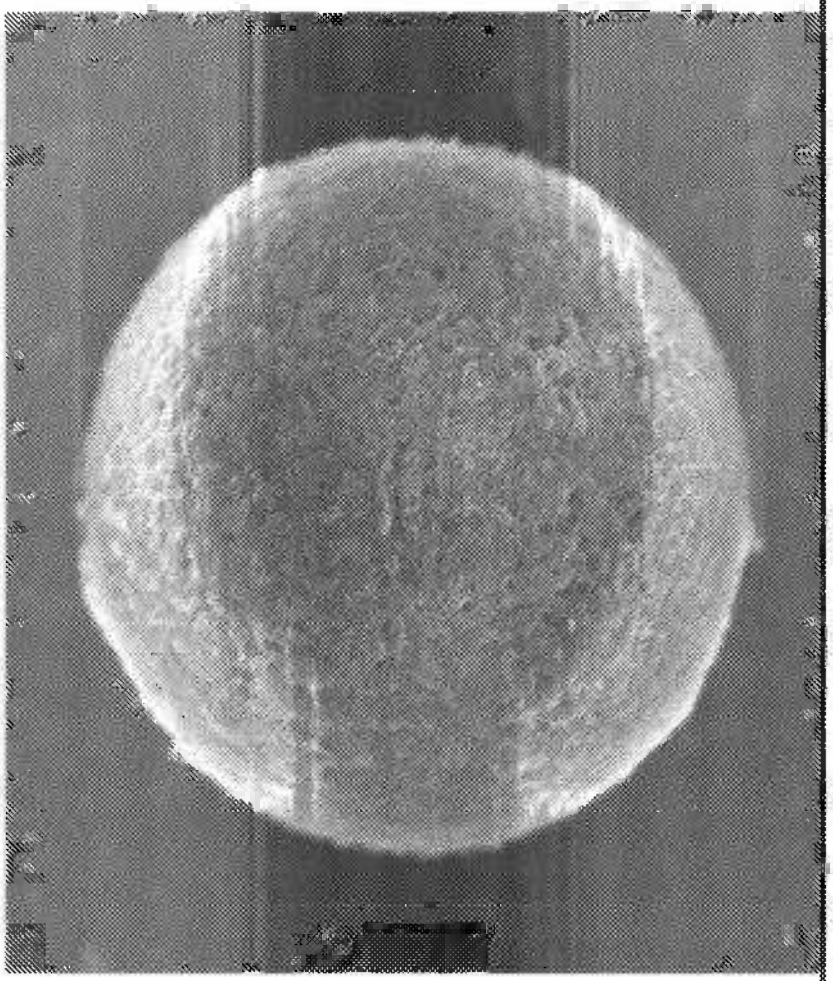
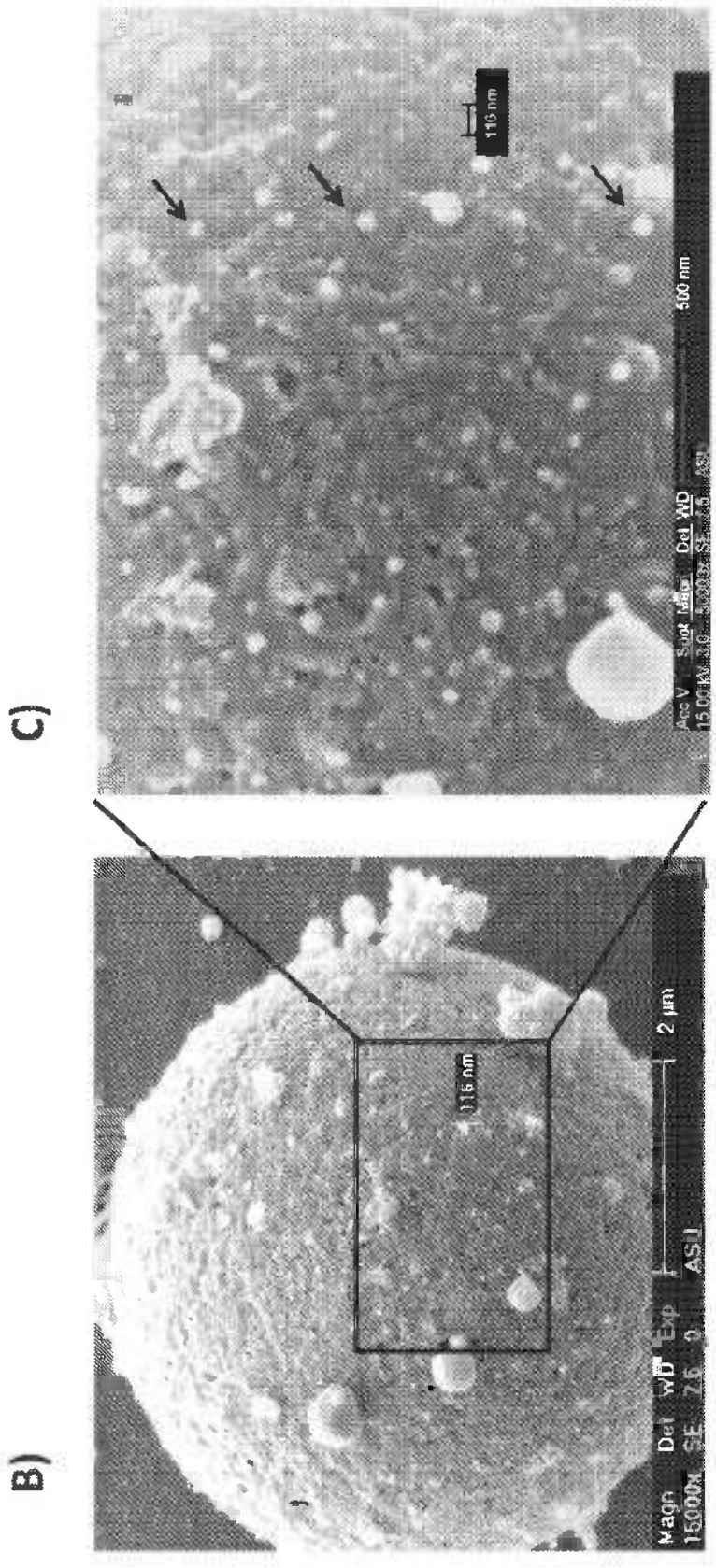
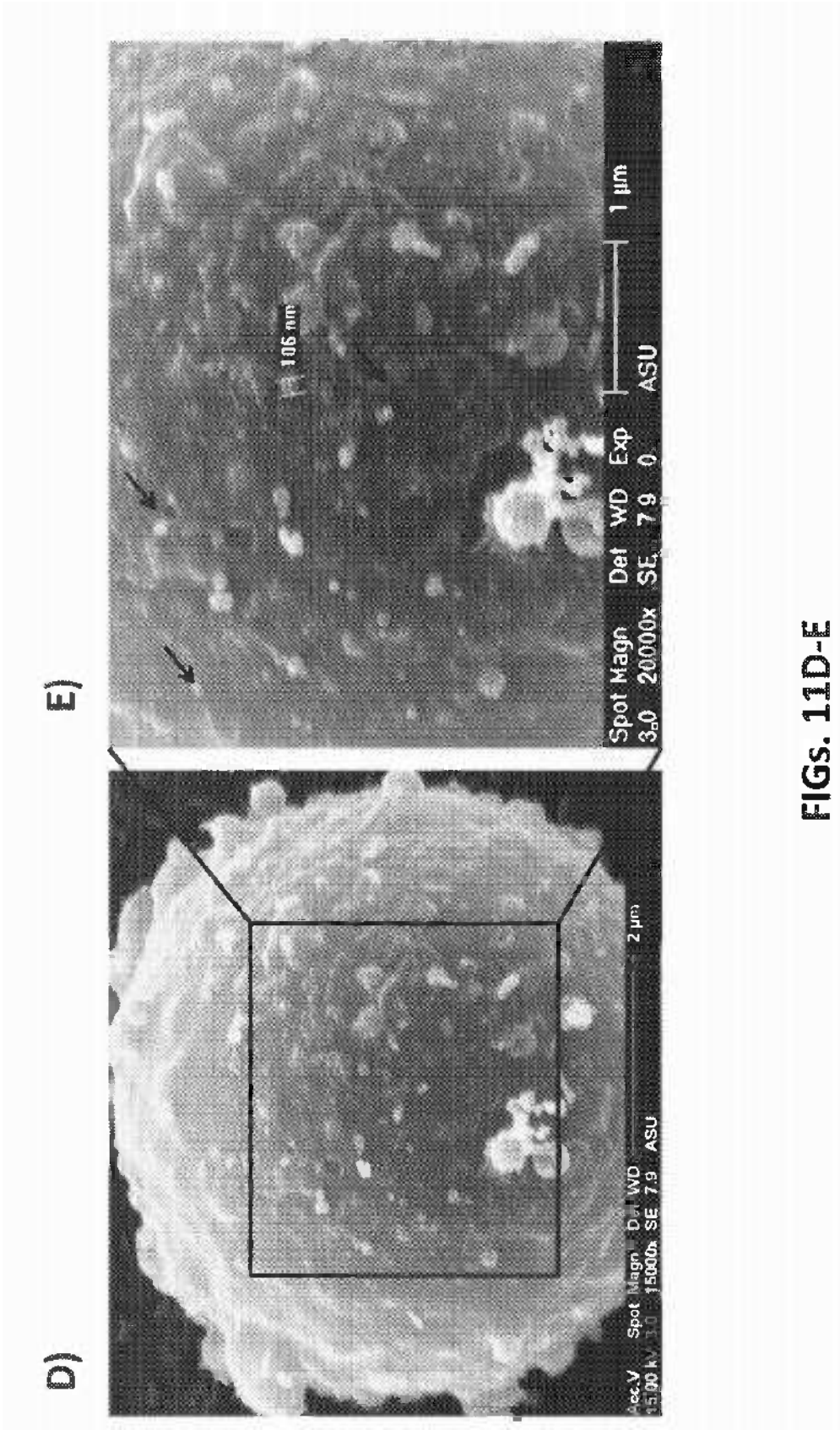


FIG. 11A

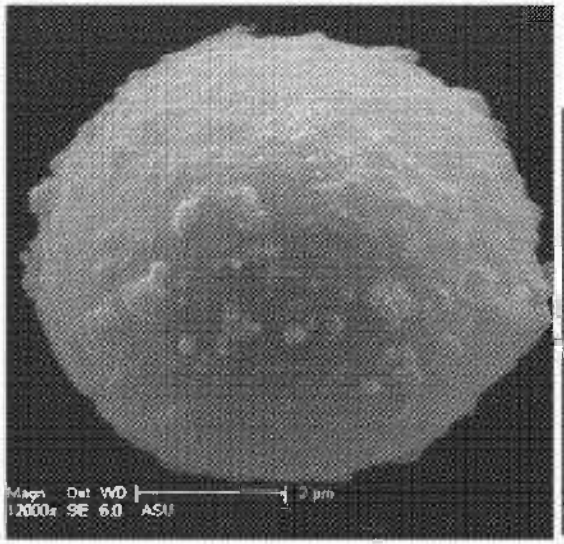


FIGs. 11B-C

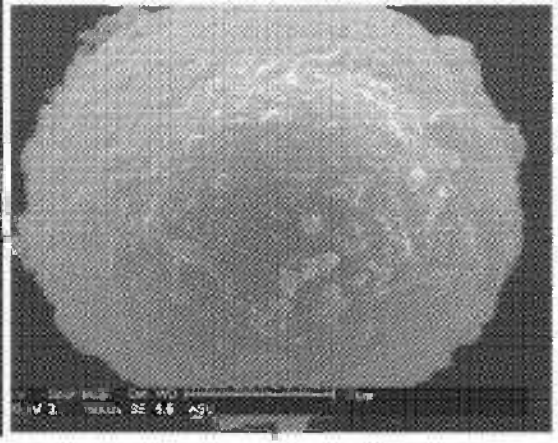

D)
E)
106 nm
Spot Magn Det WD Exp
3.0 20000x SE 7.9 0
ASU
1 µm
Acc.V Spot Magn Det WD
15.00 kV 3.0 15000x SE 7.9
ASU
2 µm

FIGs. 11D-E

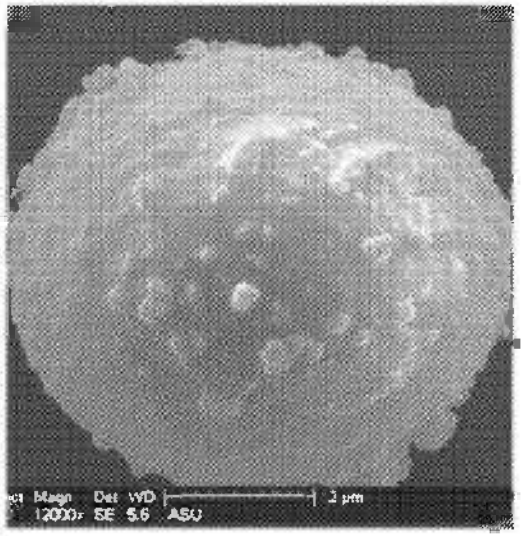
F) Concanavalina A



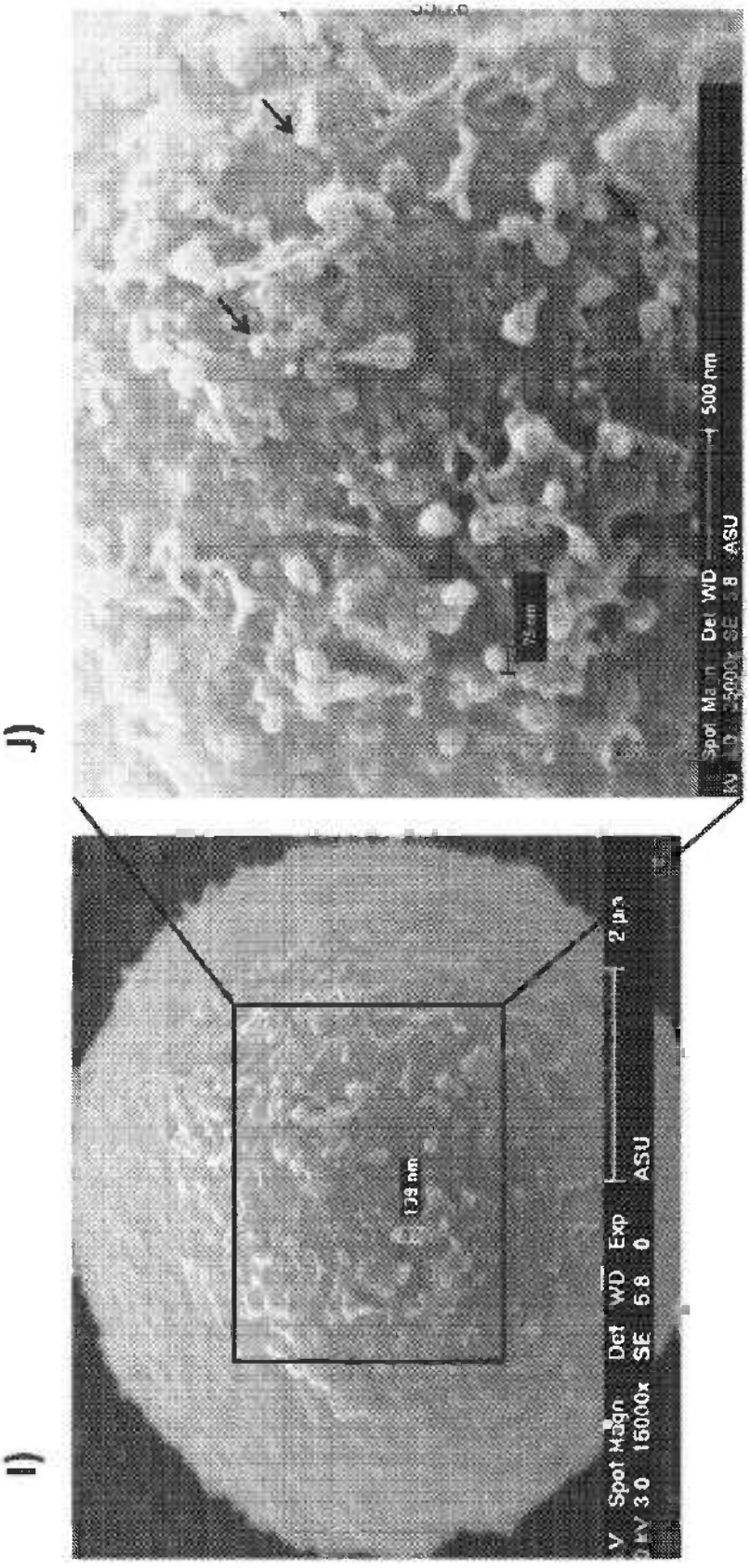
G) Âncora de lipídeo



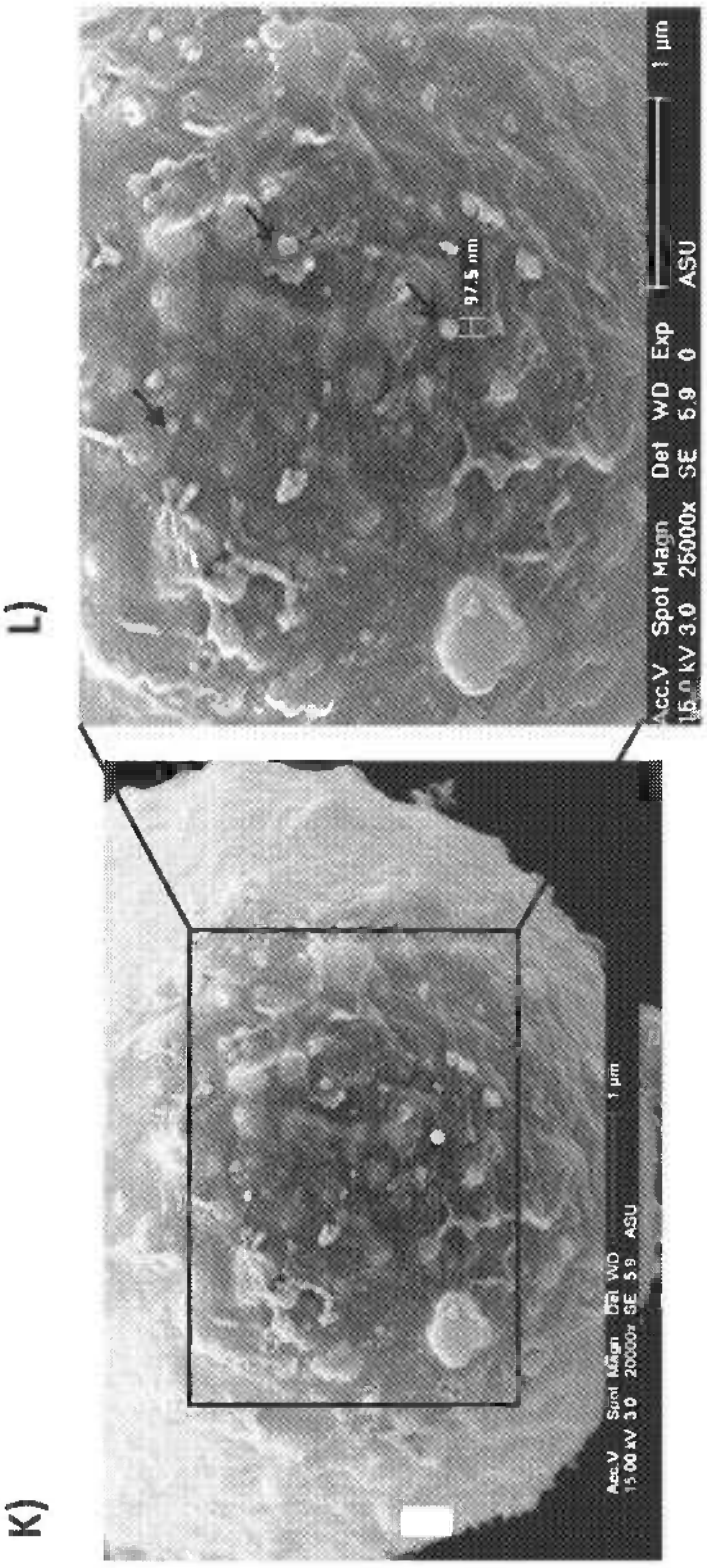
H) Anticorpo anti-CD9



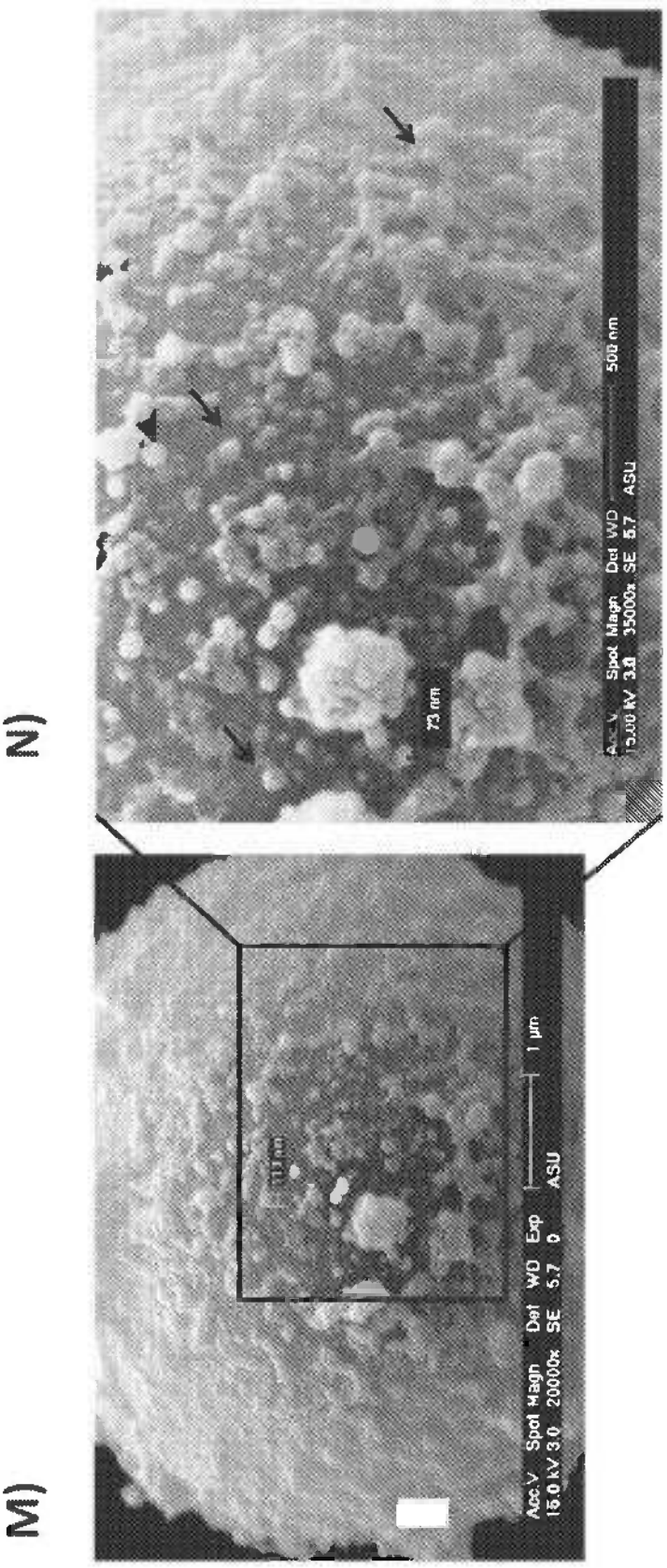
FIGs. 11F-H



FIGs. 11I-J


K)
L)
97.5 nm
Acc.V Spot Magn Det WD Exp
15.0 kV 3.0 25000x SE 5.9 0 ASU
1 µm

FIGs. 11K-L


M)
N)
Acc.V Spot Magn Det WD Exp
15.0 kV 3.0 20000x SE 5.7 0 ASU
1 µm
73 nm
Acc.V Spot Magn Det WD
15.00 kV 3.0 35000x SE 5.7 ASU
500 nm
73 nm

FIGs. 11M-N

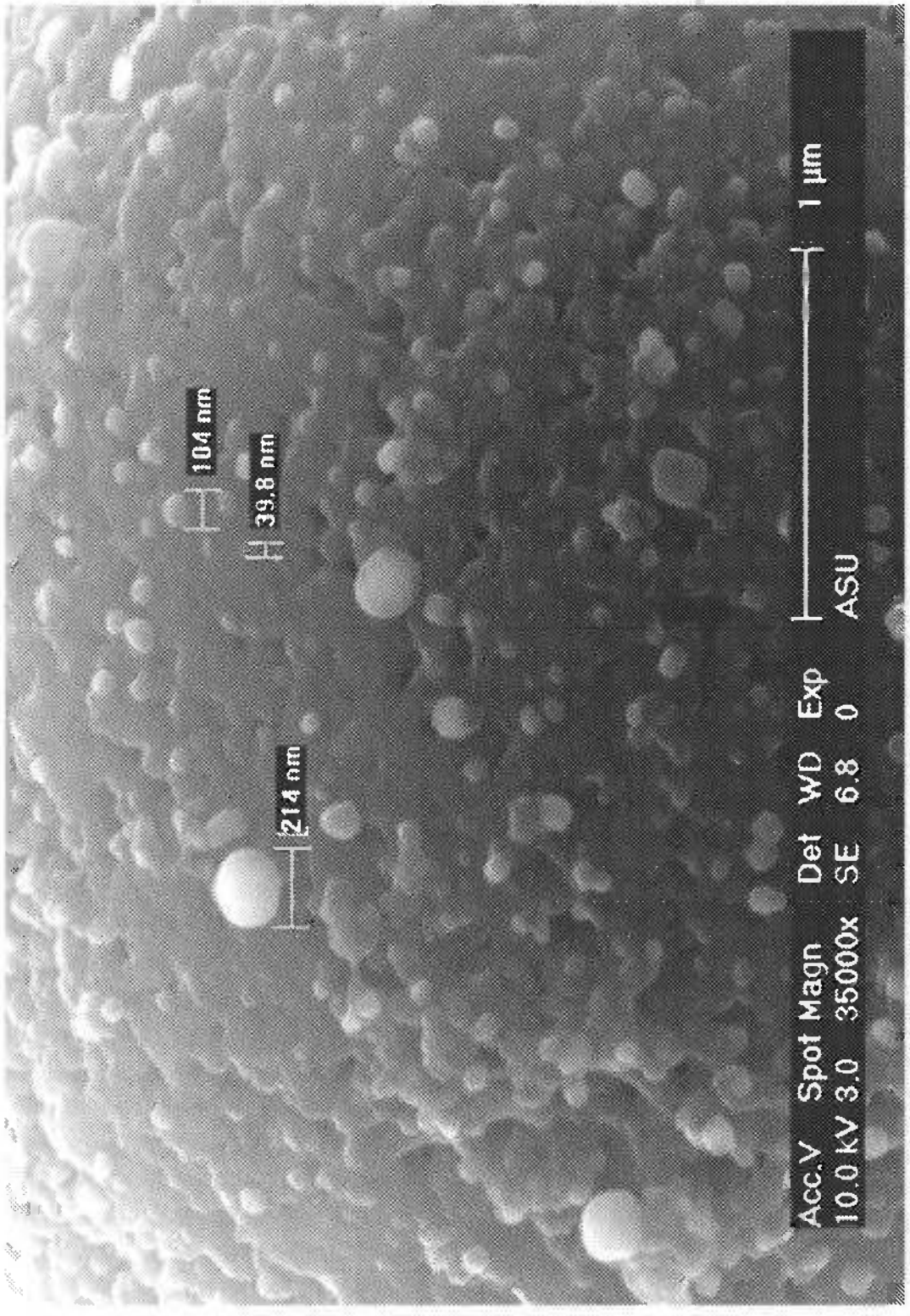

214 nm
104 nm
39.8 nm
Acc.V Spot Magn Det WD Exp
10.0 kV 3.0 35000x SE 6.8 0
1 µm
ASU

FIG. 12A

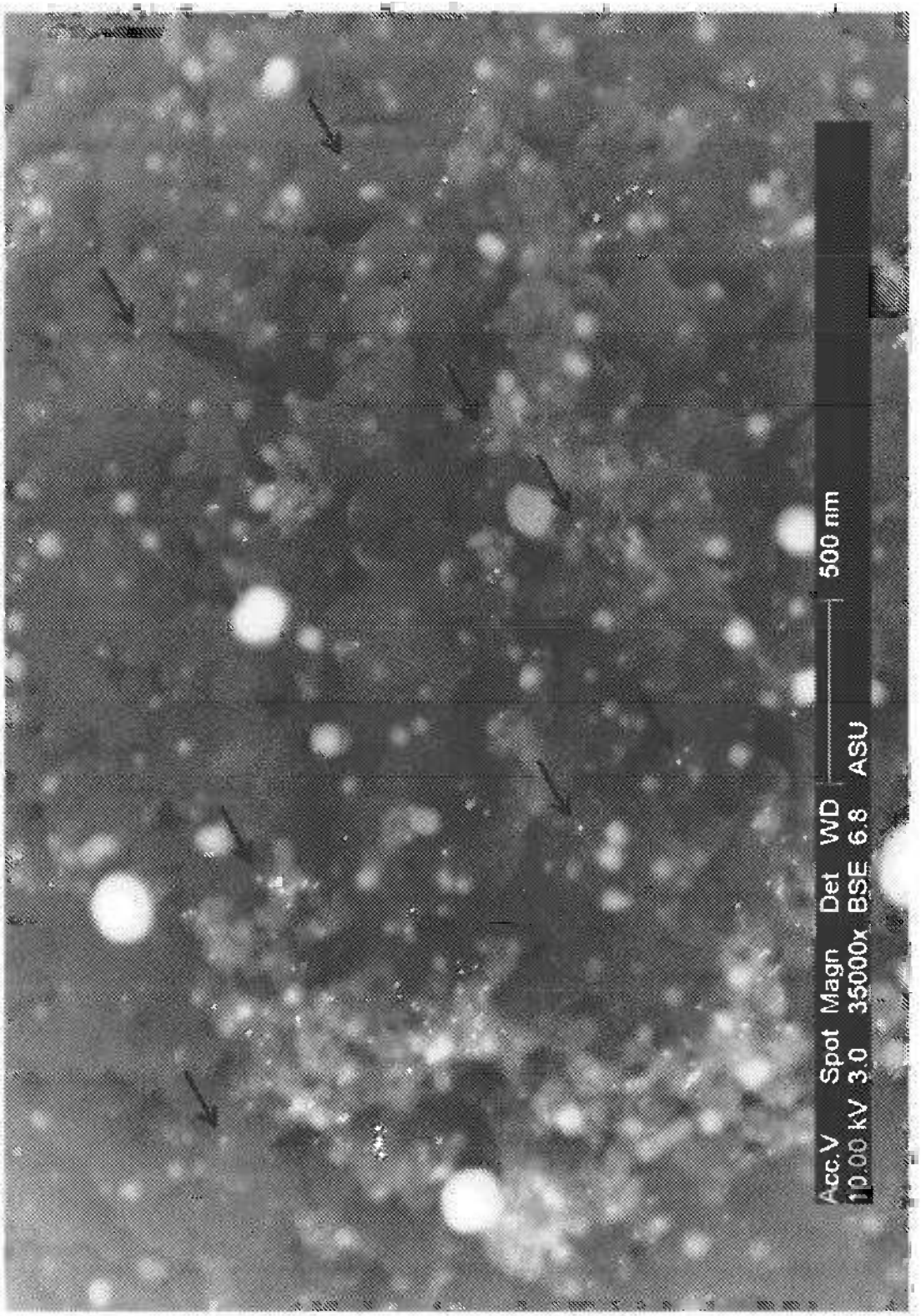


FIG. 12B

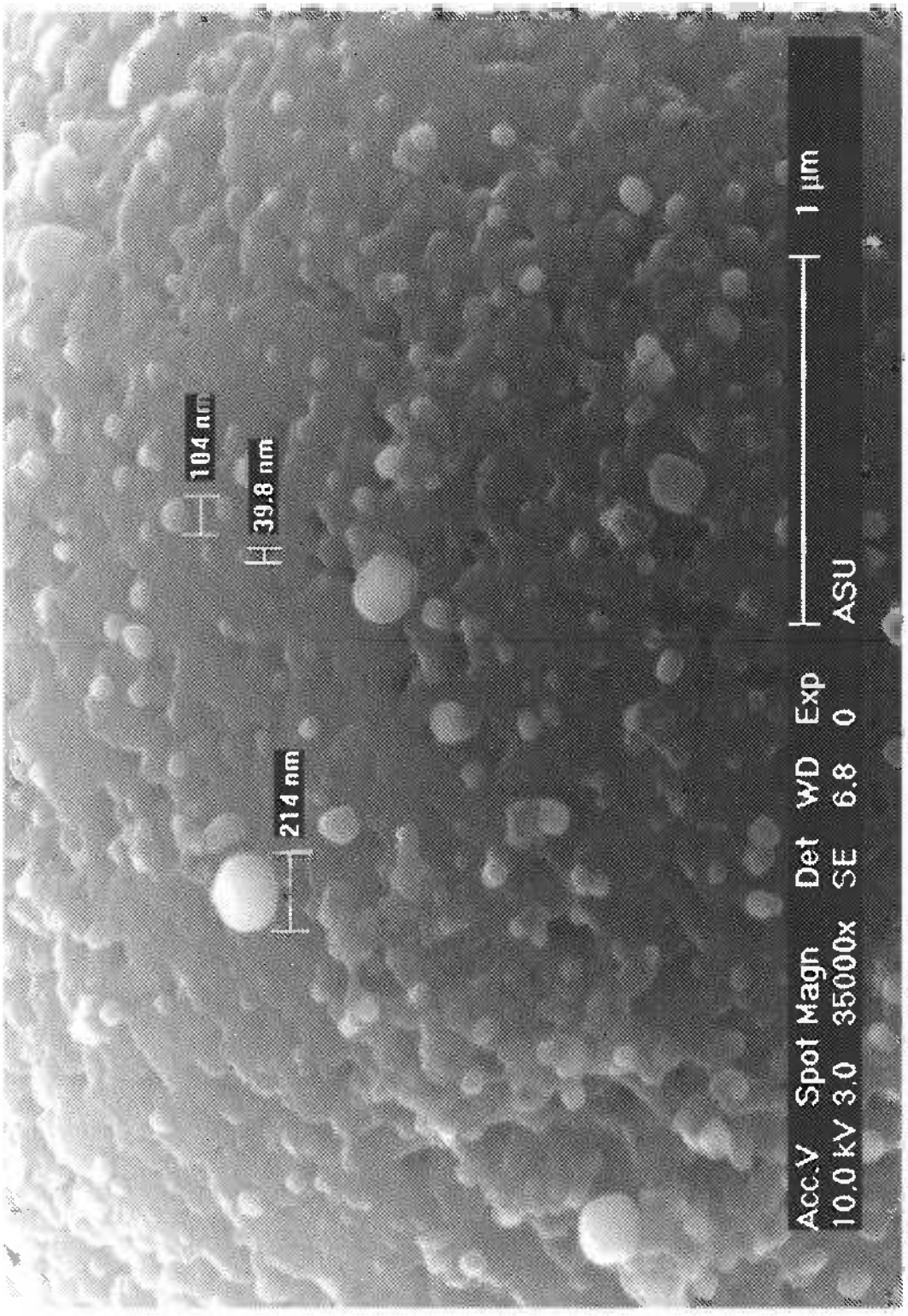

104 nm
39.8 nm
214 nm
Acc.V Spot Magn Det WD Exp
10.0 kV 3.0 35000x SE 6.8 0
1 µm
ASU

FIG. 12C

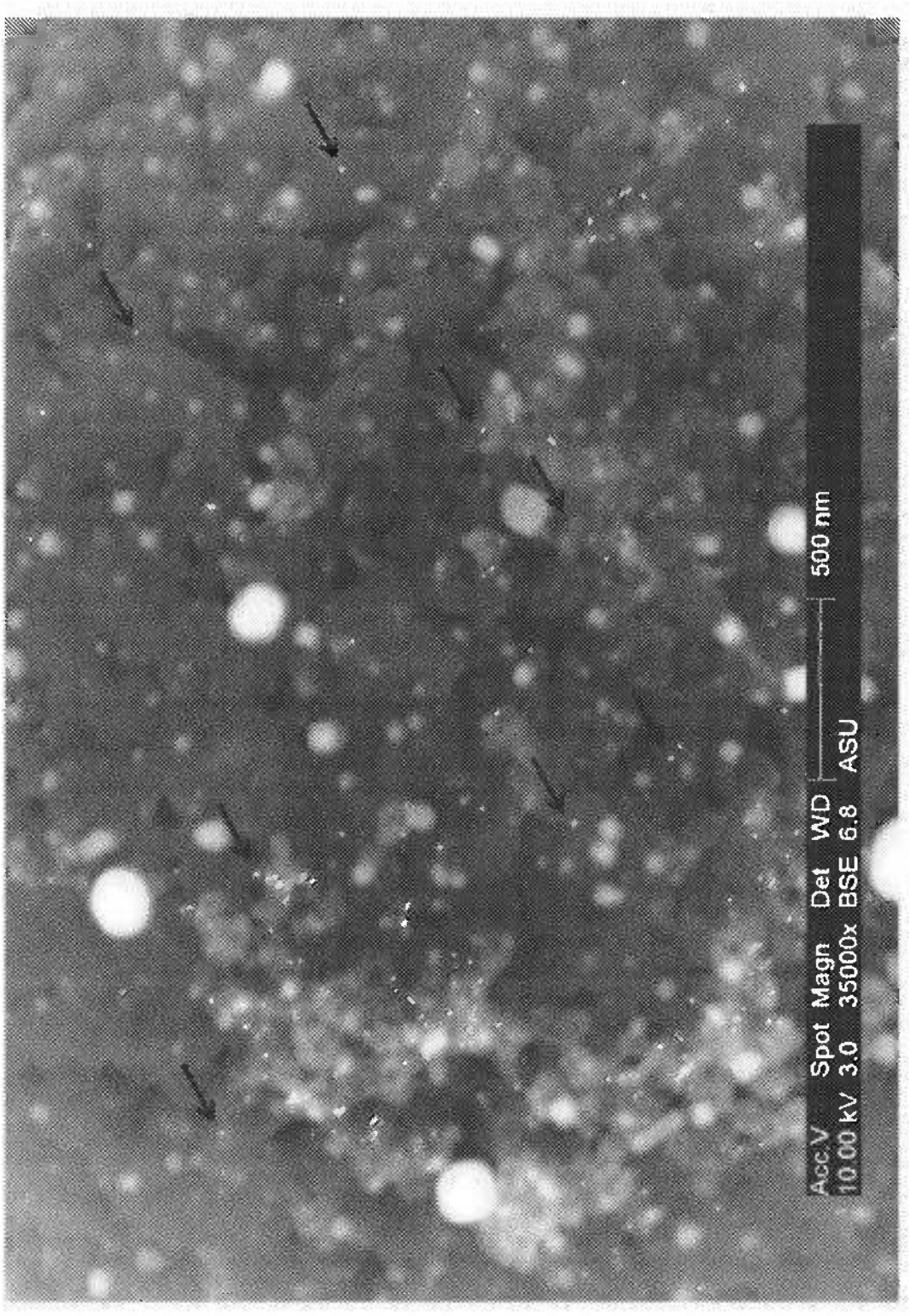


FIG. 12D

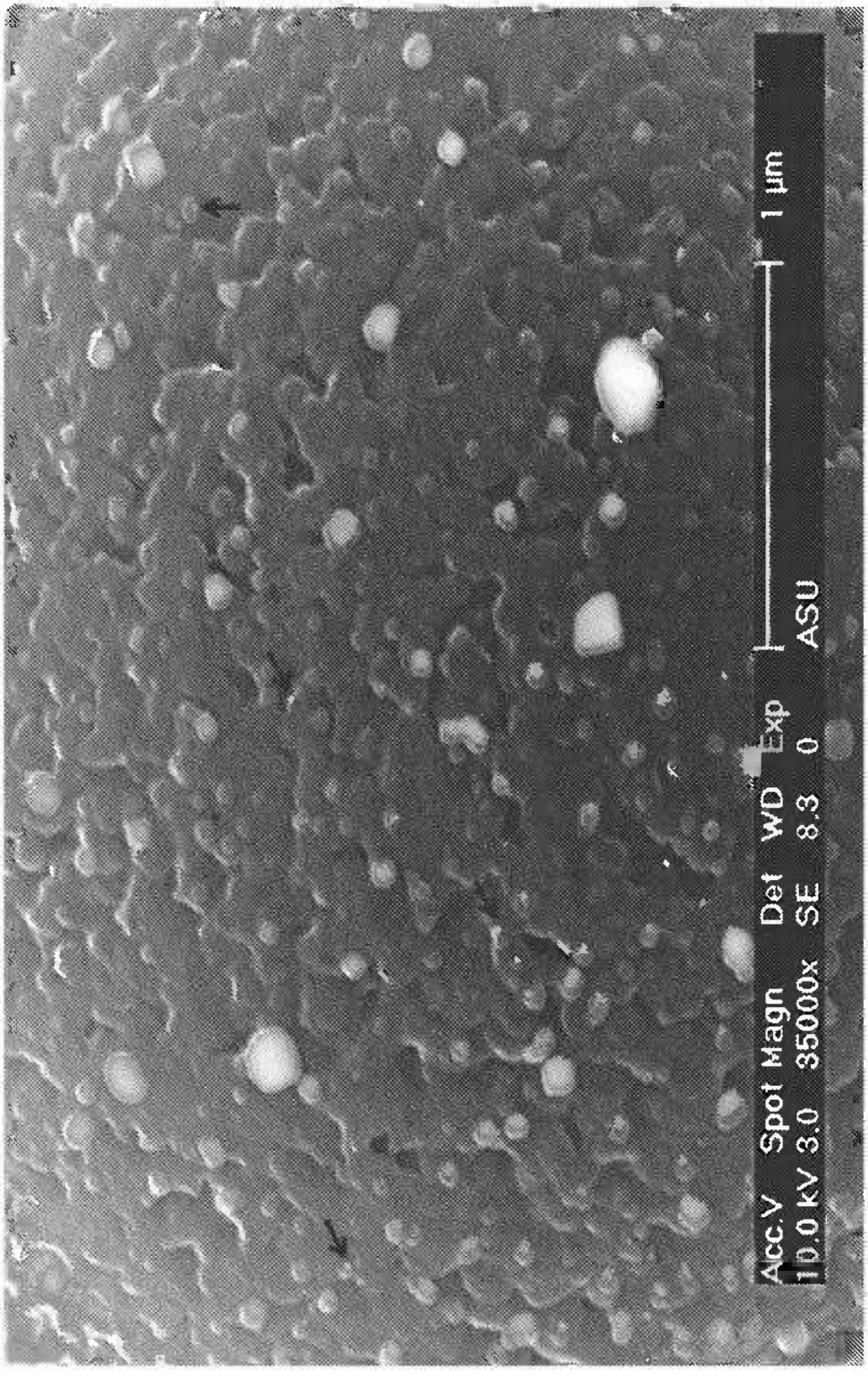


FIG. 12E

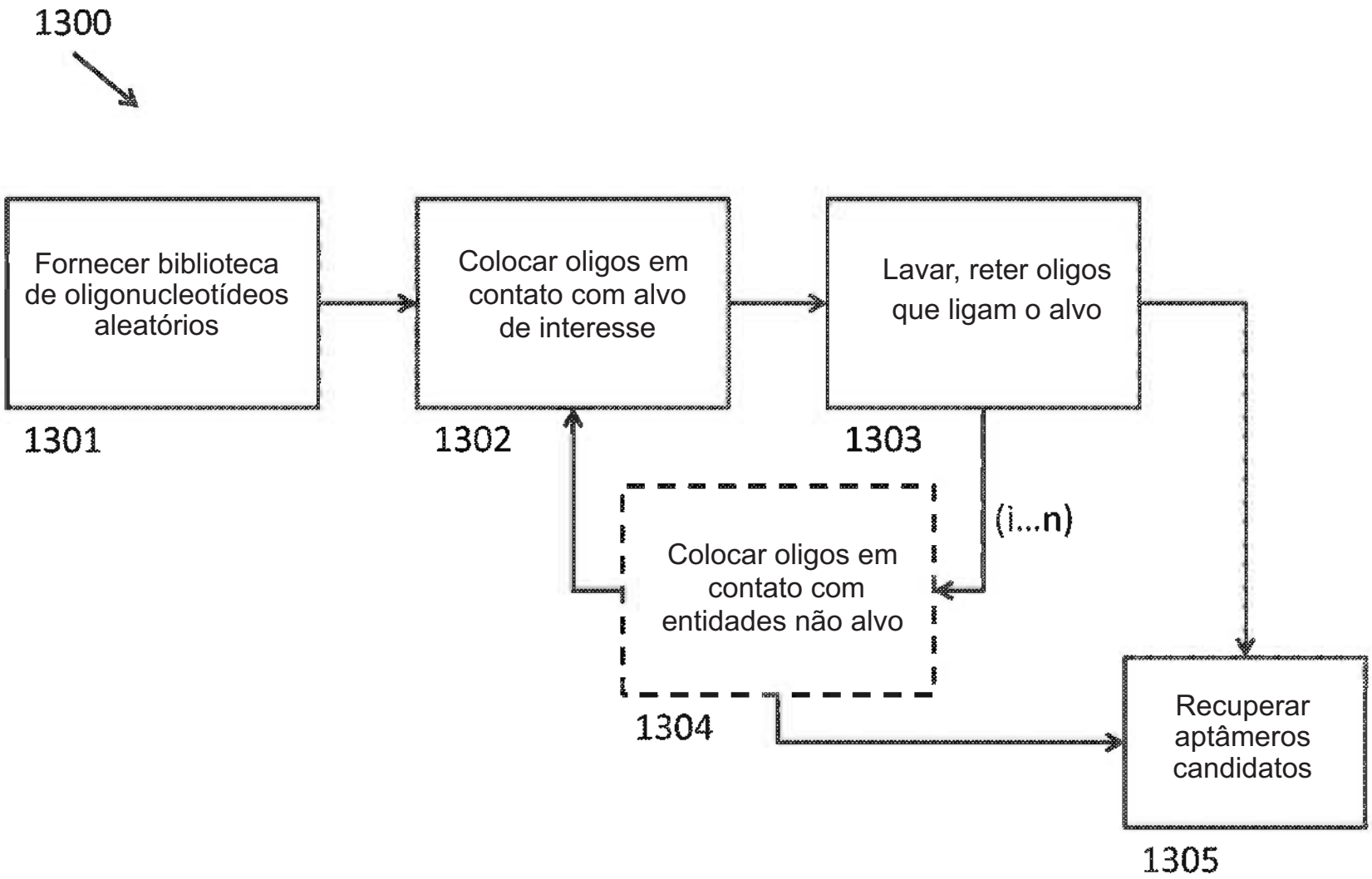

1300
Fornecer biblioteca de oligonucleotídeos aleatórios
1301
Colocar oligos em contato com alvo de interesse
1302
Lavar, reter oligos que ligam o alvo
1303
(i...n)
Colocar oligos em contato com entidades não alvo
1304
Recuperar aptâmeros candidatos
1305

FIG. 13A


Seleção 1
Ca1 > nCa1 > Ca2 > nCa2 > Ca3 > nCa3 > Ca4 > nCa4 > Ca5 > nCa5 > Ca6 > nCa6 > Ca7 > nCa7 > Ca8
Seleção 2
Ca8 > nCa1 > Ca7 > nCa2 > Ca6 > nCa3 > Ca5 > nCa4 > Ca4 > nCa5 > Ca3 > nCa6 > Ca2 > nCa7 > Ca1
Seleção 3
Ca8 > nCa7 > Ca7 > nCa6 > Ca6 > nCa5 > Ca5 > nCa4 > Ca4 > nCa3 > Ca3 > nCa2 > Ca2 > nCa1 > Ca1
Seleção 4
Ca2 > nCa7 > Ca3 > nCa6 > Ca4 > nCa5 > Ca5 > nCa4 > Ca6 > nCa3 > Ca7 > nCa2 > Ca8 > nCa1 > Ca1
Seleção 5
Ca7 > nCa2 > Ca5 > nCa4 > Ca3 > nCa6 > Ca1 > nCa1 > Ca8 > nCa3 > Ca6 > nCa5 > Ca4 > nCa7 > Ca2
Seleção 6
Ca4 > nCa3 > Ca5 > nCa2 > Ca6 > nCa1 > Ca7 > nCa7 > Ca8 > nCa6 > Ca1 > nCa5 > Ca2 > nCa4 > Ca3
Seleção 7
Ca5 > nCa1 > Ca3 > nCa3 > Ca1 > nCa2 > Ca8 > nCa4 > Ca6 > nCa3 > Ca4 > nCa5 > Ca2 > nCa7 > Ca7

FIG. 13B

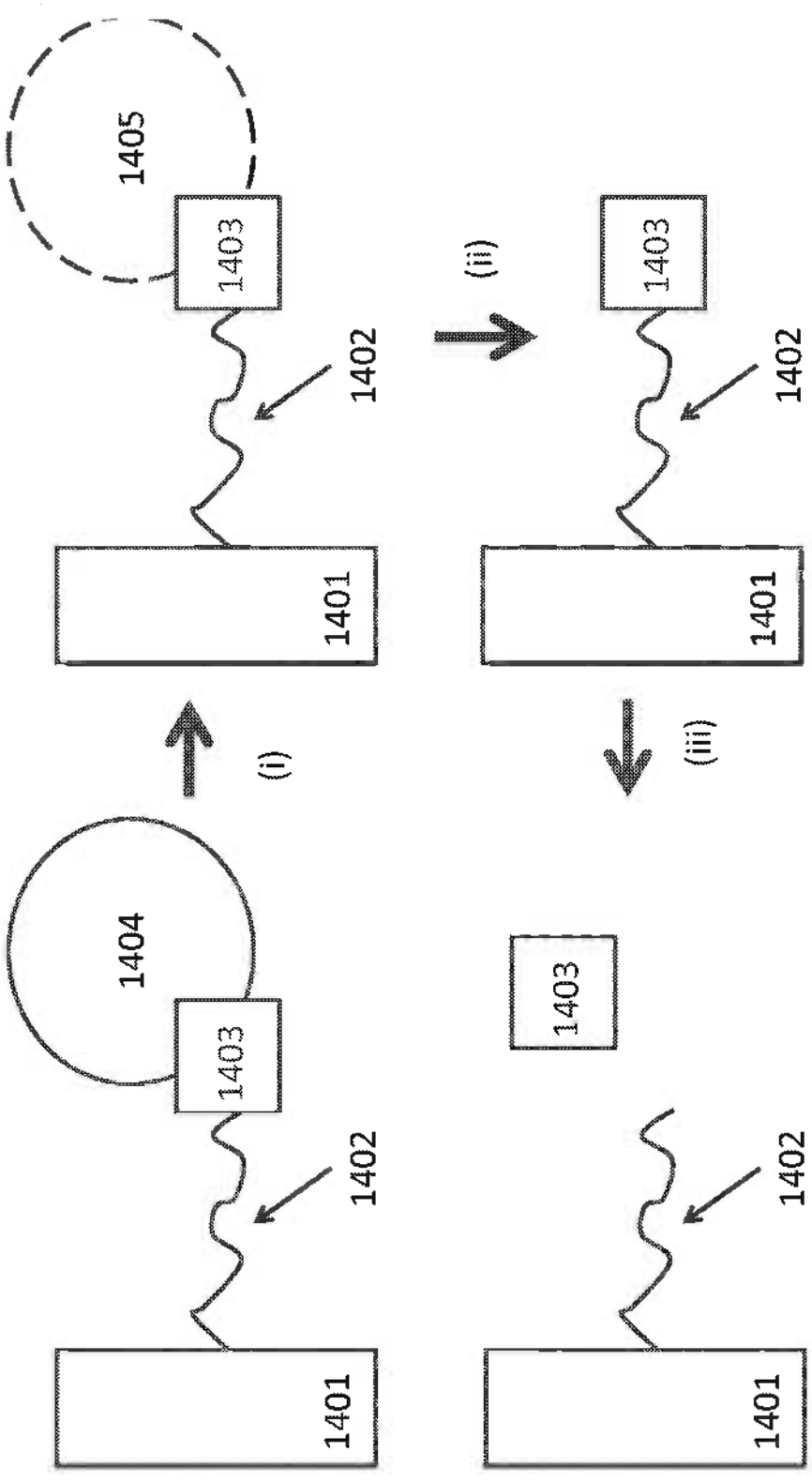

1405
1403
1402
1401
(ii)
1403
1402
1401
(i)
1404
1403
1402
1401
(iii)
1403
1402
1401

FIG. 14

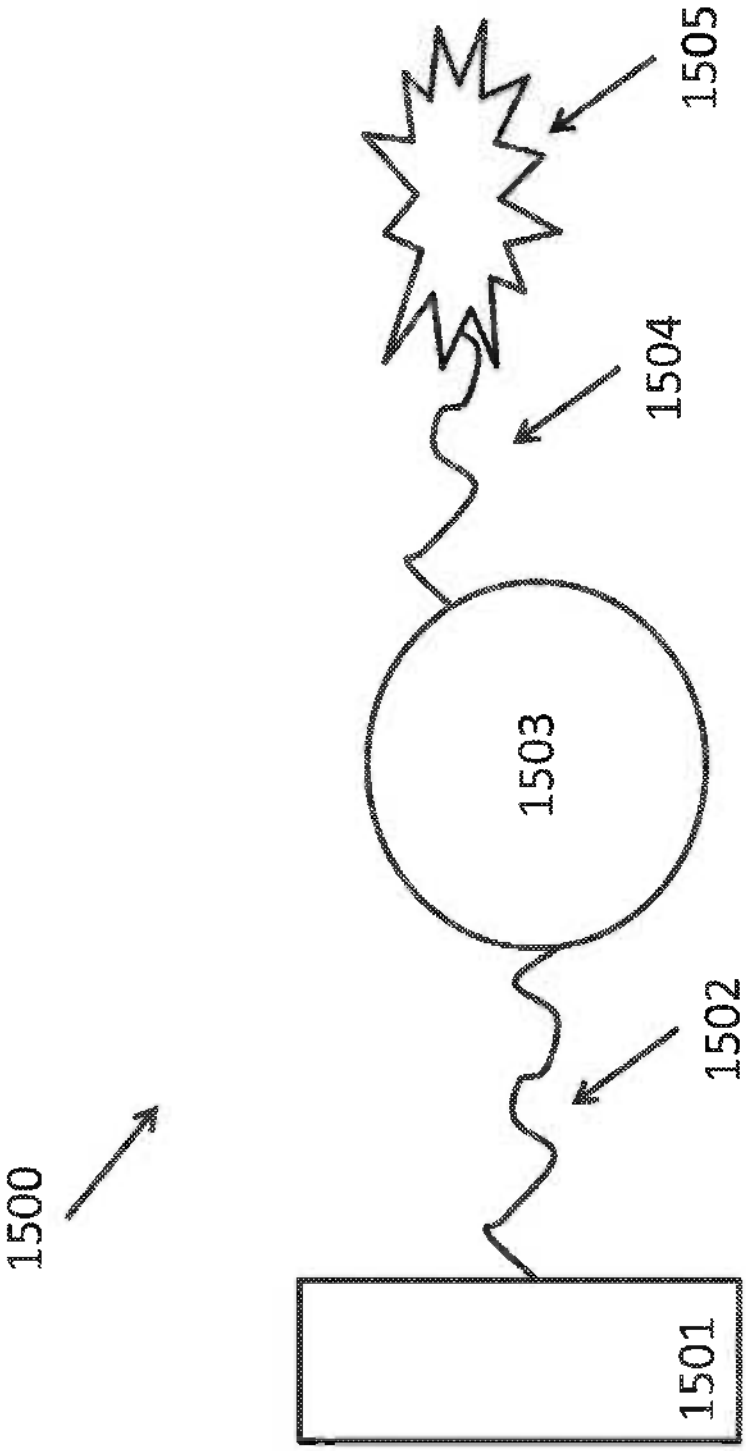


FIG. 15A

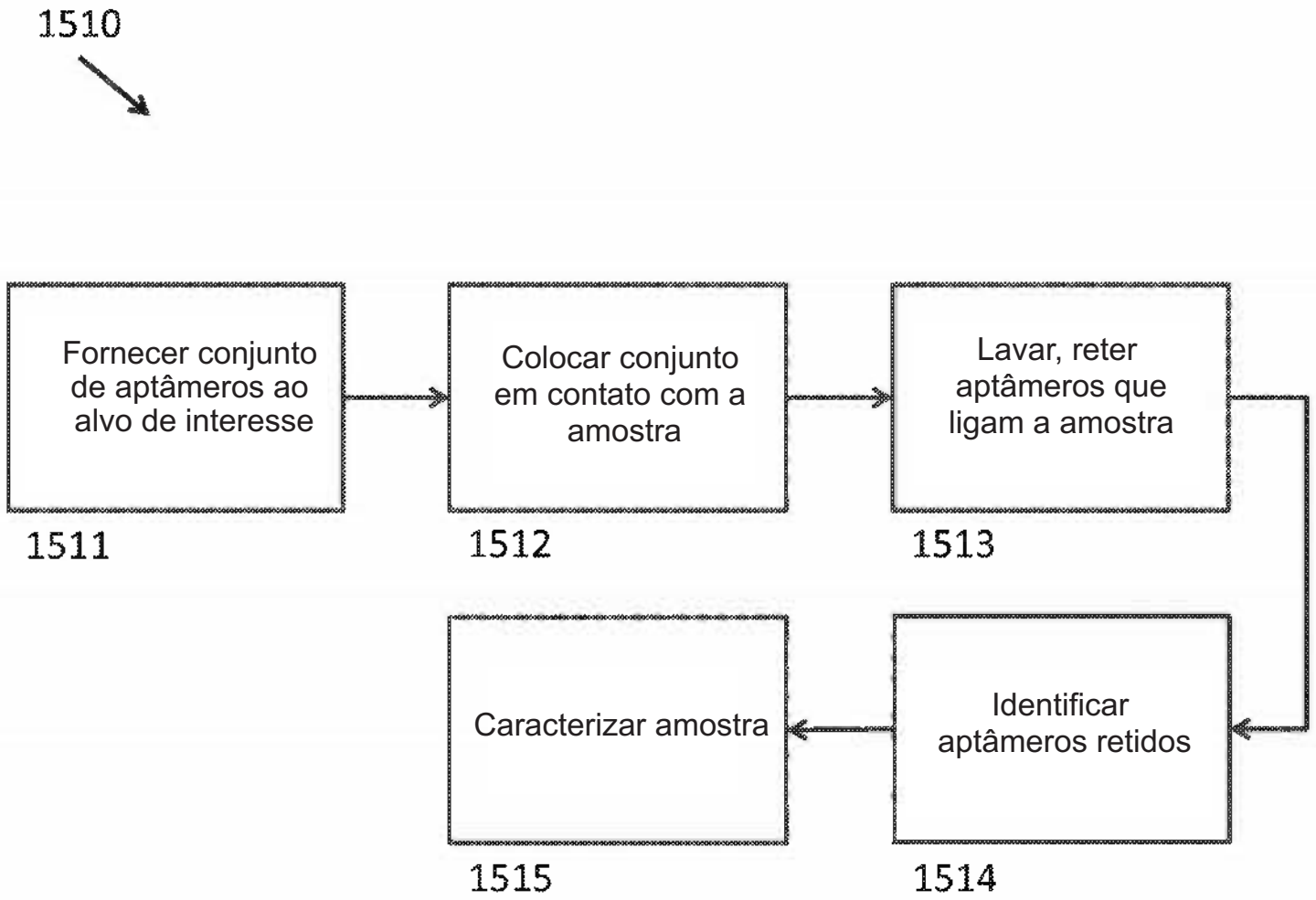

1510
Fornecer conjunto de aptâmeros ao alvo de interesse
1511
Colocar conjunto em contato com a amostra
1512
Lavar, reter aptâmeros que ligam a amostra
1513
Identificar aptâmeros retidos
1514
Caracterizar amostra
1515

FIG. 15B

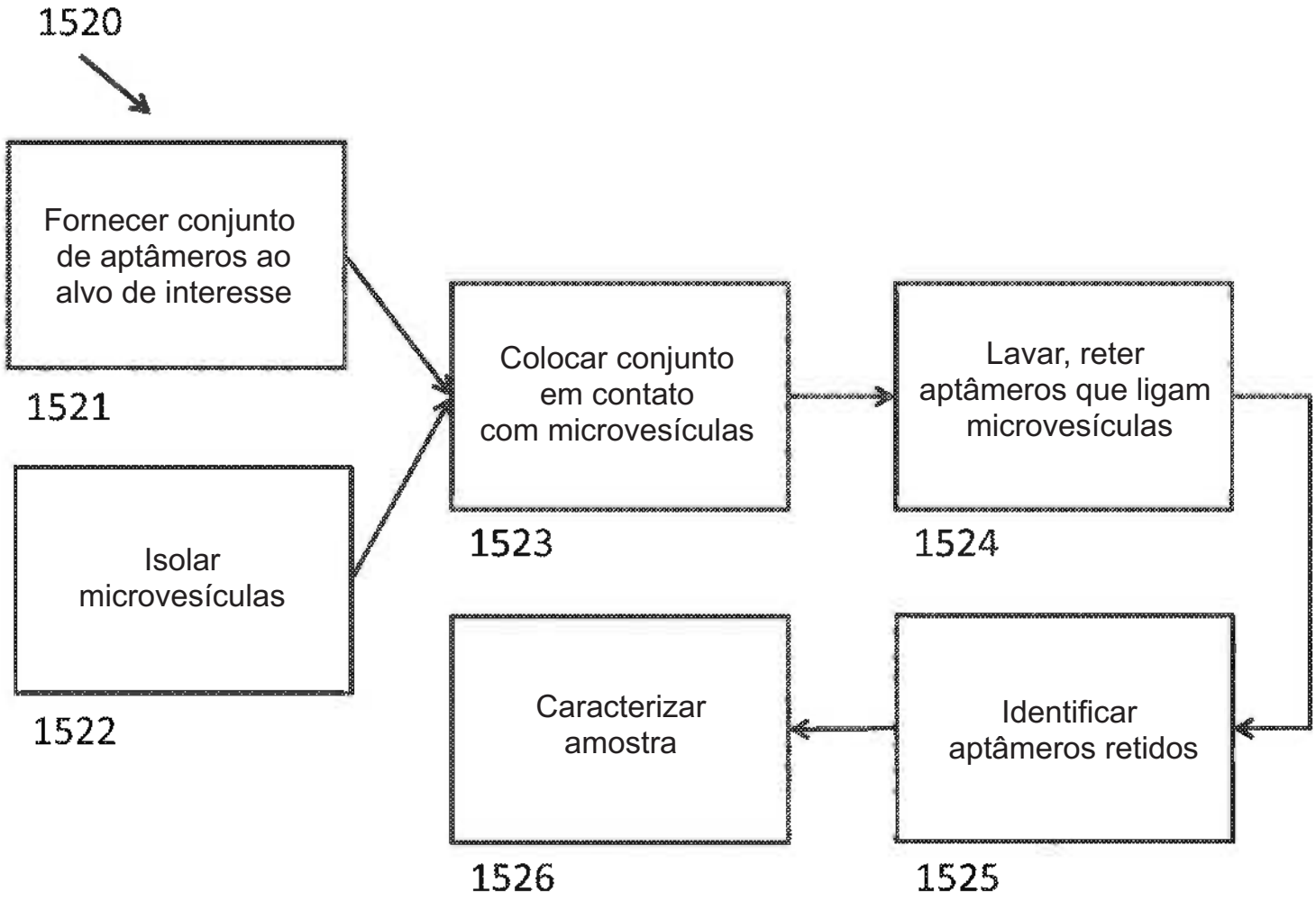

1520
Fornecer conjunto de aptâmeros ao alvo de interesse
1521
Isolar microvesículas
1522
Colocar conjunto em contato com microvesículas
1523
Lavar, reter aptâmeros que ligam microvesículas
1524
Identificar aptâmeros retidos
1525
Caracterizar amostra
1526

FIG. 15C

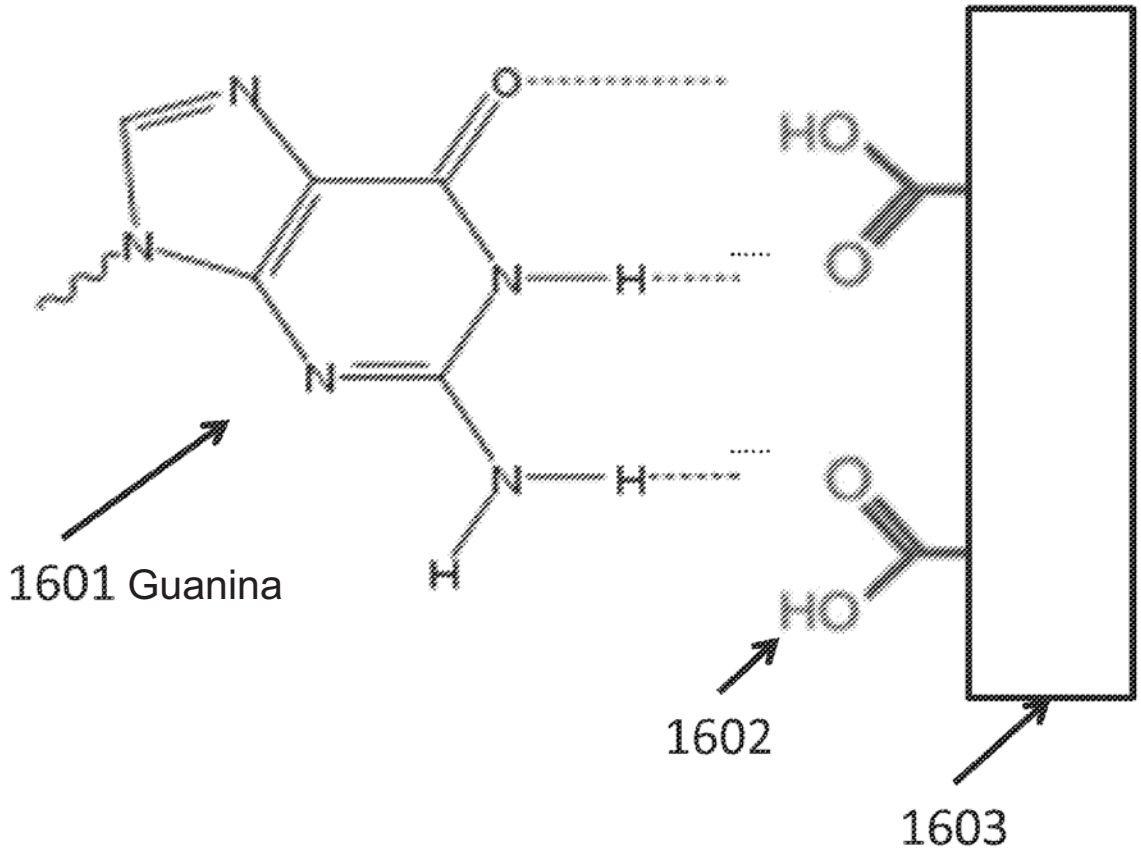


FIG. 16A

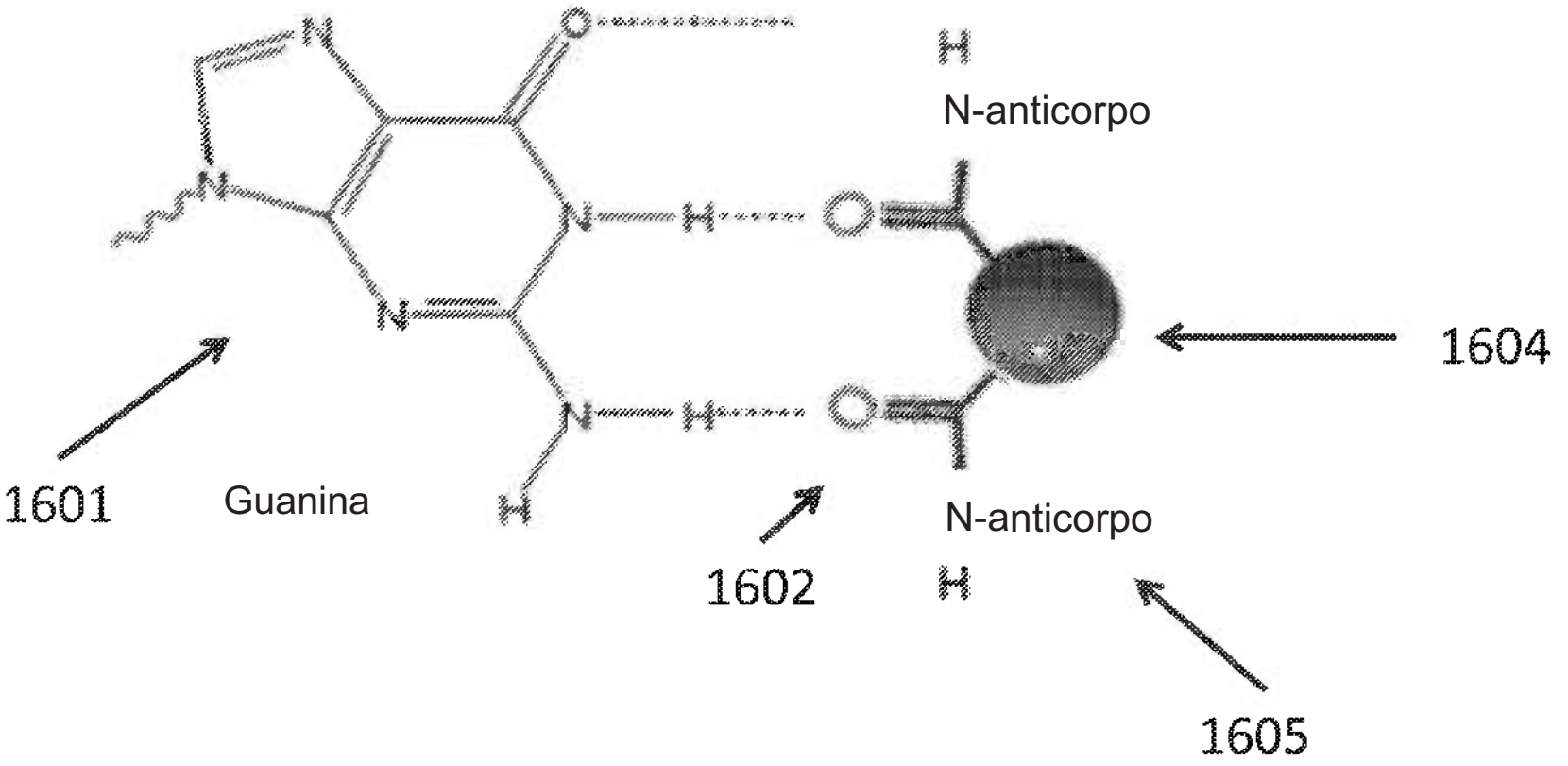


FIG. 16B

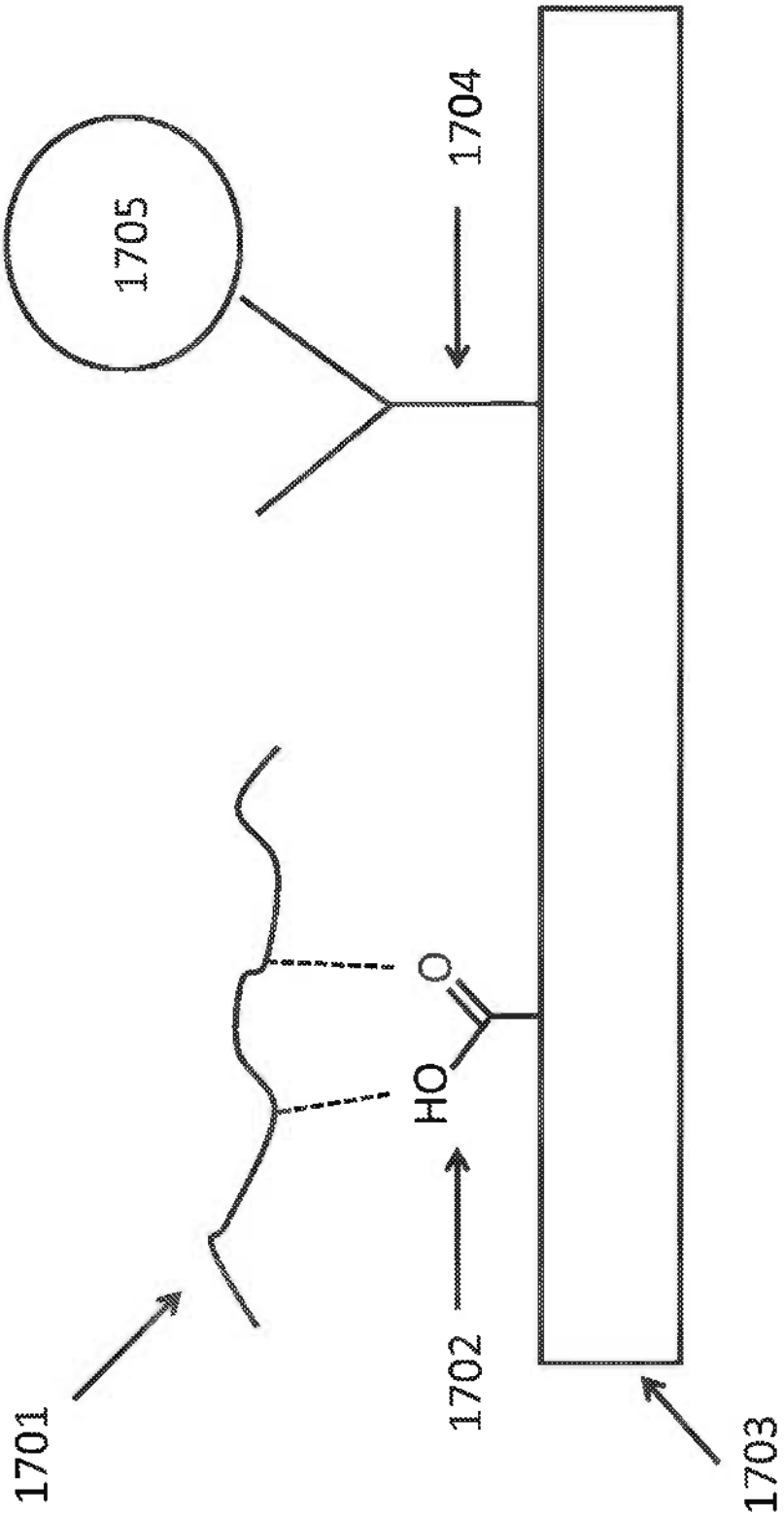


FIG. 17A

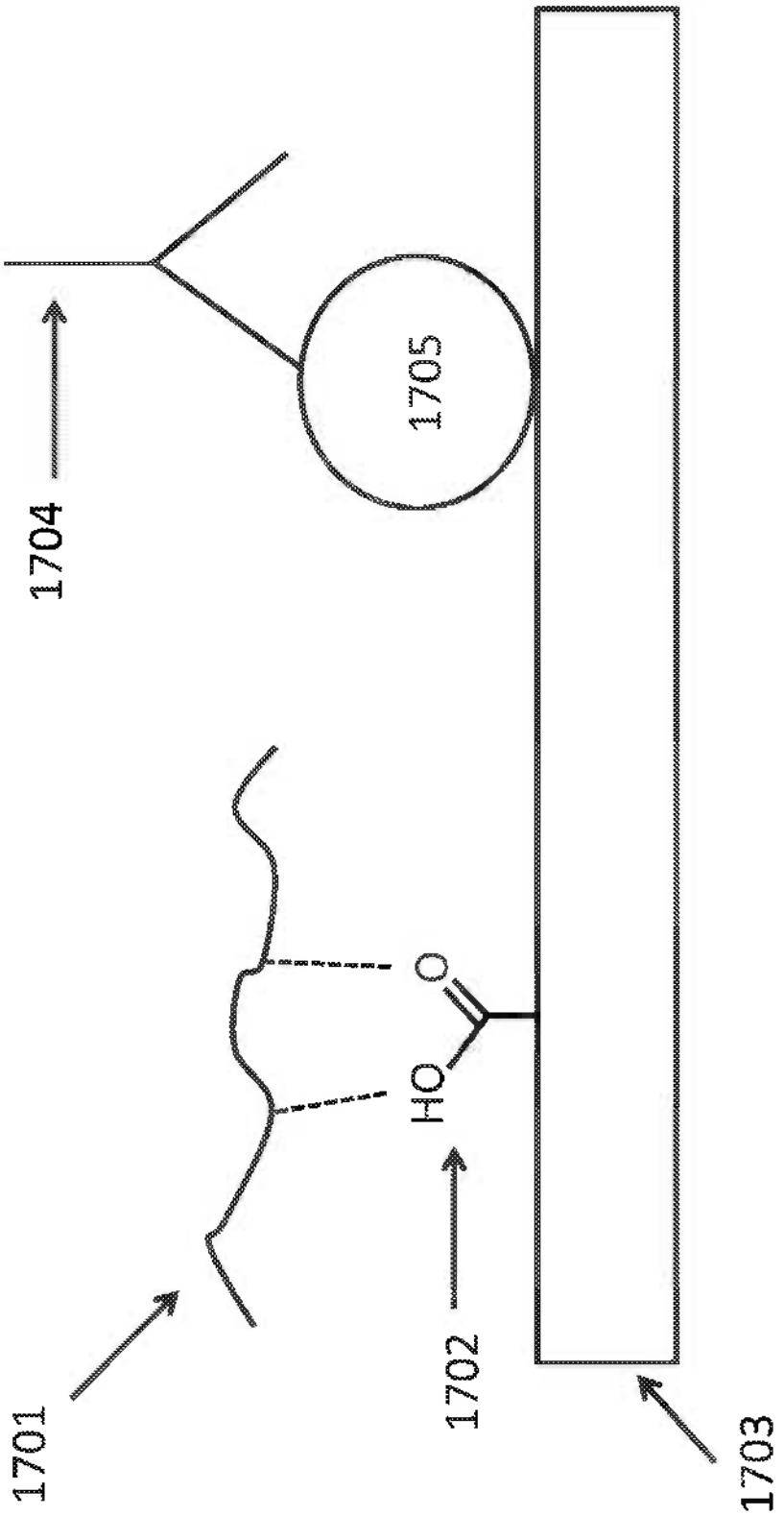
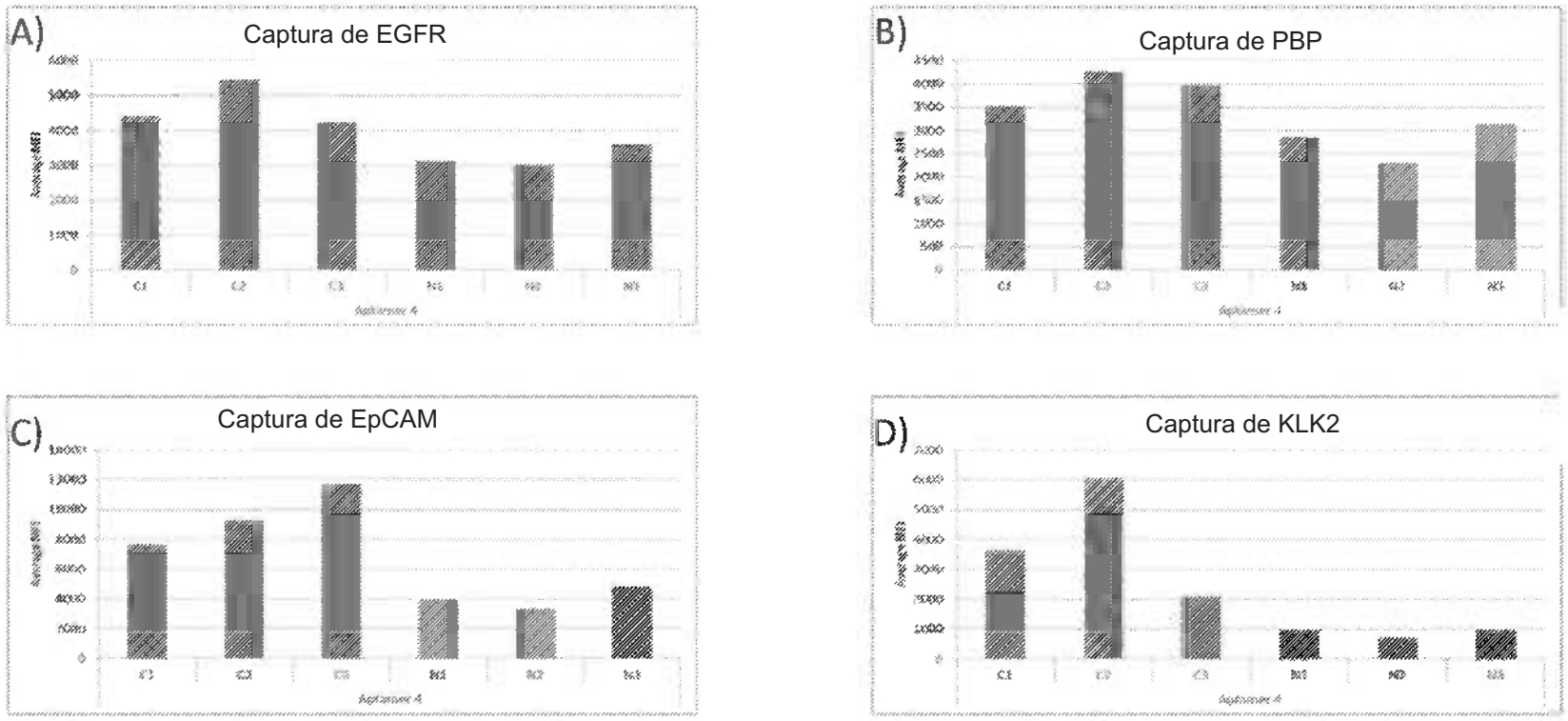


FIG. 17B


A)
Captura de EGFR
B)
Captura de PBP
C)
Captura de EpCAM
D)
Captura de KLK2

FIGs. 18A-18D

M	Escada de 25 bp	
25	80mer SPDEF	4
26	1M	4
27	2M	4
28	3M	4
29	4M	4
30	5M	4
31	NTC	4
M	Escada de 10 bp	

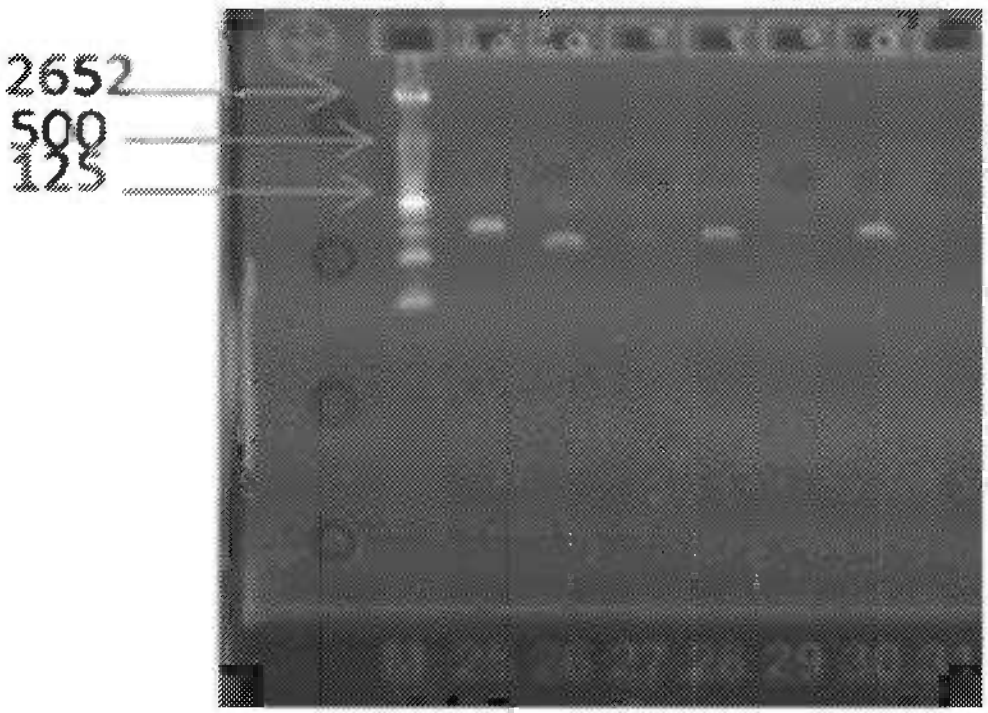


FIG. 19A

25	80mer SPDEF	4
26	1M	4
27	2M	4
28	3M	4
29	4M	4
30	5M	4
31	NTC	4
M	Escada de 10 bp	

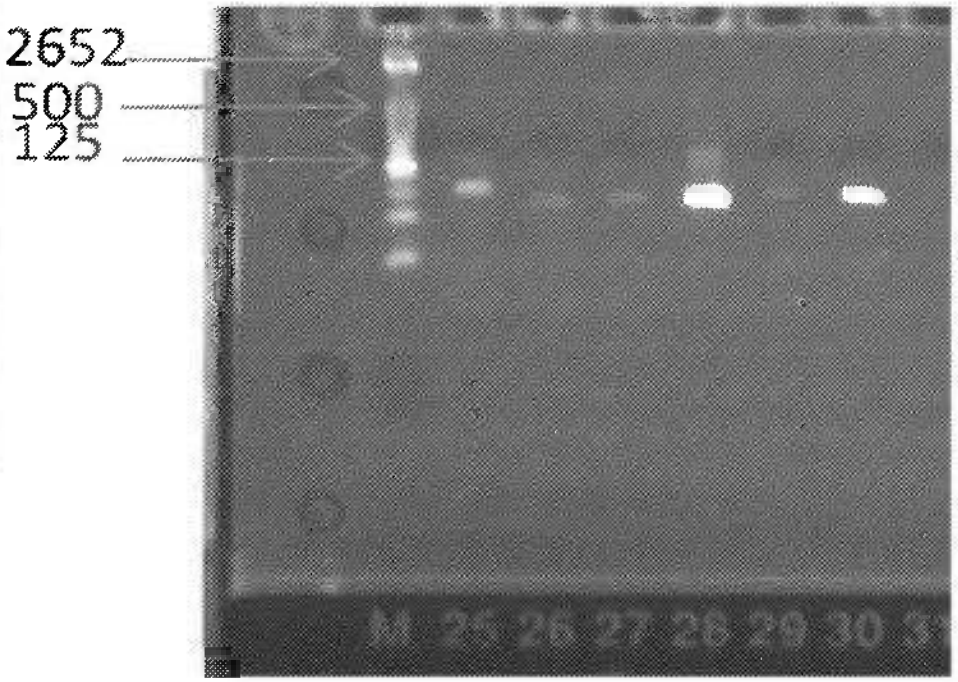


FIG. 19B

25	80mer SPDEF	4
26	1M	4
27	2M	4
28	3M	4
29	4M	4
30	5M	4
31	NTC	4
M	Escada de 10 bp	

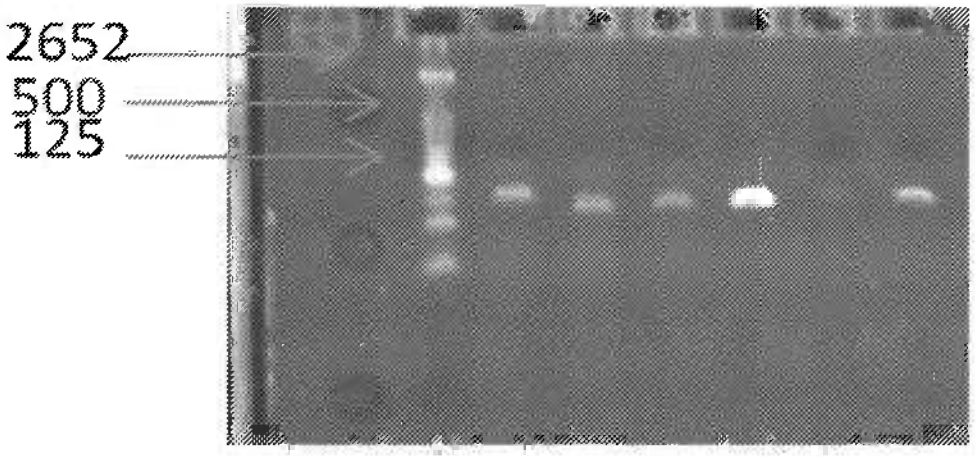


FIG. 19C

Faixa	Amostra	Volume carregado
M	Escada de 25 bp	
1	60mer SSX2	4
2	65mer SSX2	4
3	70mer SSX2	4
4	75mer SSX2	4
5	80mer SSX2	4
6	60mer SSX4	4
7	65mer SSX4	4
8	70mer SSX4	4
9	75mer SSX4	4
10	80mer SSX4	4
11	60mer PBP	4
12	65mer PBP	4
13	70mer PBP	4
	75mer PBP	4
	80mer PBP	4
16	60mer KLK2	4
17	65mer KLK2	4
18	70mer KLK2	4
19	75mer KLK2	4
20	80mer KLK2	4
21	60mer SPDEF	4
22	65mer SPDEF	4
23	70mer SPDEF	4
24	75mer SPDEF	4
M	Escada de 10 bp	
M	Escada de 25 bp	

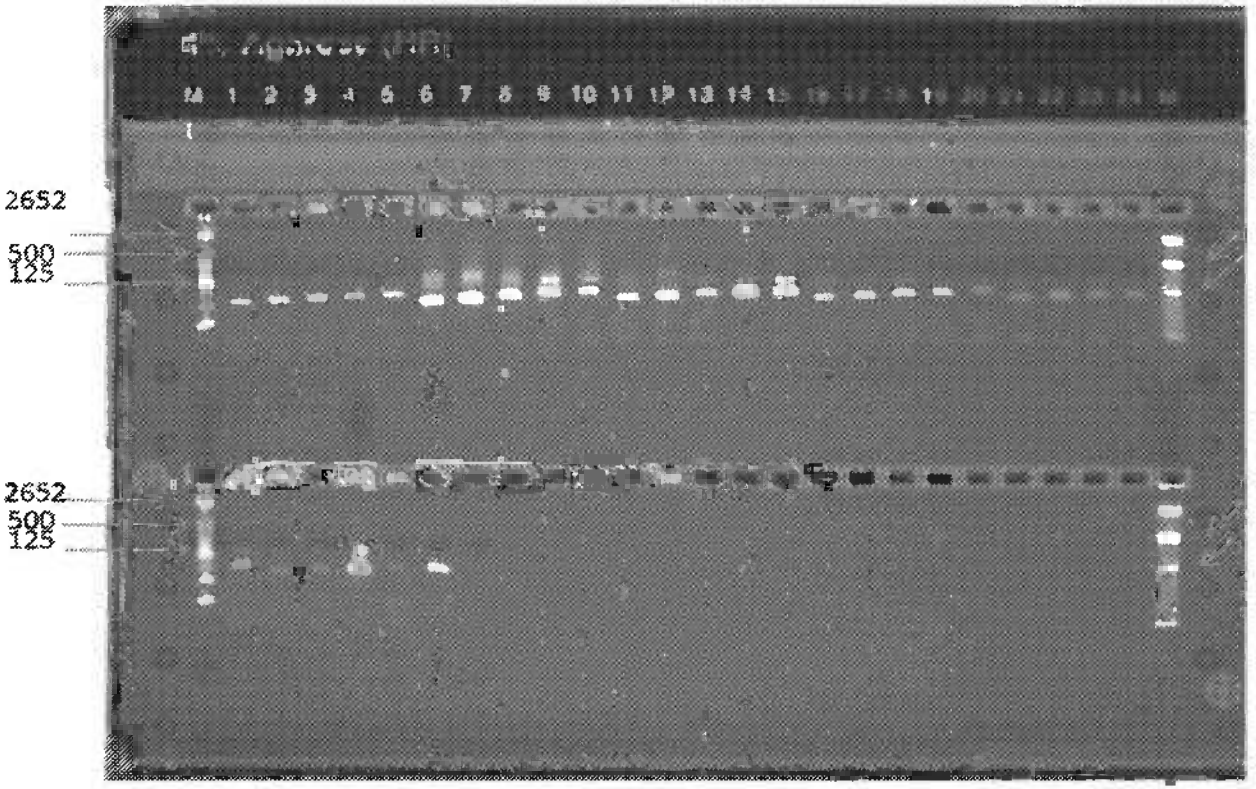


FIG. 19D

Faixa	Amostra	Volume carregado
M	Escada de 25 bp	
1	60mer SSX2	4
2	65mer SSX2	4
3	70mer SSX2	4
4	75mer SSX2	4
5	80mer SSX2	4
6	60mer SSX4	4
7	65mer SSX4	4
8	70mer SSX4	4
9	75mer SSX4	4
10	80mer SSX4	4
11	60mer PBP	4
12	65mer PBP	4
13	70mer PBP	4
	75mer PBP	4
	80mer PBP	4
16	60mer KLK2	4
17	65mer KLK2	4
18	70mer KLK2	4
19	75mer KLK2	4
20	80mer KLK2	4
21	60mer SPDEF	4
22	65mer SPDEF	4
23	70mer SPDEF	4
24	75mer SPDEF	4
M	Escada de 10 bp	
M	Escada de 25 bp	

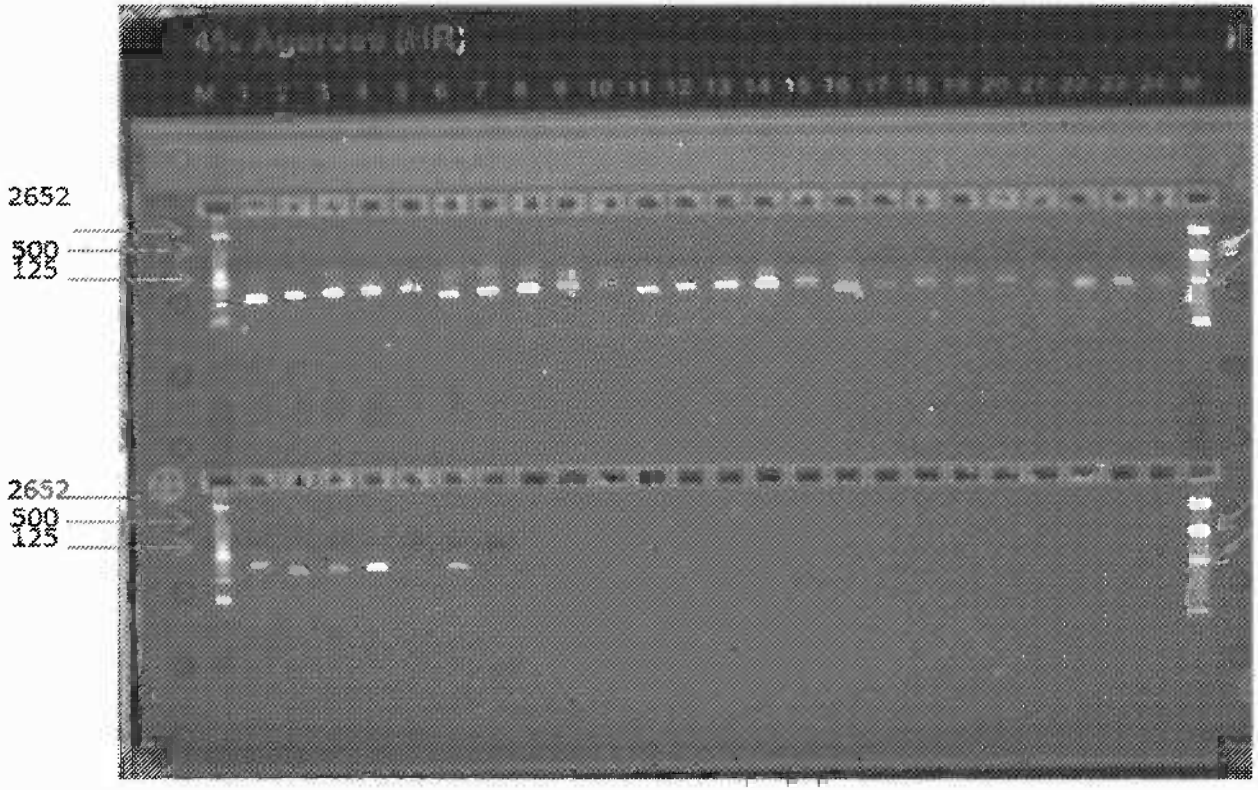
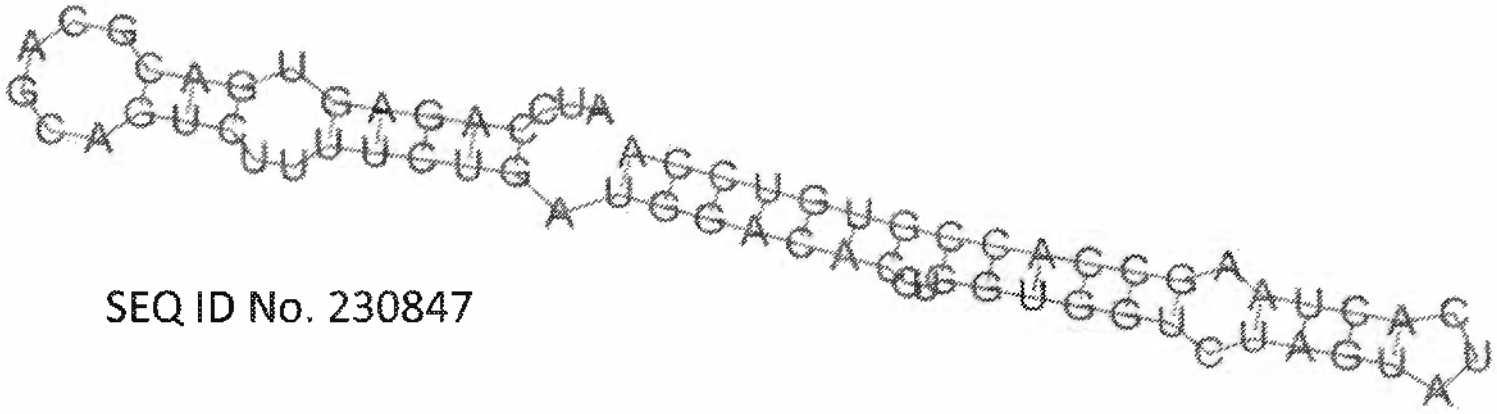


FIG. 19E

A) SEQ ID No. 230822

5′-ATCCAGAGTGACGCAGCAGTCTTTTCTGATGGACAC
GTGGTGGTCTAGTATCTGGACACGGTGGCTTAGT

B)



SEQ ID No. 230847

FIGs. 20A-20B

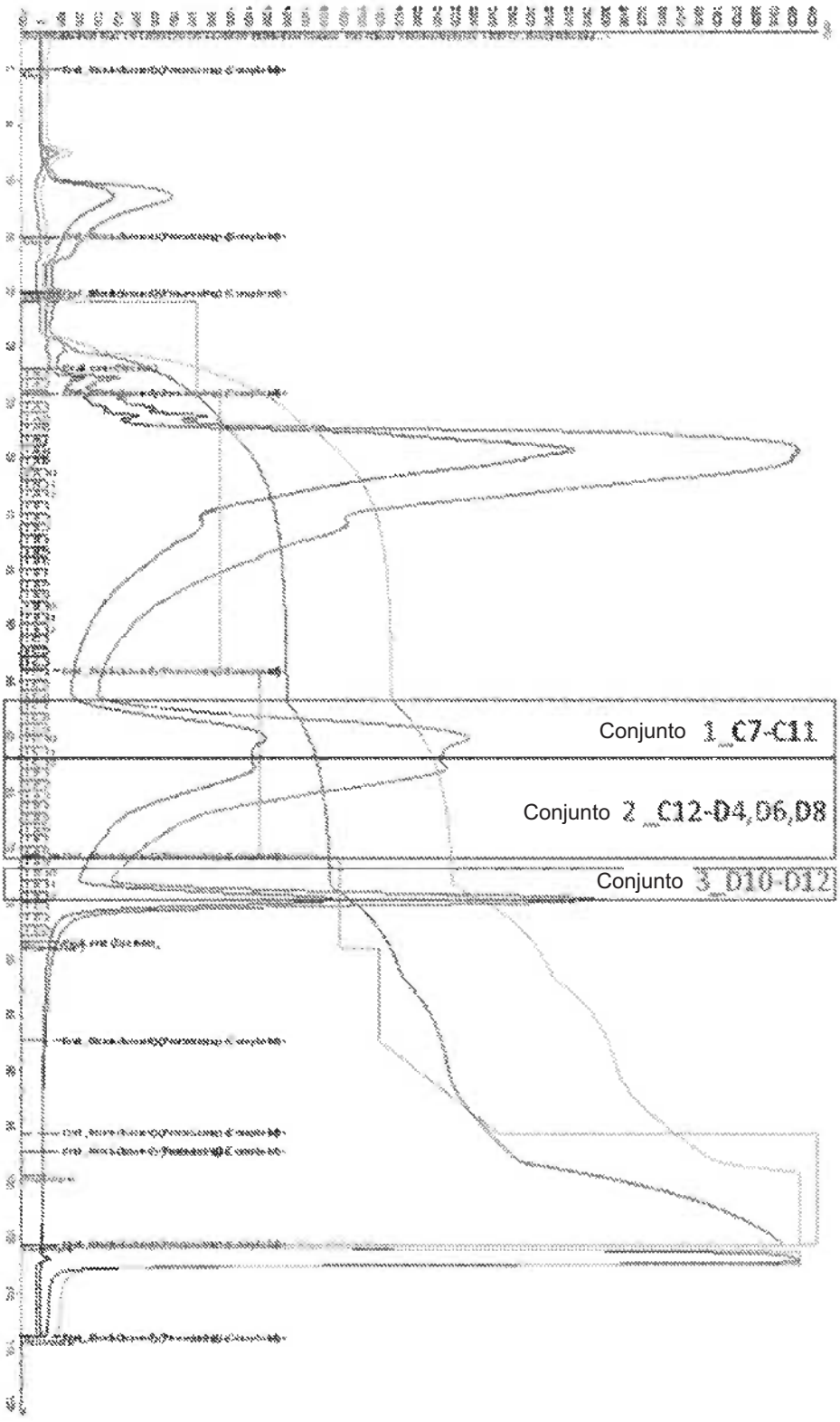


FIG. 20C

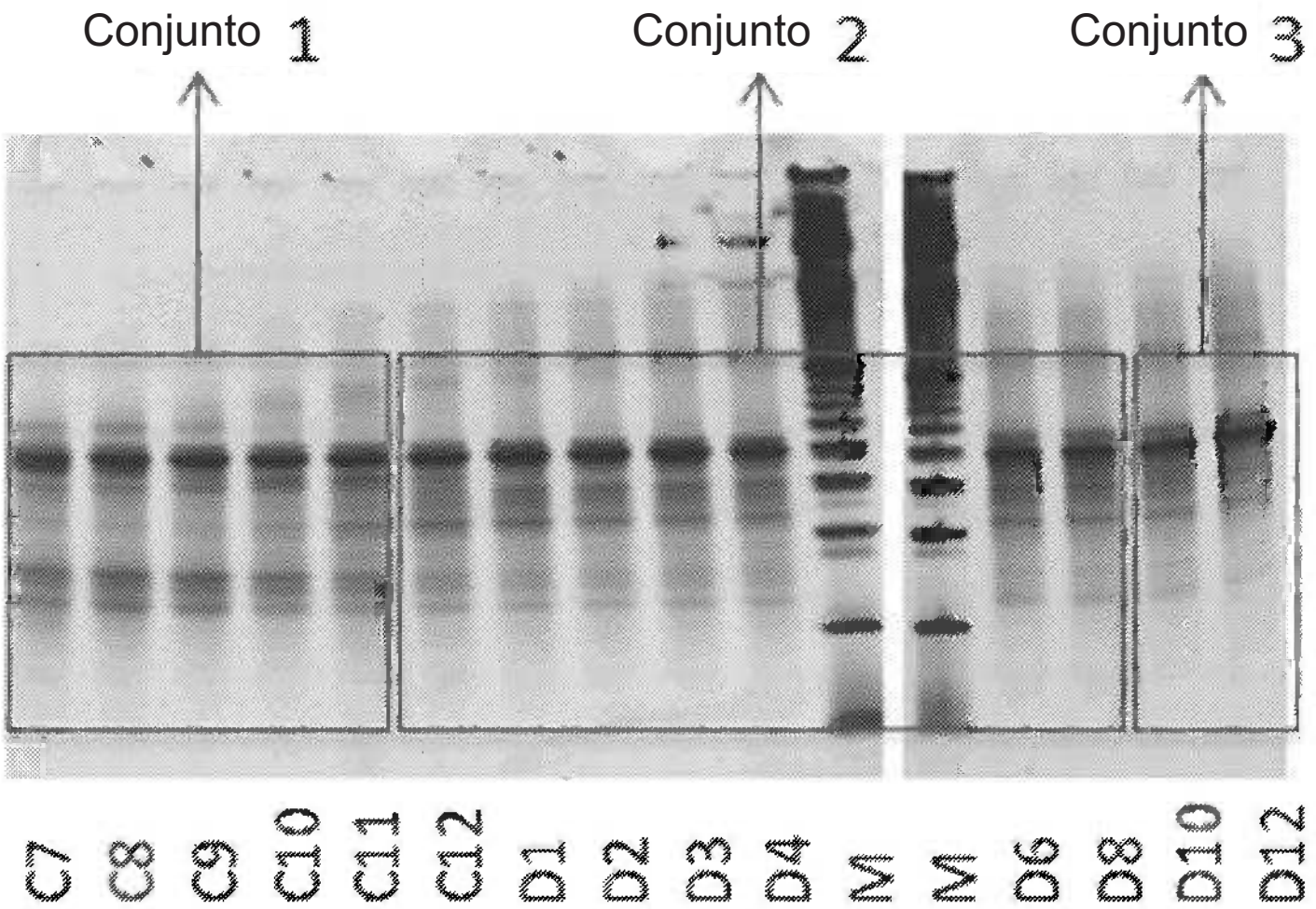

Conjunto 1
Conjunto 2
Conjunto 3
C7
C8
C9
C10
C11
C12
D1
D2
D3
D4
M
M
D6
D8
D10
D12

FIG. 20D

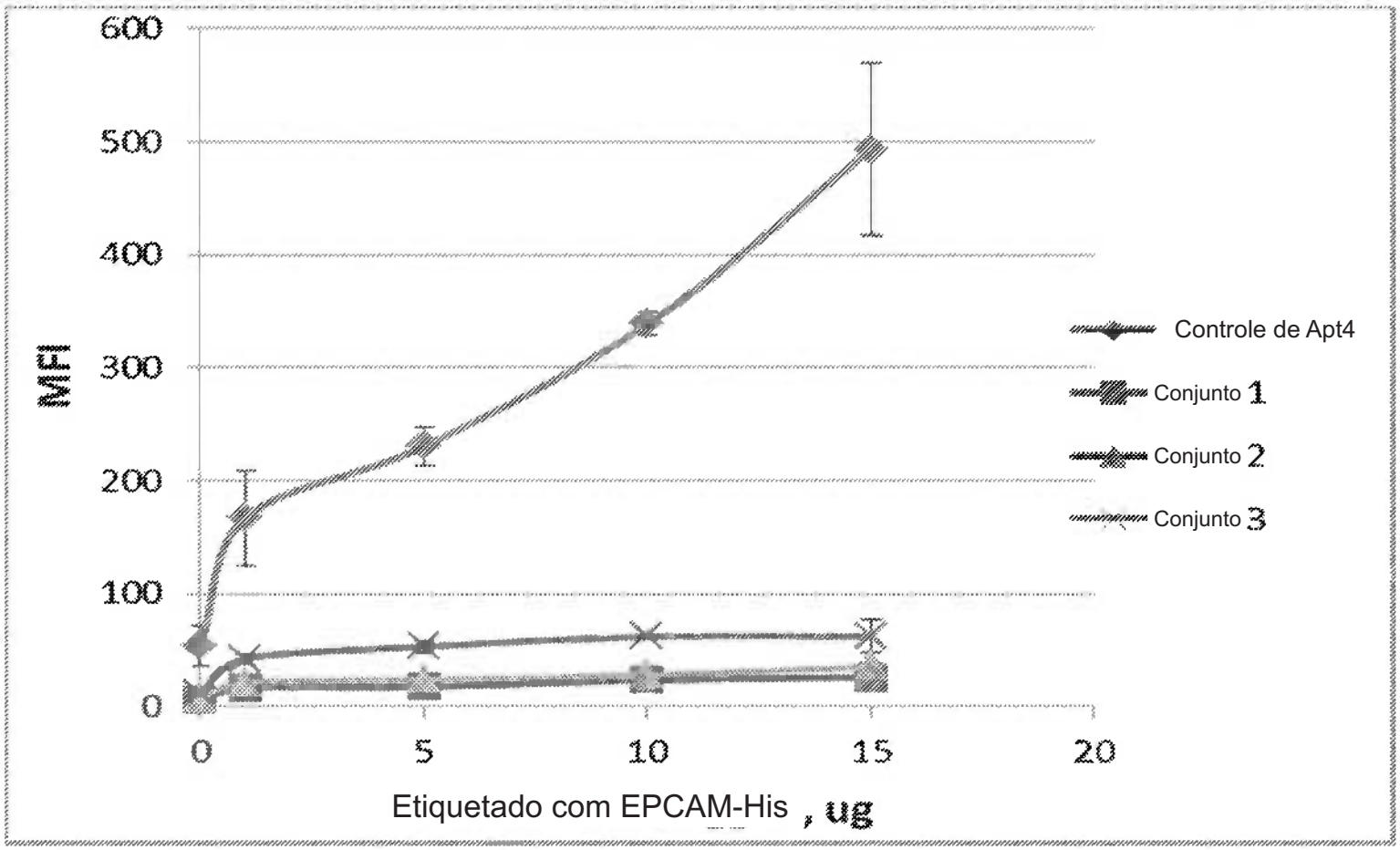

600
500
400
300
200
100
0
MFI
0
5
10
15
20
Etiquetado com EPCAM-His , ug
Controle de Apt4
Conjunto 1
Conjunto 2
Conjunto 3

FIG. 20E

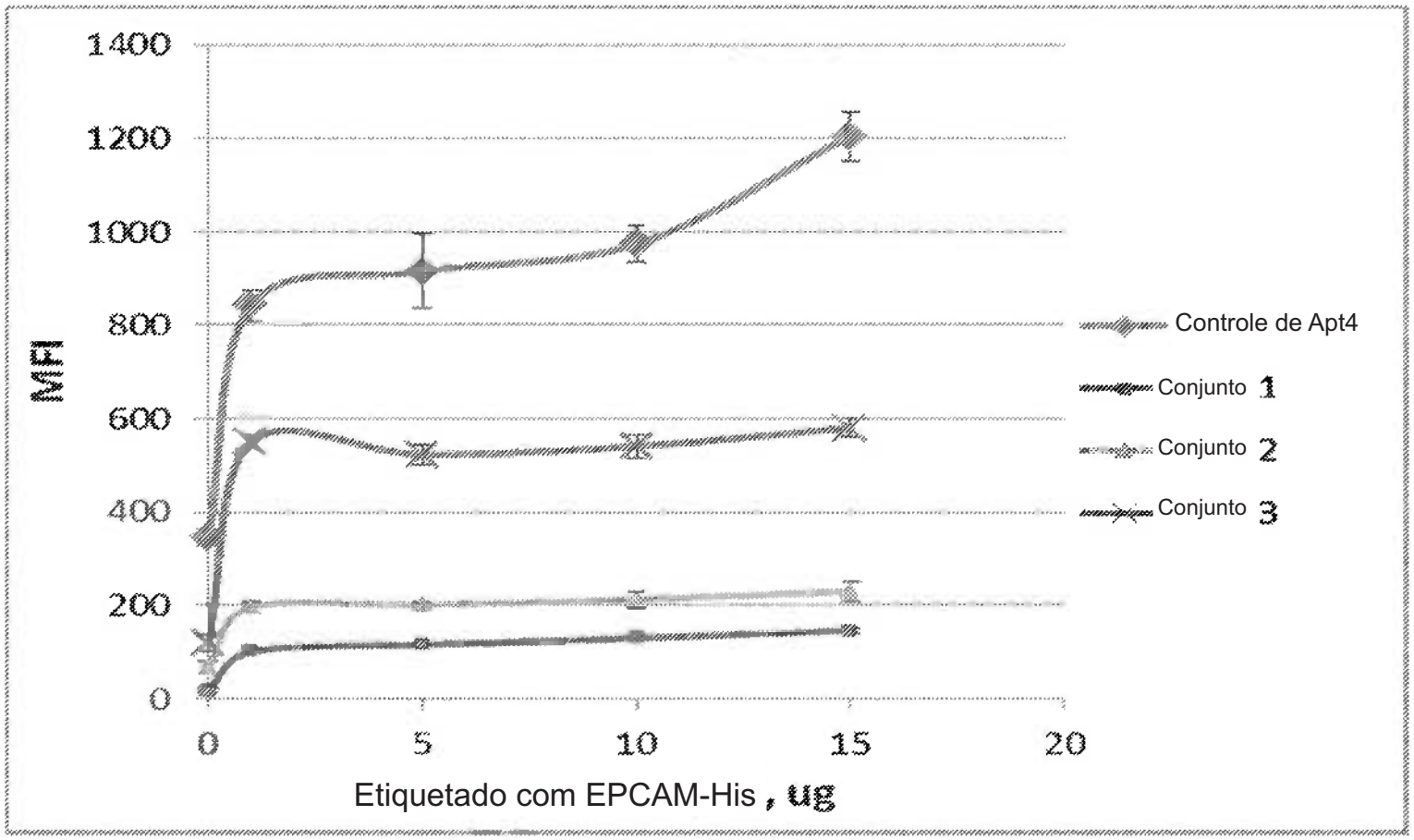

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
MFI
0
5
10
15
20
Etiquetado com EPCAM-His , ug
Controle de Apt4
Conjunto 1
Conjunto 2
Conjunto 3

FIG. 20F

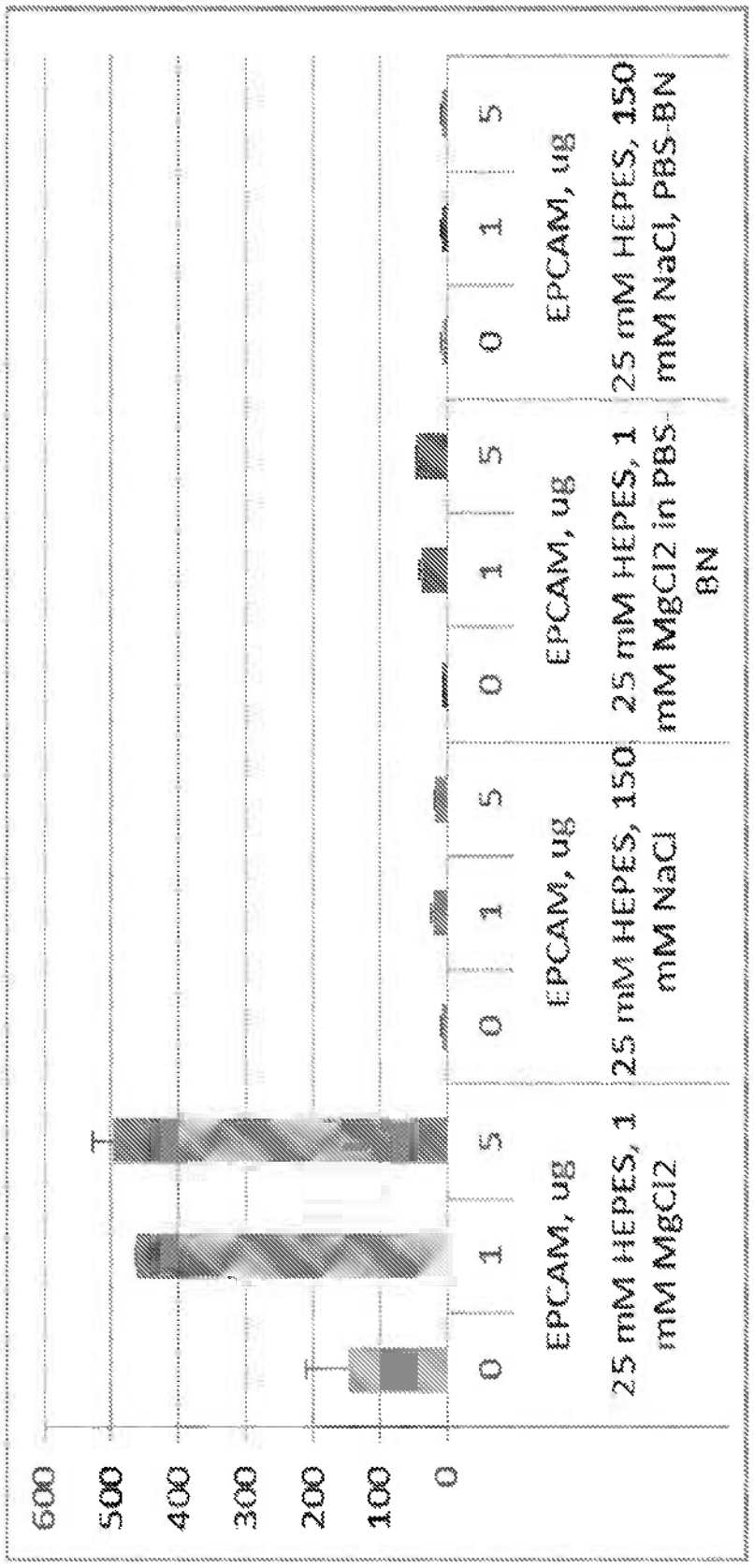

600
500
400
300
200
100
0
0
1
5
EPCAM, ug
25 mM HEPES, 1 mM MgCl2
25 mM HEPES, 150 mM NaCl
25 mM HEPES, 1 mM MgCl2 in PBS-BN
25 mM HEPES, 150 mM NaCl, PBS-BN

FIG. 20G

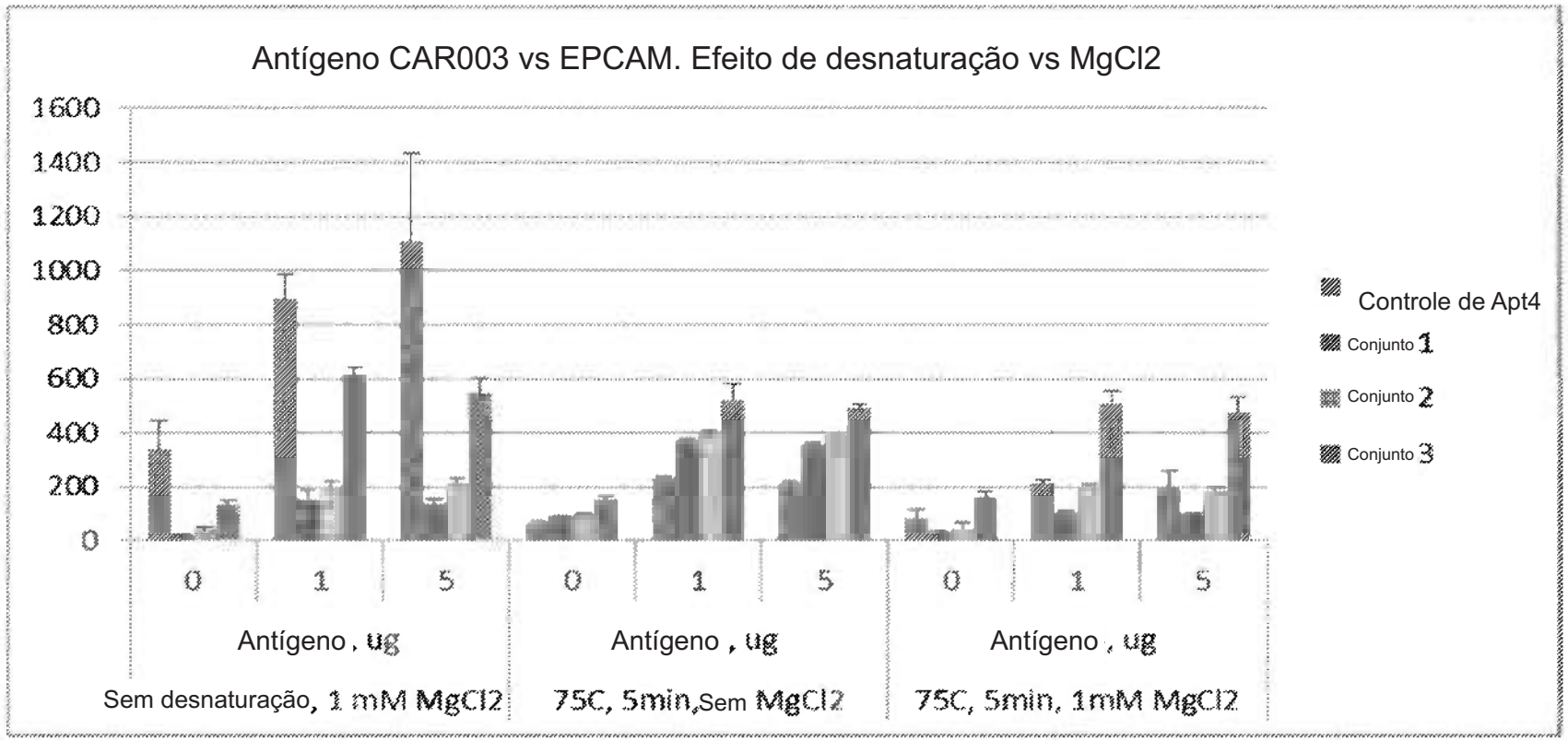

Antígeno CAR003 vs EPCAM. Efeito de desnaturação vs MgCl2
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
1
5
Antígeno , ug
Sem desnaturação, 1 mM MgCl2
0
1
5
Antígeno , ug
75C, 5min,Sem MgCl2
0
1
5
Antígeno , ug
75C, 5min, 1mM MgCl2
Controle de Apt4
Conjunto 1
Conjunto 2
Conjunto 3

FIG. 20H

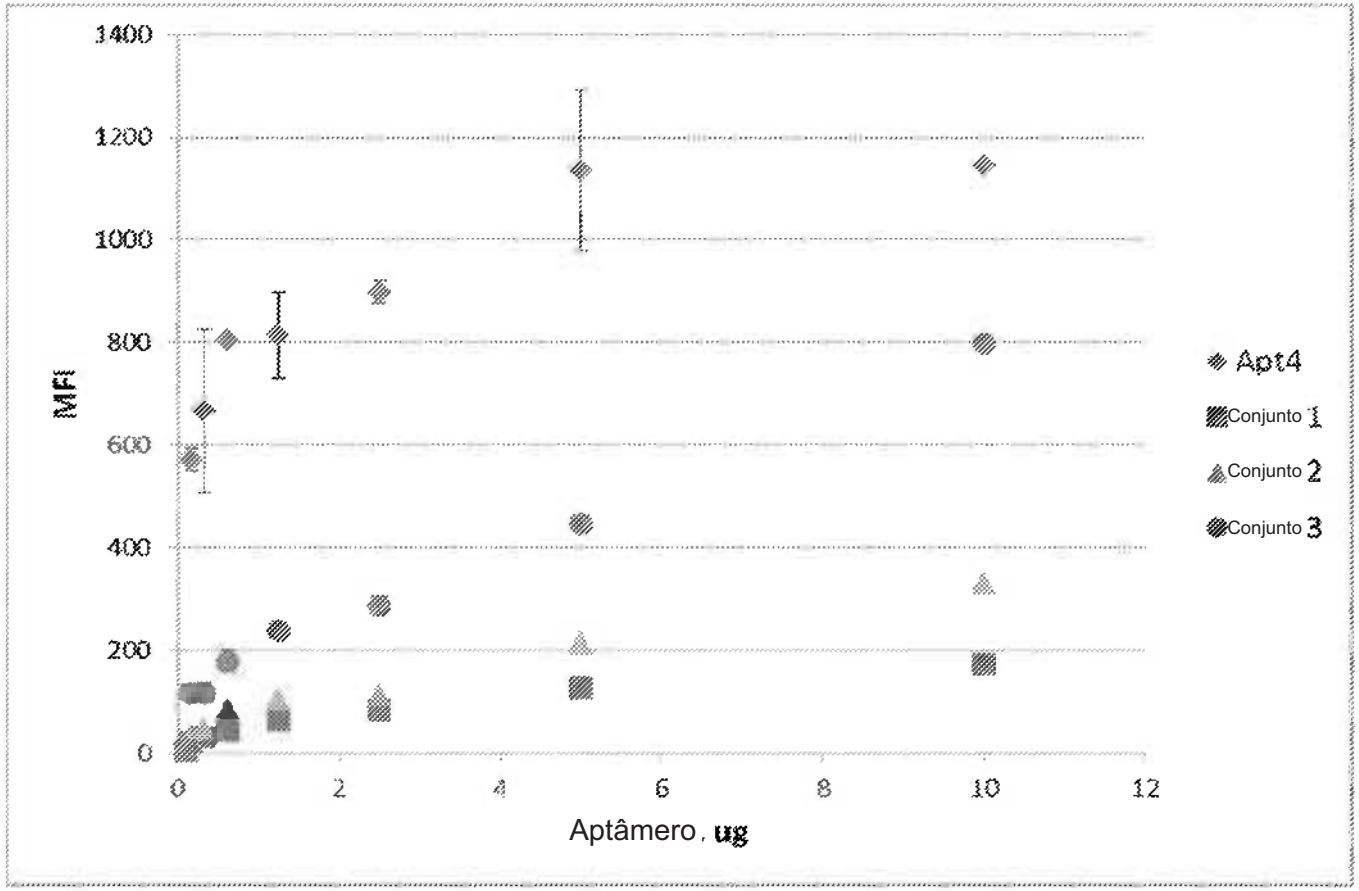

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
MFI
0
2
4
6
8
10
12
Aptâmero, ug
Apt4
Conjunto 1
Conjunto 2
Conjunto 3

FIG. 20I

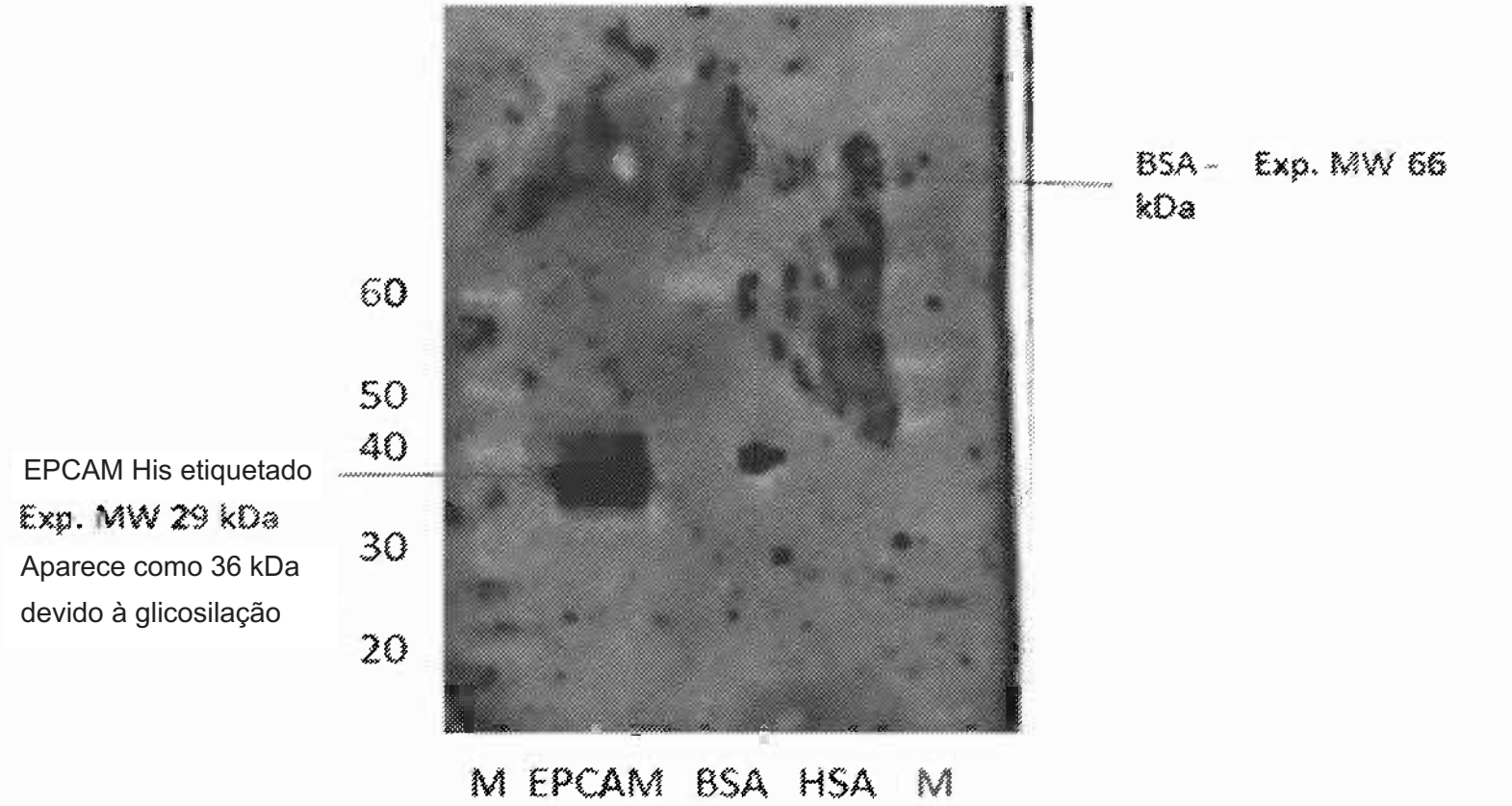
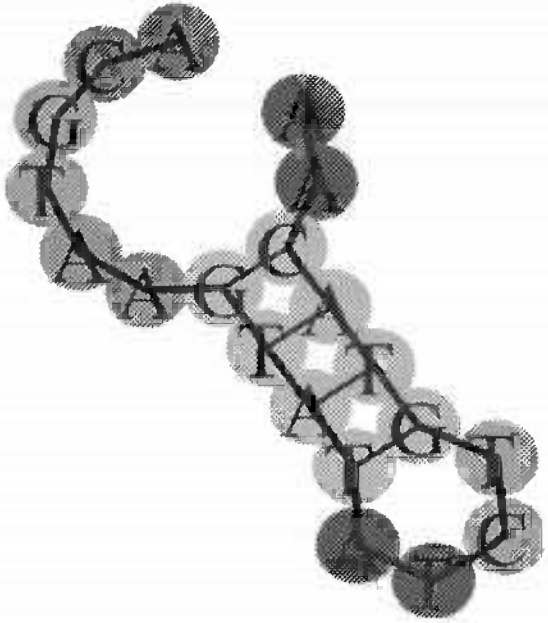

BSA – Exp. MW 66 kDa
60
50
40
30
20
EPCAM His etiquetado
Exp. MW 29 kDa
Aparece como 36 kDa
devido à glicosilação
M EPCAM BSA HSA M

FIG. 20J

A) CAR016 (SEQ ID NO. 230840)



B) CAR016_M13 (SEQ ID NO. 230883)



FIGs. 21A-21B

C) CAR016_M14 (SEQ ID NO. 230884)



D) CAR016_M23 (SEQ ID NO. 230893)



FIGs. 21C-21D

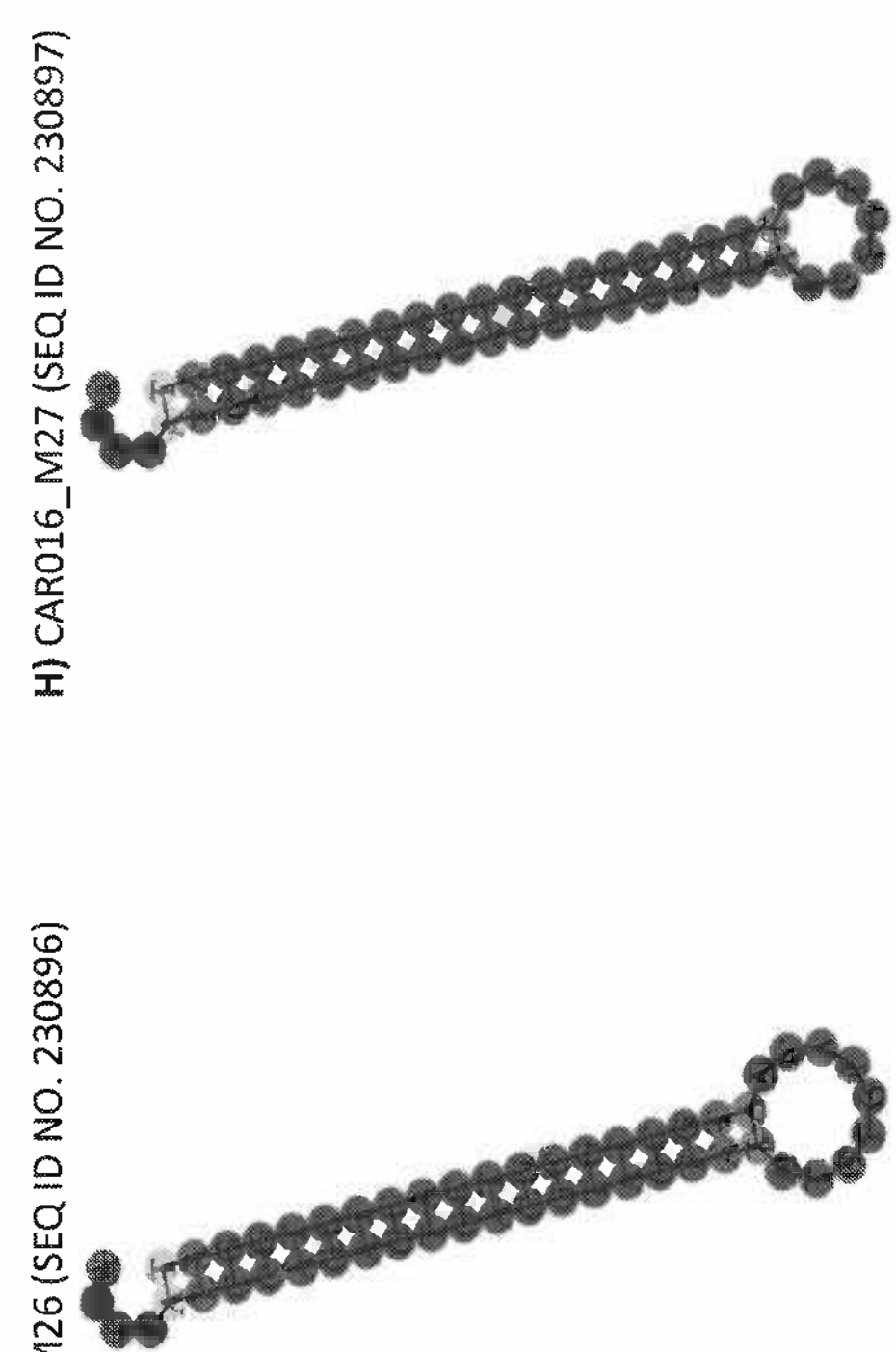
E) CAR016_M24 (SEQ ID NO. 230894)



F) CAR016_M25 (SEQ ID NO. 230895)

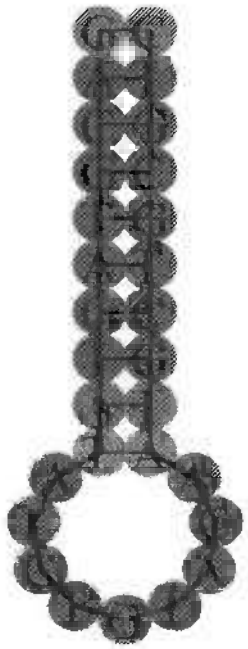


FIGs. 21E-21F

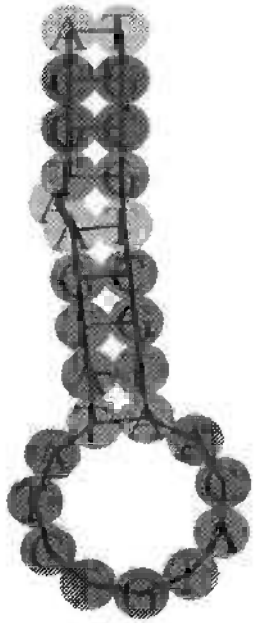


FIGs. 21G-21H

I) CAR016_M28 (SEQ ID NO. 230898)



J) CAR016_M29 (SEQ ID NO. 230899)



FIGs. 21I-21J

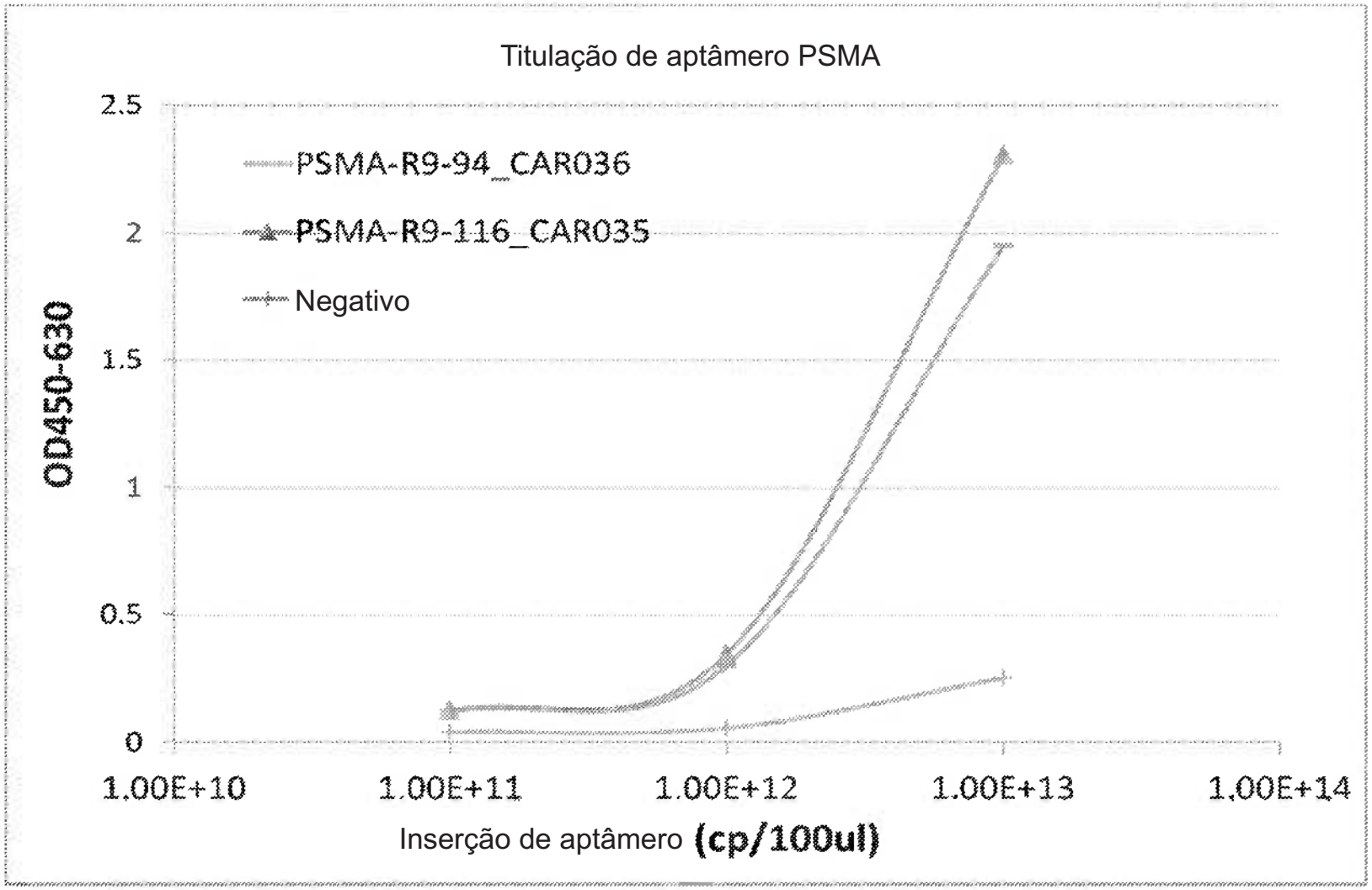

Titulação de aptâmero PSMA
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD450-630
PSMA-R9-94_CAR036
PSMA-R9-116_CAR035
Negativo
1.00E+10
1.00E+11
1.00E+12
1.00E+13
1.00E+14
Inserção de aptâmero (cp/100ul)

FIG. 22

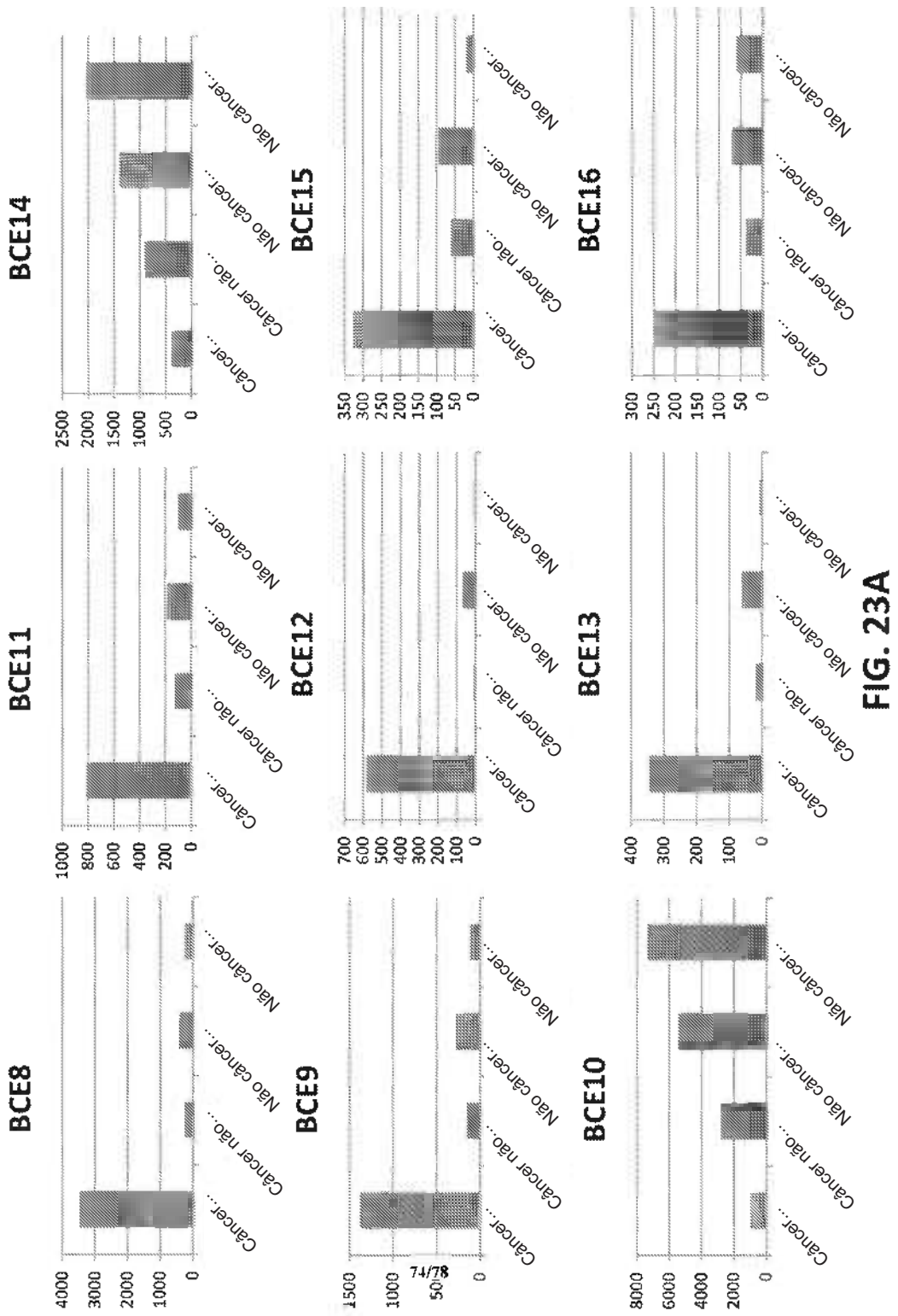

BCE8
BCE9
BCE10
BCE11
BCE12
BCE13
BCE14
BCE15
BCE16
Câncer...
Câncer não...
Não câncer...
Não câncer...
4000
3000
2000
1000
0
1500
1000
500
0
8000
6000
4000
2000
0
1000
800
600
400
200
0
700
600
500
400
300
200
100
0
400
300
200
100
0
2500
2000
1500
1000
500
0
350
300
250
200
150
100
50
0
300
250
200
150
100
50
0

FIG. 23A

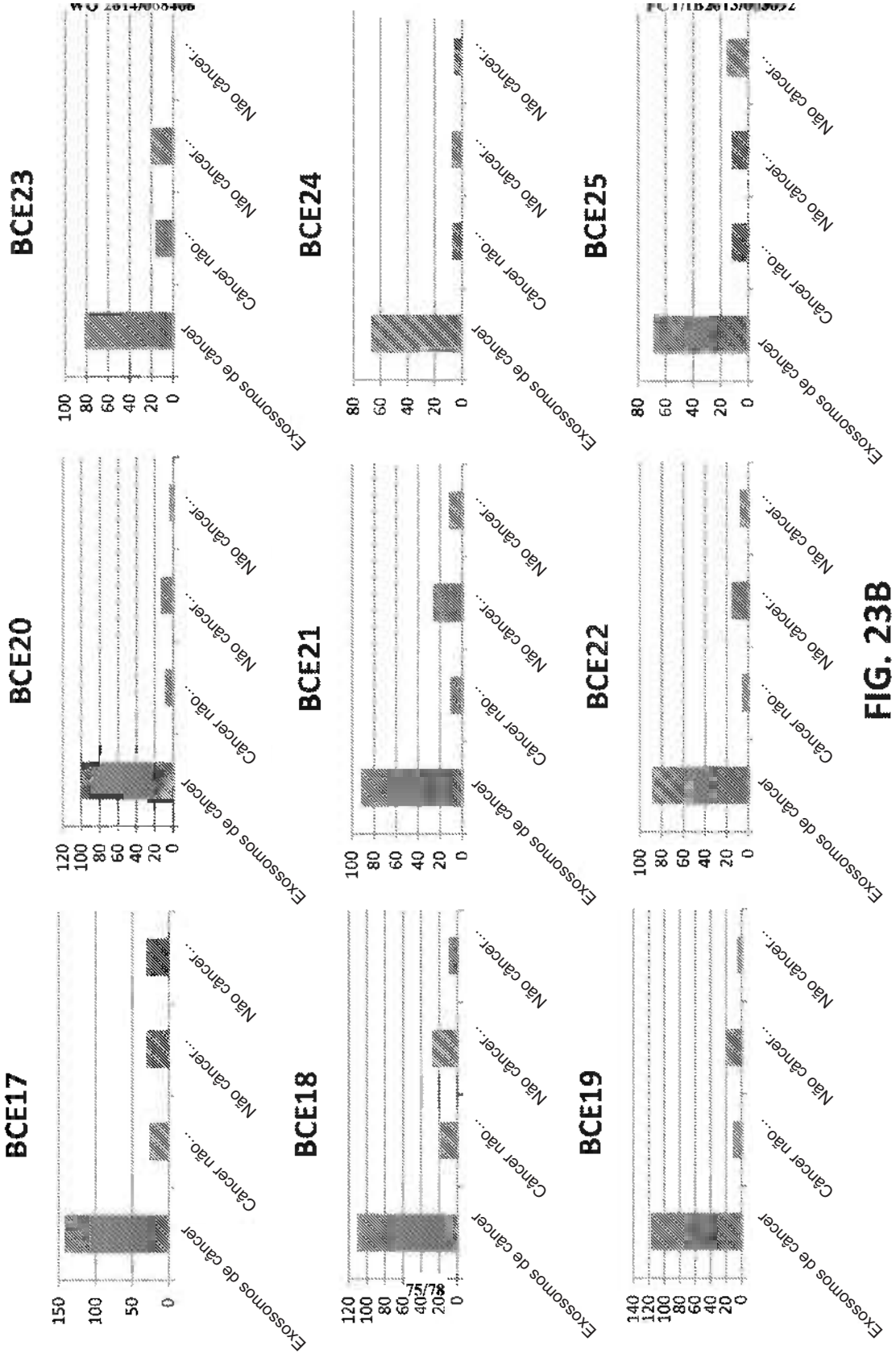

BCE17
BCE18
BCE19
BCE20
BCE21
BCE22
BCE23
BCE24
BCE25
Exossomos de cãncer
Cãncer não...
Não cãncer...
Não cãncer...

FIG. 23B

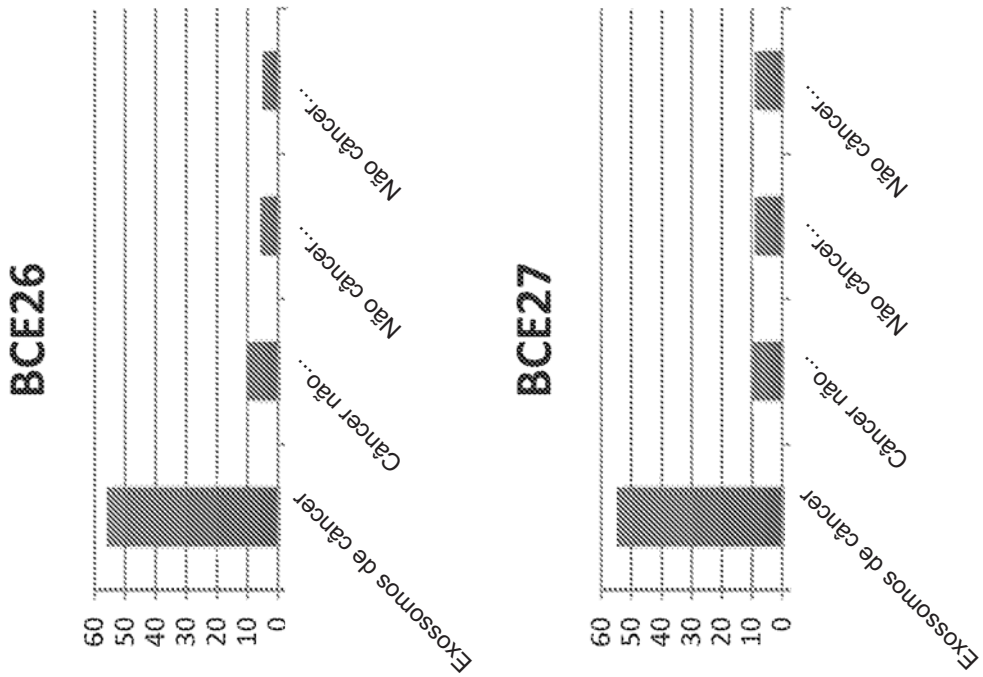

BCE26
60
50
40
30
20
10
0
Exossomos de câncer
Câncer não...
Não câncer...
Não câncer...
BCE27
60
50
40
30
20
10
0
Exossomos de câncer
Câncer não...
Não câncer...
Não câncer...

FIG. 23C

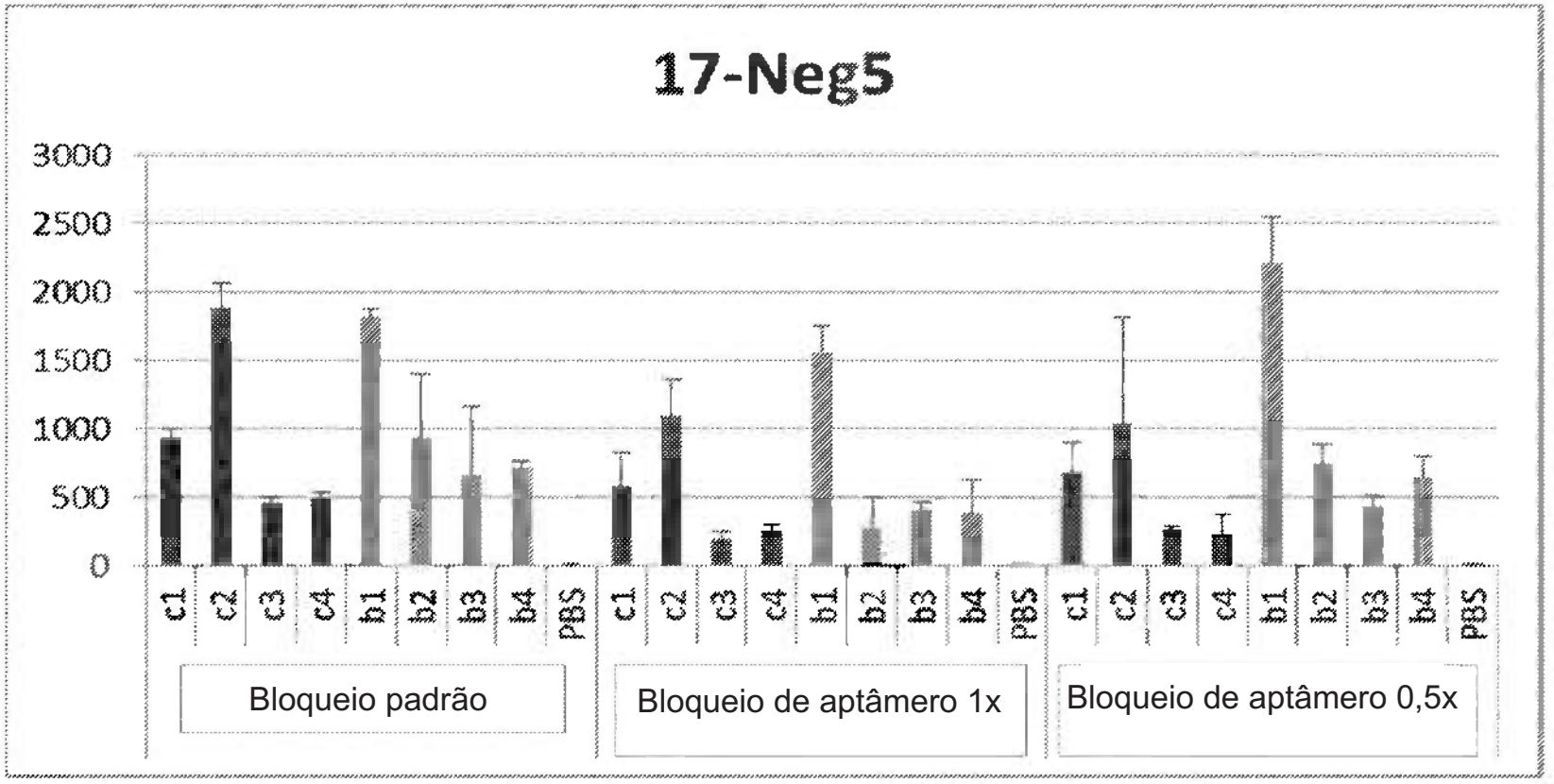

17-Neg5
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
c1
c2
c3
c4
b1
b2
b3
b4
PBS
Bloqueio padrão
Bloqueio de aptâmero 1x
Bloqueio de aptâmero 0,5x

FIG. 24A

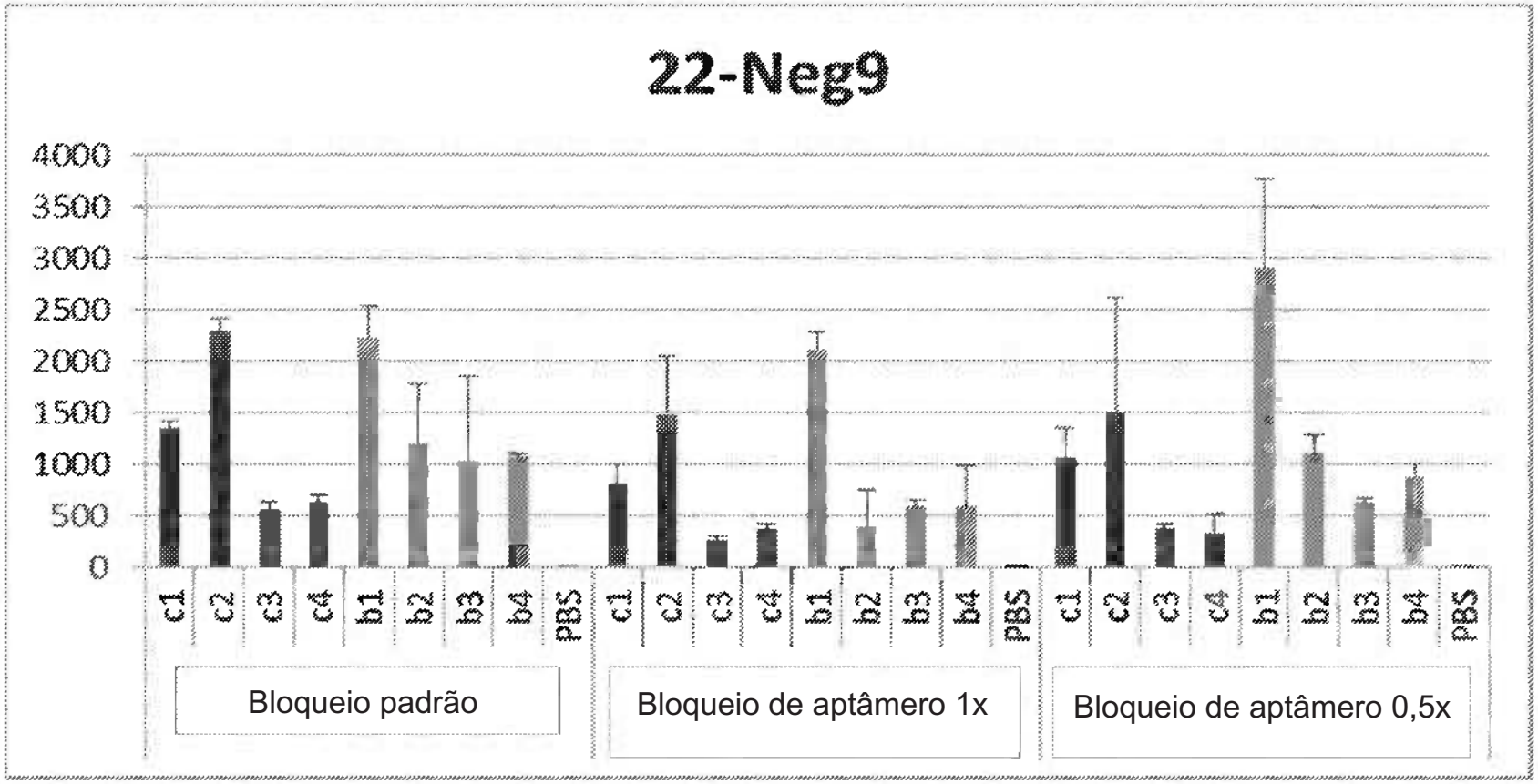

22-Neg9
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
c1
c2
c3
c4
b1
b2
b3
b4
PBS
Bloqueio padrão
Bloqueio de aptâmero 1x
Bloqueio de aptâmero 0,5x

FIG. 24B

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA CARACTERIZAR UM CÂNCER".**

A presente invenção refere-se a métodos e composições para aptâmeros específicos e conjuntos de aptâmeros que se ligam a biomarcadores de interesse, tais como, antígenos de superfície de microvesícula ou fragmentos funcionais dos antígenos de superfície de microvesícula. Em diversas modalidades, os aptâmeros da invenção são usados em processos de diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico para avaliar uma amostra biológica quanto à presença ou níveis de biomarcadores, tais como, microvesículas que são determinadas a fornecer uma leitura de diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico. O diagnóstico, prognóstico, ou teragnóstico pode ser relacionado a câncer ou outras doenças e distúrbios. A invenção também fornece métodos e composição para facilitar a avaliação de biblioteca de aptâmeros e métodos de detecção de aptâmeros.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



9CFD6DABC857A3CC

Campo 2



918371CEB6AB13AC

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: p213306 32064038_1.txt
- Data de Geração do Código: 19-10-2016
- Hora de Geração do Código: 11:16:52
- Código de Controle:
    - Campo 1: 9CFD6DABC857A3CC
    - Campo 2: 918371CEB6AB13AC