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

(21) BR 112016004153-4 A2

(22) Data do Depósito: 28/08/2014

(43) Data da Publicação Nacional: 05/03/2015

(54) Título: "MÉTODO PARA CARACTERIZAR UMA DOENÇA OU DISTÚRBIO, KIT, COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA GERAR UMA BIBLIOTECA DE ENTRADA, OLIGONUCLEOTÍDEO, PLURALIDADE DE OLIGONUCLEOTÍDEOS E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM APTÂMERO

(51) Int. Cl.: C40B 40/08; C07H 21/02; C07H 21/04.

(30) Prioridade Unionista: 03/04/2014 US 61/974,949; 05/12/2013 US 61/912,471; 06/01/2014 US 61/924,192; 06/03/2014 US 61/949,216; 06/09/2013 US 61/874,621; (...).

(71) Depositante(es): CARIS LIFE SCIENCES SWITZERLAND HOLDINGS GMBH.

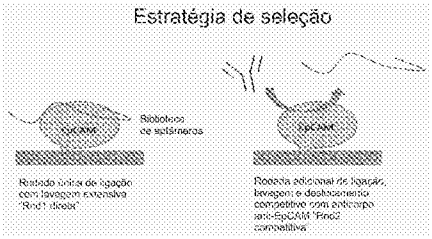
(72) Inventor(es): DAVID SPETZLER; VALERIY DOMENYUK; NIANQING XIAO; ADAM STARK; ZHENYU ZHONG.

(86) Pedido PCT: PCT US2014053306 de 28/08/2014

(87) Publicação PCT: WO 2015/031694 de 05/03/2015

(85) Data da Fase Nacional: 25/02/2016

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a métodos e composições para oligonucleotídeos que ligam biomarcadores-alvo e permite a caracterização de um fenótipo. Os biomarcadores-alvo podem incluir antígenos de microvesícula, incluindo microvesículas derivadas de várias doenças. A caracterização pode compreender detecção, diagnóstico, prognóstico, teragnóstico ou outra caracterização de uma doença ou distúrbio.



"MÉTODO PARA CARACTERIZAR UMA DOENÇA OU DISTÚRBIO, KIT, COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA GERAR UMA BIBLIOTECA DE ENTRADA, OLIGONUCLEOTÍDEO, PLURALIDADE DE OLIGONUCLEOTÍDEOS E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM APTÂMERO".

REFERÊNCIA CRUZADA

[001] Este pedido reivindica o benefício dos Pedidos de Patente Provisórios nº 61/871.107, depositado em 28 de agosto de 2013; nº 61/874.621, depositado em 6 de setembro de 2013; nº 61/900.975, depositado em 6 de novembro de 2013; nº 61/912.471, depositado em 5 de dezembro de 2013; nº 61/924.192, depositado em 6 de janeiro de 2014; nº 61/949.216, depositado em 6 de março de 2014; nº 61/974.949, depositado em 3 de abril de 2014; nº 61/990.085, depositado em 7 de maio de 2014; nº 61/994.704, depositado em 16 de maio de 2014; e nº 62/024.436, depositado em 14 de julho de 2014; cujos pedidos estão incorporados ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS APRESENTADA POR MEIO DE EFS-WEB

[0002] O conteúdo total 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(a), está incorporado ao presente documento em sua totalidade, a título de referência, para todos os propósitos. A listagem de sequências está dentro do arquivo de texto eletronicamente depositado que é identificado conforme segue:

[0003] Nome do Arquivo: 37901820601SeqList.txt

[0004] Data de Criação: 27 de agosto de 2014

[0005] Tamanho (bytes): 101.923.503 bytes

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0006] A presente invenção refere-se, em geral, ao campo de aptâmeros que podem se ligar 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 se refere, ainda, a materiais e métodos para a administração de aptâmeros que podem se ligar a microvesículas. As microvesículas podem ser derivadas de células indicativas de câncer, por exemplo, um câncer de mama.

[0007] Os aptâmeros são moléculas de ácido nucleico multiméricas que têm afinidade de ligação específica a moléculas, que pode ser através de interações além do pareamento de bases de Watson-Crick clássico. Os termos aptâmero, oligonucleotídeo, polinucleotídeo ou similares podem ser usados de modo intercambiável no presente documento.

[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 25 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 especifi-

cidade 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 inteiramente *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. Enquanto a maioria dos agentes terapêuticos de anticorpo atualmente aprovados é administrada por infusão intravenosa (tipicamente durante 2 a 4 horas), os aptâmeros podem ser administrados por injeção subcutânea (a biodisponibilidade de aptâmero por meio de administração subcutânea é >80% em estudos em 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 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. Enquanto as dificuldades de escalonamento de produção são atualmente limitantes à disponibilidade de alguns agentes biológicos e o custo de capital de uma fábrica de produção de proteína de grande escala é enorme, um único sintetizador de oligonucleotídeo de grande escala pode produzir mais 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 publicação, 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. O diagnóstico pode estar relacionado a um câncer, por exemplo, um câncer de mama. Em outras modalidades, os aptâmeros da invenção são quimicamente modificados ou compostos em uma composição farmacêutica para aplicações terapêuticas.

[0017] Em um aspecto, a invenção fornece um oligonucleotídeo pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homólogo à SEQ ID NO. 10558. Em um aspecto, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 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, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, 500.000, 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 oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga à SEQ ID NO. 10558.

[0018] Em outro aspecto, a invenção fornece um pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65,

70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 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, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000 ou 500.000 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga a uma sequência selecionada dentre as SEQ ID NOs. 10559 a 510558. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeo que compreende pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos 99% dos oligonucleotídeos listados nas SEQ ID NOs. 10559 a 510558.

[0019] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um oligonucleotídeo que compreende uma sequência de ácidos nucleicos ou uma porção da mesma que é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga a uma sequência selecionada dentre as SEQ ID NOs. 510559 a 510578. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga às SEQ ID NOs. 510559 a 510578.

[0020] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um oligonucleotídeo que compreende uma sequência de ácidos nucleicos ou uma porção da mesma que é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga a uma sequência selecionada dentre as SEQ ID NOs. 510579 a 510598. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19, 20 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga às SEQ ID NOs. 510579 a 510598.

[0021] Em um aspecto, a invenção fornece um oligonucleotídeo que compreende uma sequência de ácidos nucleicos ou uma porção da mesma que é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga a uma sequência selecionada dentre as SEQ ID NOs. 510599 a 510763. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 125, 130, 140, 150, 160 ou 165 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga às SEQ ID NOs. 510599 a 510763. Em ainda outro aspecto relacionado, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 125, 130, 140, 150, 160 ou 165 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga às SEQ ID NOs. em uma linha da Tabela 16.

[0022] As sequências de ácidos nucleicos fornecidas no presente documento podem ser também modificadas conforme desejado contanto que os aspectos funcionais sejam ainda mantidos (por exemplo, ligação a vários alvos ou capacidade de caracterizar um fenótipo). Tal modificação pode ser referida como uma "modificação funcional" no

presente documento. Uma modificação funcional pode intensificar ou ter efeito mínimo ou nenhum efeito sobre os aspectos funcionais de um oligonucleotídeo. Por exemplo, os oligonucleotídeos podem compreender DNA ou RNA, incorporar vários nucleotídeos não naturais, incorporar outras modificações químicas ou compreender várias deleções ou inserções. Tais modificações podem facilitar a síntese, estabilidade, entrega, identificação, etc, ou pode ter pouco a nenhum efeito na prática. Em alguns casos, alguns nucleotídeos em um oligonucleotídeo podem ser substituídos enquanto mantêm aspectos funcionais do oligonucleotídeo. Similarmente, as regiões de flanqueamento 5' e 3' podem ser substituídas. Em ainda outros casos, apenas uma porção de um oligonucleotídeo pode ser determinada para direcionar sua funcionalidade de modo que outras porções possam ser deletadas ou substituídas. Inúmeras técnicas para sintetizar e modificar nucleotídeos e polinucleotídeos, incluindo várias modificações químicas, são reveladas no presente documento e são conhecidas no campo.

[0023] Em um aspecto, a invenção também fornece um método que compreende colocar um oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos em contato com uma amostra e detectar a presença ou o nível de ligação do oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos a um alvo na amostra, em que, o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos podem ser aqueles fornecidos na invenção acima. A amostra pode compreender uma amostra biológica, uma amostra orgânica, uma amostra inorgânica, um tecido, uma cultura celular, um fluido corporal, sangue, soro, uma célula, uma microvesícula, um complexo proteico, um complexo lipídico, um carboidrato ou qualquer combinação, fração ou variação dos mesmos. O alvo pode compreender uma célula, uma organela, um complexo proteico, uma lipoproteína, um carboidrato, uma microvesícula, um fragmento de membrana, uma molécula pequena, um metal pesado, uma toxina ou um fármaco.

[0024] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método que compreende: a) colocar uma amostra biológica que compreende microvesículas em contato com uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeo, em que, opcionalmente, a biblioteca de sondas de oligonucleotídeo compreende um oligonucleotídeo ou uma pluralidade de oligonucleotídeos fornecidos pela invenção acima; b) identificar oligonucleotídeos ligados a pelo menos uma porção das microvesículas; e c) caracterizar a amostra com base em um perfil dos oligonucleotídeos identificados.

[0025] Em outro aspecto, a invenção fornece um método que compreende: a) colocar uma amostra em contato com uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos que compreende 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} oligonucleotídeos de sequências de oligonucleotídeos diferentes para formar uma mistura em uma solução, em que os oligonucleotídeos têm capacidade para ligar uma pluralidade de entidades na amostra para formar complexos, em que, opcionalmente, a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos compreende um oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos, conforme fornecido pela invenção acima; b) particionar os complexos formados na etapa (a) da mistura; e c) detectar oligonucleotídeos pres4entes nos complexos particionados na etapa (b) para identificar um perfil de oligonucleotídeo para a amostra. Em uma modalidade, a etapa de detecção compreende realizar sequenciamento de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos, amplificação de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos e/ou hibridização de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos a um arranjo. O arranjo pode ser qualquer arranjo útil, tal como um arranjo plano ou baseado em partícula.

[0026] Em ainda um outro aspecto, a invenção fornece um método para gerar uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos enriquecida

que compreende: a) colocar uma primeira biblioteca de oligonucleotídeos em contato com uma amostra biológica de teste e uma amostra biológica de controle, em que complexos são formados entre as entidades biológicas presentes nas amostras biológicas e uma pluralidade de oligonucleotídeos presente na primeira biblioteca de oligonucleotídeos; b) particionar os complexos formados na etapa (a) e isolar os oligonucleotídeos nos complexos para produzir um subconjunto de oligonucleotídeos para cada uma dentre a amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle; c) colocar os subconjuntos de oligonucleotídeos em (b) em contato com a amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle, em que complexos são formados entre as entidades biológicas presentes nas amostras biológicas e uma segunda pluralidade de oligonucleotídeos presente nos subconjuntos de oligonucleotídeos para gerar um grupo de segundo subconjunto de oligonucleotídeos; e d) repetir, opcionalmente, as etapas b) e c), uma, duas, três ou mais vezes para produzir um respectivo terceiro, quarto, quinto ou mais grupo de subconjunto de oligonucleotídeos, produzindo, assim, a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos enriquecida. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que 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, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 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, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000 ou 500.000 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que a pluralidade resulta do método nesse parágrafo, em que a biblioteca tem capacidade para distinguir um primeiro fenótipo de um segundo fenótipo. Em algumas modalidades, o primeiro fenótipo compreende uma doença ou distúrbio e o segundo fenótipo compreende um estado saudável; ou em que o

primeiro fenótipo compreende uma doença ou distúrbio e o segundo fenótipo compreende uma doença ou distúrbio diferente; ou em que o primeiro fenótipo compreende um estágio ou progressão de uma doença ou distúrbio e o segundo fenótipo compreende um estágio ou progressão diferente da mesma doença ou distúrbio; ou em que o primeiro fenótipo compreende uma resposta positiva para uma terapia e o segundo fenótipo compreende uma resposta negativa para a mesma terapia.

[0027] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um método para caracterizar uma doença ou distúrbio que compreende: a) colocar uma amostra biológica de teste em contato com o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos fornecidos pela invenção; b) detectar uma presença ou nível de complexos formados na etapa (a) entre o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos fornecidos pela invenção e um alvo na amostra biológica de teste; e c) comparar a presença ou nível detectado na etapa (b) a um nível de referência de uma amostra biológica de controle, caracterizando, assim, a doença ou distúrbio. A etapa de detecção pode compreender realizar sequenciamento de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos, amplificação de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos e/ou hibridização de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos a um arranjo. O sequenciamento pode ser sequenciamento de alto rendimento ou next generation.

[0028] Nos métodos da invenção, a amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle, cada uma, compreender uma amostra de tecido, uma cultura celular ou um fluido biológico. Em algumas modalidades, o fluido biológico compreende um fluido corporal. Os fluidos corporais dentro do método da invenção compreendem sangue periférico, soros, plasma, ascites, urina, fluido cerebrospinal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico,

cerume, leite materno, fluido de lavagem bronqueoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de cowper ou fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido de cisto, fluido pleural e peritoneal, fluido pericardial, linfa, quimo, quilo, bílis, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreções vaginais, secreção mucosal, água de defecação, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades sinusais, aspirações broncopulmonares, fluido da cavidade blastocística ou sangue do cordão umbilical. Em algumas modalidades preferenciais, o fluido corporal compreende sangue, soro ou plasma. O fluido biológico pode compreender microvesículas. Em tal caso, complexos podem ser formados entre o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos e pelo menos uma das microvesículas.

[0029] A amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle podem compreende, ainda, microvesículas isoladas, em que, opcionalmente, as microvesículas são isoladas com o uso de pelo menos um dentre cromatografia, filtração, ultrafiltração, centrifugação, ultracentrifugação, citometria de fluxo, captura por afinidade (por exemplo, a uma superfície plana, coluna ou microesfera), precipitação de polímero e uso de microfluidos. As vesículas podem ser também isoladas após o contato com o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos.

[0030] Em várias modalidades dos métodos da invenção, o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos liga um polipeptídeo ou fragmento do mesmo. O polipeptídeo ou fragmento do mesmo pode ser solúvel ou ligado à membrana, em que, opcionalmente, a membrana compreende uma membrana de microvesícula. A membrana poderia ser também de uma célula ou um fragmento de uma célula de vesícula. Em algumas modalidades, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo compreende um biomarcador na Tabela 3 ou Tabela 4. Por exem-

plo, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo poderia ser um marcador de vesícula geral, tal como na Tabela 3, ou um marcador relacionado a tecido ou relacionado a doença, como na Tabela 4. O oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos pode ligar-se a um antígeno de superfície de microvesícula na amostra biológica. Por exemplo, o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos pode ser enriquecido a partir de uma biblioteca virgem contra microvesículas.

[0031] A doença ou distúrbio detectado pelo oligonucleotídeo, pluralidade de oligonucleotídeos ou métodos fornecidos aqui pode compreender qualquer doença ou distúrbio adequado de interesse, incluindo, sem limitação, câncer de mama, doença de Alzheimer, asma brônquica, carcinoma de célula transicional da bexiga, osteoblastoclastoma celular gigante, tumor cerebral, adenocarcinoma colorretal, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), carcinoma de células escamosas do cérvice, infarto agudo do miocárdio (AMI)/insuficiência cardíaca aguda, doença de Chron, diabetes mellitus tipo II, carcinoma de esôfago, carcinoma de células escamosas da laringe, leucemia aguda e crônica da medula óssea, carcinoma de pulmão, linfoma maligno, esclerose múltipla, carcinoma ovariano, doença de Parkinson, adenocarcinoma de próstata, psoríase, artrite reumatoide, carcinoma de células renais, carcinoma de células escamosas da pele, adenocarcinoma do estômago, carcinoma da glândula tireoide, câncer de testículo, colite ulcerativa ou adenocarcinoma uterino.

[0032] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio 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 incluir, sem limitação, um dentre leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cancros relacionados à AIDS; linfoma relaciona-

dos 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 brônquica; 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 de pulmão; 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 Sezary; 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. A afecção maligna pode incluir, sem limitação, Esôfago de Barrett. A doença autoimune pode incluir, sem limitação, um dentre doença inflamatória intes-

tinal (IBD), doença de Crohn (CD), colite ulcerativa (UC), inflamação pélvica, vasculite, psoríase, diabetes, hepatite autoimune, esclerose múltipla, mastenia grave, diabetes tipo I, artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), tireoidite de Hashimoto, doença de Grave, espondilite anquilosante, doença de Sjogrens, síndrome CREST, escleroderma, doença reumática, rejeição de órgão, colangite esclerosante primária ou sepse. A doença cardiovascular pode incluir, sem limitação, um dentre aterosclerose, insuficiência cardíaca congestiva, placa vulnerável, derrame, isquemia, pressão sanguínea alta, estenose, oclusão de vaso ou um evento trombótico. A doença neurológica pode incluir, sem limitação, um dentre 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, sem limitação, uma dentre fibromialgia, dor neuropática crônica ou dor neuropática periférica. A doença infecciosa pode incluir, sem limitação, um dentre infecção bacteriana, infecção viral, infecção por levedura, doença de Whipple, doença de Prion, cirrose, Staphylococcus aureus resistente à meticilina, HIV, HCV, hepatite, sífilis, meningite, malária, tuberculose, influenza. O versado na técnica perceberá que o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos ou métodos da invenção podem ser usados para avaliar qualquer número dessas ou outras doenças e distúrbios relacionados.

[0033] Em algumas modalidades da invenção, o oligonucleotídeo

ou pluralidade de oligonucleotídeos e métodos de uso dos mesmos são úteis para caracterizar determinadas doenças ou estados doentios. Conforme desejado, um conjunto de oligonucleotídeos úteis para caracterizar várias doenças é montado para criar um conjunto mestre que pode ser útil para caracterizar várias doenças. Por exemplo, a combinação de SEQ ID NOs. 510599 a 510763 fornecida no presente documento compreende tal conjunto. O versado na técnica também perceberá que conjuntos de oligonucleotídeos úteis para caracterizar doenças ou distúrbios específicos podem ser também criados. Os oligonucleotídeos e conjuntos dos mesmos podem ser modificados conforme descrito no presente documento.

[0034] Em uma modalidade, a doença ou distúrbio compreende um câncer de mama e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou pelo menos 40 das SEQ ID NOs. 510559 a 510598. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0035] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende doença de Alzheimer e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510604, 510605, 510608, 510609, 510612, 510614, 510629, 510632, 510633, 510634, 510641, 510642, 510643, 510646, 510648, 510649, 510651, 510652, 510653, 510655, 510661, 510667, 510673, 510675, 510676, 510677, 510678, 510679, 510681, 510683, 510685, 510687, 510688, 510690, 510694, 510696, 510702, 510707, 510709, 510726, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510732, 510737, 510740, 510748, 510749, 510751, 510752, 510754,

510756, 510757, 510758, 510761 e 510762. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende doença de Alzheimer e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510601, 510603, 510606, 510608, 510609, 510611, 510613, 510614, 510615, 510619, 510621, 510625, 510628, 510629, 510630, 510632, 510634, 510635, 510636, 510637, 510644, 510647, 510648, 510651, 510652, 510654, 510657, 510665, 510666, 510667, 510668, 510677, 510678, 510679, 510687, 510692, 510693, 510696, 510698, 510699, 510701, 510702, 510707, 510708, 510710, 510713, 510716, 510725, 510726, 510728, 510731, 510732, 510733, 510734, 510736, 510741, 510748, 510749, 510755, 510757, 510758, 510761 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0036] A doença ou distúrbio pode compreender asma brônquica e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510601, 510614, 510619, 510623, 510627, 510631, 510633, 510635, 510647, 510655, 510656, 510660, 510672, 510689, 510690, 510693, 510698, 510701, 510702, 510707, 510709, 510710, 510713, 510720, 510723, 510724, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510735, 510738, 510743, 510744, 510745, 510746, 510748, 510749, 510750, 510751, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761 e 510762. A doença ou distúrbio pode também compreender asma brônquica e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510608, 510609, 510610, 510611, 510617, 510619, 510622, 510631, 510632, 510634, 510635, 510637, 510642, 510643, 510644, 510652, 510655, 510657, 510658, 510665, 510668, 510673, 510675, 510676, 510677, 510678, 510679, 510683, 510691, 510701, 510703, 510704, 510706, 510708, 510709, 510714, 510725, 510736, 510737, 510740, 510741, 510742 e 510756. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0037] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de célula transicional da bexiga e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510607, 510619, 510623, 510631, 510632, 510635, 510641, 510642, 510647, 510656, 510657, 510658, 510659, 510673, 510674, 510683, 510686, 510693, 510695, 510701, 510702, 510707, 510708, 510711, 510716, 510722, 510725, 510726, 510728, 510731, 510734, 510737, 510744, 510748, 510749, 510751, 510752, 510753, 510756, 510757, 510758, 510761 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0038] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um osteoblastoclastoma celular gigante e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510612, 510620, 510635, 510637,

510641, 510644, 510648, 510658, 510662, 510663, 510667, 510668, 510670, 510676, 510678, 510679, 510682, 510683, 510685, 510686, 510699, 510708, 510712, 510722, 510737 e 510753. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0039] A doença ou distúrbio pode compreender um tumor cerebral e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510607, 510619, 510624, 510628, 510639, 510641, 510645, 510647, 510648, 510655, 510657, 510665, 510668, 510673, 510674, 510689, 510695, 510698, 510699, 510705, 510710, 510711, 510712, 510713, 510716, 510734, 510737, 510738 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0040] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um adenocarcinoma colorretal e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510603, 510607, 510611, 510616, 510618, 510619, 510623, 510624, 510641, 510644, 510646, 510647, 510655, 510656, 510672, 510673, 510690, 510693, 510695, 510698, 510701, 510702, 510709, 510711, 510714, 510716, 510719, 510723, 510724, 510725, 510726, 510730, 510731, 510734, 510735, 510737, 510738, 510743, 510744, 510748, 510749, 510751, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510760, 510761, 510762 e 510763. Os oligonucleo-

tídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0041] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende uma doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510604, 510608, 510609, 510612, 510614, 510616, 510619, 510620, 510629, 510634, 510637, 510640, 510647, 510649, 510653, 510661, 510666, 510667, 510669, 510673, 510678, 510682, 510689, 510690, 510701, 510707, 510715, 510723, 510727, 510728, 510749, 510754, 510755, 510757, 510758, 510762 e 510763. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende uma doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510601, 510609, 510611, 510613, 510620, 510634, 510637, 510647, 510648, 510654, 510664, 510668, 510679, 510694, 510696, 510698, 510699, 510701, 510705, 510706, 510710, 510718, 510734 e 510741. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0042] A doença ou distúrbio pode ser um carcinoma de células escamosas da cérvice e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510615, 510619, 510623, 510626, 510630, 510632,

510633, 510635, 510638, 510639, 510641, 510642, 510644, 510647, 510650, 510655, 510656, 510657, 510661, 510673, 510674, 510677, 510683, 510688, 510693, 510695, 510698, 510711, 510712, 510714, 510716, 510717, 510722, 510725, 510729, 510731, 510734, 510737, 510743, 510745, 510747, 510753, 510755, 510756, 510758, 510759 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0043] A doença ou distúrbio pode compreender um infarto agudo do miocárdio (AMI) ou insuficiência cardíaca aguda ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510607, 510608, 510613, 510626, 510629, 510631, 510634, 510635, 510638, 510639, 510646, 510648, 510656, 510667, 510669, 510671, 510672, 510675, 510682, 510689, 510698, 510701, 510707, 510710, 510715, 510721, 510723, 510727, 510728, 510730, 510731, 510734, 510735, 510743, 510744, 510748, 510749, 510751, 510752, 510757, 510758, 510760, 510761 e 510762. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende um infarto agudo do miocárdio (AMI) ou insuficiência cardíaca aguda ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510601, 510606, 510607, 510608, 510609, 510611, 510614, 510616, 510619, 510622, 510624, 510626, 510635, 510636, 510637, 510640, 510641, 510643, 510644, 510648, 510651, 510665, 510668, 510669, 510672, 510675, 510677, 510678, 510679, 510682, 510692, 510695, 510696, 510698, 510699, 510701, 510703, 510707, 510710, 510725, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510733, 510734, 510736, 510743, 510750, 510751,

510752, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0044] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio compreende doença de Chron e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510602, 510608, 510611, 510624, 510644, 510653, 510656, 510659, 510669, 510671, 510676, 510686, 510689, 510690, 510697, 510698, 510700, 510713, 510727, 510728, 510729, 510731, 510734, 510744, 510751 e 510757. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende doença de Chron e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510610, 510611, 510615, 510618, 510621, 510623, 510625, 510626, 510628, 510631, 510632, 510635, 510637, 510638, 510643, 510647, 510648, 510649, 510653, 510654, 510655, 510657, 510658, 510666, 510667, 510668, 510672, 510675, 510677, 510678, 510679, 510680, 510682, 510684, 510689, 510691, 510694, 510696, 510698, 510701, 510707, 510708, 510709, 510710, 510713, 510714, 510715, 510719, 510725, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510736, 510738, 510743, 510744, 510748, 510750, 510751, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761, 510762 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0045] A doença ou distúrbio pode compreender diabetes mellitus tipo II e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510604, 510608, 510610, 510611, 510614, 510616, 510620, 510624, 510629, 510632, 510634, 510640, 510649, 510667, 510669, 510670, 510671, 510678, 510685, 510700, 510701, 510702, 510707, 510709, 510718, 510721, 510723, 510726, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510733, 510735, 510743, 510748, 510749, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510760, 510761, 510762 e 510763. De modo relacionado, a doença ou distúrbio pode compreender diabetes mellitus tipo II e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510613, 510632, 510635, 510636, 510641, 510645, 510647, 510648, 510654, 510660, 510664, 510667, 510668, 510670, 510675, 510684, 510691, 510695, 510696, 510706, 510710, 510734 e 510749. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0046] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de esôfago e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510602, 510619, 510623, 510632, 510635, 510638, 510641, 510644, 510653, 510656, 510661, 510671, 510682, 510689, 510693, 510698, 510714, 510722, 510725, 510731, 510734, 510738, 510753 e 510761. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substitui-

ções ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0047] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de células escamosas da laringe e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510605, 510607, 510612, 510614, 510619, 510623, 510632, 510635, 510641, 510642, 510655, 510656, 510657, 510659, 510661, 510668, 510673, 510674, 510689, 510690, 510693, 510695, 510698, 510708, 510712, 510732, 510734, 510737, 510738, 510745, 510747, 510753 e 510755. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0048] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende uma leucemia crônica ou aguda da medula óssea e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510605, 510607, 510610, 510612, 510628, 510631, 510633, 510641, 510644, 510650, 510664, 510670, 510673, 510674, 510675, 510681, 510684, 510685, 510686, 510701, 510711, 510712, 510717, 510718, 510719, 510720, 510721, 510724, 510729, 510732, 510739, 510740, 510743, 510745, 510746, 510747, 510752, 510754 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0049] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de pulmão e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510604, 510626, 510628, 510631, 510633, 510635, 510649, 510650, 510654, 510668, 510672, 510674, 510677, 510699, 510701, 510702, 510710, 510712, 510715, 510717, 510719, 510720, 510721, 510723, 510724, 510726, 510727, 510733, 510735, 510738, 510743, 510744, 510745, 510746, 510747, 510750, 510751, 510754, 510755, 510758, 510760 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0050] A doença ou distúrbio pode compreender um linfoma maligno e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510601, 510611, 510618, 510623, 510624, 510631, 510632, 510636, 510638, 510641, 510644, 510645, 510647, 510656, 510660, 510662, 510672, 510673, 510675, 510690, 510693, 510701, 510702, 510707, 510708, 510713, 510717, 510719, 510721, 510723, 510724, 510725, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510735, 510737, 510743, 510744, 510749, 510751, 510752, 510754, 510755, 510756, 510757, 510758, 510760, 510762 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0051] A doença ou distúrbio pode também compreender esclero-

se múltipla e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510607, 510612, 510620, 510646, 510653, 510655, 510661, 510663, 510669, 510675, 510682, 510685, 510686, 510690, 510699, 510701, 510710, 510713, 510731, 510738, 510747, 510758 e 510762. De modo, relacionado, a doença ou distúrbio pode compreender esclerose múltipla e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510604, 510609, 510610, 510613, 510617, 510618, 510622, 510632, 510635, 510647, 510670, 510675, 510677, 510687, 510690, 510692, 510695, 510701, 510706, 510708, 510731 e 510733. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0052] Em uma modalidade, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de ovário e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510618, 510626, 510628, 510633, 510638, 510641, 510642, 510643, 510645, 510646, 510647, 510650, 510652, 510658, 510665, 510666, 510673, 510674, 510677, 510682, 510683, 510689, 510705, 510707, 510712, 510717, 510722, 510724, 510729, 510732, 510735, 510737, 510745, 510746, 510747, 510753 e 510756. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0053] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende doença de Parkinson e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510601, 510604, 510608, 510609, 510612, 510614, 510624, 510631, 510633, 510634, 510640, 510641, 510642, 510649, 510650, 510651, 510653, 510667, 510673, 510675, 510676, 510677, 510683, 510686, 510689, 510694, 510700, 510703, 510704, 510705, 510706, 510707, 510709, 510713, 510715, 510721, 510723, 510724, 510726, 510727, 510729, 510730, 510731, 510732, 510734, 510735, 510736, 510737, 510739, 510740, 510741, 510742, 510744, 510745, 510746, 510747, 510748, 510751, 510752, 510754, 510756, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761 e 510762. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende doença de Parkinson e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510601, 510606, 510608, 510609, 510610, 510614, 510616, 510632, 510634, 510643, 510644, 510647, 510648, 510654, 510662, 510664, 510665, 510667, 510668, 510670, 510677, 510678, 510679, 510687, 510692, 510696, 510698, 510699, 510701, 510703, 510704, 510706, 510708, 510710, 510722, 510727, 510734, 510736, 510741, 510742, 510753 e 510756. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0054] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um adenocarcinoma de próstata e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou

todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510603, 510607, 510619, 510623, 510624, 510628, 510641, 510642, 510644, 510647, 510650, 510655, 510656, 510657, 510669, 510673, 510674, 510677, 510684, 510688, 510689, 510690, 510695, 510698, 510701, 510709, 510710, 510718, 510726, 510734, 510737, 510738, 510739, 510757 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0055] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende psoríase e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510601, 510608, 510609, 510611, 510614, 510620, 510624, 510626, 510631, 510633, 510634, 510635, 510638, 510647, 510649, 510650, 510653, 510656, 510665, 510666, 510667, 510669, 510672, 510674, 510675, 510680, 510685, 510689, 510698, 510702, 510707, 510711, 510712, 510715, 510717, 510719, 510720, 510721, 510723, 510724, 510726, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510735, 510743, 510744, 510745, 510746, 510747, 510748, 510749, 510750, 510751, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761, 510762 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0056] A doença ou distúrbio pode ser psoríase e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510601, 510604,

510613, 510621, 510627, 510637, 510641, 510644, 510648, 510650, 510652, 510663, 510667, 510668, 510676, 510680, 510681, 510699, 510701, 510703, 510705, 510709, 510710, 510722, 510734, 510739, 510750 e 510753. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0057] A doença ou distúrbio pode ser também artrite reumatoide e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510603, 510604, 510607, 510608, 510609, 510614, 510616, 510622, 510625, 510627, 510629, 510630, 510634, 510635, 510636, 510637, 510640, 510642, 510646, 510649, 510650, 510651, 510653, 510656, 510664, 510665, 510667, 510671, 510675, 510677, 510678, 510679, 510682, 510689, 510699, 510707, 510726, 510727, 510728, 510729, 510731, 510733, 510737, 510738, 510748, 510755, 510758, 510761 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0058] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio compreende artrite reumatoide e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510601, 510603, 510604, 510606, 510607, 510608, 510609, 510610, 510611, 510612, 510613, 510614, 510616, 510617, 510618, 510622, 510623, 510625, 510629, 510630, 510634, 510635, 510636, 510637, 510638, 510639, 510640, 510641, 510643, 510644, 510645, 510646, 510648, 510649, 510651, 510652, 510653,

510654, 510658, 510662, 510663, 510664, 510665, 510666, 510667, 510668, 510669, 510671, 510673, 510677, 510678, 510679, 510682, 510685, 510692, 510696, 510697, 510698, 510699, 510701, 510703, 510710, 510716, 510722, 510725, 510726, 510727, 510730, 510733, 510734, 510738, 510741, 510743, 510753, 510755 e 510757. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0059] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de célula renal e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510603, 510604, 510606, 510608, 510614, 510616, 510622, 510628, 510629, 510630, 510632, 510634, 510635, 510640, 510644, 510645, 510646, 510652, 510653, 510656, 510664, 510665, 510666, 510667, 510671, 510675, 510677, 510683, 510685, 510687, 510690, 510701, 510722, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510732, 510733, 510734, 510738, 510748, 510749, 510752, 510753, 510758, 510761 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0060] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de células escamosas de pele e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510618, 510622, 510626, 510639, 510641, 510642, 510650, 510658, 510673, 510674, 510683,

510696, 510708, 510712, 510717, 510720, 510722, 510723, 510724, 510727, 510729, 510743, 510745, 510746, 510747, 510752, 510753, 510754, 510755, 510756, 510759, 510761 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0061] Em várias modalidades, a doença ou distúrbio compreende um adenocarcinoma do estômago e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510604, 510608, 510609, 510612, 510626, 510631, 510632, 510634, 510639, 510653, 510658, 510663, 510667, 510681, 510689, 510692, 510693, 510696, 510698, 510699, 510705, 510711, 510715, 510717, 510719, 510723, 510725, 510729, 510731, 510734, 510735, 510736, 510743, 510746, 510748, 510751, 510754, 510757, 510760, 510762 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0062] A doença ou distúrbio pode compreender um carcinoma da glândula tireoide e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510602, 510603, 510614, 510626, 510638, 510641, 510644, 510646, 510653, 510658, 510659, 510661, 510662, 510674, 510689, 510693, 510695, 510698, 510699, 510701, 510704, 510705, 510708, 510717, 510718, 510722, 510727, 510731, 510734, 510736, 510739, 510740, 510741, 510747, 510753 e 510755. Os oligonucleotídeos po-

dem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0063] A doença ou distúrbio pode também compreender um câncer testicular e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510603, 510607, 510615, 510616, 510618, 510619, 510621, 510622, 510623, 510624, 510630, 510636, 510637, 510641, 510644, 510645, 510647, 510650, 510654, 510655, 510656, 510657, 510659, 510662, 510665, 510670, 510673, 510674, 510681, 510684, 510685, 510687, 510688, 510689, 510690, 510692, 510693, 510695, 510696, 510698, 510700, 510701, 510704, 510707, 510712, 510713, 510717, 510718, 510726, 510734, 510737, 510738, 510739, 510740, 510742, 510747, 510756 e 510757. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0064] A doença ou distúrbio pode ser colite ulcerativa e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510607, 510611, 510612, 510616, 510620, 510621, 510622, 510624, 510626, 510632, 510633, 510636, 510646, 510655, 510659, 510672, 510673, 510675, 510676, 510677, 510682, 510684, 510691, 510692, 510702, 510703, 510704, 510705, 510706, 510707, 510709, 510710, 510715, 510721, 510723, 510724, 510728, 510729, 510730, 510731, 510735, 510736, 510737, 510739, 510740, 510741, 510743, 510744, 510748, 510751,

510752, 510754, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761 e 510762. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende colite ulcerativa e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510610, 510611, 510612, 510619, 510622, 510623, 510634, 510635, 510641, 510647, 510648, 510654, 510657, 510664, 510668, 510670, 510671, 510676, 510677, 510678, 510679, 510689, 510691, 510696, 510701, 510703, 510704, 510710, 510722, 510734, 510742 e 510753. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0065] A doença ou distúrbio pode ser também um adenocarcinoma uterino e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510601, 510612, 510621, 510626, 510637, 510641, 510644, 510650, 510653, 510669, 510675, 510684, 510686, 510687, 510696, 510714, 510717, 510722, 510739, 510743, 510745, 510746, 510753, 510755 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[0066] Em um aspecto, a invenção fornece um kit que compreende um reagente para executar os métodos da invenção fornecida no presente documento. Em um aspecto similar, a invenção contempla o uso de um reagente para executar os métodos da invenção fornecidos no presente documento. Nas modalidades, o reagente compreende um oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos. O oligonucleotí-

deo ou pluralidade de oligonucleotídeos podem ser aqueles fornecidos no presente documento. O reagente pode compreender vários outros componentes úteis, incluindo, sem limitação, um ou mais dentre: a) um reagente configurado para isolar uma microvesícula, em que, opcionalmente, o pelo menos um reagente configurado para isolar uma microvesícula compreende um agente de ligação a um antígeno de microvesícula, uma coluna, um substrato, uma unidade de filtração, um polímero, polietilenoglicol, PEG4000, PEG8000, uma partícula ou uma esfera; b) pelo menos um oligonucleotídeo configurado para atuar como um iniciador ou sonda a fim de amplificar, sequenciar, hibridizar ou detectar o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos; e c) um reagente configurado para remover uma ou mais proteínas abundantes de uma amostra, em que, opcionalmente, as uma ou mais proteínas abundantes compreendem pelo menos um dentre albumina, imunoglobulina, fibrinogênio e fibrina.

[0067] Em outro aspecto, a invenção fornece um aptâmero que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos cerca de 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. 8 a 21 ou uma sequência variável das mesmas conforme descrito na Tabela 8; b) SEQ ID NOs. 24 a 43 ou uma sequência variável das mesmas conforme descrito na Tabela 11; b) SEQ ID NOs. 44 a 10527; d) SEQ ID NOs. 10528 a 10557 ou uma sequência variável das mesmas conforme descrito na Tabela 12; ou e) um fragmento funcional de qualquer sequência anterior. O aptâmero pode reconhecer um antígeno de superfície de microvesícula. 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.

[0068] 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.

[0069] 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 se-

lecionada a partir do grupo que consiste em toxina de difteria, ricina, abrina, gelonina e exotoxina A de Pseudomonas. Os compostos com alto peso molecular não imunogênicos para uso com a invenção incluem polialquilenoglicóis, por exemplo, polietilenoglicol. 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.

[0070] 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.

[0071] 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 modo relacionado, 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) uma intensificação da entrega do agente ativo a um sítio de doença em relação à entrega do agente ativo sozinho; ou (b) uma intensificação de liberação de microvesículas que resulta em uma diminuição 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 diminuição em 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. Consultar acima e, ainda, a seção "Fenótipos".

[0072] A invenção fornece, ainda, um kit que compreende um aptâmero revelado no presente documento ou uma composição farmacêutica do mesmo.

[0073] 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. Consultar, por exemplo, as Figuras 2A e 2B e 16A.

[0074] 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.

[0075] 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.

[0076] Qualquer agente de ligação útil pode ser usado nos métodos em questão. Em algumas modalidades, os um ou mais agentes de ligação compreendem um anticorpo ou aptâmero para um antígeno de superfície de microvesícula selecionado a partir da Tabela 3, Tabela 4 e uma combinação das mesmas. 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.

[0077] A invenção contempla várias configurações. Por exemplo, um formato de "sanduiche" pode ser usado. Consultar, por exemplo, as Figuras 2A e 2B. 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.

[0078] 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.

[0079] 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 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.

[0080] 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 ou Tabela 4. O um ou mais aptâmeros podem ligar-se a um antígeno de superfície de microvesícula na amostra biológica.

[0081] O método fornecido no presente documento para detectar ligação de aptâmero a uma microvesícula ou para 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. Consultar, por exemplo, a seção "Fenótipos" no presente documento.

[0082] 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 relacionados aos aptâmeros da invenção. Por exemplo, o reagente pode compreender um aptâmero revelado no presente documento. O reagente pode compreen-

der, ainda, outros componentes úteis revelados no presente documento, incluindo, sem limitação, pelo menos um dentre: a) um reagente configurado para isolar uma microvesícula, em que, opcionalmente, o pelo menos um reagente configurado para isolar uma microvesícula compreende um agente de ligação a um antígeno de microvesícula, uma coluna, um substrato, uma unidade de filtração, um polímero, polietilenoglicol, PEG4000, PEG8000, uma partícula ou uma esfera; b) pelo menos um oligonucleotídeo configurado para atuar como um iniciador ou sonda a fim de amplificar, sequenciar, hibridizar ou detectar o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos; e c) um reagente configurado para remover uma ou mais proteínas abundantes de uma amostra, em que, opcionalmente, as uma ou mais proteínas abundantes compreendem pelo menos um dentre albumina, imunoglobulina, fibrinogênio e fibrina.

[0083] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição que compreende uma biblioteca de oligonucleotídeos de entrada para avaliar uma amostra de vesícula celular ou extracelular que compreende pelo menos dois subconjuntos de bibliotecas de oligonucleotídeos para gerar a biblioteca de oligonucleotídeos de entrada, em que um dos pelo menos dois subconjuntos de bibliotecas de oligonucleotídeos é fabricado com quantidades de nucleotídeos com um teor total de G e C que não é igual a 50%. Por exemplo, o teor total de G e C pode ser menor que 50%, ou o teor total de G e C pode ser maior que 50%. Em uma modalidade, pelo menos uma biblioteca de subconjunto é fabricada com um teor total de G e C que é maior que 50% e outra biblioteca de subconjunto é fabricada com um teor total de G e C menor que 50%. Em uma modalidade, as pelo menos duas bibliotecas de subconjunto compreendem três bibliotecas de subconjunto fabricadas com 25%, 50% e 75% de teor de G e C, respectivamente. As pelo menos duas bibliotecas de subconjunto podem ser fabricadas com quantida-

des de nucleotídeos similares ou iguais a pelo menos duas linhas na Tabela 13. Os nucleotídeos podem consistir em nucleotídeos de ocorrência natural ou nucleotídeos de ocorrência natural modificados, conforme desejado. Os nucleotídeos podem também compreender nucleotídeos de ocorrência não natural. Tais bibliotecas de oligonucleotídeos de entrada podem ser referidas como bibliotecas "GC" no presente documento.

[0084] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para gerar uma biblioteca de oligonucleotídeos de entrada da invenção, que compreende colocar em contato as pelo menos duas bibliotecas de oligonucleotídeos de subconjunto para gerar a biblioteca de oligonucleotídeos de entrada. A biblioteca de oligonucleotídeos de entrada pode ser analisada ou enriquecida para fornecer vários aptâmeros ou bibliotecas de sondas de oligonucleotídeos com o uso dos métodos descritos no presente documento.

[0085] Em um aspecto, a invenção fornece, um oligonucleotídeo que tem uma sequência que compreende uma região de adaptador de transpóson 5', uma região de deslocamento que compreende 0 ou mais nucleotídeos localizados em 5' para a região de adaptador de transpóson, uma região variável localizada em 5' para a região de deslocamento e uma região de iniciador esquerda localizada em 5' para a região variável. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 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, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, 500.000, 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 oligonucleotídeos diferentes, em que cada

uma das sequências de oligonucleotídeos compreende uma região de adaptador de transpóson 5', uma região de deslocamento que compreende 0 ou mais nucleotídeos localizados em 5' para a região de adaptador de transpóson, uma região variável localizada em 5' para a região de deslocamento e uma região de iniciador esquerda localizada em 5' para a região variável. Tais oligonucleotídeos podem ser referidos no presente documento como oligonucleotídeos "equilibrados".

[0086] O oligonucleotídeo equilibrado ou a pluralidade de oligonucleotídeos da invenção pode ser usado de modo que: a) a região de adaptador de transpóson compreenda 20 a 40 nucleotídeos; b) a região de deslocamento compreenda 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos; c) a região variável compreenda 20 a 50 nucleotídeos; e/ou d) a região de iniciador esquerda compreenda 20 a 40 nucleotídeos. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos equilibrados são tais que: a) a região de adaptador de transpóson compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga à sequência 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG (SEQ ID NO. 510764); b) a região de deslocamento compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos que são pelo menos cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homólogos a pelo menos uma das seguintes sequências: 5'-T (SEQ ID NO. 510765), 5'-CT (SEQ ID NO. 510766) e 5'-ACT (SEQ ID NO. 510767); c) a região variável compreende 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 ou 50 nucleotídeos; e/ou d) a região de iniciador esquerda compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga a uma sequência selecionada dentre as SEQ ID NOs. 510768 e 510769. A região variável pode compreender sequências de

biblioteca "GC", conforme fornecido no presente documento.

[0087] Em um aspecto, a invenção fornece um método para identificar um aptâmero, que compreende realizar um processo de seleção ou enriquecimento com o uso de um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados como uma biblioteca de entrada virgem. Tais processos de seleção ou enriquecimento são descritas ou fornecidas no presente documento, incluindo, sem limitação SELEX e as variações do mesmo. Em uma modalidade, o processo de seleção compreende pelo menos uma rodada de seleção positiva contra um alvo de interesse e, opcionalmente, pelo menos uma rodada de posição negativa contra um alvo diferente do alvo de interesse.

[0088] Em outro aspecto, a invenção fornece um método que compreende colocar um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados em contato com uma amostra e detectar a presença ou o nível de ligação do oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos a um alvo na amostra. A amostra pode compreender uma amostra biológica, tal como uma amostra orgânica, uma amostra inorgânica, um tecido, uma cultura celular, um fluido corporal, sangue, soro, uma célula, uma microvesícula, um complexo proteico, um complexo lipídico, um carboidrato ou qualquer combinação, fração ou variação dos mesmos. O alvo pode ser qualquer alvo útil, incluindo, sem limitação, uma célula, uma organela, um complexo proteico, uma lipoproteína, um carboidrato, uma microvesícula, um fragmento de membrana, uma molécula pequena, um metal pesado, uma toxina ou um fármaco.

[0089] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método que compreende: a) colocar uma amostra biológica que compreende microvesículas em contato com uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeo, em que, a biblioteca de sondas de oligonucleotídeo compre-

ende um oligonucleotídeo equilibrado ou uma pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados; b) identificar oligonucleotídeos ligados a pelo menos uma porção das microvesículas; e c) caracterizar a amostra com base em um perfil dos oligonucleotídeos identificados.

[0090] Em outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método que compreende: a) colocar uma amostra em contato com uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos que compreende 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} oligonucleotídeos de sequências de oligonucleotídeos diferentes para formar uma mistura em uma solução, em que os oligonucleotídeos têm capacidade para ligar uma pluralidade de entidades na amostra para formar complexos, em que, a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos compreende um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados; d) particionar os complexos formados na etapa (a) da mistura; e c) detectar oligonucleotídeos presentes nos complexos particionados na etapa (b) para identificar um perfil de oligonucleotídeo para a amostra. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para caracterizar uma doença ou distúrbio que compreende: a) colocar uma amostra biológica de teste em contato com um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados; b) detectar uma presença ou nível de complexos formados na etapa (a) entre o oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados e um alvo na amostra biológica de teste; e c) comparar a presença ou nível detectado na etapa (b) a um nível de referência de uma amostra biológica de controle, caracterizando, assim, a doença ou distúrbio. A etapa de detecção pode compreender realizar sequenciamento de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos, amplificação de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos e/ou hibridização de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos a um arranjo. Em algumas mo-

dalidades, o sequenciamento compreende sequenciamento de alto rendimento.

[0091] Nos métodos da invenção que compreendem o uso de um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados, a amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle, cada uma, compreender uma amostra de tecido, uma cultura celular ou um fluido biológico. Em algumas modalidades, o fluido biológico compreende um fluido corporal. Os fluidos corporais dentro do método da invenção compreendem sangue periférico, soros, plasma, ascites, urina, fluido cerebrospinal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem bronqueoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de cowper ou fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido de cisto, fluido pleural e peritoneal, fluido pericardial, linfa, quimo, quilo, bílis, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreções vaginais, secreção mucosal, água de defecação, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades sinusais, aspirações broncopulmonares, fluido da cavidade blastocística ou sangue do cordão umbilical. Em algumas modalidades preferenciais, o fluido corporal compreende sangue, soro ou plasma. O fluido biológico pode compreender microvesículas. Em tal caso, complexos podem ser formados entre o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos e pelo menos uma das microvesículas. A amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle podem compreende, ainda, microvesículas isoladas, em que, opcionalmente, as microvesículas são isoladas com o uso de pelo menos um dentre cromatografia, filtração, ultrafiltração, centrifugação, ultracentrifugação, citometria de fluxo, captura por afinidade (por exemplo, a uma superfície plana, coluna ou microesfera), precipitação de polímero e uso de microfluidos. As vesículas podem ser também isoladas após o contato com o oligonucleotídeo ou

pluralidade de oligonucleotídeos.

[0092] Em várias modalidades dos métodos da invenção que compreendem o uso de um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados, o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos liga um polipeptídeo ou fragmento do mesmo. O polipeptídeo ou fragmento do mesmo pode ser solúvel ou ligado à membrana, em que, opcionalmente, a membrana compreende uma membrana de microvesícula. A membrana poderia ser também de uma célula ou um fragmento de uma célula de vesícula. Em algumas modalidades, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo compreende um biomarcador na Tabela 3 ou Tabela 4. Por exemplo, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo poderia ser um marcador de vesícula geral, tal como na Tabela 3, ou um marcador relacionado a tecido ou relacionado a doença, como na Tabela 4. O oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos pode ligar-se a um antígeno de superfície de microvesícula na amostra biológica. Por exemplo, o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos pode ser enriquecido a partir de uma biblioteca virgem contra microvesículas.

[0093] A doença ou distúrbio detectado pelo oligonucleotídeo, pluralidade de oligonucleotídeos ou métodos fornecidos no presente documento que compreendem o uso de um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados pode compreender qualquer doença ou distúrbio adequado de interesse. 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. Consultar, por exemplo, a seção "Fenótipos" no presente documento. A doença ou distúrbio pode incluir, sem limitação, câncer de mama, doença de Alzheimer, asma brônquica, carcinoma de célula transicional

da bexiga, osteoblastoclastoma celular gigante, tumor cerebral, adenocarcinoma colorretal, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), carcinoma de células escamosas do cérvice, infarto agudo do miocárdio (AMI)/insuficiência cardíaca aguda, doença de Chron, diabetes mellitus tipo II, carcinoma de esôfago, carcinoma de células escamosas da laringe, leucemia aguda e crônica da medula óssea, carcinoma de pulmão, linfoma maligno, esclerose múltipla, carcinoma ovariano, doença de Parkinson, adenocarcinoma de próstata, psoríase, artrite reumatoide, carcinoma de células renais, carcinoma de células escamosas da pele, adenocarcinoma do estômago, carcinoma da glândula tireoide, câncer de testículo, colite ulcerativa ou adenocarcinoma uterino.

[0094] 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 relacionados às bibliotecas GC ou oligonucleotídeos equilibrados da invenção. Por exemplo, o reagente pode compreender um ou mais oligonucleotídeos que têm uma sequência derivada de uma biblioteca GC e/ou uma biblioteca de oligonucleotídeos equilibrados. O reagente pode compreender, ainda, outros componentes úteis revelados no presente documento, incluindo, sem limitação, pelo menos um dentre: a) um reagente configurado para isolar uma microvesícula, em que, opcionalmente, o pelo menos um reagente configurado para isolar uma microvesícula compreende um agente de ligação a um antígeno de microvesícula, uma coluna, um substrato, uma unidade de filtração, um polímero, polietilenoglicol, PEG4000, PEG8000, uma partícula ou uma esfera; b) pelo menos um oligonucleotídeo configurado para atuar como um iniciador ou sonda a fim de amplificar, sequenciar, hibridizar ou detectar o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos; e c) um reagente configurado para remover uma ou mais proteínas abundantes de uma amostra, em

que, opcionalmente, as uma ou mais proteínas abundantes compreendem pelo menos um dentre albumina, imunoglobulina, fibrinogênio e fibrina.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0095] A Figura 1 ilustra uma estratégia de seleção de ensaio competitivo: o grupo aleatório de aptâmero (a biblioteca) é incubado com a proteína alvo, nesse caso, EpCAM. Após a lavagem eluição do alvo, os aptâmeros eluídos são novamente adicionados ao alvo e deixados ligar-se. O anticorpo é, então, adicionado à reação, competindo com os aptâmeros no epitopo do anticorpo. Os aptâmeros deslocados pelo anticorpo são, então, coletados.

[0096] As Figuras 2A a 2F ilustram métodos para avaliar biomarcadores, tais como antígenos de superfície de microvesícula. A Figura 2A 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 2B 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 2C é um exemplo de um esquema de análise que pode ser realizado com o uso de diferentes combinações de agentes de captura e detecção aos biomarcadores indicados. As combinações de biomarcadores podem ser detectadas com o uso de ensaios, conforme mostrado nas Figuras 2A e 2B. As Figuras 2D e 2E apresentam esquemas ilustrativos para capturar e detectar vesículas para caracterizar um fenótipo. A Figura 2F apresenta esquemas ilustrativos para avaliar a carga útil de vesícula para caracterizar um fenótipo.

[0097] As Figuras 3A e 3B ilustram um exemplo não limitante de uma sequência de nucleotídeos de aptâmero e sua estrutura secundária. A Figura 3A ilustra uma estrutura secundária de um oligonucleotídeo de 32 mer, Aptâmero 4, com sequência 5'-CCCCCCGAATCAC ATGACTTGGGCGGGGGTCG (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 (consultar a Tabela 5). Os ligantes de EpCAM candidatos adicionais são identificados modelando-se o banco de dados inteiro de oligos sequenciados à estrutura secundária desse oligo. A Figura 3B ilustra outro oligo de 32 mer com sequência 5'-ACCGGATAGCGGT TGGAGGCGTGCTCCACTCG (SEQ ID NO. 2) que tem uma estrutura secundária diferente daquela do aptâmero na Figura 3A. Esse aptâmero é também mostrado com uma cauda 6-timina.

[0098] A Figura 4 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.

[0099] A Figura 5 ilustra os resultados de um ensaio de ligação que mostra a afinidade de ligação de um aptâmero exemplificativo (ID de aptâmero BTX176881 (SEQ ID NO: 3)) 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. As equações que descrevem a curva em cada concentração podem ser, então, usadas para calcular o K_D do aptâmero (consultar a Tabela 5).

[00100] A Figura 6 ilustra o uso de um aptâmero anti-EpCAM (Aptâmero 4; SEQ ID NO. 1) para detectar uma população de microvesículas. As vesículas em amostras de plasma de paciente foram capturadas com o uso de anticorpos conjugados à esfera para os antígenos

de superfície de microvesícula indicados: A) EGFR; B) PBP; C) EpCAM; D) KLK2. O Aptâmero 4 identificado com fluorescência foi usado como um detector no ensaio de microesfera. A figura mostra os valores de fluorescência mediana média (valores de 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.

[00101] A Figura 7A ilustra a sequência de aptâmero de EPCAM CAR003 (SEQ ID NO. 4). A Figura 7B ilustra a estrutura secundária ideal de CAR003 com uma energia livre mínima (ΔG) de -30,00 kcal/mol. Para propósitos de ilustração, o aptâmero é mostrado como um aptâmero de RNA (SEQ ID NO. 5) que corresponde à sequência de DNA na Figura 7A. A Figura 7C ilustra a purificação de conjunto de aptâmeros. A figura compreende um cromatograma de FPLC com todos os produtos e frações designados em conjuntos após verificar a qualidade em gel. A Figura 7D ilustra um gel manchado SYBR GOLD com diferentes frações FPLC de aptâmero CAR003 após a 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 7C. A Figura 7E e F ilustram a ligação de CAR003 à proteína EPCAM em HEPES a 25 mM com PBS-BN (Figura 7E) ou em HEPES a 25 mM com $MgCl_2$ a 1 mM (Figura 7F). A Figura 7G ilustra a ligação de CAR003 a EpCAM nos sais indicados com e sem a adição de albumina sérica bovina (BSA). A Figura 7H ilustra o efeito de desnaturação em ligação de CAR003 à proteína EPCAM. Em cada grupo de quatro barras, o aptâmero é, da esquerda para a direita: Aptâmero 4, CAR003 Conjunto 1, CAR003 Conjunto 2 e CAR003 Conjunto 3. A Figura 7I ilustra a titulação de aptâmeros contra proteína recombinante EPCAM (entrada constante 5 µg). A Figura 7J ilustra um Western blot

com aptâmero CAR003 versus proteína etiquetada com his 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.

[00102] As Figuras 8A a 8D ilustram métodos para fixar microvesículas a um substrato. A Figura 8A ilustra a conjugação direta de uma microesfera carboxilada a um antígeno de superfície de vesícula. A Figura 8B ilustra a ancoragem de uma microvesícula a uma microesfera por meio de uma âncora de lipídio funcionalizada com biotina. A Figura 8C ilustra a ligação de anticorpo a um antígeno de superfície de vesícula, em que o anticorpo está conjugado a uma microesfera carboxilada. A Figura 8D ilustra a ligação de aptâmero a um antígeno de superfície de vesícula, em que o aptâmero está conjugado a uma microesfera carboxilada.

[00103] A Figura 9 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 902, aqui um aptâmero para propósitos de ilustração, ancorado a um substrato 901. O agente de ligação 902 pode ser ligado covalentemente ao substrato 901. O agente de ligação 902 pode ser também não covalentemente ligado. Por exemplo, o agente de ligação 902 pode compreender uma identificação que pode ser atraída para o substrato, tal como um grupo biotina que pode formar um complexo com uma molécula de avidina/estreptavidina que está ligada covalentemente ao substrato. O agente de ligação 902 liga-se a um antígeno de superfície 903 de microvesícula 904. Na etapa indicada pela seta (i), a microvesícula é rompida enquanto deixa o complexo entre o agente de ligação 902 e o antígeno de superfície 903 intactos. A microvesícula rompida 905 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 903 é liberado do agente de ligação 902. O antígeno de superfície 903 pode ser analisado para determinar sua identidade.

[00104] As Figuras 10A a C ilustram a ligação de aptâmeros selecionados contra microesferas conjugadas a várias amostras de entrada. 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 nos Exemplos no presente documento. Cada gráfico mostra um aptâmero diferente. 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.

[00105] As Figuras 11A a G ilustra esquemas de seleção para enriquecer uma biblioteca de aptâmeros de partida para um alvo de interesse. Na Figura 11A, "Seleção A" indica 13 rodadas de seleção positiva contra microvesículas isoladas do plasma de pacientes com câncer de mama e indivíduos com câncer não de mama. Ca1 refere-se à rodada 1 de seleção de vesícula de câncer, etc. nCa1 refere-se à ro-

dada 1 de seleção de vesícula de não câncer, etc. "Seleção B" indica um derivado em que os conjuntos de aptâmeros após 3 rodadas de seleção positiva na "Seleção A" foram usados como entrada para 9 rodadas de adição (isto é, rodadas 4 a 12) de seleção positiva e negativa contra microvesículas isoladas do plasma de pacientes com câncer de mama e indivíduos com câncer não de mama. "noE" indica as rodadas de seleção negativa. A Figura 11B mostra a biblioteca de aptâmeros recuperada após as rodadas indicadas de enriquecimento conforme executadas em géis de agarose. Os aptâmeros selecionados contra vesículas de câncer ("Ca") e microvesículas de não câncer ("nCa") são mostrados. A Figura 11C ilustra o enriquecimento de aptâmeros que se ligam a vesículas de câncer (três colunas mais à esquerda "Ca") e microvesículas de não câncer (três colunas mais à direita "nCa") através das rodadas de seleção 1 (R1), 7 (R7) e 13 (R13). Os aptâmeros identificados após a rodada indicada de seleção foram incubados com microvesículas capturadas por esfera. O número de aptâmeros que se ligam às microvesículas capturadas por esfera foi determinado. O eixo geométrico Y indica a porcentagem de aptâmeros ligados em comparação à entrada total. O declínio das rodadas 7 a 13 pode indicar a remoção de ligantes não específicos. A Figura 11D e a Figura 11E indicam a seleção realizada para microvesículas de câncer e não câncer, respectivamente, após as rodadas 9 de "Seleção B". A Figura 11F apresenta outra vista da Figura 11D. A Figura 11G mostra uma terceira seleção "Seleção C" realizada após as rodadas 9 de "Seleção B" com rodadas alternadas de seleção contra microvesículas derivadas de câncer (Ca nº) e derivadas de não câncer (nCa nº).

[00106] A Figura 12 ilustra a distribuição de frequência de aptâmero observada em uma etapa de seleção versus teor de GC de sequência. A biblioteca nessa figura compreendeu 30 nucleotídeos de sequências geradas aleatoriamente em comprimento flanqueado por sequências

de anelamento de iniciador.

[00107] As Figuras 13A a I ilustra o desenvolvimento e o uso de uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos para distinguir os tipos de amostra biológica.

[00108] As Figuras 14A a L ilustram a aplicação da abordagem descrita nas Figuras 13A a I aplicada para distinguir amostras de câncer de mama e normais (isto é, não câncer) sondando-se microvesículas derivadas de plasma com uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos.

[00109] As Figuras 15A a AN compreendem mapas criados com o uso de análise de agrupamentos de análise de biblioteca de sondas de oligonucleotídeos quanto a várias indicações versus amostras normais.

[00110] As Figuras 16A a C ilustram o uso de aptâmeros em métodos para caracterizar um fenótipo. A Figura 16A é um esquema 1600 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 1602 é ligado ao substrato 1601. O alvo de interesse 1603 é ligado pelo aptâmero de captura 1602. O aptâmero de detecção 1604 está também ligado ao alvo de interesse 1603. O aptâmero de detecção 1604 porta a identificação 1605, que pode ser detectada para identificar o alvo capturado ao substrato1601 por meio do aptâmero de captura 1602. A Figura 16B é um esquema 1610 que mostra o uso de um conjunto de aptâmeros para caracterizar um fenótipo. Um conjunto de aptâmeros para um alvo de interesse é fornecido 1611. O conjunto é colocado em contato com uma amostra de teste a ser caracterizada 1612. A mistura é lavada para remover aptâmeros não ligados. Os aptâmeros remanescentes são dissociados e coletados 1613. Os aptâmeros coletados são identificados 1614 e a identidade dos aptâmeros retidos é usada para caracterizar o fenótipo 1615. A Figura 16C é um

esquema 1620 que mostra uma implantação do método na Figura 16B. Um conjunto de aptâmeros identificados como se ligando a uma população de microvesículas é fornecido 1621. A amostra de entrada compreende microvesículas que são isoladas de uma amostra de teste 1622. O conjunto é colocado em contato com as microvesículas isoladas a serem caracterizadas 1623. A mistura é lavada para remover aptâmeros não ligados e os aptâmeros remanescentes são dissociados e coletados 1625. Os aptâmeros coletados são identificados e a identidade dos aptâmeros retidos é usada para caracterizar o fenótipo 1626.

[00111] As Figuras 17A a H ilustram um projeto de biblioteca de aptâmeros otimizado para sequenciamento de alto rendimento (Next Generation).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00112] 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 no singular também incluem o plural, a não ser que o contexto determine claramente de outro modo. A menos que seja definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado conforme comumente entendido por um indivíduo de habilidade comum na técnica a que esta invenção pertence. No caso de conflito, o presente Relatório descritivo prevalecerá.

[00113] 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 biomarca-

dores. 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 das mesmas. Os métodos revelados compreendem processos e técnicas de diagnóstico com o uso de um ou mais aptâmeros da invenção, para determinar o nível ou 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.

[00114] As composições e os métodos da invenção compreendem oligonucleotídeos individuais que são identificados para uso na avaliação de um perfil de biomarcador. A invenção revela ainda composições e métodos de conjuntos de oligonucleotídeos que podem ser usados para detectar um perfil de biomarcador em uma dada amostra.

[00115] Os aptâmeros e as sequências revelados nas composições e nos métodos 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 qualquer forma de ácido nucleico e portar várias modificações químicas e permanecer dentro do escopo da invenção. O termo aptâmero pode ser usado na técnica para referir-se a um único oligonucleotídeo que se liga especificamente a um alvo de interesse através de mecanismos diferentes de pareamento de bases

Watson-Crick, similar à ligação de um anticorpo monoclonal a um antígeno particular. Dentro do escopo desta revelação e a não ser que determinado explicitamente ou implícito de outro modo no contexto, os termos aptâmero e oligonucleotídeo podem ser usados de modo intercambiável para referir-se a um oligonucleotídeo que tem capacidade de distinguir entidades biológicas de interesse (por exemplo, biomarcadores) se ou não a entidade específica foi identificada ou se o modo preciso de ligação foi determinado.

[00116] Um aptâmero da invenção pode ser também usado para fornecer detecção ou imageamento *in vitro* ou *in vivo*, para fornecer qualquer leitura diagnóstica adequada (por exemplo, diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico).

[00117] 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

[00118] SELEX. Um método adequado para gerar um aptâmero é com o processo denominado "Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial" ("SELEX"), de modo 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, Patente nº U.S. 5.475.096 intitulada "Nucleic Acid Ligands" e Patente nº U.S. 5.270.163 (consultar também o documento WO 91/19813) intitulada "Nucleic Acid Ligands". Cada ligante de ácido nucleico identificado por SELEX, isto é, cada aptâmero, é um ligante específico de um dado composto ou molécula alvo. O processo SELEX é baseado na percepção exclusiva que os ácidos nucleicos têm capacidade suficiente de formar uma variedade de estruturas bi e tridimensionais e versatilidade química suficiente dentro de seus monômeros para atuar como ligantes (isto é, formam pares de ligação específicos) com virtualmente

qualquer composto químico, seja monomérico ou polimérico. As moléculas de qualquer tamanho ou composição podem servir como alvos.

[00119] SELEX conta como um ponto de apoio mediante uma biblioteca 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 de promotor para RNA polimerases (por exemplo, T3, T4, T7 e SP6), sítios de restrição ou sequências homopoliméricas, tal como tratos 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 fixadas anteriormente descritas, compartilhadas por diversos aptâmeros que se ligam ao mesmo alvo.

[00120] Os oligonucleotídeos do conjunto preferencialmente incluem uma porção de sequência randomizada assim como sequências fixas úteis para amplificação eficaz. Tipicamente, os oligonucleotídeos do conjunto de partida contêm sequências terminais 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 introduzida ou aumentada por mutagênese antes ou durante as interações de seleção/amplificação.

[00121] 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. Consultar, por exemplo, a Patente nº U.S. 5.958.691; Patente nº U.S. 5.660.985; Patente nº U.S. 5.958.691; Patente nº U.S. 5.698.687; Patente nº U.S. 5.817.635; Patente nº U.S. 5.672.695 e a Publicação PCT nº 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. Consultar, 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. Consultar, 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 automatizado rendem 10^{14} a 10^{16} moléculas individuais, um número suficiente para a maioria dos experimentos SELEX. As regiões grandes o suficiente de sequência aleatória no projeto de sequência aumentam a probabilidade de que cada molécula sintetizada represente provavelmente uma única sequência.

[00122] 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.

[00123] 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 transcrevendo-se uma biblioteca de DNA *in vitro* com o uso de T7 RNA polimerase ou T7 RNA polimerases modificadas e purificadas. 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.

[00124] 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. Rodadas 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.

[00125] 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.

[00126] 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.

[00127] 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.

[00128] 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 si-

métricas 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.

[00129] O método SELEX central 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 que contêm grupos fosforreativos que têm capacidade de ligação e/ou fotorreticulação a e/ou fotoinativação de uma molécula alvo. A Patente nº U.S. 5.567.588 e a Patente nº U.S. 5.861.254 descrevem métodos baseados em SELEX que atingem partição altamente eficaz entre oligonucleotídeos que têm alta e baixa afinidade a uma molécula alvo. A Patente nº U.S. 5.496.938 descreve métodos para obter ligantes de ácido nucleico aprimorados após o processo SELEX ter sido realizado. A Patente nº U.S. 5.705.337 descreve métodos para ligar covalentemente um ligante a seu alvo.

[00130] 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 de ligação com alta afinidade à cafeína e ao análogo proximamente relacionado, teofilina.

[00131] 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 até um objetivo desejado ser atingido.

[00132] Um problema potencial encontrado no uso de ácidos nucleicos como agentes terapêuticos e vacinas é que os oligonucleotí-

deos em sua forma de fosfodiéster podem ser rapidamente degradados em fluidos corporais por enzimas intracelulares e extracelulares, tais como endonucleases e exonucleases, antes de o efeito desejado se manifestar. O método SELEX, assim, abrange a identificação de ligantes de ácido nucleico de alta afinidade que contêm 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 que contêm derivados de nucleotídeo modificados quimicamente na posição 2' de ribose, posição 5 de pirimidinas e posição 8 de purinas, na nº U.S. 5.756.703, que descreve oligonucleotídeos contendo várias pirimidinas modificadas em 2' e na Patente nº U.S. 5.580.737, que descreve ligantes de ácido nucleico altamente específicos contendo um ou mais nucleotídeos modificados cm substituintes 2'-amino (2'--NH_2), 2'-fluoro (2'-F) e/ou 2'-O-metila (2'-OMe).

[00133] 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 de açúcar na posição 2', modificações de pirimidina na posição 5, mo-

dificações de purina na posição 8, modificações em aminas exocíclicas, substituição de 4-tiouridina, substituição de 5-bromo ou 5-iodo-uracila; modificações de cadeia principal, modificações de fosforotioato ou fosfato de alila, 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.

[00134] 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----), 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 --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.

[00135] 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 substituído 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.

[00136] As modificações de processo pré-SELEX ou aquelas realizadas por incorporação no processo SELEX rendem ligantes de ácido nucleico com tanto especificado por seu alvo de SELEX como estabilidade aprimorada, por exemplo, estabilidade *in vivo*. As modificações de processo pós-SELEX realizadas 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.

[00137] O método SELEX inclui combinar oligonucleotídeos selecionados com outros oligonucleotídeos selecionados e unidades funcionais não oligonucleotídeo, conforme descrito na Patente nº U.S. 5.637.459 e a Patente nº U.S. 5.683.867. O método SELEX inclui, ainda, combinar ligantes de ácido nucleico selecionados com compostos com alto peso molecular lipofílicos ou não imunogênicos em um complexo diagnóstico ou terapêutico, conforme descrito, por exemplo, na Patente nº 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.

[00138] A identificação de ligantes de ácido nucleico a peptídeos pequenos e flexíveis por meio do método SELEX foi também explicada. Peptídeos pequenos têm estruturas flexíveis e usualmente existem em um equilíbrio de múltiplos confôrmeros e, assim, acreditava-se inicialmente que as afinidades de ligação pudessem ser limitadas por entropia conformacional perdida mediante ligação de um peptídeo flexível. No entanto, a possibilidade de identificar ligantes de ácido nucleico para peptídeos pequenos em solução foi demonstrada na Pa-

tente nº 5.648.214. Nessa patente, ligantes de ácido nucleico RNA com alta afinidade para a substância P, um peptídeo com 11 aminoácidos, forma identificados.

[00139] 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, podem ser realizadas seleções com sequências que incorporam nucleotídeos modificados para estabilizar as moléculas de aptâmero contra degradação *in vivo*.

SELEX MODIFICADO EM 2'

[00140] A fim de que um aptâmero seja adequado para uso como um agente terapêutico, o mesmo é, de preferência, não dispendioso para sintetiza, seguro e estável *in vivo*. Os aptâmeros de RNA e DNA do tipo selvagem são tipicamente não estáveis *in vivo* devido à 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'.

[00141] 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 reci-

clados no DNA hospedeiro por degradação dos oligonucleotídeos modificados e uso subsequente dos nucleotídeos como substratos para a síntese de DNA.

[00142] Os aptâmeros que contêm nucleotídeos de 2'-O-metila ("2'-OMe"), conforme fornecido no presente documento, pode superar uma ou mais desvantagens potenciais. Os oligonucleotídeos contendo nucleotídeos 2'-OMe são resistentes à nuclease e não dispendiosos para sintetizar. Embora nucleotídeos 2'-OMe sejam ubíquos em sistemas biológicos, polimerases naturais não aceitam NTPs 2'-OMe como substratos sob condições fisiológicas, assim, não há segurança em relação à reciclagem de nucleotídeos 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, Pedido de Patente Provisório de número de série U.S. 60/487.474, depositado em15 de julho de 2003, Pedido de Patente Provisório de número de série U.S. 60/517.039, depositado em 4 de novembro de 2003, Pedido de Patente de número de série U.S. 10/729.581, depositado em 34 de dezembro de 2003 e 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", cada um dos quais está incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

MÉTODOS

Detecção de Biomarcador e Diagnóstico

[00143] 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 na amostra biológicas avaliada 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 junta-

mente 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.

[00144] 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.

[00145] 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

[00146] 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).

[00147] 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.

[00148] 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.

[00149] 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.

[00150] 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.

[00151] 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 "Fenótipos" abaixo. Esses incluem, sem limitação, câncer de pulmão, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pulmão de células pequenas (incluindo carcinoma de células pequenas (câncer de células de aveia), carcinoma de células pequenas/células grandes misto e carcinoma de pequenas combinado), câncer de cólon, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de fígado, câncer pancreático, câncer cerebral, câncer renal, câncer ovariano, 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.

[00152] 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 para 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; Publicação de patente PCT Internacional WO/2010/093465, depositada em 11 de fevereiro de 2010; Pedido de patente PCT Internacional WO/2011/056688, 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. Consultar, por exemplo, "Table 4: Rules Summary for Treatment Selection" do documento WO/2011/056688.

DETECÇÃO DE BIOMARCADOR

[00153] 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 todas 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 microvesí-

cula (referida no presente documento como "carga útil") podem servir como biomarcadores. As próprias microvesículas podem ser também usadas como biomarcadores.

[00154] Os aptâmeros da invenção podem ser usados para avaliar os níveis ou a presença de uma população de microvesículas. Consultar, por exemplo, as Figuras 16B e 16C. Os aptâmeros da invenção podem ser também usados para avaliar os níveis ou a presença de sua molécula alvo específica. Consultar, por exemplo, a Figura 16A. 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. Consultar, por exemplo, as Figuras 2A e 2B, 16A. 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. Consultar, por exemplo, a Figura 2F. 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.

[00155] Os métodos da invenção podem compreender análise múltipla 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.

[00156] 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 2A mostra um esquema ilustrativo para um tipo sanduíche 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 agentes de detecção contra um 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 documento. Os exemplos de antígenos de superfície de microvesícula 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 na Publicação de Patente Internacional nº WO/2011/127219, intitulada "Circulating Biomarkers for Disease" e depositada em 6 de abril de 2011.

[00157] A Figura 2D 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 2D i), uma população de vesículas é capturada com um ou mais agentes de captura contra biomarcadores de vesícula gerais (200). As vesículas capturadas são, então, identificadas com detectores contra biomarcadores de célula de origem (201) e/ou biomarcadores doença-específicos (202). Se apenas detectores de célula de origem forem usados (201), a bioassinatura usada para caracterizar o fenótipo (203) pode incluir os marcadores de vesícula gerais (200) e os biomarcadores de célula de origem (201). Se apenas detectores de doença forem usados (202), a bioassinatura usada para caracterizar o fenótipo (203) pode incluir os marcadores de vesícula gerais (200) e os biomarcadores de doença

(202). Alternativamente, são usados detectores para detectar tanto biomarcadores de célula de origem (201) como biomarcadores doença-específico (202). Nesse caso, a bioassinatura usada para caracteriza o fenótipo (203) pode incluir os marcadores de vesícula gerais (200), os biomarcadores de célula de origem (201) e os biomarcadores de doença (202). 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.

[00158] No esquema mostrado na Figura 2D ii), uma população de vesículas é capturada com um ou mais agentes de captura contra biomarcadores de célula de origem (210) e/ou biomarcadores de doença (211). As vesículas capturadas são, então, detectadas com o uso de detectores contra biomarcadores de vesícula gerais (212). Se apenas agentes de captura de célula de origem forem usados (210), a bioassinatura usada para caracterizar o fenótipo (213) pode incluir os biomarcadores de célula de origem (210) e os marcadores de vesícula gerais (212). Se apenas agentes de captura de biomarcador de doença forem usados (211), a bioassinatura usada para caracterizar o fenótipo (213) pode incluir os biomarcadores de doença (211) e os biomarcadores de vesícula gerais (212). Alternativamente, os agentes de captura para um ou mais biomarcadores de célula de origem (210) e um ou mais biomarcadores doença-específicos (211) são usados para capturar vesículas. Nesse caso, a bioassinatura usada para caracterizar o fenótipo (213) pode incluir os biomarcadores de célula de origem (210), os biomarcadores de doença (211) e os marcadores de vesícula gerais (213). 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.

[00159] Os métodos da invenção compreendem a captura e a de-

tecção de microvesículas de interesse com o uso de qualquer combinação 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 2E representa um fluxograma de tais configurações. Qualquer um ou mais dentre um biomarcador de célula de origem (240), biomarcadores de doença (241) e biomarcador de vesícula gerais (242) é usado para capturar uma população de microvesículas. Depois disso, qualquer um ou mais dentre um biomarcador de célula de origem (243), biomarcadores de doença (244) e biomarcador de vesícula gerais (245) é usado para detectar a população de microvesículas capturada. 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.

[00160] 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; lipídio; 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 mo-

dalidades da invenção, a carga útil é analisada adicionalmente à detecção 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 2F iv), uma população de vesículas é capturada e/ou detectada (220) com o uso de um ou mais dentre biomarcadores de célula de origem (220), biomarcadores de doença (221) e/ou marcadores de vesícula (222). A carga útil das vesículas isoladas é avaliada (223). Uma bioassinatura detectada dentro da carga útil pode ser usada para caracterizar um fenótipo (224). 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.

[00161] 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 2F v), uma população de vesículas é isolada (230), e a carga útil das vesículas isoladas é avaliada (231). Uma bioassinatura detectada dentro da carga útil pode ser usada para caracterizar um fenótipo (232). 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.

[00162] 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 neurológica, doença infecciosa ou dor. Consultar 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 de tetraspanina CD9), PCSA (antígeno específico de célula da próstata, consultar Rokhlin *et al.*, 5E10: a prostate-specific surface-reactive monoclonal anticorpo. Cancer Lett. 1998 131:129 a 136), CD63 (molécula de tetraspanina CD63), CD81 (molé-

cula de tetraspanina CD81), PSMA (FOLH1, folato hidrolase (antígeno de membrana próstata-específico) 1), B7H3 (molécula CD276), PSCA (antígeno de célula-tronco de próstata), ICAM (molécula de adesão intercelular), STEAP (STEAP1, antígeno epitelial de transmembrana seis da próstata 1), KLK2 (peptidase 2 relacionada à calicreína), SSX2 (sarcoma sinovial, ponto de interrupção 2 de X), SSX4 (sarcoma sinovial, ponto de interrupção 4 de X), PBP (proteína de ligação prostática), SPDEF (domínio indicado de SAM contendo fator de transcrição ets), EGFR (receptor de fator 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.

[00163] 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 ava-

liar uma única célula ou uma única vesícula extracelular ou uma população 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 teor de proteína e o teor 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).

[00164] 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. Consultar, por exemplo, as Figuras 2A, 2B, 16A. 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-específica.

[00165] 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).

[00166] 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, lipídio 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, de-

tectando, 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. Consultar, 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.

[00167] 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.

[00168] 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.

[00169] 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 na Publicação de Patente Internacional nº WO/2011/127219, 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 identi-

ficam 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, os arranjos de baixa densidade personalizáveis usam amplificação por PCR nas cavidades da placa, por exemplo, Ensaios de Expressão de Gene TaqMan® (Applied Biosystems by Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA).

[00170] Um aptâmero da invenção ou outro agente de ligação útil

pode ser ligado direta ou indiretamente a uma superfície ou substrato sólido. Consultar, por exemplo, as Figuras 2A e 2B, 9, 16A. Uma superfície 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.

[00171] 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. Consultar, 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 fluo-

rescente 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.

[00172] 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.

[00173] Várias identificações de substrato por enzima podem ser usadas em conjunto com uma composição ou método da invenção. Tais identificações de substrato por enzima estão comercialmente disponíveis (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 vaga-lume e luciferase bacteriana; Patente nº U.S. 4.737.456), luciferina, 2,3-di-hidroftalazinedionas, 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-fosfato desidrogenase), oxidases heterocíclicas (tal 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.

[00174] 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 com-

preender uma pluralidade de substratos menores.

[00175] A presente invenção pode fazer uso de muitos tipos de arranjos 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 microarranjos 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).

[00176] 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, nos Pedidos de Patente de número de série U.S. 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. Microarranjos comercialmente disponíveis podem ser também usados para executar os métodos da invenção, incluindo, sem limitação, aqueles junto à 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.

[00177] 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. Consultar as Figuras 16B e 16C e revelação relacionada para mais detalhes.

[00178] 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 variadas 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.

[00179] Em determinadas modalidades, é desejável empregar meios físicos para separar grupos ou arranjos de ilhas de ligação ou bio-

moléculas imobilizadas: tal separação física facilita a exposição de diferentes grupos ou arranjos a diferentes soluções de interesse. Portanto, em certas modalidades, os arranjos estão situados dentro de placas de microcavidade 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 desejada.

[00180] 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 mostra sobre o arranjo.

[00181] 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 sanduíche; detecção de fluorescência com o uso de instrumentos, tais como varredores confocais, microscópicos confocais, ou sistemas baseados em CCD e técnicas, tais como fluorescên-

cia, 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, pela qual mudanças em massa de materiais adsorvidos em superfícies são medidas; técnicas que usam radioisótopos, incluindo ligação de radioisótopo convencional e ensaio de proximidade de cintilação (SPA); espectroscopia de massa, tal como espectroscopia de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI) e espectroscopia de massa de tempo de voo de MALDI (TOF); elipsometria, que é um método óptico de medir a espessura de filmes proteicos; microbalança de cristal de quartzo (QCM), um método muito sensível para medir amassa de materiais que adsorvem às superfícies; microscopias 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 tais como produto eletroquímico, impedância, acústica, micro-ondas e detecção de IR/Raman. Consulte, por exemplo, Mere l, 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 documento a título de referência em sua totalidade.

[00182] A tecnologia de microarranjo pode ser combinada com análise por espectrometria de massa (MS) e outras ferramentas. A interface de eletroaspersão a um espectrômetro de massa pode ser integra-

da com um capilar em um dispositivo de microfluido. 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 biológicas 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 documento a título de referência em sua totalidade.

[00183] 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.

[00184] Uma vesícula em um dispositivo de microfluido pode ser lisada, e seus conteúdos detectados dentro do dispositivo de microfluido, tais 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.

[00185] 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 permitem uma redução adicional na quantidade de analito de fluido em um microchip para níveis de nanolitro, e os chips usados aqui são referidos como nanochips. Consultar, por exemplo, *Unger M et al., Biotechniques 1999; 27(5):1.008 a 1.014, Kartalov EP et al., Biotechniques 2006; 40(1):85 a 90*, cada um dos quais está incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência. 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. Abordagens analíticas isentas de gel baseadas em cromatografia líquida (LC) e separações 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 está incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência) podem ser usadas em combinação com os nanochips.

[00186] 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.

[00187] 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), páginas 3.900 a 3.904 (2008)*, que está incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência. 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 al., Adv Dent Res 18(1): 3 a 5 (2005),* que está incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

Arranjos de partículas

[00188] Como uma alternativa para arranjos planos, ensaios que usam partículas, tal como ensaios baseados em esfera, têm também capacidade para uso com um aptâmero da invenção. Os aptâmeros são facilmente conjugados com esferas comercialmente disponíveis. Consultar, por exemplo, Srinivas *et al.* Anal. Chem. 21 de outubro de

2011, *Aptamer functionalized Microgel Particles for Protein Detection*; consultar, também, artigo de análise sobre aptâmeros como agentes de diagnóstico, Brody e Gold, Rev. Mol. Biotech. 2000, 74:5 a 13.

[00189] 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, micropérola), e a reação de ensaio ocorre na superfície da microesfera, tal como representado na Figura 2B. 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 desejado 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.

[00190] Os ensaios baseados em esfera podem ser também usados 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 aptâmero da invenção, usado para detectar a presença (quantitativa ou qualitativa-

mente) 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.

[00191] Um ou mais aptâmeros da invenção podem ser usados com qualquer substrato à base de esferas, incluindo, porém, sem limitação, método de captura magnética, seleção de células ativadas por fluorescência (FACS) ou citometria a laser. Os métodos de captura magnética podem incluir, porém, sem limitação, o uso de colunas magnéticas ou microesferas de selecionados de células magneticamente ativadas (MACS). Os exemplos de métodos baseados em esfera ou partícula que podem ser modificados para usar um aptâmero da invenção incluem métodos e sistemas de esferas descritos nas Patentes nº 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; Publicações de Patente Internacional nº WO/2012/174282; WO/1993/022684.

CITOMETRIA DE FLUXO

[00192] 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 classifi-

car 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.

[00193] 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.

[00194] 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.

[00195] 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.

[00196] 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 (Beckman 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.

[00197] 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 al, 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

[00198] Um ou mais aptâmeros da invenção podem ser 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 caracteriza-

ção 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 também referidos como sistemas "lab-on-a-chip", sistemas microeletromecânicos biomédicos (bioMEMs) ou sistemas integrados de multicomponente, 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.

[00199] 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.

[00200] 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.

[00201] 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.

[00202] 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 específicas 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 a laser duplo ou múltiplo pode ser parte do sistema de microfluido e pode usar um laser para identificar cada pérola ou microesfera por sua

codificação de cor, e outro laser pode detectar o sinal de hibridização associado a cada pérola.

[00203] Qualquer dispositivo de microfluido adequado pode ser usado nos métodos da invenção. Os exemplos de dispositivo de microfluidos 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 Publicação de Patente Internacional WO 2010/072410; em que cada uma das patentes ou dos pedidos é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência. Outro exemplo para uso com os métodos revelados 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*.

[00204] 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 Paten-

tes nº EP 0527905 e 1065378; em que cada m 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 controle, 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) analisar 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.

[00205] 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.

[00206] Uma amostra biológica pode ser fluída para o interior do dispositivo de microfluido, ou um microcanal, a 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 microfluido. 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 interior do dispositivo ou microcanal a taxas tais como pelo menos 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 realizando-se RT-PCR, PCR, espectrometria de massa, Western blot ou outros ensaios, para detectar um ou mais biomarcadores da vesícula.

FENÓTIPOS

[00207] 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 sequências de ácidos nucleicos.

[00208] 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.

[00209] 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 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 trata-

mento. 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).

[00210] 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.

[00211] Em algumas modalidades, o fenótipo compreende uma doença ou afecção, tal como aquelas listadas nas Tabelas 1 ou 16. 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.

[00212] O fenótipo pode ser uma afecção pré-maligna, tal como queratose actínica, gastrite atrófica, leucoplasia, eritroplasia, Granulomatose Linfomatoide, pré-leucemia, fibrose, displasia cervical, displasia cervical uterina, xeroderma pigmentoso, Esôfago de Barrett, pólipo colorretal, ou outro crescimento anormal de tecido ou lesão que provavelmente se desenvolva em um tumor maligno. Infecções virais transformativas, tais como HIV e HPV, também apresentam fenótipos que podem ser avaliados de acordo com a invenção.

[00213] 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, angiosarcoma, cystosarcoma filoide, dermato fibrossarcoma, tumor desmoide, tumor de células redondas pequenas desmoplásticas, sarcoma epitelioide, condrossarcoma extraesquelético, osteosarcoma extraesquelético, fibrossarcoma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, 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 linfomatóide, 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. Ou-

tros 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.

[00214] Em uma modalidade adicional, o câncer sob análise pode ser um câncer de pulmão, incluindo câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pulmão de células pequenas (incluindo carcinoma de células pequenas (câncer de células de aveia), carcinoma de células pequenas/células grandes misto e carcinoma de pequenas combinado), câncer de cólon, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de fígado, câncer de pâncreas, câncer cerebral, câncer renal, câncer ovariano, câncer de estômago, câncer de pele, câncer ósseo, câncer gástrico, câncer de mama, câncer pancreático, glioma, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma renal papilar, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, leucemia, linfoma, mieloma ou um tumor sólido.

[00215] Nas modalidades, o câncer compreende uma leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cancros relacionados à AIDS; linfoma relacionados à AIDS; câncer anal; câncer do apêndice; astrocitomas; tumor teratoide/rabdoide atípico; carcinoma basocelular; câncer de bexiga; glioma do tronco cere-

bral; 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 brônquica; 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 Sezary; 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.

[00216] Em algumas modalidades, o câncer compreende uma leu-

cemia 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 gastroi-ntestinais (GIST), glioblastoma, carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, leucemia, carcinoma hepatocelular do fígado, glioma de bai-xo grau, carcinoma bronquioloalveolar do pulmão (BAC), câncer pul-monar de células não pequenas do pulmão (NSCLC), câncer pulmonar de células pequenas (CPPC), linfoma, câncer do trato genital mascul-ino, tumor maligno fibroso solitário da pleura (MSFT), melanoma, mi-eloma 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, carci-noma da pituitária, oligodendroglioma, adenocarcinoma da próstata, carcinoma peritoneal retroperitoneal ou sarcoma peritoneal ou retrope-ritoneal, tumor maligno do intestino delgado, tumor de tecido mole, carcinoma do timo, carcinoma da tiroide ou melanoma uveal. Os mé-todos 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 reve-lados no presente documento.

[00217] 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, he-patite autoimune, esclerose múltipla, Miastenia Grave, diabetes Tipo I, artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), tireoi-dite de Hashimoto, doença de Grave, Doença de espondilite anquilo-sante de Sjogren, síndrome CREST, escleroderma, doença reumática, rejeição de órgão, colangite esclerosante primária ou sepse.

[00218] 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.

[00219] 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.

[00220] 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.

[00221] 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.

[00222] 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

[00223] 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 primadas humanos e não humanos). Um indivíduo pode também incluir um mamífero de importância devido a 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 seres 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, girafas, 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 ati-

vidades em que monitoramento de doença, diagnóstico e seleção de terapia são práticas rotineiras na criação para produtividade econômica e/ou segurança da cadeia alimentar.

[00224] O indivíduo pode ter uma doença ou afecção pré-existente, tal como câncer. Alternativamente, o indivíduo pode não ter qualquer afecção pré-existente. O indivíduo pode ser também não responsivo a um tratamento existente ou anterior, tal como um tratamento para câncer.

AMOSTRAS

[00225] 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, fluido 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.

[00226] A amostra usada nos métodos descritos no presente documento pode ser uma amostra fixada em formalina e embebida em pa-

rafina (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.

[00227] 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 algumas 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.

[00228] 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. Técnicas de biopsia são discutidas, por exemplo, em Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper, et al., eds., 16ª edição, 2005, Capítulo 70, e por toda a Parte V.

[00229] As técnicas de biologia molecular padrão conhecidas no

campo e não especificamente descritas são seguidas, de modo geral, conforme em Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989), and as in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and 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 incorporados ao presente documento 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).

[00230] A amostra biológica avaliada com o uso das composições e 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 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 ou outros fluidos de lavagem, células, cultura celular ou um sobrenadante de cultura celular. Uma amostra biológica pode também incluir a cavidade blastocística, sangue de cordão umbilical ou circulação materna que pode ser de origem fetal

ou maternal. 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).

[00231] A Tabela 1 apresenta uma listagem não limitante de doenças, afecções ou estados biológicos e amostras biológicas correspondentes que podem ser usadas para análise de acordo com os métodos da invenção.

Tabela 1: EXEMPLOS DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA 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,	Tumor, sangue, soro, plasma, fluido cerebroespinhal (CSF), urina, esputo, ascite, fluido sinovial, sêmen, aspirações de

Doença, Afecção ou Estado Biológico Ilustrativo	Amostras Biológicas Ilustrativas
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)	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 subaracnóidea, 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, cistite intersticial	Sangue, soro, plasma, urina

Doença, Afecção ou Estado Biológico Ilustrativo	Amostras Biológicas Ilustrativas
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

[00232]

[00233] 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).

[00234] 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.

[00235] 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.

[00236] Os métodos da invenção podem incluir avaliar uma ou mais vesículas, incluindo avaliar populações de vesículas. Uma vesícula, conforme usado no presente documento, é uma vesícula de membrana que é retirada de células. As vesículas ou vesículas de membrana incluem, sem limitação: microvesículas em circulação (cMVs), microvesícula, exossomo, nanovesícula, dexossomo, pústula, bolha, pros-

tassomo, micropartícula, vesícula intralumenal, fragmento de membrana, vesícula endossômica intralumenal, vesícula do tipo endossômica, vesícula de exocitose, vesícula de endossomo, vesícula endossômica, corpo apoptótico, corpo multivesicular, vesícula secretória, vesícula de fosfolipídio, vesícula lipossômica, argossomo, texassomo, secressomo, tolerossomo, melanossomo, oncossomo ou vesículo 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 lipídio 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, consultar *Thery et al., Nat Rev Immunol. Agosto de 2009;9(8):581 a 593*. Algumas propriedades de diferentes tipos de vesículas incluem aquelas na Tabela 2:

Tabela 2: PROPRIEDADES DE VESÍCULA (parte 1)

Característica	Exossomos	Microvesículas	Ectossomos
Tamanho	50 a 100 nm	100 a 1.000 nm	50 a 200 nm
Densidade em sacarose	1,13 a 1,19 g/ml		
Aparência EM	Formato de copo	Formato irregular, denso em elétron	Estruturas redondas bilamelares
Sedimentação	100.000 g	10.000 g	160.000 e 200.000 g
Composição de lipídio	Enriquecido em colesterol, esfingomielina e cera-	exposição de PPS	Enriquecido em colesterol e diacilglicerol;

Característica	Exossomos	Microvesículas	Ectossomos
	mida; contém grandes quantidades de lipídio; exposição de PPS		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
Origem intracelular	Aompartimentos internos (endossomos)	Membrana plasmática	Membrana plasmática

[00237]

Tabela 2: PROPRIEDADES DE VESÍCULA (parte 1)

Partículas de membrana	Vesículas do tipo exossomo	Vesículas apoptóticas
50 a 80 nm	20 a 50 nm	50 a 500 nm
1,04 a 1,07 g/ml	1,1 g/ml	1,16 a 1,28 g/ml
Redondo	Formato irregular	Heterogênio
100.000 e 200.000 g	175.000 g	1.200 g, 10.000 g, 100.000 g
	Sem grandes quantidades de lipídio	
CD133; sem CD63´´-	TNFRI	Histonas
Membrana plasmática		

[00238] *Abreviações:* fosfatidilserina (PPS); microscópio eletrônico (EM)

[00239] 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 de modo intracelular quando um segmento da membrana celular invagina espontaneamente e, por fim, sofre exocitose (consultar, por exemplo,

Keller et al., Immunol. Lett. 107 (2): 102 a 108 (2006)). As vesículas também incluem estruturas derivadas de células ligadas por uma membrana de bicamada de lipídio que surge a partir tanto de uma separação por envaginação herniada (formação de bolha) e vedação de porções da membrana plasmática como a partir da exportação de qualquer estrutura vesicular ligada à membrana intracelular que contém 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 descritas adicionalmente em *Charras et al., Nature Reviews Molecular and Cell Biology, Volume 9, Nº. 11, páginas 730 a 736 (2008)*. Uma vesícula lançada na circulação ou fluidos corporais a partir 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 quanto a tecido ou célula são revelados no presente documento e podem ser, ainda, acessados no Banco de Dados Tissue-specific Gene Expression and Regulation (TiGER), disponível em bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/; Liu et al. (2008) TiGER: a database for tissue-specific gene expression and regulation. BMC Bioinformatics. 9:271; TissueDistributionDBs, dis-

ponível em genome.dkfz-heidelberg.de/menu/tissue_db/index.html.

[00240] 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.

[00241] 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 documento, 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, a superfície plana ou esfera) e/ou com o uso de microfluidos. As Figuras 13A a I e 16B e 16C apresentam uma visão geral de um método da invenção para avaliar microvesículas com o uso de um conjunto de aptâmeros.

[00242] As vesículas, tais como exossomos, podem ser avaliados 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 corpora, 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 antí-

genos 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.

[00243] 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, genômicos 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: doença; tratado/não tratado; diferentes pontos no tempo, tal como em um estudo longitudinal; e os exemplos não limitantes de amostra de referência: não doença; normal; diferentes pontos no tempo; e sensível ou resistente ao(s) tratamento(s) candidato(s).

Isolamento e Análise de Microvesícula

Processamento de Amostra

[00244] Uma vesícula ou uma população de vesículas pode ser isolada, purificada, concentrada ou enriquecida de outro modo antes e/ou durante a análise. A não ser que especificado de outro modo, os termos "purificado", "isolado" ou similares, conforme usados no presente documento em referência a vesículas ou componentes de biomarcador, destinam-se a incluir purificação ou isolamento parcial ou completo de tais componentes de uma célula ou organismo. A análise de uma vesícula pode incluir quantificar a quantidade de uma ou mais populações de vesícula de uma amostra biológica. Por exemplo, uma população heterogênea de vesículas pode ser quantificada, ou uma população homogênea de vesículas, tal como uma população de vesículas com um perfil de biomarcador particular, uma bioassinatura particular, ou derivada de um tipo de célula particular pode ser isolada de uma população heterogênea de vesículas e quantificada. A análise de uma vesícula pode também incluir detectar, quantitativa ou qualitativamente, um ou mais perfis de biomarcador particular ou bioassinatura de uma vesícula, conforme descrito no presente documento.

[00245] Uma vesícula pode ser armazenada e arquivada, tal como em um banco de biofluido, e recuperada para análise conforme desejado. Uma vesícula pode ser também isolada de uma amostra biológica que foi coletada e armazenada anteriormente de um indivíduo vivo ou morto. Adicionalmente, uma vesícula pode ser isolada de uma

amostra biológica que foi coletada conforme descrito em *King et al., Breast Cancer Res 7(5): 198 a 204 (2005)*. Uma vesícula pode ser isolada de uma amostra arquivada ou armazenada. Alternativamente, uma vesícula pode ser isolada de uma amostra biológica e analisada sem armazenamento ou arquivamento da amostra. Além disso, uma terceira parte pode obter ou armazenar a amostra biológica ou obter ou armazenar a vesícula para análise.

[00246] Uma população enriquecida de vesículas pode ser obtida a partir de uma amostra biológica. Por exemplo, as vesículas podem ser concentradas e isoladas a partir de uma amostra biológica com o uso de cromatografia de exclusão de tamanho, centrifugação por gradiente de densidade, centrifugação diferencial, ultrafiltração por nanomembrana, captura por imunoabsorvente, purificação por afinidade, separação de microfluido, ou combinações dos mesmos.

[00247] Métodos de cromatografia de exclusão de tamanho, tal como colunas de permeação em gel, centrifugação ou centrifugação por gradiente de densidade e filtração podem ser usados. Por exemplo, uma vesícula pode ser isolada por centrifugação diferencial, troca de ânion e/ou cromatografia de permeação em gel (por exemplo, conforme descrito nas Patentes nº US 6.899.863 e 6.812.023), gradientes de densidade de sacarose, eletroforese de organela (por exemplo, conforme descrito na Patente nº US 7.198.923), seleção de células magneticamente ativadas (MACS) ou com um concentrador de ultrafiltração por nanomembrana. Várias combinações de métodos de isolamento ou concentração podem ser usadas.

[00248] Proteínas altamente abundantes, tal como albumina e imunoglobulina em amostras de sangue, podem impedir o isolamento de vesículas a partir de uma amostra biológica. Por exemplo, uma vesícula pode ser isolada a partir de uma amostra biológica com o uso de um sistema que usa múltiplos anticorpos que são específicos para a maio-

ria das proteínas abundantes encontradas em uma amostra biológica, tal como sangue. Tal sistema pode remover até diversas proteínas de uma vez, desvelando, assim, as espécies de abundância mais baixa, tais como vesículas específicas de célula de origem. Esse tipo de sistema pode ser usado para isolamento de vesículas a partir de amostras biológicas, tais como sangue, fluido cerebrospinhal ou urina. O isolamento de vesículas a partir de uma amostra biológica pode ser também intensificado por métodos de remoção de proteína altamente abundante conforme descrito em *Chromy et al. J Proteome Res 2004; 3:1.120 a 1.127*. Em outra modalidade, o isolamento de vesículas de uma amostra biológica pode também ser intensificado removendo-se proteínas séricas com o uso de captura de glicopeptídeo conforme descrito em *Zhang et al, Mol Cell Proteomics 2005;4:144 a 155*. Adicionalmente, as vesículas de uma amostra biológica, tal como urina, podem ser isoladas por centrifugação diferencial seguida por anticorpos direcionados a epitopos citoplasmáticos ou anticitoplasmáticos, conforme descrito em *Pisitkun et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2004;101:13.368 a 13.373*.

[00249] O plasma contém uma grande variedade de proteínas, incluindo albumina, imunoglobulinas e proteínas coagulantes, tal como fibrinogênio. Cerca de 60% das proteínas plasmáticas compreendem a proteína albumina (por exemplo, albumina sérica humana ou HSA), que contribui para a pressão osmótica do plasma para auxiliar no transporte de lipídios e hormônios esteroides. As globulinas constituem cerca de 35% das proteínas plasmáticas e são usadas no transporte de íons, hormônios e lipídios, auxiliando na função imunológica. Cerca de 4% das proteínas plasmáticas compreendem fibrinogênio que é essencial na coagulação do sangue e pode ser convertido na proteína insolúvel fibrina. Outros tipos de proteínas do sangue incluem: Pré-albumina, Alfa 1 antitripsina, Alfa 1 glicoproteína ácida, Alfa 1 fetopro-

teína, Haptoglobina, Alfa 2 macroglobulina, Ceruloplasmina, Transferrina, proteínas de complemento C3 e C4, Beta 2 microglobulina, Beta lipoproteína, proteínas Gama globulina, proteína C-reativa (CRP), Lipoproteínas (quilomícrons, VLDL, LDL, HDL), outras globulinas (tipos alfa, beta e gama), Pró-trombina e lecitina de ligação de manose (MBL). Qualquer uma dessas proteínas, incluindo classes de proteínas, ou derivados das mesmas (tal como fibrina, que é derivada da clivagem de fibrinogênio) pode ser depletada seletivamente de uma amostra biológica antes de análise adicionar ser realizada na amostra. Sem ater-se à teoria, a remoção de tais proteínas de plano de fundo pode facilitar a detecção mais sensível, exata e precisa dos biomarcadores de interesse na amostra.

[00250] As proteínas abundantes no sangue ou derivados de sangue (por exemplo, plasma ou soro) incluem, sem limitação, albumina, IgG, transferrina, fibrinogênio, IgA, α_2-Macroglobulina, IgM, α_1-Antitripsina, complemento C3, haptoglobulina, apolipoproteína A1, apolipoproteína A3, apolipoproteína B, α_1-Glicoproteína Ácida, ceruloplasmina, complemento C4, C1q, IgD, pré-albumina (transtiretina) e plasminogênio. Tais proteínas podem ser depletadas com o uso de colunas e kits comercialmente disponíveis. Os exemplos de tais colunas compreendem o Sistema de Remoção por Afinidade Múltipla da Agilent Technologies (Santa Clara, CA). Esse sistema inclui vários cartuchos projetados para depletar diferentes perfis proteicos, incluindo os seguintes cartuchos com características de desempenho de acordo com o fabricante: Human 14, que elimina aproximadamente 94% das proteínas totais (albumina, IgG, antitrpsina, IgA, transferrina, haptoglobina, fibrinogênio, alfa2-macroglobulina, alfa1-glicoproteína ácida (orosomucoide), IgM, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, complemento C3 e transtiretina); Human 7, que elimina aproximadamente 85 a 90% das proteínas totais (albumina, IgG, IgA, transferrina, haptoglobina,

antitripsina e fibrinogênio); Human 6, que elimina aproximadamente 85 a 90% das proteínas totais (albumina, IgG, IgA, transferrina, haptoglobina e antitripsina); Albumina Humana/IgG, que elimina aproximadamente 69% das proteínas totais (albumina e IgG); e Albumina Humana, que elimina aproximadamente 50 a 55% das proteínas totais (albumina). O Kit de Imunodepleção de Plasma ProteoPrep® 20 da Sigma-Aldrich destina-se a remover especificamente as 20 proteínas mais abundantes do plasma ou soro humano, que é equivalente a remover 97 a 98% da massa de proteínas totais no plasma ou soro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). De acordo com o fabricante, o ProteoPrep® 20 remove: albumina, IgG, transferrina, fibrinogênio, IgA, α_2-Macroglobulina, IgM, α_1-Antitripsina, complemento C3, haptoglobulina, apolipoproteína A1, A3 e B; α_1-Glicoproteína ácida, ceruloplasmina, complemento C4, C1q; IgD, pré-albumina e plasminogênio. A Sigma-Aldrich também fabrica colunas ProteoPrep® para remover albumina (HSA) e imunoglobulinas (IgG). Os kits de Partição de Proteoma de Alta Capacidade ProteomeLab IgY-12 da Beckman Coulter (Fullerton, CA) são especificamente projetados para remover doze proteínas altamente abundantes (Albumina, IgG, Transferrina, Fibrinogênio, IgA, α2-macroglobulina, IgM, α1-Antitripsina, Haptoglobina, Orosomucoide, Apolipoproteína A-I, Apolipoproteína A-II) dos fluidos biológicos humanos, tais como soro e plasma. De modo geral, tais sistemas baseiam-se na imunodepleção para remover as proteínas alvo, por exemplo, com o uso de ligantes pequenos e/ou anticorpos completos. O Kit de Depleção de Albumina/Imunoglobulina Humanas PureProteome™ Human da Millipore (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) é um kit à base de esferas magnéticas que possibilita alta eficácia de depleção (tipicamente >99%) de Albumina e todas as Imunoglobulinas (isto é, IgG, IgA, IgM, IgE e IgD) de amostras de plasma ou soro humano. O Kit de Remoção de Albumina/IgG ProteoExtract®, também da Millipore,

é projetado para depletar >80% da albumina e IgG de amostras de fluido corporal. Outros produtos de depleção de proteína similares incluem, sem limitação, os seguintes: mini kit Aurum™ Affi-Gels Blue (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA); kit anti-HSA/IgG Vivapure® (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemanha), kit de depleção de albumina/IgG Qproteome (Qiagen, Hilden, Alemanha); coluna MIXED12-LC20 Seppro® (GenWay Biotech, San Diego, CA, EUA); Kit de Depleção de Proteína Sérica Abundante (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canadá); Coluna/Kit de Depleção 3 em 1 de Albumina Humana/IgG/Transferrina GBC (Good Biotech Corp., Taiwan). Esses sistemas e sistemas similares podem ser usados para remover proteínas abundantes de uma amostra biológica, aprimorando, assim, a capacidade de detectar biomarcadores circulantes de baixa abundância, tais como proteínas e vesículas.

[00251] A tromboplastina é uma proteína plasmática que auxilia a coagulação sanguínea através da conversão de pró-trombina em trombina. A trombina, por sua vez, atua como uma serina protease que converte fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis de fibrina, assim como catalisa muitas outras reações relacionadas à coagulação. Assim, a tromboplastina é uma proteína que pode ser usada para facilitar a precipitação de fibrinogênio/fibrina (fatores de coagulação sanguínea) para fora do plasma. Adicionalmente ou como uma alternativa à remoção de proteínas por imunoafinidade, uma amostra de sangue pode ser tratada com tromboplastina para depletar fibrinogênio/fibrina. A remoção de tromboplastina pode ser realizada adicionalmente ou como uma alternativa à remoção de proteínas por imunoafinidade conforme descrito acima com o uso de métodos conhecidos na técnica. A precipitação de outras proteínas e/ou outro particulado de amostra pode também aprimorar a detecção de biomarcadores circulantes, tais como vesículas, em uma amostra. Por exemplo, tratamento com sulfa-

to de amônio, conforme conhecido na técnica, pode ser usado para precipitar imunoglobulinas e outras proteínas altamente abundantes.

[00252] Em uma modalidade, a invenção fornece um método para detectar uma presença ou nível de um ou mais biomarcadores circulantes, tal como uma microvesícula, em uma amostra biológica, que compreende: (a) fornecer uma amostra biológica que compreende ou suspeita-se que compreenda o um ou mais biomarcadores circulantes; (b) depletar seletivamente uma ou mais proteínas abundantes da amostra biológica fornecida na etapa (a); (c) realizar seleção por afinidade do um ou mais biomarcadores circulantes da amostra depletada na etapa (b), detectando, assim, a presença ou nível de um ou mais biomarcadores circulantes. A amostra biológica pode compreender um fluido corporal, por exemplo, sangue periférico, soro, plasma, ascite, urina, fluido cerebrospinhal (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. Em algumas modalidades, a amostra biológica compreende sangue periférico, soro ou plasma. Os protocolos ilustrativos e resultados da depleção seletiva de uma ou mais proteínas abundantes do plasma sanguíneo antes da detecção de vesículas podem ser encontrados no Exemplo 40 da Publicação de Patente Internacional nº WO/2014/082083, depositada em 26 de novembro de 2013, em que a publicação de patente está incorporada ao presente documento em sua totalidade a título de referên-

cia.

[00253] Uma proteína abundante pode compreender uma proteína na amostra que está presente na amostra a uma concentração alta o suficiente para interferir potencialmente no processamento ou análise a jusante. Tipicamente, uma proteína abundante não é o alvo de qualquer análise adicional da amostra. A proteína abundante pode constituir pelo menos 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou pelo menos 99% da massa de proteínas totais na amostra. Em algumas modalidades, a proteína abundante está presente em menos de 10^{-5}% da massa de proteínas totais na amostra, por exemplo, no caso de um alvo raro de interesse. Conforme descrito no presente documento, no caso de sangue ou um derivado do mesmo, 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, pré-albumina (transtiretina), plasminogênio, um derivado de qualquer um dos mesmos e uma combinação dos mesmos. As uma ou mais proteínas abundantes no sangue ou um derivado de sangue podem compreender também um ou mais dentre Albumina, Imunoglobulinas, Fibrinogênio, Pré-albumina, 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), Pró-trombina, Lectina de ligação à manose (MBL), um derivado de qualquer um dos mesmos e uma combinação dos mes-

mos.

[00254] Em algumas modalidades, a depleção seletiva das uma ou mais proteínas abundantes compreende colocar a amostra biológica em contato com tromboplastina para iniciar a precipitação de fibrina. As uma ou mais proteínas abundantes podem ser também depletadas por imunoafinidade, precipitação ou uma combinação dos mesmos. Por exemplo, a amostra pode ser tratada com tromboplastina para precipitar fibrina, e, então, a amostra pode ser passada através de uma coluna para remover HSA, IgG e outras proteínas abundantes, conforme desejado.

[00255] "Depletar seletivamente" as uma ou mais proteínas abundantes compreende depletar a proteína abundante da amostra em uma porcentagem mais alta que a depletação de outra entidade na amostra, tal como outra proteína ou microvesícula, incluindo um alvo de interesse para processamento ou análise a jusante. Depletar seletivamente as uma ou mais proteínas abundantes pode compreender depletar a proteína abundante a uma taxa 1,1 vez, 1.2 vez, 1,3 vez, 1,4 vez, 1,5 vez, 1,6 vez, 1,7 vez, 1,8 vez, 1,9 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 11 vezes, 12 vezes, 13 vezes, 14 vezes, 15 vezes, 16 vezes, 17 vezes, 18 vezes, 19 vezes, 20 vezes, 25 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes, 100 vezes, 200 vezes, 300 vezes, 400 vezes, 500 vezes, 600 vezes, 700 vezes, 800 vezes, 900 vezes, 1.000 vezes, 10^4 vezes, 10^5 vezes, 10^6 vezes, 10^7 vezes, 10^8 vezes, 10^9 vezes, 10^{10} vezes, 10^{11} vezes, 10^{12} vezes, 10^{13} vezes, 10^{14} vezes, 10^{15} vezes, 10^{16} vezes, 10^{17} vezes, 10^{18} vezes, 10^{19} vezes, 10^{20} vezes ou mais alta que outra entidade na amostra, tal como outra proteína ou microvesícula, incluindo um alvo de interesse para processamento ou análise a jusante. Em uma modalidade, há pouca a nenhuma depleção observável do alvo de interesse em comparação com a

depleção da proteína abundante. Em algumas modalidades, depletar seletivamente as uma ou mais proteínas abundantes da amostra biológica compreende 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.

[00256] A remoção de proteínas altamente abundantes e outras entidades não desejadas pode ser, ainda, facilitada com uma etapa de exclusão de tamanho não rigorosa. Por exemplo, a amostra pode ser processada com o uso de uma etapa de exclusão de tamanho de corte de alto peso molecular para enriquecer, de preferência, vesículas com alto peso molecular além de proteínas com peso molecular mais baixo e outras entidades. Em algumas modalidades, uma amostra é processada com uma coluna (por exemplo, uma coluna de filtração em gel) ou filtro que tem um corte de peso molecular (MWCO) de 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 9.500, 10.000, ou maior que 10.000 quilodaltons (kDa). Em uma modalidade, uma coluna de filtração de 700 kDa é usada. Em tal etapa, as vesículas serão retidas ou fluirão mais lentamente do que a coluna ou o filtro do que as entidades com peso molecular mais baixo. Tais colunas e filtros são conhecidos na técnica.

[00257] O isolamento ou enriquecimento de uma vesícula de uma amostra biológica pode ser também acentuado pelo uso de sonicação (por exemplo, aplicando-se ultrassom), detergentes, outros agentes de ativação de membrana ou qualquer combinação dos mesmos. Por exemplo, a estratégia ultrassônica pode ser aplicada a um sítio de tumor potencial, e, sem ater-se à teoria, a liberação de vesículas de um tecido pode ser aumentada, permitindo uma população enriquecida de vesículas que pode ser analisada ou avaliada a partir de uma amostra

biológica com o uso de um ou mais métodos revelados no presente documento.

[00258] Com métodos para detectar biomarcadores circulantes, conforme descrito no presente documento, por exemplo, isolamento por afinidade de anticorpo, a consistência dos resultados pode ser otimizada conforme desejado com o uso de vários procedimentos de concentração e isolamento. Tais etapas podem incluir agitação, tal como sacudidela ou vórtice, diferentes técnicas de isolamento, tal como isolamento baseado em polímero, por exemplo, com PEG, e concentração a níveis diferentes durante a filtração ou outras etapas. Será entendido por aqueles versados na técnica que tais tratamentos podem ser aplicados a vários estágios de testagem da amostra contendo vesícula. Em uma modalidade, a própria amostra, por exemplo, um fluido corporal, tal como plasma ou soro, é submetida a vórtice. Em algumas modalidades, a amostra é submetida a vórtice após uma ou mais etapas de tratamento de amostra, por exemplo, isolamento de vesícula, ter ocorrido. Agitação pode ocorrer em algumas ou todas as etapas de tratamento de amostra adequadas, conforme desejado. Aditivos podem ser introduzidos nas várias etapas para aprimorar o processo, por exemplo, para controlar a agregação ou degradação dos biomarcadores de interesse.

[00259] Os resultados podem ser também otimizados conforme desejável tratando-se a amostra com vários agentes. Tais agentes incluem aditivos para controlar a agregação e/ou aditivos para ajustar o pH ou intensidade iônica. Os aditivos que controlam a agregação incluem agentes de bloqueio, tal como albumina sérica bovina (BSA), leite ou StabilGuard® (um agente de bloqueio isento de BSA; Código de produto SG02, Surmodics, Eden Prairie, MN), agentes caotrópicos, tal como cloridrato de guanídio, e detergentes ou tensoativos. Os detergentes iônicos úteis incluem dodecil sulfato de sódio (SDS, lauril sulfato de só-

dio (SLS)), lauret sulfato de sódio (SLS, sulfato de lauril éter de sódio (SLES)), lauril sulfato de amônio (ALS), brometo de cetrimônio, cloreto de cetrimônio, estearato de cetrimônio e similares. Os detergentes não iônicos úteis (zwitteriônicos) incluem polioxietilenoglicóis, polissorbato 20 (também conhecido como Tween 20), outros polissorbatos (por exemplo, 40, 60, 65, 80, etc), Triton-X (por exemplo, X100, X114), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanossulfonato (CHAPS), CHAPSO, ácido desoxicólico, desoxicolato de sódio, NP-40, glicoídeos, octiltio-glucosídeos, maltosídeo e similares. Em algumas modalidades, Pluronic F-68, um tensoativo que mostrou reduzir a agregação de plaquetas, é usado para tratar amostras que contêm vesículas durante o isolamento e/ou a detecção. O F68 pode ser usado a partir de uma concentração de 0,1% a 10%, por exemplo, uma concentração de 1%, 2,5% ou 5%. O pH e/ou intensidade iônica da solução podem ser ajustados com vários ácidos, bases, tampões ou sais, incluindo, sem limitação, cloreto de sódio (NaCl), solução salina tamponada com fosfato (PBS), solução salina tamponada com tris (TBS), fosfato de sódio, cloreto de potássio, fosfato de potássio, citrato de sódio e tampão de solução salina e citrato de sódio (SSC). Em algumas modalidades, NaCl é adicionado a uma concentração de 0,1% a 10%, por exemplo, uma concentração final de 1%, 2,5% ou 5%. Em algumas modalidades, Tween 20 é adicionado a uma concentração de 0,005 a 2%, por exemplo, uma concentração final de 0,05%, 0,25% ou 0,5%. Os agentes de bloqueio para uso com a invenção compreendem proteínas inertes, por exemplo, proteínas de leite, proteína de leite seca sem gordura, albumina, BSA, caseína, ou soro, tal como soro de bezerro recém-nascido (NBCS), soro de cabra, soro de coelho e soro de salmão. As proteínas podem ser adicionadas a uma concentração de 0,1% a 10%, por exemplo, uma concentração de 1%, 2%, 3%, 3.5%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% ou 10%. Em algumas modalidades, BSA é

adicionada a uma concentração de 0,1% a 10%, por exemplo, uma concentração de 1%, 2%, 3%, 3.5%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% ou 10%. Em uma modalidade, a amostra é tratada de acordo com a metodologia apresentada no Pedido de Patente nº U.S. 11/632946, depositado em 13 de julho de 2005, em que o pedido está incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência. Bloqueadores comercialmente disponíveis podem ser usados, tais como SuperBlock, StartingBlock, Protein-Free from Pierce (uma divisão da Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Em algumas modalidades, SSC/detergente (por exemplo, 20X SSC com 0,5% de Tween 20 ou 0,1% de Triton-X 100) é adicionado a uma concentração de 0,1% a 10%, por exemplo, a uma concentração de 1,0% ou 5,0%.

[00260] Os métodos para detectar vesículas e outros biomarcadores circulantes podem ser otimizados conforme desejado com várias combinações de protocolos e tratamentos conforme descrito no presente documento. Um protocolo de detecção pode ser otimizado por várias combinações de agitação, métodos de isolamento e aditivos. Em algumas modalidades, a amostra de paciente é submetida a vórtice, antes e após etapas de isolamento, e a amostra é tratada com agentes de bloqueio, incluindo BSA e/ou F68. Tais tratamentos podem reduzir a formação de agregados grandes ou proteína ou outros resíduos biológicos e, assim, fornecer uma leitura de detecção mais consistente.

Filtração e Ultrafiltração

[00261] Uma vesícula pode ser isolada de uma amostra biológica filtrando-se uma amostra biológica de um indivíduo através de um módulo de filtração e coletando-se do módulo de filtração um retentado que compreende a vesícula, isolando, assim, a vesícula da amostra biológica. O método pode compreender filtrar uma amostra biológica de um indivíduo através de um módulo de filtração que compreende

um filtro (também referido no presente documento como uma membrana de seleção); e coletar do módulo de filtração um retentado que compreende a vesícula, isolando assim a vesícula da amostra biológica. Por exemplo, em uma modalidade, o filtro retém moléculas maiores que cerca de 100 quilodaltons. Em tais casos, as microvesículas são, de modo geral, encontradas dentro do retentado do processo de filtração, enquanto entidades menores, tais como proteínas, complexos proteicos, ácidos nucleicos, etc, passam para o filtrado.

[00262] O método pode ser usado ao determinar uma bioassinatura de uma ou mais microvesículas. O método pode também compreender, ainda, colocar o retentado da filtração com uma pluralidade de substratos, em que cada substrato é acoplado a um ou mais agentes de captura, e cada subconjunto da pluralidade de substratos compreende um agente de captura ou combinação de agentes de captura diferente de outro subconjunto da pluralidade de substratos.

[00263] Também é fornecido no presente documento um método para determinar uma bioassinatura de uma vesícula em uma amostra que compreende: filtrar uma amostra biológica de um indivíduo com um distúrbio através de um módulo de filtração, coletar do módulo de filtração um retentado que compreende uma ou mais vesículas e determinar uma bioassinatura de uma ou mais vesículas. Em uma modalidade, o módulo de filtração compreende um filtro que retém moléculas maiores que cerca de 100 ou 150 quilodaltons.

[00264] O método revelado no presente documento pode compreende, ainda, caracterizar um fenótipo em um indivíduo filtrando-se uma amostra biológica de um indivíduo através de um módulo de filtração, coletar do módulo de filtração um retentado que compreende uma ou mais vesículas; detectar uma bioassinatura das uma ou mais vesículas; e caracterizar um fenótipo no indivíduo com base na bioassinatura, em que a caracterização é com pelo menos 70% de sensibilidade. Em

algumas modalidades, caracterizar compreende determinar uma quantidade de uma ou mais vesículas que têm a bioassinatura. Além disso, a caracterização pode ser de cerca de 80% a 100% de sensibilidade.

[00265] Também é fornecido no presente documento um método para análise multiplex de uma pluralidade de vesículas. Em algumas modalidades, o método compreende filtrar uma amostra biológica de um indivíduo através de um módulo de filtração; coletar do módulo de filtração um retentado que compreende a pluralidade de vesículas, aplicar a pluralidade de vesículas a uma pluralidade de agentes de captura, em que a pluralidade de agentes de captura está acoplada a uma pluralidade de substratos, e cada subconjunto da pluralidade de substratos é identificada de modo diferente de outro subconjunto da pluralidade de substratos; capturar pelo menos um subconjunto da pluralidade de vesículas; e determinar uma bioassinatura para pelo menos um subconjunto das vesículas capturadas. Em uma modalidade, cada substrato é acoplado a um ou mais agentes de captura, e cada subconjunto da pluralidade de substratos compreende um agente de captura ou combinação de agentes de captura diferente em comparação a outro subconjunto da pluralidade de substratos. Em algumas modalidades, pelo menos um subconjunto da pluralidade de substratos é identificado intrinsecamente, tal como compreendendo uma ou mais identificações. O substrato pode ser uma partícula ou esfera ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o filtro retém moléculas maiores que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 9.500, 10.000 ou maior que 10.000 quilodaltons (kDa). Em uma modalidade, o módulo de filtração compreende um filtro que retém moléculas maiores que cerca de 100 ou 150 quilo-

daltons. Em uma modalidade, o módulo de filtração compreende um filtro que retém moléculas maiores que cerca de 9, 20, 100 ou 150 quilodaltons. Em ainda outra modalidade, o módulo de filtração compreende um filtro que retém moléculas maiores que cerca de 7.000 quilodaltons.

[00266] Em algumas modalidades, o método para análise multiplex de uma pluralidade de vesículas compreende filtrar uma amostra biológica de um indivíduo através de um módulo de filtração, em que o módulo de filtração compreende um filtro que retém moléculas maiores que cerca de 100 quilodaltons; coletar do módulo de filtração um retentado que compreende a pluralidade de vesículas; aplicar a pluralidade de vesículas a uma pluralidade de agentes de captura, em que a pluralidade de agentes de captura está acoplada a um microarranjo; capturar pelo menos um subconjunto da pluralidade de vesículas no microarranjo; e determinar uma bioassinatura pelo menos um subconjunto das vesículas capturadas. Em algumas modalidades, o filtro retém moléculas maiores que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 9.500, 10.000 ou maior que 10.000 quilodaltons (kDa). Em uma modalidade, o módulo de filtração compreende um filtro que retém moléculas maiores que cerca de 100 ou 150 quilodaltons. Em uma modalidade, o módulo de filtração compreende um filtro que retém moléculas maiores que cerca de 9, 20, 100 ou 150 quilodaltons. Em ainda outra modalidade, o módulo de filtração compreende um filtro que retém moléculas maiores que cerca de 7.000 quilodaltons.

[00267] A amostra biológica pode ser clarificada antes do isolamento por filtração. A clarificação compreende remoção seletiva de resíduos

celulares e outros materiais indesejados. Por exemplo, resíduos celulares e outros componentes que podem interferir na detecção dos biomarcadores circulantes podem ser removidos. A clarificação pode ser por centrifugação de baixa velocidade, tal como a cerca de 5.000x g, 4.000x g, 3.000x g, 2.000x g, 1.000x g ou menos. O sobrenadante, ou amostra biológica clarificada, contendo a vesícula pode ser, então, coletado e filtrado para isolar a vesícula da amostra biológica clarificada. Em algumas modalidades, a amostra biológica não é clarificada antes do isolamento de uma vesícula por filtração.

[00268] Em algumas modalidades, o isolamento de uma vesícula de uma amostra não usa centrifugação de alta velocidade, tal como ultracentrifugação. Por exemplo, o isolamento pode não exigir o uso de velocidades centrífugas, tal como cerca de 100.000x g ou mais. Em algumas modalidades, o isolamento de uma vesícula de uma amostra usa velocidades de menos que 50.000 x g, 40.000 x g, 30.000 x g, 20.000 x g, 15.000 x g, 12.000 x g ou 10.000 x g.

[00269] Qualquer número de configurações de filtro aplicáveis pode ser usado para filtrar uma amostra de interesse. Em algumas modalidades, o módulo de filtração usado para isolar os biomarcadores circulantes da amostra biológica é um cartucho de filtração baseado em filtro. Por exemplo, a fibra pode ser uma fibra polimérica oca, tal como uma fibra oca de polipropileno. Uma amostra biológica pode ser introduzida no módulo de filtração bombeando-se o fluido de amostra, tal como um fluido biológico, conforme revelado no presente documento, para o interior do módulo com um dispositivo de bomba, tal como uma bomba peristáltica. A taxa de fluxo de bomba pode variar, tal como a cerca de 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ml/minuto. A taxa de fluxo pode ser ajustada dada a configuração, por exemplo, tamanho e rendimento, do módulo de filtração.

[00270] O módulo de filtração pode ser um módulo de filtração por

membrana. Por exemplo, o módulo de filtração por membrana pode compreender uma membrana de disco de filtro, tal como uma membrana de disco de filtro de polivinilideno hidrofílico (PVDF) alojada em um aparelho de células agitado (por exemplo, que compreende um agitador magnético). Em algumas modalidades, a amostra move-se através do filtro como um resultado de um gradiente de pressão estabelecido em qualquer lado da membrana de filtro.

[00271] O filtro pode compreender um material que tem baixa absortividade hidrofóbica e/ou altas propriedades hidrofílicas. Por exemplo, o filtro pode ter um tamanho de poro médio para retenção de vesícula e permeação da maioria das proteínas assim como uma superfície que é hidrofílica, limitando, assim, a absorção de proteína. Por exemplo, o filtro pode compreender um material selecionado a partir do grupo que consiste em polipropileno, PVDF, polietileno, polifluoroetileno, celulose, acetato de celulose secundário, álcool polivinílico e álcool etilenovinílico (EVAL®, Kuraray Co., Okayama, Japão). Os materiais adicionais que podem ser usados em um filtro incluem, porém, sem limitação, polissulfona e polietersulfona.

[00272] O módulo de filtração pode ter um filtro que retém moléculas maiores que cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ou 900 quilodaltons (kDa), tal como um filtro que tem um MWCO (corte de peso molecular) de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ou 900 kDa, respectivamente. Nas modalidades, o módulo de filtração tem um MWCO de 1.000 kDa, 1.500 kDa, 2.000 kDa, 2.500 kDa, 3.000 kDa, 3.500 kDa, 4.000 kDa, 4.500 kDa, 5.000 kDa, 5.500 kDa, 6.000 kDa, 6.500 kDa, 7.000 kDa, 7.500 kDa, 8.000 kDa, 8.500 kDa, 9.000 kDa, 9.500 kDa, 10.000 kDa, ou maior que

10.000 kDa. Membranas de ultrafiltração com uma faixa de MWCO de 9 kDa, 20 kDa e/ou 150 kDa podem ser usadas. Em algumas modalidades, o filtro dentro do módulo de filtração tem um diâmetro médio de poro de cerca de 0,01 μm a cerca de 0,15 μm e, e algumas modalidades, de cerca de 0,05 μm a cerca de 0,12 μm. Em algumas modalidades, o filtro tem um diâmetro médio de poro de cerca de 0,06 μm, 0,07 μm, 0,08 μm, 0,09 μm, 0,1 μm, 0,11 μm ou 0,2 μm.

[00273] O módulo de filtração pode ser uma coluna comercialmente disponível, tal como uma coluna tipicamente usada para concentrar proteínas ou para isolar proteínas (por exemplo, ultrafiltração). Os exemplos incluem, porém, sem limitação, colunas da Millpore (Billerica, MA), tais como filtros centrífugos Amicon®, ou da Pierce® (Rockford, IL), tais como dispositivos de filtro Pierce Concentrador. As colunas úteis da Pierce incluem dispositivos centrífugos de ultrafiltração descartáveis com um MWCO de 9 kDa, 20 kDa e/ou 150 kDa. Esses concentradores consistem em uma membrana de celulose regenerada de alto desempenho soldada a um dispositivo cônico. Os filtros podem ser descritos nas Patentes nº U.S. 6.269.957 ou 6.357.601, em que ambos os pedidos estão incorporados ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

[00274] O retentado que compreende a vesícula isolada pode ser coletado a partir do módulo de filtração. O retentado pode ser coletado removendo-se por jato o retentado do filtro. A seleção de uma composição de filtro que tem propriedades de superfície hidrofílica, limitando, assim, a absorção de proteína, pode ser usada, sem ater-se à teoria, para coleta mais fácil do retentado e para minimizar o uso de técnicas de coleta difíceis ou demoradas.

[00275] O retentado coletado pode ser, então, usado na análise subsequente, tal como avaliação de uma bioassinatura de uma ou mais vesículas no retentado, conforme adicionalmente descrito no pre-

sente documento. A análise pode ser realizada diretamente no retentado coletado. Alternativamente, o retentado coletado pode ser adicionalmente concentrado ou purificado, antes da análise de uma ou mais vesículas. Por exemplo, o retentado pode ser adicionalmente concentrado ou as vesículas adicionalmente isoladas do retentado com o uso de cromatografia de exclusão de tamanho, centrifugação por gradiente de densidade, centrifugação diferencial, captura de imunoabsorvente, purificação por afinidade, separação de microfluido ou combinações dos mesmos, tal como descrito no presente documento. Em algumas modalidades, o retentado pode parrar por outra etapa de filtração. Alternativamente, antes do isolamento de uma vesícula com o uso de um filtro, a vesícula é concentrada ou isolada com o uso de técnicas que incluem, sem limitação, cromatografia de exclusão de tamanho, centrifugação por gradiente de densidade, centrifugação diferencial, captura de imunoabsorvente, purificação por afinidade, separação de microfluido ou combinações dos mesmos.

[00276] Combinações de filtros podem ser usadas para concentrar e isolar biomarcadores. Por exemplo, a amostra biológica pode ser primeiramente filtrada através de um filtro que tem uma porosidade ou tamanho de poros entre cerca de 0,01 µm a cerca de 10 µm, por exemplo, 0,01 µm a cerca de 2 µm ou cerca de 0,05 µm a cerca de 1,5 µm, e, então, a amostra é filtrada. Por exemplo, antes de filtrar uma amostra biológica através de um módulo de filtração com um filtro que retém moléculas maiores que cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 95.00, 10.000 ou maior que 10.000 quilodaltons (kDa), tal como um filtro que tem um MWCO (corte de peso molecular) de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25,

30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 9.500, 10.000 ou maior que 10.000 kDa, respectivamente, a amostra biológica pode ser primeiramente filtrada através de um filtro que tem uma porosidade ou tamanho de poro entre cerca de 0,01 µm a cerca de 10 µm, por exemplo, 0,01 µm a cerca de 2 µm ou cerca de 0,05 µm a cerca de 1,5 µm. Em algumas modalidades, o filtro tem um tamanho de poros de cerca de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 ou 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ou 10,0 µm. O filtro pode ser um filtro de seringa. Assim, em uma modalidade, o método compreende filtrar a amostra biológica através de um filtro, tal como um filtro de seringa, em que o filtro de seringa tem uma porosidade maior que cerca de 1 µm, antes de filtrar a amostra através de um módulo de filtração que compreende um filtro que retém moléculas maiores que cerca de 100 ou 150 quilodaltons. Em uma modalidade, o filtro é um filtro de 1,2 µM e a filtração é seguida por passagem da amostra através de uma coluna de concentrador de 7 ml ou 20 ml com um corte de 150 kDa. Múltiplas colunas de concentrador podem ser usadas, por exemplo, em série. Por exemplo, uma unidade de filtração de 7.000 MWCO pode ser usada antes de uma unidade de 150 MWCO.

[00277] O módulo de filtração pode ser um componente de um dispositivo de microfluido. Os dispositivos de microfluido, que podem ser também referidos como sistemas "lab-on-a-chip", sistemas microeletromecânicos biomédicos (bioMEMs) ou sistemas integrados de multicomponente, podem ser usados para isolar e analisar vesículas. Tais sistemas miniaturizam e compartimentalizam processos que permite a ligação de vesículas, detecção de biomarcadores e outros processos,

tais como adicionalmente descritos no presente documento.

[00278] O módulo de filtração e a avaliação podem ser conforme descritos em Grant, R., et al., A filtration-based protocol to isolate human Plasma Membrane-derived Vesicles and exosomes from blood plasma, *J Immunol Methods* (2011) 371:143 a 151 (Epub 30 de junho de 2011), cuja referência é incorporada ao presente documento em sua totalidade.

[00279] Um dispositivo de microfluido pode ser usado para isolamento de uma vesícula compreendendo-se um módulo de filtração. Por exemplo, um dispositivo de microfluido pode usar um ou mais canais para isolar uma vesícula de uma amostra biológica com base no tamanho 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. O dispositivo de microfluido pode compreender, ainda, agentes de ligação ou mais de um módulo de filtração para selecionar vesículas com base em uma propriedade das vesículas, por exemplo, tamanho, formato, deformabilidade, perfil de biomarcador ou bioassinatura.

[00280] O retentado de uma etapa de filtração pode ser, ainda, processado antes da avaliação de microvesículas ou outros biomarcadores no mesmo. Em uma modalidade, o retentado é diluído antes da avaliação de biomarcador, por exemplo, com um diluente adequado, tal como um tampão biologicamente compatível. Em alguns casos, o retentado é diluído em série. Em um aspecto, a invenção fornece um método para detectar uma população de microvesículas de uma amostra biológica que compreende: a) concentrar a amostra biológica com o uso de uma membrana de seleção que tem um tamanho de poros de 0,01 µm a cerca de 10 µm, ou um corte de peso molecular (MWCO) de cerca de 1 kDa a 10.000 kDa; b) diluir um retentado da etapa de concentração em uma ou mais alíquotas; e c) colocar cada uma das uma

ou mais alíquotas de retentado em contato com um ou mais agentes de ligação específicos para uma molécula de pelo menos uma microvesícula na população de microvesículas. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para detectar uma população de microvesículas de uma amostra biológica que compreende: a) concentrar a amostra biológica com o uso de uma membrana de seleção que tem um tamanho de poros de 0,01 µm a cerca de 10 µm, ou um corte de peso molecular (MWCO) de cerca de 1 kDa a 10.000 kDa; e b) colocar uma das uma ou mais alíquotas do retentado da etapa de concentração em contato com um ou mais agentes de ligação específicos para uma molécula de pelo menos uma microvesícula na população de microvesículas.

[00281] A membrana de seleção pode ser dimensionada para reter os biomarcadores desejados no retentado ou para permitir que os biomarcadores desejados passem através do filtro para o filtrado. A membrana de filtro pode ser escolhida para ter um determinado tamanho de poro ou valor de MWCO. A membrana de seleção pode ter um tamanho de poro de cerca de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 ou 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ou 10,0 µm. A membrana de seleção pode ter também um MWCO de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 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 ou 10.000 kDa.

[00282] O retentado pode ser separado e/ou diluído em qualquer número de alíquotas desejadas. Por exemplo, múltiplas alíquotas sem qualquer diluição ou a mesma diluição podem ser usadas para determinar a reprodutibilidade. Em outro exemplo, múltiplas alíquotas a diluições diferentes podem ser usadas para construir uma curva de con-

centração. Em uma modalidade, o retentado é separado e/ou diluído em pelo menos 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, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ou 400 alíquotas. As alíquotas podem estar em uma mesma diluição ou em diluições diferentes.

[00283] Um fator de diluição é a razão do volume final de uma mistura (a mistura dos diluentes e alíquota) dividido pelo volume inicial da alíquota. O retentado pode ser diluído em uma ou mais alíquotas a um fator de diluição de cerca de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 9.500, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000 e/ou 100.000. Por exemplo, o retentado pode ser diluído em uma ou mais alíquotas a um fator de diluição de cerca de 500.

[00284] Para estimar uma concentração ou formar uma curva, o retentado pode ser diluído em múltiplas alíquotas. Em uma modalidade do método, o retentado é diluído em uma ou mais alíquotas a um fator de diluição de cerca de 100, 250, 500, 1.000, 10.000 e 100.000. Conforme desejado, o método pode compreender, ainda, detectar uma quantidade de microvesículas em cada alíquota de retentado, por exemplo, que formou um complexo com os um ou mais agentes de ligação. A curva pode ser usada para determinar uma faixa linear da quantidade de microvesículas em da alíquota detectada versus fator de diluição. Uma concentração das microvesículas detectadas para a amostra biológica pode ser determinada com o uso da quantidade de microvesículas determinada em uma ou mais alíquotas dentro da faixa linear. A concentração pode ser comparada a uma concentração de referência, por exemplo, a fim de caracterizar um fenótipo, conforme

descrito no presente documento.

[00285] A invenção também fornece um método relacionado que compreende filtrar uma amostra biológica de um indivíduo através de um módulo de filtração e coletar um filtrado que compreende a vesícula, isolando, assim, a vesícula da amostra biológica. Em tais casos, células e outras entidades grandes podem ser retidas no retentado enquanto as microvesículas passam para o filtrado. Deve-se perceber que estratégias para reter e filtrar as microvesículas podem ser usadas de acordo. Por exemplo, uma amostra pode ser filtrada com uma membrana de seleção que permite que as microvesículas passem, isolando, assim, as microvesículas de partículas grandes (células, complexos, etc). O filtrado que compreende a microvesícula pode ser, então, filtrado com o uso de uma membrana de seleção que retém microvesículas, isolando, assim, as microvesículas de partículas menores (proteínas, ácidos nucleicos, etc). As microvesículas isoladas podem ser, ainda, avaliadas de acordo com os métodos da invenção, por exemplo, para caracterizar um fenótipo.

Precipitação

[00286] As vesículas podem ser isoladas com o uso de um método de precipitação polimérica. O método pode estar em combinação com ou em lugar dos outros métodos de isolamento descritos no presente documento. Em uma modalidade, a amostra contendo as vesículas é colocada em contato com uma formulação de polietilenoglicol (PEG). A formulação polimérica é incubada com a amostra contendo vesículas, então precipitada por centrifugação. O PEG pode ligar-se às vesículas e pode ser tratado para capturar especificamente vesículas adicionalmente a uma porção química de captura, por exemplo, uma proteína de ligação peguilada, tal como um anticorpo. O versado na técnica perceberá que outros polímeros adicionalmente a PEG podem ser usados, por exemplo, derivados de PEG, incluindo metoxipolietileno-

glicóis, poli(óxido de etileno), e vários polímeros de fórmula HO-CH_2-(CH_2-O-CH_2-)n-CH_2-OH que têm diferentes pesos moleculares. A eficácia de isolamento pode depender de vários fatores, incluindo o comprimento das cadeias poliméricas e concentração do polímero usado. Nas modalidades preferenciais, PEG4000 ou PEG8000 pode ser usado a uma concentração de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% ou 10%, por exemplo, 4% ou 8%.

[00287] Em algumas modalidades da invenção, as vesículas são concentradas a partir de uma amostra com o uso do método de precipitação polimérica e as vesículas isoladas são, ainda, separadas com o uso de outra abordagem. A segunda etapa pode ser usada para identificar uma subpopulação de vesículas, por exemplo, que exibem determinados biomarcadores. A segunda etapa de separação pode compreende exclusão de tamanho, um agente de ligação, uma etapa de captura de anticorpo, microesferas, conforme descrito no presente documento.

[00288] Em uma modalidade, as vesículas são isoladas de acordo com os kits ExoQuick™ e ExoQuick-TC™ da System Biosciences, Mountain View, CA EUA. Esses kits usam um método de precipitação à base de polímero para peletizar as vesículas. Similarmente, as vesículas podem ser isoladas com o uso dos kits Isolamento Total de Exossomo (de Soro) ou Isolamento Total de Exossomo (de Meios de Cultura Celular) da Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA EUA). O reagente de Isolamento Total de Exossomo força os componentes menos solúveis, tais como vesículas, para fora da solução, permitindo que os mesmos sejam coletados por uma centrifugação curta e de baixa velocidade. O reagente é adicionado à amostra biológica, e a solução é incubada de um dia para o outro a 2 °C a 8 °C. As vesículas precipitadas são recuperadas por centrifugação padrão.

Agentes de Ligação

[00289] Os agentes de ligação (também referidos como reagentes de ligação) incluem agentes que têm capacidade de ligar um biomarcador alvo. Um agente de ligação pode ser específico para o biomarcador alvo, significando que o agente tem capacidade para ligar um biomarcador alvo. O alvo pode ser qualquer biomarcador útil revelado no presente documento, tal como um biomarcador na superfície da vesícula. Em algumas modalidades, o alvo é uma única molécula, tal como uma única proteína, de modo que o agente de ligação seja específico para a única proteína. Em outras modalidades, o alvo pode ser um grupo de moléculas, tal como uma família ou proteínas que têm um epitopo ou porção química similar, de modo que o agente de ligação seja específico para a família ou grupo de proteínas. O grupo de moléculas pode ser também uma classe de moléculas, tal como proteína, DNA ou RNA. O agente de ligação pode ser um agente de captura usado para capturar uma vesícula ligando-se um componente ou biomarcador de uma vesícula. Em algumas modalidades, um agente de captura compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo, ou um aptâmero, que se liga a um antígeno em uma vesícula. O agente de captura pode ser opcionalmente acoplado a um substrato e usado para isolar uma vesícula, conforme adicionalmente descrito no presente documento.

[00290] Um agente de ligação é um agente que se liga a um biomarcador circulante, tal como uma vesícula ou um componente de uma vesícula. O agente de ligação pode ser usado como um agente de captura e/ou um agente de detecção. Um agente de captura pode ligar e capturar um biomarcador circulante, tal como ligando-se um componente ou biomarcador de uma vesícula. Por exemplo, o agente de captura pode ser um anticorpo de captura ou um antígeno de captura que se liga a um antígeno em uma vesícula. Um agente de detecção pode ligar-se a um biomarcador circulante, facilitando, assim, a

detecção do biomarcador. Por exemplo, um agente de captura que compreende um anticorpo ou aptâmero que é sequestrado a um substrato pode ser usado para capturar uma vesícula em uma amostra, e um agente de detecção que compreende um anticorpo ou aptâmero que porta uma identificação pode ser usado para detectar a vesícula capturada por meio de detecção da identificação do agente de detecção. Em algumas modalidades, uma vesícula é avaliada com o uso de agentes de captura e detecção que reconhecem os mesmos biomarcadores de vesícula. Por exemplo, uma população de vesículas pode ser capturada com o uso de uma tetraspanina, tal como com o uso de um anticorpo anti-CD9 ligado a um substrato, e as vesículas capturadas podem ser detectadas com o uso de um anticorpo anti-CD9 identificado com fluorescência para identificar as vesículas capturadas. Em outras modalidades, uma vesícula é avaliada com o uso de agentes de captura e detecção que reconhecem biomarcadores de vesícula diferentes. Por exemplo, uma população de vesículas pode ser capturada com o uso de um marcador célula-específico, tal como com o uso de um anticorpo anti-PCSA ligado a um substrato, e as vesículas capturadas podem ser detectadas com o uso de um anticorpo anti-CD9 identificado com fluorescência para identificar as vesículas capturadas. Similarmente, a população de vesículas pode ser capturada com o uso de um marcador de vesículas geral, tal como com o uso de um anticorpo anti-CD9 ligado a um substrato, e as vesículas capturadas podem ser detectadas com o uso de um anticorpo identificado com fluorescência para uma marcador célula-específico ou doença-específico para identificar as vesículas capturadas.

[00291] Os biomarcadores reconhecidos pelo agente de ligação são, algumas vezes, referidos no presente documento como um antígeno. A não ser que especificado de outro modo, antígeno, conforme usado no presente documento, destina-se a abranger qualquer entida-

de que tenha capacidade de ser ligada por um agente de ligação, a despeito do tipo de agente de ligação ou da imunogenicidade do biomarcador. O antígeno abrange, ainda, um fragmento funcional do mesmo. Por exemplo, um antígeno pode abranger um biomarcador de proteína que tem capacidade de ser ligado por um agente de ligação, incluindo um fragmento da proteína que tem capacidade de ser ligado por um agente de ligação.

[00292] Em uma modalidade, uma vesícula é capturada com o uso de um agente de captura que se liga a um biomarcador em uma vesícula. O agente de captura pode ser acoplado a um substrato e usado para isolar uma vesícula, conforme adicionalmente descrito no presente documento. Em uma modalidade, um agente de captura é usado para captura por afinidade ou isolamento de uma vesícula presente em uma substância ou amostra.

[00293] Um agente de ligação pode ser usado após uma vesícula ser concentrada ou isolada de uma amostra biológica. Por exemplo, uma vesícula pode ser primeiramente isolada de uma amostra biológica antes de uma vesícula com uma bioassinatura específica ser isolada ou detectada. A vesícula com uma bioassinatura específica pode ser isolada ou detectada com o uso de um agente de ligação para o biomarcador. Uma vesícula com o biomarcador específico pode ser isolada ou detectada a partir de uma população heterogênea de vesículas. Alternativamente, um agente de ligação pode ser usado em uma amostra biológica que compreende vesículas sem uma etapa de isolamento ou concentração anterior. Por exemplo, um agente de ligação é usado para isolar ou detectar uma vesícula com uma bioassinatura específica diretamente a partir de uma amostra biológica.

[00294] Um agente de ligação pode ser um ácido nucleico, proteína ou outra molécula que pode se ligar a um componente de uma vesícula. O agente de ligação pode compreender DNA, RNA, anticorpos mo-

noclonais, anticorpos policlonais, Fabs, Fab', anticorpos de cadeia única, anticorpos sintéticos, aptâmeros (DNA/RNA), peptoides, zDNA, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), ácidos nucleico bloqueados (LNAs), lectinas, compostos químicos de ocorrência natural ou sintéticos (incluindo, porém, sem limitação, fármacos, reagentes de identificação), dendrímeros ou uma combinação dos mesmos. Por exemplo, o agente de ligação pode ser um anticorpo de captura. Nas modalidades da invenção, o agente de ligação compreende um agente de identificação de proteína de membrana. Consultar, 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.

[00295] Em alguns casos, um único agente de ligação pode ser empregado para isolar ou detectar uma vesícula. Em outros casos, uma combinação de diferentes agentes de ligação pode ser empregada para isolar ou detectar uma vesícula. Por exemplo, 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 agentes de ligação diferentes podem ser usados para isolar ou detectar uma vesícula a partir de uma amostra biológica. Além disso, os um ou mais agentes de ligação diferentes para uma vesícula podem formar uma bioassinatura de uma vesícula, conforme adicionalmente descrito abaixo.

[00296] Diferentes agentes de ligação podem ser também usados para multiplexação. Por exemplo, o isolamento ou a detecção de mais de uma população de vesículas pode ser realizado isolando-se ou detectando-se cada população de vesículas com um agente de ligação diferente. Diferentes agentes de ligação podem ser ligados a diferentes partículas, em que as diferentes partículas são identificadas. Em

outra modalidade, um arranjo que compreende diferentes agentes de ligação pode ser usado para análise multiplex, em que os diferentes agentes de ligação são identificados de modo diferente ou podem ser avaliados com base na localização do agente de ligação no arranjo. A multiplexação pode ser realizada até a capacidade de resolução das identificações ou método de detecção, tal como descrito abaixo. Os agentes de ligação podem ser usados para detectar as vesículas, tal como para detectar vesículas específicas de célula de origem. O próprio agente de ligação ou os próprios múltiplos agentes de ligação podem formar um perfil de agente de ligação que fornece uma bioassinatura para uma vesícula. Um ou mais agentes de ligação podem ser selecionados a partir da Figura 2 da Publicação de Patente Internacional nº WO/2011/127219, 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. Por exemplo, se uma população de vesículas for detectada ou isolada com o uso de dois, três, quatro ou mais agentes de ligação em uma detecção ou isolamento diferencial de uma vesícula a partir de uma população heterogênea de vesículas, o perfil de agente de ligação particular para a população de vesículas fornece uma bioassinatura para a população de vesículas particular. A vesícula pode ser detectada com o uso de qualquer número de agentes de ligação de uma forma multiplex. Assim, o agente de ligação pode ser também usado para formar uma bioassinatura para uma vesícula. A bioassinatura pode ser usada para caracterizar um fenótipo.

[00297] O agente de ligação pode ser uma lecitina. Lecitinas são proteínas que se ligam seletivamente a polissacarídeos e glicoproteínas e estão amplamente distribuídos em plantas e animais. Por exemplo, lectinas, tais como aquelas derivadas de Galanthus nivalis na forma de Galanthus nivalis agglutinin ("GNA"), Narcissus pseudonarcis-

sus na forma de Narcissus pseudonarcissus agglutinin ("NPA") e as algas verdes azuis Nostoc ellipsosporum chamadas "cianovirina" (*Boyd et al. Antimicrob Agents Chemother 41(7): 1.521 a 1.530, 1997; Hammar et al. Ann N Y Acad Sci 724: 166 a 169, 1994; Kaku et al. Arch Biochem Biophys 279(2): 298 a 304, 1990*) podem ser usadas para isolar uma vesícula. Essas lectinas podem ligar-se a glicoproteínas que têm um alto teor de manose (*Chervenak et al. Biochemistry 34(16): 5.685 a 5.695, 1995*). Alto teor de manose refere-se a glicoproteínas que têm ligações manose-manose na forma de ligações manose-manose α-1→3 ou α-1→6.

[00298] O agente de ligação pode ser um agente que liga uma ou mais lectinas. A captura de lecitina pode ser aplicada ao isolamento do biomarcador catepsina D já que o mesmo é uma proteína glicosilada capaz de ligar as lectinas Galanthus nivalis agglutinin (GNA) e concanavalina A (ConA).

[00299] Métodos e dispositivos para usar lectinas para capturar vesículas são descritos nas Publicações de Patente Internacional nº WO/2011/066589, intitulada "METHODS AND SYSTEMS FOR ISOLATING, STORING, AND ANALYZING VESICLES" e depositada em 30 de novembro de 2010; WO/2010/065765, intitulada "AFFINITY CAPTURE OF CIRCULATING BIOMARKERS" e depositada em 3 de dezembro de 2009; WO/2010/141862, intitulada "METHODS AND MATERIALS FOR ISOLATING EXOSOMES" e depositada em 4 de junho de 2010; e WO/2007/103572, intitulada "EXTRACORPOREAL REMOVAL OF MICROVESICULAR PARTICLES" e depositada em 9 de março de 2007, em cada um dos pedidos é incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

[00300] O agente de ligação pode ser um anticorpo. Por exemplo, uma vesícula pode ser isolada com o uso de um ou mais anticorpos específicos para um ou mais anticorpos específicos presentes na vesí-

cula. Por exemplo, uma vesícula pode ter CD63 em sua superfície, e um anticorpo, ou anticorpo de captura, para CD63 pode ser usado para isolar a vesícula. Alternativamente, uma vesícula derivada de uma célula tumoral pode expressar EpCam, a vesícula pode ser isolada com o uso de um anticorpo para EpCam e CD63. Outros anticorpos para isolar vesículas podem incluir um anticorpo, ou anticorpo de captura, para CD9, PSCA, TNFR, CD63, B7H3, MFG-E8, EpCam, Rab, CD81, STEAP, PCSA, PSMA ou 5T4. Outros anticorpos para isolar vesículas podem incluir um anticorpo, ou anticorpo de captura, para DR3, STEAP, epha2, TMEM211, MFG-E8, Fator de Tecido (TF), unc93A, A33, CD24, NGAL, EpCam, MUC17, TROP2 ou TETS.

[00301] Em algumas modalidades, o agente de captura é um anticorpo para CD9, CD63, CD81, PSMA, PCSA, B7H3, EpCam, PSCA, ICAM, STEAP ou EGFR. O agente de captura pode ser também usado para identificar um biomarcador de uma vesícula. Por exemplo, um agente de captura, tal como um anticorpo para CD9, poderia identificar CD9 como um biomarcador da vesícula. Em algumas modalidades, uma pluralidade de agentes de captura pode ser usada, tal como em análise multiplex. A pluralidade de agentes de captura pode compreende agentes de ligação para um ou mais dentre: CD9, CD63, CD81, PSMA, PCSA, B7H3, EpCam, PSCA, ICAM, STEAP e EGFR. Em algumas modalidades, a pluralidade de agentes de captura compreende agentes de ligação para CD9, CD63, CD81, PSMA, PCSA, B7H3, MFG-E8 e/ou EpCam. Em ainda outras modalidades, a pluralidade de agentes de captura compreende agentes de ligação para CD9, CD63, CD81, PSMA, PCSA, B7H3, EpCam, PSCA, ICAM, STEAP e/ou EGFR. A pluralidade de agentes de captura compreende agentes de ligação para TMEM211, MFG-E8, Fator de Tecido (TF) e/ou CD24.

[00302] Os anticorpos referidos no presente documento podem ser moléculas de imunoglobulina ou porões imunologicamente ativas de

moléculas de imunoglobulina, isto é, moléculas que contêm um sítio de ligação de antígeno que liga especificamente um antígeno e anticorpos sintéticos. As moléculas de imunoglobulina podem ser de qualquer classe (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD ou IgA) ou subclasse de moléculas de imunoglobulina. Os anticorpos incluem, porém, sem limitação, anticorpos policlonais, monoclonais, biespecíficos, sintéticos, humanizados e quiméricos, anticorpos de cadeia única, fragmentos Fab e fragmentos $F(ab')_2$, porções Fv ou Fv', fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) ou fragmentos de ligação de epitopo de qualquer um dos anteriores. Um anticorpo, ou, de modo geral, qualquer molécula, "liga-se especificamente" a um antígeno (ou outra molécula) se o anticorpo se ligar, de preferência, ao antígeno e, por exemplo, tiver menos que cerca de 30%, 20%, 10%, 5% ou 1% de reatividade cruzada com outra molécula.

[00303] O agente de ligação pode ser também um polipeptídeo ou peptídeo. Polipeptídeo é usado em seu sentido mais amplo e pode incluir uma sequência de aminoácidos de subunidade, análogos de aminoácido ou peptidomiméticos. As subunidades podem ser ligadas por ligações peptídicas. Os polipeptídeos podem ser de ocorrência natural, formas processadas de polipeptídeos de ocorrência natural (tal como por digestão enzimática), quimicamente sintetizados ou expressos de modo recombinante. Os polipeptídeos para uso nos métodos da presente invenção podem ser quimicamente sintetizados com o uso de técnicas padrão. Os polipeptídeos podem compreender D-aminoácidos (que são resistentes a proteases L-aminoácido-específicas), uma combinação de D e L-aminoácidos, β aminoácidos ou vários outros aminoácidos de ocorrência não natural ou projetados (por exemplo, β-metil aminoácidos, Cα-metil aminoácidos e Nα-metil aminoácidos, etc.) para conduzir propriedades especiais. Os aminoácidos sintéticos po-

dem incluir ornitina para lisina e norleucina para leucina ou isoleucina. Adicionalmente, os polipeptídeos podem ter ligações peptidomiméticas, tais como ligações de éster, para preparar polipeptídeos com propriedades inovadoras. Por exemplo, pode ser gerado um polipeptídeo que incorpora uma ligação peptídica reduzida, isto é, R_1-CH_2-NH-R_2, em que R_1 e R_2 são resíduos ou sequências de aminoácidos. Um peptídeo reduzido pode ser introduzido como uma subunidade de dipeptídeo. Tal polipeptídeo poderia ser resistente à atividade de protease e poderia possuir uma meia vida estendida *in vivo*. Os polipeptídeos podem também incluir peptoides (glicinas N-substituídas), em que as cadeias laterais são anexadas a átomos de nitrogênio ao longo da cadeia principal da molécula, em vez de aos α-carbonos, como em aminoácidos. Polipeptídeos e peptídeos destinam-se a ser usados de modo intercambiável por todo este pedido, isto é, nos casos em que o termo peptídeo é usado, o mesmo pode também incluir polipeptídeos, e nos casos em que o termo polipeptídeos é usado, o mesmo pode também incluir peptídeos. O termo "proteína" também se destina a ser usado de modo intercambiável por todo este pedido com os termos "polipeptídeos" e "peptídeos", a não ser que especificado de outro modo.

[00304] Uma vesícula pode ser isolada, capturada ou detectada com o uso de um agente de ligação. O agente de ligação pode ser um agente que liga uma "proteína de manutenção" de vesícula ou biomarcador de vesícula geral. O biomarcador pode ser CD63, CD9, CD81, CD82, CD37, CD53, Rab-5b, Anexina V, MFG-E8 ou outros marcadores de vesícula comumente observados, incluindo aqueles listados na Tabela 3. Além disso, qualquer um dos marcadores revelados no presente documento ou na Tabela 3 pode ser selecionado na identificação de uma bioassinatura candidata para uma doença ou afecção, em que os um ou mais biomarcadores selecionados têm um papel direto ou indireto em mecanismos envolvidos na doença ou afecção.

[00305] O agente de ligação pode ser também um agente que se liga a uma vesícula derivada e um tipo de célula específico, tal como uma célula tumoral (por exemplo, agente de ligação para fator de Tecido, EpCam, B7H3, RAGE ou CD24) ou uma célula de origem específica. O agente de ligação usado para isolar ou detectar uma vesícula pode ser um agente de ligação para um antígeno selecionado a partir da Figura 1 da Publicação de Patente Internacional nº WO/2011/127219, 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. O agente de ligação para uma vesícula pode ser também selecionado dentre aqueles listados na Figura 2 da Publicação de Patente Internacional nº WO/2011/127219. O agente de ligação pode ser para um antígeno, tal como uma tetraspanina, MFG-E8, Anexina V, 5T4, B7H3, caveolina, CD63, CD9, E-Caderina, fator de tecido, MFG-E8, TMEM211, CD24, PSCA, PCSA, PSMA, Rab-5B, STEAP, TNFR1, CD81, EpCam, CD59, CD81, ICAM, EGFR ou CD66. Um agente de ligação para plaqueta pode ser uma glicoproteína, tal como GpIa-IIa, GpIIb-IIIa, GpIIIb, GpIb ou GpIX. Um agente de ligação pode ser para um antígeno que compreende um ou mais dentre 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 e CD80. Por exemplo, o agente de ligação pode ser um ou mais dentre CD9, CD63, CD81, B7H3, PCSA, MFG-E8, MUC2, EpCam, RAGE e Muc17. Um ou mais agentes de ligação, tais como um ou mais agentes de ligação para dois ou mais dos antígenos, podem ser usados para isolar ou detectar uma vesícula. O agente de ligação usado pode ser selecionado com base no desejo de isolar ou detectar uma vesícula derivada de um tipo de célula particular ou vesícula específica para célula de ori-

gem. O agente de ligação pode ser para um ou mais marcadores de vesícula na Tabela 4.

[00306] Um agente de ligação pode estar também ligado direta ou indiretamente a uma superfície ou substrato sólido. Uma superfície 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, politetrafluoroetileno (PTFE,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.

[00307] Por exemplo, um anticorpo usado para isolar uma vesícula

pode ser ligado a um substrato sólido, tal como uma cavidade, tais como placas comercialmente disponíveis (por exemplo, da Nunc, Milão, Itália). Cada cavidade pode ser revestida com o anticorpo. Em algumas modalidades, o anticorpo usado para isolar uma vesícula está ligado a um substrato sólido, tal como um arranjo. O arranjo pode ter uma disposição espacial predeterminada de interações de moléculas, ilhas de ligação, biomoléculas, zonas, domínios ou disposições espaciais de ilhas de ligação ou agentes de ligação depositados dentro de limites distintos. Ademais, o termo arranjo pode ser usado no presente documento para referir-se a múltiplos arranjos dispostos em uma superfície, tal como poderia ser o caso em que uma superfície porta múltiplas cópias de um arranjo. Tais superfícies que portam múltiplos arranjos podem ser também referidas como múltiplos arranjos ou arranjos de repetição.

[00308] Os arranjos tipicamente contêm porções químicas endereçáveis que podem detectar a presença de uma entidade, por exemplo, uma vesícula na amostra por meio de um evento de ligação. Um arranjo pode ser referido como um microarranjo. Arranjos ou microarranjos 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). Os arranjos de DNA tipicamente compreendem sequências de nucleotídeos endereçáveis que podem ligar-se a sequências presentes em uma amostra. Arranjos de microRNA, por exemplo, o arranjo MMChips da Universidade de Louisville ou sistemas comerciais da Agilent, podem ser usados para detectar microRNAs. Microarranjos de proteína podem ser usados para identificar interações proteína–proteína, incluindo, sem

limitação, identificar substratos de proteínas quinase, ativação de proteína por fator de transcrição, ou para identificar alvos de moléculas pequenas biologicamente ativas. Os arranjos de proteína podem compreender um arranjo de diferentes moléculas de proteína, comumente anticorpos, ou sequências de nucleotídeos que se ligam às proteínas de interesse. Em um exemplo não limitante, um arranjo de proteína pode ser usado para detectar vesículas que têm determinadas proteínas em sua superfície. Os arranjos de anticorpo compreendem anticorpos pontuados no chip de proteína que são usados para capturar moléculas para detectar proteínas ou outros materiais biológicos a partir de uma amostra, por exemplo, a partir de soluções de lisado de célula ou tecido. Por exemplo, arranjos de anticorpos podem ser usados para detectar biomarcadores associados à vesícula a partir de fluidos corporais, por exemplo, soro e urina. Os microarranjos de tecido compreendem núcleos de tecido separados montados na forma de arranjo para permitir análise histológica multiplex. Microarranjos celulares, também chamados de microarranjos de transfecção, compreendem vários agentes de captura, tais como anticorpos, proteínas ou lipídios, que podem interagir com células para facilitar sua captura em locais endereçáveis. Os arranjos celulares podem ser também usados para capturar vesículas devido à similaridade entre uma vesícula e a membrana celular. Os microarranjos de composto químico compreendem arranjos de compostos químicos e podem ser usados para detectar proteína ou outros materiais biológicos que ligam os compostos. Os arranjos de carboidrato (glicoarranjos) compreendem arranjos de carboidratos e podem detectar, por exemplo, proteína que liga porções químicas de açúcar. O versado na técnica perceberá que tecnologias ou aprimoramentos similares podem ser usados de acordo com os métodos da invenção.

[00309] Um agente de ligação pode ser também ligado a partículas,

tais como esferas ou microesferas. Por exemplo, um anticorpo específico para um componente de uma vesícula pode ser ligado a uma partícula, e a partícula ligada a anticorpo é usada para isolar uma vesícula de uma amostra biológica. Em algumas modalidades, as microesferas podem ser magnéticas ou identificadas por fluorescência. Adicionalmente, o próprio agente de ligação para isolar vesículas pode ser um substrato sólido. Por exemplo, esferas de látex, tais como esferas de aldeído/sulfato (Interfacial Dynamics, Portland, OR), podem ser usadas.

[00310] Um agente de ligação ligado a uma esfera magnética pode ser também usado para isolar uma vesícula. Por exemplo, uma amostra biológica, tal como soro, de um paciente pode ser coletada para avaliação de câncer de cólon. A amostra pode ser incubada com anti-CCSA-3 (Antígeno Específico para Câncer de Cólon) acoplado a microesferas magnéticas. Uma microcoluna de baixa densidade pode ser colocada no campo magnético de um Separador MACS, e a coluna é, então, lavada com uma solução tampão, tal como solução salina tamponada com Tris. Os complexos imunológicos magnéticos podem ser, então, aplicados à coluna, e o material não específico e não ligado pode ser descartado. A vesícula selecionada por CCSA-3 pode ser recuperada removendo-se a coluna do separados e colocando-se a mesma em um tubo de coleta. Um tampão pode ser adicionado à coluna, e a vesícula magneticamente identificada pode ser liberada aplicando-se o êmbolo suprido com a coluna. A vesícula isolada pode ser diluída em tampão de eluição de IgG, e o complexo pode ser, então, centrifugado para separar microesferas da vesícula. A vesícula específica de célula de origem isolada peletizada pode ser ressuspensa em tampão, tal como solução salina tamponada com fosfato e quantificada. Alternativamente, devido à forte adesão entre vesícula específica de célula de origem capturada por anticorpo e as microesferas magnéticas, uma

enzima proteolítica, tal como tripsina pode ser usada para a liberação das vesículas capturadas sem a necessidade de centrifugação. A enzima proteolítica pode ser incubada com as vesículas específicas de célula de origem capturadas por anticorpo por pelo menos um tempo suficiente para liberar as vesículas.

[00311] Um agente de ligação, tal como um anticorpo, para isolar vesículas é, de preferência, colocado em contato com a amostra biológica que compreende as vesículas de interesse por pelo menos um tempo suficiente para o agente de ligação ligar-se a um componente da vesícula. Por exemplo, um anticorpo pode ser colocado em contato com uma amostra biológica por vários intervalos na faixa de segundos a dias, incluindo, porém, sem limitação, cerca de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 5 horas, 7 horas, 10 horas, 15 horas, 1 dia, 3 dias, 7 dias ou 10 dias.

[00312] Um agente de ligação, tal como um anticorpo específico para um antígeno listado na Figura 1 da Publicação de Patente Internacional nº WO/2011/127219, intitulada "Circulating Biomarkers for Disease" e depositada em 6 de abril de 2011, cujo pedido é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade, ou um agente de ligação listado na Figura 2 da Publicação de Patente Internacional nº WO/2011/127219, pode ser identificado para facilitar a detecção. 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. Várias identificações proteicas, radioativas, fluorescentes, enzimáticas e outras são descritas adicional-

mente acima.

[00313] Um agente de ligação pode ser direta ou indiretamente identificado, por exemplo, a identificação é fixada ao anticorpo através de biotina-estreptavidina. Alternativamente, um anticorpo 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.

[00314] Dependendo do método de isolamento ou detecção usado, o agente de ligação pode ser ligado a uma superfície ou substrato sólido, tais como arranjos, partículas, cavidades e outros substratos descritos acima. Os métodos para acoplamento químico direto de anticorpos à superfície celular são conhecidos na técnica e podem incluir, por exemplo, acoplamento com o uso de anticorpos ativados por glutaraldeído ou maleimida. 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. A biotinilação pode ser realizada, por exemplo, tratando-se as células com ditiotreitol seguido pela adição de biotina maleimida.

Ensaios baseados em Partícula

[00315] Como uma alternativa para arranjos planos, ensaios que usam partículas ou microesferas, tal como ensaios baseados em esfera, têm capacidade para uso com um agente de ligação. Por exemplo, anticorpos ou aptâmeros são facilmente conjugados com esferas comercialmente disponíveis. *Consultar, por exemplo,* Fan *et al.*, Illumina universal bead arrays. Methods Enzymol. 2006 410:57 a 73; Srinivas

et al. Anal. Chem. 21 de outubro de 2011, *Aptamer functionalized Microgel Particles for Protein Detection*; consultar, também, artigo de análise sobre aptâmeros como agentes de diagnóstico, Brody e Gold, Rev. Mol. Biotech. 2000, 74:5 a 13.

[00316] 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, micropérola), e a reação de ensaio ocorre na superfpicie da microesfera, tal como representado na Figura 2B. Um agente de ligação para uma vesícula pode ser um anticorpo ou aptâmero 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 desejado 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.

[00317] Vários substratos e sistemas de partícula/esfera úteis para os métodos da invenção são descritos adicionalmente acima.

CITOMETRIA DE FLUXO

[00318] Em várias modalidades da invenção, citometria de fluxo, que é descrito em mais detalhes acima, é usada para avaliar uma população de microvesículas em uma amostra biológica. Se desejado, a população de microvesículas pode ser selecionada a partir de outras

partículas (por exemplo, restos de células, agregados de proteína, etc) em uma amostra identificando-se as vesículas com o uso de um ou mais marcadores de vesícula gerais. O marcador de vesícula geral pode ser um marcador na Tabela 3. Os marcadores de vesícula comumente usados incluem tetraspaninas, tais como CD9, CD63 e/ou CD81. As vesículas que compreendem uma ou mais tetraspaninas são, algumas vezes, referidas como "Tet+" no presente documento para indicar que as vesículas são positivas para tetraspanina. As microvesículas selecionadas podem ser, ainda, avaliadas com o uso da metodologia descrita no presente documento. Por exemplo, antígenos de superfície nas microvesículas selecionadas podem ser detectados com o uso de fluxo ou outros métodos. Em algumas modalidades, a carga útil dentro das microvesículas selecionadas é avaliada. Como um exemplo ilustrativo, uma população de microvesículas é colocada em contato com um agente de ligação identificado para um antígeno de superfície de interesse, as microvesículas colocadas em contato são selecionadas com o uso de citometria de fluxo, e a carga útil com as microvesículas é avaliada. A carga útil podem ser polipeptídeos, ácidos nucleicos (por exemplo, mRNA ou microRNA) ou outras entidades biológicas, conforme desejado. Tal avaliação é usada para caracterizar um fenótipo conforme descrito no presente documento, por exemplo, para diagnosticar, prognosticar ou teragnosticar um câncer.

[00319] Em uma modalidade, seleção de fluxo é usada para distinguir populações de microvesículas de outros complexos biológicos. Em um exemplo não limitante, partículas Ago2+/Tet+ e Ago2+/Tet- são detectadas com o uso de metodologia de fluxo para separar vesículas Ago2+ de complexos Ago2+ isentos de vesícula, respectivamente.

Multiplexação

[00320] Experimentos multiplex compreendem experimentos que podem medir simultaneamente múltiplos analitos em um único ensaio.

As vesículas e biomarcadores associados podem ser avaliados de uma forma multiplex. Diferentes agentes de ligação podem ser usados para multiplexar diferentes biomarcadores circulantes, por exemplo, microRNA, proteína ou populações de vesículas. Diferentes biomarcadores, por exemplo, diferentes populações de vesículas, podem ser isolados ou detectados com o uso de diferentes agentes de ligação. Cada população em uma amostra biológica pode ser identificada com uma identificação de sinalização diferente, tal como um fluoróforo, ponto quântico ou identificação radioativa, tal como descrito acima. A identificação pode ser conjugada diretamente a um agente de ligação ou usada indiretamente para detectar um agente de ligação que liga uma vesícula. O número de populações detectadas em um ensaio de multiplexação depende da capacidade de resolução das identificações e da soma de sinais, já que mais de duas populações de vesículas identificadas de modo diferente que ligam dois ou mais elementos de afinidade podem produzir sinais somados.

[00321] A multiplexação 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 circulantes diferentes podem ser realizados. Por exemplo, uma população de vesículas específica para uma célula de origem pode ser avaliada juntamente com uma segunda população de vesículas específica para uma célula de origem diferente, em que cada população é identificada com uma identificação diferente. Alternativamente, uma população de vesículas com um biomarcador ou bioassinatura particular pode ser avaliada com uma segunda população de vesículas com um biomarcador ou bioassinatura diferente. Em alguns casos, centenas ou milhares de vesículas são avaliadas em um único ensaio.

[00322] Em uma modalidade, a análise multiplex é realizada aplicando-se uma pluralidade de vesículas que compreende mais de uma população de vesículas a uma pluralidade de substratos, tais como

esferas. Cada esfera é acoplada a um ou mais agentes de captura. A pluralidade de esferas é dividida em subconjuntos, em que as esferas com o mesmo agente de captura ou combinação de agentes de captura formam um subconjunto de esferas, de modo que cada subconjunto de esferas tenha um agente de captura ou combinação de agentes de captura diferente de outro subconjunto de esferas. As esferas podem ser, então usadas para capturar vesículas que compreender um componente que se liga ao agente de captura. Os diferentes subconjuntos podem ser usados para capturar diferentes populações de vesículas. As vesículas capturadas podem ser, então, analisadas detectando-se um ou mais biomarcadores.

[00323] Citometria de fluxo pode ser usada em combinação com um ensaio baseado em partícula ou baseado em esfera. Podem ser usados imunoensaios 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. Por exemplo, as esferas em cada subconjunto podem ser identificadas de modo diferente de outro subconjunto. Em um sistema de ensaio baseado em partícula, um agente de ligação ou um agente de captura para uma vesícula, tal como um anticorpo de captura, pode ser imobilizado em esferas ou microesferas endereçáveis. Cada agente de ligação para cada ensaio de ligação individual (tal como um imunoensaio quando o agente de ligação é um anticorpo) pode ser acoplado a um tipo distinto de microesfera (isto é, micropérola), e areação de ensaio de ligação ocorre na superfície das microesferas. As microesferas podem distinguidas por identificações diferentes, por exemplo, uma microesfera com um agente de captura específico poderia ter uma identificação de sinalização diferente em comparação a outra microesfera com um agente de captura diferente. Por exemplo, as microesferas podem ser tingidas com intensidades de

fluorescência distintas de modo que a intensidade de fluorescência de uma microesfera com um agente de ligação específico seja diferente daquela de outra microesfera com um agente de ligação diferente. Os biomarcadores ligados por diferentes agentes de captura podem ser detectados de modo diferente com o uso de identificações diferentes.

[00324] Uma microesfera pode ser identificada ou tingida com pelo menos 2 identificações ou corantes diferentes. Em algumas modalidades, a microesfera é identificada com pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 identificações diferentes. Diferentes microesferas em uma pluralidade de microesferas podem ter mais de uma identificação ou corante, em que vários subconjuntos das microesferas têm várias razões e combinações das identificações ou corantes, permitindo a detecção de diferentes microesferas com diferentes agentes de ligação. Por exemplo, as várias razões e combinações de identificações e corantes podem permitir diferentes intensidades fluorescentes. Alternativamente, as várias razões e combinações podem ser usadas para gerar diferentes padrões de detecção para identificar o agente de ligação. As microesferas podem ser identificadas ou tingidas externamente ou podem ter fluorescência intrínseca ou identificações de sinalização. As esferas podem ser carregadas separadamente com seus agentes de ligação adequados e, assim, diferentes populações de vesículas podem ser isoladas com base nos diferentes agentes de ligação nas microesferas identificadas de modo diferente às quais os diferentes agentes de ligação são acoplados.

[00325] Em outra modalidade, a análise multiplex pode ser realizada com o uso de um substrato plano, em que o substrato compreende uma pluralidade de agentes de captura. A pluralidade de agentes de captura pode capturar uma ou mais populações de vesículas, e um ou mais biomarcadores das vesículas capturadas detectados. O substrato plano pode ser um microarranjo ou outro substrato conforme adicio-

nalmente descrito no presente documento.

Agentes de Ligação

[00326] Uma vesícula pode ser isolada ou detectada com o uso de um agente de ligação para um componente inovador de uma vesícula, tal como um anticorpo para um antígeno inovador específico para uma vesícula de interesse. Os antígenos inovadores que são específicos para uma vesícula de interesse podem ser isolados ou identificados com o uso de diferentes compostos de teste de composição conhecida ligados a um substrato, tal como um arranjo ou uma pluralidade de partículas, que podem permitir que uma grande quantidade de espaço químico/estrutural seja adequadamente amostrada com o uso de apenas uma pequena fração do espaço. O antígeno inovador identificado pode também servir como um biomarcador para a vesícula. Por exemplo, um antígeno inovador identificado para uma vesícula específica para célula de origem pode ser um biomarcador útil.

[00327] O termo "agente" ou "reagente", conforme usado em relação a entrar em contato com uma amostra, pode significar qualquer entidade projetada para ligar-se, hibridizar-se, associar-se ou, de outro modo, detectar ou facilitar a detecção de uma molécula alvo, incluindo polipeptídeos, peptídeos, moléculas de ácido nucleico, leptinas, lipídios ou qualquer outra entidade biológica alvo que possa ser detectada conforme descrito no presente documento ou conforme conhecido na técnica. Os exemplos de tais agentes/reagentes são bem conhecidos na técnica e incluem, porém, sem limitação, iniciadores de ácido nucleico específicos, sondas de ácido nucléico, anticorpos, aptâmeros, peptoide, ácido nucleico peptídico, ácido nucleico bloqueado, lecitina, dendrímero, composto químico ou outras entidades descritas no presente documento ou conhecidas na técnica.

[00328] Um agente de ligação pode ser identificado avaliando-se uma população de vesículas homogênea ou heterogênea contra com-

postos de teste. Como a composição de cada composto de teste na superfície do substrato é conhecida, essa constitui uma tela para elementos de afinidade. Por exemplo, um arranjo de compostos de teste compreende composto de teste em locais específicos nos locais endereçáveis de substrato e pode ser usado para identificar um ou mais agentes de ligação para uma vesícula. Os compostos de teste podem ser todos não relacionados ou relacionados com base em variações menores de uma sequência ou estrutura nuclear. Os compostos de teste diferentes podem incluir variantes de um dado composto de teste (tal como isoformas de polipeptídeo), compostos de teste que são não relacionados de modo estrutura e composicional ou uma combinação dos mesmos.

[00329] Um composto de teste pode ser um peptoide, polissacarídeo, composto orgânico, composto inorgânico, polímero, lipídios, ácido nucleico, polipeptídeo, anticorpo, proteína, polissacarídeo ou outro composto. O composto de teste pode ser natural ou sintético. O composto de teste pode compreender ou consistir em compostos heteropoliméticos lineares ou ramificados com base em qualquer uma de diversas ligações ou combinações de ligações (por exemplo, amida, éster, éter, tiol, adições de radical, coordenação de metal, etc.), estruturas dendríticas, estruturas circulares, estruturas de cavidade ou outras estruturas com múltiplos sítios próximos de ligação que servem como arcabouços nos quais adições específicas são realizadas. Os compostos de teste podem ser pontuados em um substrato ou sintetizados *in situ*, com o uso de métodos padrão na técnica. Adicionalmente, o composto de teste pode ser pontuado ou sintetizado *in situ* em combinações a fim de detectar interações úteis, tal como ligação cooperativa.

[00330] O composto de teste pode ser um polipeptídeo com sequência de aminoácidos conhecida, assim, a detecção de uma ligação

de composto de teste com uma vesícula pode levar à identificação de um polipeptídeo de sequência de aminoácidos conhecida que pode ser usado como um agente de ligação. Por exemplo, uma população homogênea de vesículas pode ser aplicada a um arranjo pontuado em uma lâmina que contém entre poucos e 1.000.000 polipeptídeos de teste que têm um comprimento de aminoácidos variáveis. Os polipeptídeos podem ser fixados à superfície através do C-terminal. A sequência dos polipeptídeos pode ser gerada aleatoriamente a partir de 19 aminoácidos, excluindo cisteína. A reação de ligação pode incluir um competidor não específico, tal como proteínas bacterianas em excesso identificadas com outro corante de modo que a razão de especificidade para cada alvo de ligação de polipeptídeo possa ser determinada. Os polipeptídeos com a especificidade e ligação mais altas podem ser selecionados. A identidade do polipeptídeo em cada ponto é conhecida e, assim, pode ser facilmente identificada. Uma vez que os antígenos inovadores específicos para a população homogênea de vesículas, tal como uma vesícula específica para célula de origem, sejam identificados, tais vesículas específicas para célula de origem podem ser subsequentemente isoladas com o uso de tais antígenos em métodos descritos adiante.

[00331] Um arranjo pode ser também usado para identificar um anticorpo como um agente de ligação para uma vesícula. Os anticorpos de teste podem ser fixados a um arranjo e avaliados contra uma população heterogênea de vesículas para identificar anticorpos que podem ser usados para isolar ou identificar uma vesícula. Uma população homogênea de vesículas, tais como vesículas específicas para célula de origem, pode ser também avaliada com um arranjo de anticorpos. Além de identificar anticorpos para isolar ou detectar uma população homogênea de vesículas, um ou mais biomarcadores específicos para a população homogênea podem ser identificados. As plataformas co-

mercialmente disponíveis com anticorpos de teste pré-selecionados ou seleção personalizada de anticorpos de teste fixados ao arranjo podem ser usadas. Por exemplo, um arranjo de anticorpos da Full Moon Biosystems pode ser avaliado com o uso de vesículas derivadas de células de câncer de próstata que identificam anticorpos para Bcl-XL, ERCC1, Queratina 15, CD81/TAPA-1, CD9, Antígeno Epitelial Específico (ESA) e Mastócitos Quimase como agentes de ligação, e as proteínas identificadas podem ser usadas como biomarcadores para as vesículas. O biomarcador pode estar presente ou ausente, subexpresso ou superexpresso, com mutação ou modificado em ou sobre uma vesícula e usado na caracterização de uma afecção.

[00332] Um anticorpo ou anticorpo sintético a ser usado como um agente de ligação podem também ser identificado através de um arranjo de peptídeos. Outro método é o uso de geração de anticorpo sintético através de exibição de fago de anticorpo. As bibliotecas de bacteriófagos M13 de anticorpos (por exemplo, Fabs) são exibidas nas superfícies de partículas de fago como fusões a uma proteína de revestimento. Cada partícula de fago exibe um anticorpo exclusivo e também encapsula um vetor que contém o DNA de codificação. Bibliotecas altamente diversas podem ser construídas e representadas como conjuntos de fagos, que podem ser usados na seleção de anticorpos para ligação à antígenos imobilizados. Os fagos de ligação de antígeno são retidos pelo antígeno imobilizado, e os fagos de não ligação são removidos por lavagem. O conjunto de fagos retido pode ser amplificado por infecção de um hospedeiro *Escherichia coli* e o conjunto amplificado pode ser usado para redadas adicionais de seleção para obter eventualmente uma população que é dominada por clones de ligação de antígeno. Nesse estágio, clones de fago individuais podem ser isolados e submetidos a sequenciamento de DNA para decodificar as sequências dos anticorpos exibidos. Através do uso de exibição de

fago e outros métodos conhecidos na técnica, anticorpos designer de alta afinidade para vesículas podem ser gerados.

[00333] Ensaios baseados em esferas podem ser também usados para identificar agentes de ligação inovadores para isolar ou detectar uma vesícula. Um anticorpo ou peptídeo de teste pode ser conjugado a uma partícula. Por exemplo, uma esfera pode ser conjugada a um anticorpo ou peptídeo e usada para detectar e quantificar as proteínas expressas na superfície de uma população de vesículas a fim de revelar e selecionar especificamente os anticorpos inovadores que podem alvejar vesículas de tipos específicos de tecido ou tumor. Qualquer molécula de origem orgânica pode ser conjugada com sucesso a uma esfera de poliestireno através do uso de um kit comercialmente disponível de acordo com as instruções do fabricante. Cada esfera apresentada pode ser colorida em um determinado comprimento de onda detectável e cada uma pode ser ligada a um anticorpo ou peptídeo conhecido que pode ser usado para medir especificamente que esferas estão ligadas às proteínas exossômicas que correspondem ao epitopo de anticorpos ou peptídeos anteriormente conjugados. As esferas podem ser tingidas com intensidades de fluorescência distintas de modo que cada esfera com uma intensidade diferente tenha um agente de ligação diferente, conforme descrito acima.

[00334] Por exemplo, uma preparação de vesícula purificada pode ser diluída em tampão de ensaio a uma concentração adequada de acordo com a faixa dinâmica empiricamente determinada de ensaio. Um volume suficiente de esferas acopladas pode ser preparado e aproximadamente 1 µl das esferas acopladas a anticorpo podem ser aliquotados em uma cavidade e ajustados a um volume final de aproximadamente 50 µl. Uma vez que as esferas conjugadas a anticorpo tenham sido adicionadas a uma placa compatível com vácuo, as esferas podem ser lavadas para garantir condições de ligação apropriadas.

Um volume adequado de preparação de vesícula pode ser, então, adicionado a cada cavidade que é testada, e a mistura incubada, tal como por 15 a 18 horas. Um volume suficiente de anticorpos de detecção com o uso de solução de diluente de anticorpo de detecção pode ser preparado e incubado com a mistura por 1 hora ou mais. As esferas podem ser, então, lavadas antes da adição da mistura de anticorpo de detecção (que expressa biotina) composta por estreptavidina ficoereitina. As esferas podem ser, então, lavadas e aspiradas a vácuo diversas veze antes da análise em um sistema de arranjo de suspensão com o uso de software dotado de um instrumento. A identidade de antígenos que podem ser usados para extrair seletivamente as vesículas pode ser, então, elucidada a partir da análise.

[00335] Os ensaios que usam sistemas de imageamento podem ser usados para detectar e quantificar proteínas expressas na superfície de uma vesícula a fim de revelar e selecionar especificamente e enriquecer vesículas de tipos específicos de tecido, célula ou tumor. Anticorpos, peptídeos ou células conjugados a placas revestidas com carbono multiplex com múltiplas cavidades podem ser usados. A medição simultânea de muitos analitos em uma cavidade pode ser atingida através do uso de anticorpos de captura dispostos em arranjo na superfície de trabalho de carbono com padrão. Os analitos podem ser, então, detectados com anticorpos identificados com reagentes em cavidades de eletrodo com uma placa eletroquimioluminescente intensificada. Qualquer molécula de origem orgânica pode ser conjugada com sucesso à placa revestida de carbono. As proteínas expressas na superfície das vesículas podem ser identificadas a partir desse ensaio e podem ser usadas como alvos para selecionar especificamente e enriquecer vesículas de tipos específicos de tecido ou tumor.

[00336] O agente de ligação pode ser também um aptâmero para um alvo específico. O termo "específico", conforme usado em relação

a um agente de ligação, pode significar que um agente tem uma afinidade maior para seu alvo que outros alvos, tipicamente com uma afinidade muito grande, mas não exige que o agente de ligação seja absolutamente específico para seu alvo.

MICROFLUIDOS

[00337] Os métodos para isolar ou identificar vesículas podem ser usados em combinação com dispositivos de microfluido. Os métodos para isolar ou detectar uma vesícula, tal como descrito no presente documento, podem ser realizados com o uso de um dispositivo de microfluido. Os dispositivos de microfluido, que podem ser também referidos como sistemas "lab-on-a-chip", sistemas microeletromecânicos biomédicos (bioMEMs) ou sistemas integrados de multicomponente, 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.

[00338] 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.

[00339] 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.

[00340] 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.

[00341] 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 específicas 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

a laser duplo ou múltiplo pode ser parte do sistema de microfluido e pode usar um laser para identificar cada pérola ou microesfera por sua codificação de cor, e outro laser pode detectar o sinal de hibridização associado a cada pérola.

[00342] Vários dispositivos de microfluido e métodos são descritos acima.

Metodologia de Isolamento Combinada

[00343] O versado na técnica perceberá que vários métodos de tratamento de amostra e isolamento e concentração de biomarcadores circulantes, tais como vesículas, podem ser combinados conforme desejado. Por exemplo, uma amostra biológica pode ser tratada para impedir a agregação, remover particulado indesejado e/ou depletar proteínas altamente abundantes. As etapas usadas podem ser escolhidas para otimizar etapas de análise a jusante. Em seguida, os biomarcadores, tais como vesículas, podem ser isolados, por exemplo, por cromatografia, centrifugação, gradiente de densidade, filtração, precipitação ou técnicas de afinidade. Qualquer número das etapas posteriores pode ser combinado, por exemplo, uma amostra poderia ser submetida a um ou mais dentre cromatografia, centrifugação, gradiente de densidade, filtração e precipitação a fim de isolar ou concentrar todas ou a maior parte das microvesículas. Em uma etapa subsequente, técnicas de afinidade, por exemplo, com o uso de agentes de ligação para um ou mais alvos de interesse, podem ser usadas para isolar ou identificar microvesículas que portam perfis de biomarcador desejados. Sistemas de microfluido podem ser empregados para realizar algumas ou todas dessas etapas.

[00344] Um esquema de isolamento exemplificado, embora não limitante, para isolar e analisar microvesículas inclui o seguinte: Coleta de plasma ou soro -> remoção de proteínas altamente abundantes -> ultrafiltração -> concentração por nanomembrana -> citometria de fluxo

ou ensaio baseado em partícula.

[00345] Com o uso dos métodos revelados no presente documento ou conhecidos na técnica, os biomarcadores circulantes, tais como vesículas, podem ser isolados ou concentrados em pelo menos cerca de 2 vezes, 3 vezes, 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 12 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 25 vezes, 30 vezes, 35 vezes, 40 vezes, 45 vezes, 50 vezes, 55 vezes, 60 vezes, 65 vezes, 70 vezes, 75 vezes, 80 vezes, 90 vezes, 95 vezes, 100 vezes, 110 vezes, 120 vezes, 125 vezes, 130 vezes, 140 vezes, 150 vezes, 160 vezes, 170 vezes, 175 vezes , 180 vezes, 190 vezes, 200 vezes, 225 vezes, 250 vezes, 275 vezes, 300 vezes, 325 vezes, 350 vezes, 375 vezes, 400 vezes, 425 vezes, 450 vezes, 475 vezes, 500 vezes, 525 vezes, 550 vezes, 575 vezes, 600 vezes, 625 vezes, 650 vezes, 675 vezes, 700 vezes, 725 vezes, 750 vezes, 775 vezes, 800 vezes, 825 vezes, 850 vezes, 875 vezes, 900 vezes, 925 vezes, 950 vezes, 975 vezes, 1.000 vezes, 1.500 vezes, 2.000 vezes, 2.500 vezes, 3.000 vezes, 4.000 vezes, 5.000 vezes, 6.000 vezes, 7.000 vezes, 8.000 vezes, 90.00 vezes ou pelo menos 10.000 vezes. Em algumas modalidades, as vesículas são isoladas ou concentradas em pelo menos 1 ordem de magnitude, 2 ordens de magnitude, 3 ordens de magnitude, 4 ordens de magnitude, 5 ordens de magnitude, 6 ordens de magnitude, 7 ordens de magnitude, 8 ordens de magnitude, 9 ordens de magnitude ou 10 ordens de magnitude ou mais.

[00346] Uma vez concentrados ou isolados, os biomarcadores circulantes podem ser avaliados, por exemplo, a fim de caracterizar um fenótipo conforme descrito no presente documento. Em algumas modalidades, as próprias etapas de concentração ou isolamento lançam luz sobre o fenótipo de interesse. Por exemplo, os métodos de afinidade podem detectar a presença ou nível de biomarcadores específicos de interesse.

[00347] Os vários sistemas de isolamento e detecção descritos no presente documento podem ser usados para isolar ou detectar biomarcadores circulantes, tais como vesículas, que são informativos para diagnóstico, prognóstico, estratificação de doença, teragnose, previsão de situação de responsivo/não responsivo, monitoramento de doença, monitoramento de tratamento e similares conforme relacionado a tais doenças e distúrbios. As combinações das técnicas de isolamento estão dentro do escopo da invenção. Em um exemplo não limitante, uma amostra ser passada através de uma coluna de cromatografia para isolar vesículas com base em uma propriedade, tal como tamanho de motilidade eletroforética, e as vesículas podem ser, então, passadas através de um dispositivo de microfluido. Agentes de ligação podem ser usados antes, durante ou após essas etapas.

[00348] Os métodos e composições da invenção podem ser usados com microvesículas isoladas ou detectadas com o uso de tais métodos, conforme descrito no presente documento. Em vários exemplos não limitantes: um aptâmero fornecido pelos métodos da invenção pode ser usado como um agente de captura e/ou detecção para um biomarcador, tal como uma proteína ou microvesícula; uma amostra, tal como um fluido corporal, pode ser colocada em contato com uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos da invenção antes de as microvesículas na amostra serem isoladas com o uso de uma ou mais técnicas descritas no presente documento (por exemplo, cromatografia, centrifugação, citometria de fluxo, filtração, isolamento por afinidade, precipitação de polímero, etc); as microvesículas em uma amostra são isoladas com o uso de uma ou mais técnicas descritas no presente documento (por exemplo, cromatografia, centrifugação, citometria de fluxo, filtração, isolamento por afinidade, precipitação de polímero, etc) antes de colocar as microvesículas em contato com um aptâmero ou biblioteca de sondas de oligonucleotídeos da invenção. Contami-

nantes, tais como proteínas altamente abundantes podem ser removidos em todo ou em parte em qualquer etapa adequada em tais processos. Essas e várias outras iterações úteis de tais técnicas para avaliação de microvesículas e outros biomarcadores são contempladas pela invenção.

Biomarcadores

[00349] 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 usado no presente documento, "proteína", "polipeptídeo" e "peptídeo" são usados de modo intercambiável a não ser que declarado de outra maneira. 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 lipídio. O biomarcador pode compreender um carboidrato. O biomarcador pode também ser um complexo, por exemplo, um complexo que compreende proteína, ácidos nucleicos, lipídios 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. Consultar, por exemplo, as Figuras 16B e C. Em outros casos, os biomarcadores associados às microvesículas são avaliados de acordo com os métodos da invenção. Consultar, por exemplo, as Figuras 2A a 2F; a Figura 16A.

[00350] Uma bioassinatura que compreende mais de um biomarca-

dor pode compreender um tipo e 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.

[00351] 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

comumente observados incluem aqueles litados 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 (VE-caderina (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

Classe	Proteína
	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

[00352]

[00353] Qualquer um dos tipos de biomarcadores descritos no presente 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, pode estar circulando livremente 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 par caracterizar fenótipos, conforme revelado no presente documento. Em alguns casos, múltiplas capturas e/ou detectores são usados para intensificar a caracterização. Consultar, por exemplo, as Figuras 2D e E. Os marcadores podem ser detectados 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 perceberão que os marcadores podem ser também usados em ambientes alternativos em determinados casos. Por exemplo, um marcador que pode ser usado para caracterizar um tipo de doença pode ser usado para caracterizar outra doença, conforme for adequado. Considera-se um exemplo não limitante de um marcador tumoral que pode ser usado como um biomarcador para tumores de várias linhagens. As referências de biomarcador na Tabela 4 são aquelas comumente usadas 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 recomendados 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, somente 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, CDWS2, CES2, CK 14, CK 17, CK 5/6, c-KIT, c-Met, c-Myc, COX-2, Ciclin D1, DCK, DHFR, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, E-Caderina, ECGF1, EGFR, fusão de EML4-ALK, EPHA2, Epiregilina, ER, ERBB2, 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, BNF1A, 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	ABL1, AKT1, ALK, APC, AR, ATM, BRAF, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDH1, cKIT, cMET, CSF1R, CTNNB1, EGFR, EGFR (pontuação H),

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	EGFRvIII, ER, ERBB2 (HER2), ERBB4, ERCC1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HER2, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR (VEGFR2), KIT, KRAS, MET,MGMT, Metilação de promotor MGMT, instabilidade de microssatélite (MSI), MLH1, MPL, MSH2, MSH6, NOTCH1, NPM1, NRAS, PD-1, PDGFRA, PD-L1, Pgp, PIK3CA, PMS2, PR, PTEN, PTPN11, RB1, RET, ROS1, RRM1, SMAD4, SMARCB1, SMO, SPARC, STK11, TLE3, TOP2A, TOPO1, TP53, TS, TUBB3, VHL
Alvos associados a fármaco	Codeleção de 1p19, ABL1, AKT1, ALK, APC, AR, ARAF, ATM, BAP1, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK1, CHEK2, cKIT, cMET, CSF1R, CTNNB1, DDR2, EGFR, EGFRvIII, ER, ERBB2 (HER2), ERBB3, ERBB4, ERCC1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, H3K36me3, HER2, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR (VEGFR2), KRAS, MDMT, MGMT, Metilação de MGM, instabilidade de icrossatélite, MLH1, MPL, MSH2, MSH6, NF1, NOTCH1, NPM1, NRAS, NY-ESO-1, PD-1, PDGFRA, PD-L1, Pgp, PIK3CA, PMS2, PR, PTEN, PTPN11, RAF1, RB1, RET, ROS1, ROS1, RRM1, SMAD4, SMARCB1, SMO, SPARC, STK11, TLE3, TOP2A, TOPO1, TP53, TRKA, TS, TUBB3 , VHL, WT1
Alvos associados a fármaco	ABL1, AKT1, ALK, APC, AR, ATM, BRAF, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDH1, cKIT, cMET, CSF1R, CTNNB1, EGFR, EGFR (pontuação H), EGFRvIII, ER, ERBB2 (HER2), ERBB4, ERCC1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HER2, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR (VEGFR2), KRAS, MGMT, Metilação de Promotor MGM, instabilidade de microssatélite (MSI), MLH1, MPL, MSH2, MSH6, NOTCH1, NPM1, NRAS, PD-1, PDGFRA, PD-L1, Pgp, PIK3CA, PMS2, PR, PTEN, PTPN11, RB1, RET, ROS1, RRM1, SMAD4, SMARCB1, SMO, SPARC, STK11, TLE3, TOP2A, TOPO1, TP53, TS, TUBB3, VHL
Alvos associados a fármaco	TOP2A, alteração de cromossomo 17, PBRM1 (PB1/BAF180), BAP1, SETD2 (ANTI-HISTONE H3), MDM2, alteração de cromossomo 12, ALK, CTLA4, CD3, NY-ESO-1, MAGE-A, TP, EGFR
Eficácia do ácido 5-aminossalicíclico (5-ASA)	μ-protocaderina, KLF4, CEBPα
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 cólon	AREG, BRAF, EGFR, EML4-ALK, ERCC1, EREG, KRAS, MSI, NRAS, PIK3CA, PTEN, TS, VEGFR2
Marcadores associados ao tratamento de câncer cólon	AREG, BRAF, EGFR, EML4-ALK, ERCC1, EREG, KRAS, MSI, NRAS, PIK3CA, PTEN, TS, VEGFR2
Marcadores associados ao trata-	BRAF, cKIT, ERBB3, ERBB4, ERCC1, GNA11, GNAQ, MGMT, metilação de MGMT, NRAS, PIK3CA, TUBB3, VEGFR2

Classe ilustrativa	Biomarcadores
mento de melanoma	
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
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

Classe ilustrativa	Biomarcadores
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, 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

Classe ilustrativa	Biomarcadores
Marcadores de vesícula comuns	HSPA8, CD63, Actb, GAPDH, CD9, CD81, ANXA2, HSP90AA1, ENO1, YWHAZ, PDCD6IP, CFL1, SDCBP, PKM2, MSN, MFGE8, EZR, YWHAG, PGK1, EEF1A1, PPIA, GLG1F, 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 (D-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,
Marcadores de vesícula	NSE, TRIM29, CD63, CD151, ASPH, LAMP2, TSPAN1, SNAIL, CD45, CKS1, NSE, FSHR, OPN, FTH1, PGP9, ANNEXIN 1, SP3, CD81, EPCAM, PTHLR, 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-5f2-5p, 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-186b-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*

Classe ilustrativa	Biomarcadores
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	FOXO1A, 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 e.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 seq1TA, 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
Marcadores de vesícula de câncer de próstata	5T4, ACTG1, ADAM10, ADAM15, ALDOA, ANXA2, ANXA6, APOA1, ATP1A1, BASP1, C1orf58, C20orf14, 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

Classe ilustrativa	Biomarcadores
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, Glol, 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), cromogramina 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 (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, Fosfatidiletanolamina (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

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	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, miR-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, Calicreina 2, Calicreina 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, SOX3
Câncer de próstata	NY-ESO-1, SSX-2, SSX-4, XAGE-1b, AMACR, autoantígeno p90, LEDGF
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

Classe ilustrativa	Biomarcadores
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
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,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	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.102038, 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.132883, 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.145968, 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.177186, 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.078047 (GLI2), E.076248 (UNC), 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.116794 (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.123001 (GPR83), E.124962 (SNRPC), E.124788 (ATXN1), E.124795 (DGKE), E.125246 (CLYBL), E.126883 (NUP214), E.127816 (SMARCA4), E.127884 (ECHS1), E.128050 (PARCS), E.129351 (ILF3), E.129787 (CDKN1C), E.130038 (TULP4), E.130612 (CYP2G1P), E.131351 (HAUS8), E.131467 (PSME3), E.133315 (MACROD1), E.134452 (FBXO18), E.134851 (TMEM165), E.135940 (COX5B), E.136169 (SETD2), E.136807 (CDK9), E.137727 (ARHGAP20), E.138031 (ADCY3), E.138050 (TBUMPD2), E.138069 (RAB1A), E.138594 (TMOD3), E.138760 (SCARB2), E.138796 (BAIAP), E.139613 (SMARCC2), E.139684 (ESD), E.140263 (SORD), E.140350 (ANP32A), E.140632 (GLYR1), E.142765 (SVTL1), 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 (PUM1), E.162694 (EXTL2), E.165264 (NDUFB6), E.167113 (COQ4), E.167513 (CDT1), E.167772 (ANGPTL4), E.167978 (SERINC2), 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 (PIBF), E.178473 (UCN3), E.179981 (TSHZ1), E.181163 (NPM1), E.182319 (Tirosina-proteína quinase $gK223), 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.198133 (ZNF544), E.198156, E.198732 (SMOC1), E.198793 (MTCH2), E.039068 (CBH1), E.173230 (GOLGB1), E.124193 (SRSF6), E.140497 (SCAMP2), E.166393 (DTYMK), E.184708 (EIF4ENIF1), E.124164 (VAPB), E.123733 (VASP), E.118260 (CREB1), E.139052 (GOLM1), E.010244 (ZNF207), E.010278 (CD9), E.047597 (SK1), E.049246 (PERP), 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 (BABAM1), 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 (RABSA), E.151715 (TMEM45B), E.152582 (SPEF2), E.154957 (ZNF18), E.162385 (MAGOH), E.165416 (CFL2), E.166398 (HIST1H1E), E.169418 (NPR1), E.178187 (ZNF454), E.178741 (COX5A), E.179115 (FARSA), E.182732 (RGS6), E.183431 (SF3A3), E.183049 (WNK2), E.196236 (XPNPEP3), E.197217 (ENTPD4), E.197813, E.203301, E.116833 (NR3A2), E.121057 (AKAP1), E.006471 (ABCB4), E.071859 (FAM50A), E.084234 (APLP2), E.101222 (SPEF1), E.103175 (WFDC1), E.101449 (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 (NRAS), E.155508 (CNOT8), E.163795 (DPS3), E.166926 (ZNF3), E.172733 (PURG), E.176371 (ZSCAN2), E.177674 (AGTRAP), E.181773 (GPR3), E.183048 (SLC25A16; MRPL12 SLC25A16), E.186376 (ZNF75D), E.187323 (OCC), E.198712 (MT-CO2), E.203909 (C6orf221; KHDC3L), E.001497 (LAS1L), E.009694 (ODZ1), E.080572 (CXorf41; PIH1D3), E.083093 (PALB2), E.089048 (FSF1), E.100065 (CARD10), E.100739 (BEKRB1), E.102904 (TSNAXIP1), E.104824 (HNRNPL), E.107404 (DVL1), E.110066 (SLIV420H1), E.120328 (PCDHB12), E.121903 (ZSCAN20), E.122025 (FLT3), E.136930 (PSMB7), E.142025 (DMRTC2), E.144136 (SLC20A1), E.148535 (GNA12), E.147140 (NONO), E.153391 (INO80C), E.164919 (COX6C), E.171540 (QTP), E.177991 (BET1L), E.179796 (LRRC38), E.197479 (PCDHB11), E.198804 (MT-CO1), E.086205 (FOLH1), E.108432 (ERH), E.100796 (SMEK1), E.104760 (FGL1), E.114302 (PRKAR2A), E.130299 (GTPBP3), E.133961 (NUMB), E.144485 (IRS6), 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.174906 (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 (MRS3), 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.091561 (ENPP4), E.011451 (WIZ), E.053108 (FSTL4), E.064655 (EYA2), E.065308 (TRAM2), E.075151 (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 (MTHF), 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 (B3HDM2), 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.135980 (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 (C3orf54), 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.103442 (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 (FBXW), 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 (WHKKN2), E.172115 (CYCS), E.005882 (PDK2), E.087952 (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.115790 (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 (PPP1R18), 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 (BAP1), 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 (TAP1), 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.086695 (COX10), E.067369 (TP53BP1), E.089248 (ERP29), E.112096 (SOD2), E.136073 (PRCD), E.146856 (AGRL3), E.159423 (ALDH4A1), E.171345 (KRT19), E.172345 (STARD5), E.111847 (UBE2E3), E.117877 (CDH5), E.155714 (PIGZ), E.156603 (MED19), E.075886 (TUBA3D), E.167699 (GLOD4), E.121749 (TBC1D15), E.090861 (AARS), E.093010 (COMT), E.117676 (RPS6KA1), E.155702 (MRM1), E.159921 (GNE), E.169562 (GJB1), E.179776 (CDH15), 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.048239 (HAPD), E.066888 (SNRNP40), E.075239 (ACAT1), E.095627 (TDRD3), 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 (MRS1), E.048544 (MRPS10), E.062485 (CS), E.114054 (PCCB), E.136587 (MXRA1), E.155959 (VHP1), E.181222 (POLR2A), E.183723 (CMTM4), E.184661 (CTCA2), E.204316 (MRPL38), E.140694 (PARN), E.035141 (FAM136A), E.095485 (CWF19L1), E.115540 (MOB4), E.123595 (RAB9A), E.140678 (ITGAX), E.141258 (RGS2), E.158941 (KIAA1967), E.169189 (NSMCE1), E.198431 (TXNRD1), E.016402 (IL20RA), E.112234 (FBXL4), E.125485 (MRPS7), E.128342 (LIF), E.164051 (CCDC51), E.175866 (RAIAP2), E.102780 (DGKH), E.203813 (HIST1H3H), E.198221 (DDX42), E.030582 (GRN), E.106049 (HIBADH), E.130810 (PPAN), E.132475 (H3F3B), E.158286 (CUL4B), E.166266 (CUL5), E.026559 (KCNG1), E.059122 (FLYWCH1), E.107897 (ACBD5), E.121068 (TBX2), E.125944 (HNRNPR), E.134308 (YWHAQ), E.137538 (PI15), E.137601 (NEK1), E.147548 (WHSC1L1), E.149182 (ARFGAP2), E.150458 (KIAA0494), E.165699 (TSC1), E.170027 (PKHD1), E.186575 (NF2), E.188021 (UBQLN2), E.167552 (TUBA1A), E.003756 (RBM5), E.134138 (MEIS2), E.008196 (TFAP2B), E.079331 (REXO1), E.089127 (OAS1), E.106078 (COBL), E.113648 (WWC1), E.116288 (PARK7), E.121940 (CLCC1), E.136240 (CCM2), E.141639 (MAPK4), E.147475 (ERLIN2), E.155660 (PDIA4), E.162298 (SYVN1), E.176978 (DPP7), E.176894 (SMC1B), 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 (DLAT), E.100062 (SLC9A3R1), E.170037 (CNTROB), E.066557 (LRRC40), E.074964 (ARHGEF10L), E.078269 (SYNJ2), E.096063 (BLVRB), E.100142 (POLR2F), E.100399 (CHADL), E.104365 (IKBKB), E.111261 (MANSC1), E.111907 (TPD52L1), E.112978 (BYSL), E.121957 (GPSM2), E.122884 (PSMA1), E.124693 (HIST1H3I), 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 (JOSD3), E.185122 (IBSF1), E.122952 (ZWINT), E.151093 (OXSM), E.067704 (IARS2), E.088899 (PinSAP-proteína de interação 1), E.091483 (FH), E.114388 (NPRL2), E.114861 (FOXP1), E.135914 (HTR2B), E.197837 (HIST4H4), E.127720 (C12orf26, METTL25), E.123416 (TUBA1C), E.067410 (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.170888 (TMEM192), E.175946 (KLHL38), E.178163 (ZNF518B), E.182217 (HIST2H4B), E.184470 (TXNRD2), E.130021 (EIF4G2), E.171862 (BNIMTL1), E.065978 (YBX1), E.115738 (ID2), E.143294 (PRCC), E.158042 (MRPL17), E.160093 (ASMTL), E.099565 (RAB11FIP3), E.183591 (SP1), E.156304 (SCAF4), E.092978 (GPATCH2), E.100056 (DGCR14), E.180883 (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 (DUSL), E.147044 (CASK), E.152818 (LTBR), E.180867 (YOD1), E.184916 (JAG2), E.196526 (AFAP1), E.198785 (ZNF830), E.108465 (CDK5RAP3), E.156515 (HK1), E.036448 (MYO5A), 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 (DPF3), E.010810 (FYN), E.051596 (THOC3), E.006453 (BAI1-associated protein 2-like 1), E.126945 (HNRNPH2), E.185885 (AKR), E.060869 (NEDD4), E.111801 (ISTN3A3),

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 (C1orf130), 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.073614 (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, DHF4B, SVIP, CD151, ALOX5, SLC9A3R2, RAB27B, DLG1, ARCN1, CRCHD3, 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, TEBK2, DDX1, DLD, UNPEP, 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, CUTA, 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, CYB5R3, 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, TNFR1, 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, APAP1, 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, Catenina 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-Caderina, 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, PKA R2, 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, Serpin86, SET, SH3PX1, SLC20A2, SLC3A2 / CD98, SLC9A3R2, SMARCA4, Sorbitol Desidrogenase, SPEN/ RBM15, SPOCK1, SPR, SRVN,Estanniocalcina 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, TNFR1, 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	A2MG1A, A2MG1B, A2M, ACAA2, ACE, ACOT7, ACP1, ACTA1, ACTA2, ACTB, ACTBL2, ACTBL3, ACTC1, ACTG1, ACTG2, ACTN1, ACTN2, ACTN4, ACTR3, ADAM10, ADH5, 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, ARPC5, ARRDC1, ARVCF, ASCC3L1, ASNS, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1B1, ATP4A, ATP5A1, ATP5B, ATP5I, ATP5L, ATP5O, ATP6AP2, B2M, BAIAP2, BAIAP2L1, BRI3BP, BSG, BUB3, C1orf58, C9orf32, CAD, CALM1, CALM2, CALM3, CAND1, CANX, CAP2A1, CBR1, CBR3, CCT2, CCT3, CCT4, CCT5, CCT6A, CCT7, CCT8, CD44, CD46, CD55, CD59, CD63, CD81, CD82, CD9, CDC42, CH60, CH10, CEACAM5, CFL1, CFL2, CHMP1A, CHMP2A, CHMP4B, CKB, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC1, CLIC4, CLSTN1, CLTC, CLTCL1, CLU, COL12A1, COPB1, COPB2, COROIC, COX4I1, COX5B, CRY2, CSPG4, CSRP1, CST3, CTNNA1, CTNNB1, CTNND1, CTTN, CYFIP1, DCD, DERA, DHP2A, DHP2B, DHP2C, DNAH1, DPEP1, DPP4, DYNC1H1, EDIL3, EEF1A1, EEF1A2, EEF1AL3, EEF1G, EIF2, EPNB1, EGFR, EHD1, EHD4, EIF3CP, 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, GalNS, 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_1737335, HEPH, HIST1H2AB, HIST1H2AC, HIST1H2AI, HIST1H2AK, HIST1H3A, 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, HSP90B1, HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPA2, HSPA4, HSPA5, HSPA6, HSPA7, HSPA8, HSPA9, HSPD1, HSPE1, HSPG2, HYOU1, IDH1, IFITM1, IFITM2, IFITM3, IGHG, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHG4, IGHM, IGHV4-31, IGKC, 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, LMAN1, LIN7A, LIN7C, LOC100128956, LOC100130553, LOC100133382, LOC100133739, LOC284889, LOC399828, LOC399720, LOC442497, LOC653269, LRP4, LRPPRC, LRSAM1, LSR, LYZ, MAN1A1, MAP9K4, MARCKS, MARCKSL1, METRNL, MFGE8, MICA, MIF, MINK1, MITD1, MMP7, MOBKL1A, MSN, MTCH2, MUC13, MYADM, MYH10, MYH11, MYH14, MYH9, MYL6, MYL6B, MYO1C, MYO1D, NAB2, 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, PSMD9, 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, TIP2, 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, eMET, 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 e 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, LDR, 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, eMET, 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 SInte-tase (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 Ribosila-ção 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 Esque-lético; 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

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	(160kDa); CNPase; Peptídeo Amilina; Gai1; CD6; alfa-1-antiquimotripsina; E2F-2; MyoD1
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, músculo 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, IF30, IL1RL2, IL7, IL8, ILF2, ILF3, IQCG, ISOC2, IST1, ITGA7, ITGB7, piacoblobina de junção, Queratina 15, KRAS, KRT19, KRT2, KRT7, KRT8, KRT9, KTN1, LAMP1, LMNA, LMNB1, LNPEP, LRPPRC, LRRC57, Mamaglobina, MAN1A1, MAN1A2, MART1, MATR3, MBD5, MCT2, MDR2, 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)7, 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

Classe ilustrativa	Biomarcadores
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, Caderina P, Colágeno IX, p27Kip1, Catepsina D, CD30 (marcador de célula 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	Parmc1
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, NBEL2, 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

Classe ilustrativa	Biomarcadores
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, M8K12, MDF20), ITGB2 (CD18, LFA-1, MAC-1, MF17), ITGB3 (CD61, GP3A, GPIIIa), ITGB4 (CD104), ITGB5 (FLJ26658), ITGB6, ITGB7, ITGB8
Glicoproteína	Gpla-IIa, GpIIb-IIIa, GpIIb, 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,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	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, 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 à 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 tu-

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	mor, 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, Receptor 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, Metalo-

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	proteinase-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 à 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, Lactoilglutationa liase, Peptídeo associado à latência de fator beta de crescimento por transformação, Leptina, Proteína 3 beta inflamatória de macrófago, Fator inibidor de migração

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	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 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, Apolipo-

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	proteína 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, 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

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	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 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,

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	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 fofoespecífica), 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, Re-

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	ceptor 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-14/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 (Colagenase 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 (Silenciador 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-

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	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, TNFa, 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, 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 dependem de ciclina; CHD1L, domínio tipo 1 de ligação de DNA de cromodomínio helicase; CKS1B, CDC28 proteína quinase 1B; COPS3, subunidade 3 de COP9;

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	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 lipídio 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 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); proteína de alvejamento

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	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 Quinase 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), ERCa+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 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

Classe ilustrativa	Biomarcadores
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),

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	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 (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, MUC1.1, 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 carcinoembriô-

Classe ilustrativa	Biomarcadores
	nico (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, Deomogleina, 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)), 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, SK1, SKP2, SRC, TACC3, TAS2R13, TGM2, TJP1, TK1, TNS3, TTK, UBC, USP9X, VCL, VEZT, XRCC5, YAP1, YES1, ZC3HC1
Transição de epitelial-mesenquimal (EMT)	SERPINA3, ACTN1, AGR2, AKAP12, ALCAM, AP1M2, AXL, BSPRY, CCL2, CDH1, CDH2, CEF170, CLDN3, CLDN4, CNN3, CYP4X1, DNMT3A, DSG3, DSP, EFNB2, EHF, ELF3, ELF5, ERBB3, ETV5, FLRT3, FOSB, FOSL1, FOXC1, FX YD 5, GPDIL, HMGA1, HMGA2, HOPX, IF116, 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

[00354]

[00355] Os exemplos de biomarcadores adicionais que podem ser incorporados nos métodos e composições da invenção incluem, sem limitação, aqueles revelados nos Pedidos de Patente Internacional nº

PCT/US2012/042519 (WO 2012/174282), depositado em 14 de junho de 2012, e PCT/US2012/050030 (WO 2013/022995), depositado em 8 de agosto de 2012.

[00356] 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).

[00357] EpCAM é um antígeno de diferenciação pan-epitelial que é expresso em muitas células tumorais. O mesmo está ligado de modo complexo à trajetória de Caderina-Catenina e, portanto, a trajetória WNT fundamental para 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): 1.013 a 1.019.). O mesmo é expresso em células-tronco pluripotentes não diferenciadas. EpCAM é um membro de uma família que inclui pelo menos duas proteínas de membrana tipo I e funciona como uma molécula de adesão celular independente de cálcio homotípico. As mutações nesse gene resultam em enteropatia congênita com formação de tufos. 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. O versado na técnica perceberá que várias modalidades e exemplos que usam EpCAM podem ser aplicados a outros antígenos de superfície de microvesícula também.

Agentes terapêuticos

[00358] Conforme usado no presente documento, "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de composição que atenua (em alguma extensão, conforme julgado por um médico versado) um ou mais sintomas da doença ou afecção em um mamífero. Porém, uma determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz está dentro da habilidade de um clínico com habilidade comum mediante apreciação da revelação apresentada no presente documento. Um médico versado na técnica pode determinar a quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição a fim de tratar ou prevenir uma doença, afecção ou distúrbio particular quando é administrada, tal como por via intravenosa, via subcutânea, via intraperitoneal, via oral ou

através de inalação. A quantidade exata da composição exigida para ser terapeuticamente eficaz dependerá de inúmeros fatores, por exemplo, tal como a atividade específica do agente ativo, o dispositivo de entrega empregado, as características físicas do agente, o propósito para a administração, adicionalmente a muitas considerações específicas sobre o paciente. Mas a determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz está dentro da habilidade de um médico de habilidade comum mediante apreciação da revelação apresentada no presente documento.

[00359] Os termos "tratar", "tratamento", "terapia" e "tratamento terapêutico", conforme usados no presente documento, referem-se à terapia curativa, terapia profilática ou terapia preventiva. Aqueles que precisam de tratamento incluem aqueles já com a doença ou afecção assim como aqueles propensos a ter a doença ou afecção a ser prevenida. Aqueles que precisam de tratamento incluem aqueles já com a doença ou afecção assim como aqueles propensos a ter a doença ou a afecção a ser prevenida. Os termos "tratar", "tratamento", "terapia" e "tratamento terapêutico", conforme usados no presente documento também descrevem a supervisão e cuidado de um mamífero para o propósito de combater uma doença, ou afecção relacionada, e inclui a administração de uma composição para atenuar os sintomas, efeitos colaterais ou outras complicações da doença, afecção. O tratamento terapêutico para câncer inclui, porém, sem limitação, cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia genética e imunoterapia.

[00360] 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".

[00361] 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.

[00362] 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.

[00363] 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.

[00364] 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

[00365] 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 proteicas, 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)

[00366] Os aptâmeros são funcionalmente similares aos anticorpos, exceto pelo fato de que suas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção ("ADME") são intrinsecamente diferentes e, de modo geral, os mesmos carecem de muitas das funções efetoras imunológicas, de modo geral, associadas aos anticorpos (por exemplo, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, citotoxicidade dependente de complemento). Na comparação de muitas das propriedades de aptâmeros e anticorpos anteriormente descritas, diversos fatores sugerem que a entrega de toxina por meio de aptâmeros oferece diversas vantagens concretas em relação à entrega com anticorpos, em último caso, proporcionando aos mesmos um melhor potencial como agentes terapêuticos. Diversos exemplos das vantagens de entrega de

toxina por meio de aptâmeros em relação a anticorpos são como seguem:

[00367] 1) Conjugados de aptâmero-toxina são sintetizados quimicamente por inteiro. A síntese química fornece mais controle sobre a natureza do conjugado. Por exemplo, a estoiquiometria (razão de toxinas por aptâmero) e o sítio de ligação podem ser definidos com precisão. Diferentes químicas de ligante podem ser facilmente testadas. A reversibilidade de dobragem de aptâmero significa que a perda de atividade durante a conjugação é improvável e fornece mais flexibilidade no ajuste das condições de conjugação para maximizar os rendimentos.

[00368] 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. Consultar 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 (como 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)).

[00369] 3) PK ajustável. A meia-vida/metabolismo do aptâmero pode ser facilmente ajustada para corresponder às propriedades de carga útil, otimizando a capacidade de entregar toxina ao tumor enquanto minimiza a exposição sistêmica. Modificações adequadas à cadeia principal do aptâmero e a adição de PEGs com alto peso molecular deve tornar possível a correspondência da meia-vida do aptâmero com

a meia-vida intrínseca da toxina/ligante conjugado, minimizando a exposição sistêmica aos metabólitos que portam toxina não funcionais (esperado se $t_{1/2}$(aptâmero)<<$t_{1/2}$(toxina)) e reduzindo a probabilidade de que aptâmero não conjugado persistente bloqueie funcionalmente a absorção de aptâmero conjugado (esperado se $t_{1/2}$(aptâmero)>>$t_{1/2}$ (toxina)).

[00370] 4) Exigências de material relativamente baixas. 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.

[00371] 5) Administração parenteral é preferencial para essa indicação. Não haverá necessidade especial de desenvolver formulações alternativas para induzir a aceitação do paciente/médico.

[00372] A invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um aptâmero fornecido pela invenção 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 modo relacionado, 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) uma intensificação da entrega do agente ativo a um sítio de doença em relação à entrega do agente ativo sozinho; ou (b) uma intensificação de liberação de microvesículas que resulta em uma diminuição 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 diminuição em 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. Consultar, por exemplo, a seção "Fenótipos".

Métodos de Identificação de Aptâmero

[00373] 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 se liguem 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.

[00374] Os aptâmeros são criados gerando-se aleatoriamente oligonucleotídeos de um comprimento específico, tipicamente com 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.

[00375] O resultado final compreende um ou mais aptâmeros com alta afinidade ao alvo. A invenção fornece, ainda, processamento de tais aptâmeros resultantes que podem ser usados para fornecer características desejáveis: 1) ensaios de ligação competitiva para identificar aptâmeros para um epitopo desejado; 2) análise de motivo para identificar aptâmeros 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. Os métodos são descritos em mais detalhes abaixo e adicionalmente nos Exemplos.

[00376] 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 alinhadas de modo ideal. 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 10). 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).

[00377] 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

[00378] 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 epitopo 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 epitopo 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 epitopo de interesse e coletar os aptâmeros que são deslocados pelo anticorpo. O alvo pode ser uma proteína. Consultar, por exemplo, a Figura 1, que ilustra o método para identificar um aptâmero para um epitopo específico de EpCam.

ANÁLISE DE MOTIVO

[00379] 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 números 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 com alta afinidade com o uso de métodos tradicionais, tais como revelados no presente documento ou conhecido na técnica (por exemplo, ensaio de ligação de ressonância de plásmon, consultar a Figura 5), aproximar a estrutura bidimensional do aptâmero com alta afinidade e identificar aptâmeros dentre um conjunto de sequências que são previstas como tendo uma estrutura bidimensional similar ao aptâmero com 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 Acids Res. 31, 3.429 a 3.431 (2003), cujo conteúdo está incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência. Consultar a Figura 3. 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 Torrent 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, ensaios de ligação de ressonância de plásmon ou similares.

MÉTODOS DE SUBTRAÇÃO DE APTÂMERO

[00380] A fim de desenvolver um ensaio para detectar uma doença, por exemplo, câncer, tipicamente, avalia-se uma grande população de biomarcadores conhecidos de pacientes normais e doentes a fim de identificar marcadores que se correlacionem com a doença. Esse processo apenas funciona se marcadores discriminantes já tiverem sido 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 normais ou microvesículas retiradas 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.

[00381] 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, um alvo de uma população alvo doente 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.

[00382] As microvesículas circulantes podem ser isoladas de amostras de controle, por exemplo, plasma de indivíduos "normais" que não têm uma doença de interesse, tal como uma ausência de câncer. As vesículas na amostra 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, ultrafiltração, ultrafiltração por nanomembrana, o reagente ExoQuick (System Biosciences, Inc., Mountain View, CA), ultracentrifugação, uso de um reagente de agrupamento molecular (por exemplo, TEXIS da Life Technologies), precipitação de polímero (por exemplo, polietilenoglicol (PEG)), isolamento por afinidade, seleção por afinidade, imunoprecipitação, cromatografia, exclusão de tamanho 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 embora os métodos de ultracentrifugação possam ter maior tendência de produzir vesículas em tamanho de exossomo. As bibliotecas de oligonucleotídeos geradas aleatoriamente (por exemplo, produzidas conforme descrito nos Exemplos no presente documento) 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 a biotina. Os aptâmeros isolados são 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.

[00383] 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, 10^7, 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} oligonucleotídeos, é colocado em contato com um componente ou alvo biológico 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 capacidade de se ligar (por exemplo, polipeptídeos, peptídeo, moléculas de ácido nucleico, carboidratos, lipídeos, etc.). 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. Os oligonucleotídeos resultantes compreendem aptâmeros que podem detectar de modo diferente 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.

[00384] Um processo exemplificativo é ilustrado na Figura 4, que demonstra o método para identificar um aptâmero que reconhece, de preferência, vesículas de câncer com o uso de vesículas de indivíduos normais (não 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 diferente 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.

[00385] Em uma modalidade, a invenção fornece um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo, 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).

[00386] 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 distúrbio, tal como 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.

[00387] 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). Um "componente" ou "alvo", conforme usado no contexto da amostra biológica de teste, pode ser algo que esteja presente em amostra ao qual os aptâmeros têm capacidade de se ligar (por exemplo, polipeptídeos, peptídeo, moléculas de ácido nucleico, carboidratos, lipídeos, etc.). Por exemplo, se uma amostra for uma amostra de plasma ou soro, as moléculas de aptâmero podem ligar um biomarcador de polipeptídeo que é somente expresso ou expresso de modo diferente (superexpresso ou subexpresso) em um estado de doença em comparação com um indivíduo não doente. A comparação do

perfil de aptâmero na amostra de teste conforme comparada com a amostra de controle pode ser baseada em medida qualitativa e quantitativa de ligação de aptâmero (por exemplo, ligação versus não ligação, ou nível de ligação em amostra de teste versus nível diferente de ligação na amostra de controle de referência).

[00388] 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, porém, não à amostra de controle identificando, desse modo, 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 liga a um ou mais componentes 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.

[00389] 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, 10^7, 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} 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.

[00390] 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 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 biológica de teste e, opcionalmente, o controle biológico podem também compreender uma amostra de tumor, por exemplo, células de um tumor ou tecido tumoral. Em outras modalidades, a amostra de teste biológico e opcio-

nalmente 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. De modo correspondente, o conjunto de aptâmeros pode ser usado para fornecer uma leitura diagnóstica, prognóstica e/ou teragnóstica de uma doença.

[00391] 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 pode 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 afinidade a um ou mais componentes das microvesículas extracelulares. Os agentes de ligação podem compreender aptâmeros, anticorpos e/ou

outro tipo útil de agente de ligação revelado no presente documento ou conhecido na técnica.

[00392] 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. De modo correspondente, 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.

[00393] 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.

SELEÇÃO DE APTÂMERO NEGATIVA E POSITIVA

[00394] Os aptâmeros podem ser usados em vários ensaios biológicos, incluindo inúmeros tipos de ensaios que dependem de um agen-

te 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.

[00395] Em um aspecto, 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 aos 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, 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 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} se-

quências de ácido nucleico. Uma abordagem ilustrativa para realizar o método é fornecida no Exemplo 7.

[00396] Em algumas modalidades, as etapas (a) a (b) são opcionais. Em outras modalidades, as etapas (a) 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 múltiplas rodadas. 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 da identificação do aptâmero específico para o alvo de interesse. Múltiplas rodadas podem fornecer um rigor de seleção melhorado.

[00397] Em algumas modalidades, os um ou mais componentes de ensaio colocados em contato 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.

[00398] 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 lipídio. O alvo de interesse pode compreender um carboidrato. O alvo de interesse pode também ser um complexo, por exemplo, um complexo que com-

preende proteína, ácidos nucleicos, lipídios e/ou carboidratos. Em algumas modalidades, o alvo de interesse compreende uma microvesícula. Em tais casos, o aptâmero pode ser um agente de ligação para 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. Antígenos de superfície de microvesícula gerais adicionais são fornecidos na Tabela 3 no presente documento.

[00399] 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 teragnóstico 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. Antígenos de superfície de microvesícula adicionais são fornecidos nas Tabelas 3 e 4 no presente documento.

[00400] 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.

[00401] 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).

[00402] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para selecionar um grupo de aptâmeros que compreende: (a) colocar um conjunto de aptâmeros em contato com 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) colocar o subconjunto em contato com 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.

[00403] 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.

[00404] 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.

[00405] As etapas (a) 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) 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) 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 subsequentes das etapas (a) a (d), o primeiro conjunto de amostra pode compreender amostras de pacientes com câncer diferentes das rodadas anteriores. Similarmente, o segundo conjunto de amostra pode compreender amostras de controles diferentes das rodadas anteriores.

[00406] 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 Next Generation conforme desejado.

[00407] O método pode também compreender identificar os alvos do grupo selecionado de aptâmeros. Métodos para identificar alvos de aptâmero são revelados no presente documento.

IDENTIFICAÇÃO DE ALVO DE APTÂMERO

[00408] 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.

[00409] Em uma modalidade, 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 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.

[00410] Um esquema ilustrativo para executar o método é mostrado na Figura 9. A figura mostra um agente de ligação 902, aqui um aptâmero para propósitos de ilustração, ancorado a um substrato 901. O agente de ligação 902 pode ser ligado covalentemente ao substrato 901. O agente de ligação 902 pode ser também não covalentemente ligado. Por exemplo, o agente de ligação 902 pode compreender uma identificação que pode ser atraída para o substrato, tal como um grupo biotina que pode formar um complexo com uma molécula de avidina/estreptavidina que está ligada covalentemente 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 902 liga-se a um antígeno de superfície 903 de microvesícula 904. Na etapa indicada pela seta (i), a microvesícula é rompida enquanto deixa o complexo entre o agente de ligação 902 e o antígeno de superfície 903 intactos. A microvesícula rompida 905 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 903 é libera-

do do agente de ligação 902. O antígeno de superfície 903 pode ser analisado para determinar sua identidade com o uso de 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, lipídio ou carboidrato ou outra entidade biológica revelada no presente documento ou conhecida na técnica.

[00411] 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]} metanotiosiiltonato 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.

[00412] 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 manase. 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 ester 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. Os métodos mecânicos de ruptura que podem ser usados compreendem, sem limitação, cisalhamento mecânico, moagem de esferas, homogeneização, microfluidização, sonicação, French Press, colisão, um moinho coloidal, descompressão, choque osmótico, termólise, congelamento-descongelamento, dissecação ou qualquer combinação dos mesmos.

[00413] Conforme mostrado na Figura 9, o agente de ligação pode ser preso 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 substra-

to por meio de um evento de ligação de biotina-avidina.

[00414] 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 aminoácidos N-terminais, análise de aminoácidos C-terminais, degradação de Edman, cromatografia, eletroforese, eletroforese em gel bidimensional (gel 2D), arranjo de anticorpo e imunoensaio. Os ácidos nucleicos podem ser identificados por sequenciamento.

[00415] 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 9, todas as etapas, exceto pela etapa indicada pela seta (i) (isto é, romper a microvesícula), poderiam ser realizadas para um alvo circulante, tal como uma proteína, ácido nucleico, lipídio, carboidrato ou combinação dos mesmos.

CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRA

[00416] 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.

[00417] Em um aspecto, a invenção fornece um aptâmero que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos cerca de 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. 8 a 21 ou uma sequência variável das mesmas conforme descrito na Tabela

8; b) SEQ ID NOs. 24 a 43 ou uma sequência variável das mesmas conforme descrito na Tabela 11; b) SEQ ID NOs. 44 a 10527; d) SEQ ID NOs. 10528 a 10557 ou uma sequência variável das mesmas conforme descrito na Tabela 12; ou e) um fragmento funcional de qualquer sequência anterior. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para caracterizar uma doença ou um distúrbio que compreende: (a) colocar uma amostra de teste biológica em contato com um ou mais aptâmeros da invenção, por exemplo, qualquer uma daquelas nesse parágrafo ou modificações das mesmas; (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.

[00418] 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 compreendem 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.

[00419] 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 am-

niótico, 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.

[00420] 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.

[00421] 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 (lipídio, 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 Tabela 4.

[00422] 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, por exemplo, 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.

[00423] A Figura 16A é um esquema 1600 que mostra uma configuração de ensaio que pode ser usada para detectar e/ou quantificar um alvo de interesse com ou uso de um ou mais aptâmeros da invenção. O aptâmero de captura 1602 é ligado ao substrato 1601. 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 1603 é ligado pelo aptâmero de captura 1602. 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 lipídio, 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 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 1604 está também ligado ao alvo de interesse 1603. O aptâme-

ro de detecção 1604 porta a identificação 1605, que pode ser detectada para identificar o alvo capturado ao substrato1601 por meio do aptâmero de captura 1602. A identificação pode ser identificação fluorescente, identificação radioativa, enzima ou outra identificação detectável conforme revelada no presente documento. Qualquer aptâmero de captura 1602 ou aptâmero de detecção 1604 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.

[00424] Os aptâmeros da invenção podem ser identificados e/ou usados para vários propósitos 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.

[00425] 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.

[00426] 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 de difteria, ricina, abrina, gelonina e exotoxina A de Pseudomonas. Os compostos com alto peso molecular não imunogênicos para uso com a invenção incluem polialquilenoglicóis, por exemplo, polietilenoglicol. 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.

[00427] 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.

Conjuntos de Oligonucleotídeos para Caracterizar uma Amostra

[00428] A complexidade e a heterogeneidade presentes na biologia desafiam o entendimento de sistemas biológicos e doenças. Existe diversidade em vários níveis, por exemplo, dentre e entre células, tecidos, indivíduos e estados doentios. Consultar, por exemplo, a Figura 13A. A Figura 13B é uma visão geral de várias entidades biológicas que podem ser avaliadas para caracterizar tais amostras. Conforme mostrado na Figura Figure, conforme se passa de avaliar DNA, para RNA, para proteína e, finalmente para complexos de proteína, a quan-

tidade de diversidade e complexidade aumenta drasticamente. O método de biblioteca de sondas de oligonucleotídeos da invenção pode ser usado para caracterizar fontes biológicas complexas, por exemplo, amostras de tecido, células, células tumorais circulantes, microvesículas e complexos, tais como complexos de proteína e proteolipídio.

[00429] Os métodos atuais para caracterizar amostras biológicas podem não tratar adequadamente tal complexidade e diversidade. Conforme mostrado na Figura 13C, tais métodos atuais frequentemente têm uma alternância entre medir diversidade e complexidade. Como um exemplo, considera-se tecnologia de sequenciamento de alto rendimento. A abordagem next generation podem consultar muitos milhares de alvos moleculares em um único ensaio. No entanto, tais abordagens apenas sondam moléculas individuais de DNA e/ou RNA, e, assim, omitem a grande diversidade de proteínas e complexos biológicos. Por outro lado, a citometria de fluxo pode sondas complexos biológicos, mas é limitada a um pequeno número de ligantes predefinidos. Por exemplo, um único ensaio pode sondar um unhado de anticorpos identificados de modo diferente para alvos predefinidos.

[00430] A biblioteca de sondas de oligonucleotídeos da invenção pode superar obstáculos acima com tecnologias de detecção biológica atuais. O tamanho da biblioteca de partida pode ser ajustado para medir tantas entidades diferentes quanto houver membros de biblioteca. Nesse Exemplo, a biblioteca de oligonucleotídeos não treinada inicial tem o potencial de medir 10^{12} ou mais características biológicas. Uma biblioteca maior e/ou diferente pode ser construída conforme desejado. A tecnologia é adaptada para encontrar diferenças entre amostras sem hipóteses sobre o que "poderia ser diferente". Por exemplo, a biblioteca de sondas pode distinguir com base em proteínas individuais, modificações de proteína, complexos de proteína, lipídios, ácidos nucleicos, dobras ou conformações diferentes ou se há algo que distinga uma

amostra de interesse. Assim, o método fornece uma abordagem imparcial para identificar diferenças em amostras biológicas que podem ser usadas para identificar diferentes populações de interesse.

[00431] No contexto de microvesículas cuja superfície pode compreender qualquer número de biomarcadores em várias configurações e complexos, o uso da sonda de biblioteca de oligonucleotídeos para avaliar uma amostra pode ser referida como Perfilagem Topológica de Oligonucleotídeo: TOP™. Embora, conforme observado, os termos aptâmero e oligonucleotídeos sejam tipicamente usados de modo intercambiável no presente documento, algumas diferenças entre aptâmeros individuais "clássicos" e sondas TOP são conforme segue. Os aptâmeros individuais podem compreender oligonucleotídeos individuais selecionados para ligar-se a um alvo específico conhecido em um modo de ligação "chave na fechadura" similar a anticorpo. Os mesmos podem ser avaliados individualmente com base em especificidade e afinidade de ligação para o alvo destinado. No entanto, sondas TOP podem compreender uma biblioteca de oligonucleotídeos destinada a produzir assinaturas de múltiplas sondas. As sondas TOP compreendem inúmeras modalidades de ligação potenciais (complexos eletrostáticos, hidrofóbicos, Watson-Crick, multioligo, etc.). As assinaturas de sonda TOP têm o potencial de identificar subpopulações de pacientes heterogêneas. Por exemplo, uma única biblioteca de sondas TOP pode ser montada para diferenciar múltiplos estados doentios, conforme demonstrado no presente documento. Diferente de aptâmeros únicos clássicos, os alvos de ligação podem ou não ser isolados ou identificados. Deve-se entender que métodos de avaliação que identificam aptâmeros individuais, por exemplo, SELEX, podem ser também usados para enriquecer uma biblioteca virgem de oligonucleotídeos para identificar uma biblioteca de sondas TOP.

[00432] O método geral da invenção é apresentado na Figura 13D.

Uma entrada para o método compreende uma biblioteca randomizada de oligonucleotídeos com o potencial para medir 10^{12} ou mais características biológicas. Conforme apresentado na figura, o método identifica um número desejado (por exemplo, aproximadamente 10^5 a 10^6) que é diferente entre dois tipos de amostra de entrada. A biblioteca randomizada de oligonucleotídeos é colocada em contato com um primeiro e um segundo tipos de amostra, e os oligonucleotídeos que se ligam a cada amostra são identificados. As populações de oligonucleotídeos ligados são comparadas, e os oligonucleotídeos que se ligam especificamente a uma ou outra amostra biológica de entrada são retidos para a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos, enquanto os oligonucleotídeos que se ligam a ambas as amostras biológicas de entrada são descartados. Essa biblioteca de sondas de oligonucleotídeos treinada pode ser, então, colocada em contato com uma nova amostra de teste, e as identidades de oligonucleotídeos que ligam a amostra de teste são determinadas. A amostra de teste é caracterizada com base no perfil de oligonucleotídeos que se ligam. Consultar, por exemplo, a Figura 13H.

[00433] As vesículas extracelulares fornecem um veículo atrativo para o traçar o perfil da complexidade e diversidade biológica acionadas por muitas fontes interrelacionadas. Pode haver bastante heterogeneidade entre populações de microvesículas de paciente para paciente, ou mesmo em populações de microvesículas de um único paciente sob diferentes condições (por exemplo, estresse, dieta, exercício, repouso, doença, etc). A diversidade de fenótipos moleculares dentro das populações de microvesículas em vários estados doentios, mesmo após o isolamento ou seleção de microvesícula por biomarcadores de vesícula, pode apresentar obstáculos que identificam ligantes de ligação de superfície. Essa situação é ainda mais complicada por complexos de proteínas membrânicas de superfície de vesícula. A biblioteca

de sondas de oligonucleotídeos pode ser usada para tratar de tais obstáculos e permitir a caracterização de fenótipos biológicos. A abordagem combina o potencial de diversas bibliotecas de oligonucleotídeos e tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (next generation) para sondas a complexidade de microvesículas extracelulares. Consultar a Figura 13E.

[00434] A determinação de perfil TOP™ pode fornecer medições quantitativas de eventos dinâmicos adicionalmente à detecção de presença/ausência de vários biomarcadores em uma amostra. Por exemplo, as sondas de ligação podem detectar complexos de proteína ou outras modificações pós-traducionais, permitindo a diferenciação de amostras com as mesmas proteínas, mas em configurações biológicas diferentes. Tais configurações são ilustradas nas Figuras 13F e G. Na Figura 13F, microvesículas com vários marcadores de superfície são mostradas a partir de uma população de amostras de microvesícula de exemplo: População de Amostras A. Os Oligonucleotídeos de Sondagem Ligados 1301 indicados são colocados em contato com dois marcadores de superfície 1302 e 1303 em uma dada relação especial. Aqui, sondas exclusivas para esses complexos funcionais e relações espaciais podem ser retidas. Em contraste, na População de Amostras B de microvesícula mostrada na Figura 13F, os dois marcadores de superfície 1302 e 1303 são encontrados em relação espacial díspar. Aqui, as sondas 1301 não estão ligadas devido à ausência da relação espacial dos componentes de interação 1302 e 1303.

[00435] Uma abordagem ilustrativa 1310 para usar determinação de perfil TOP™ para avaliar uma amostra é mostrada na Figura 13H. A biblioteca de sondagem 1311 é misturada com a amostra 1312. A amostra pode ser, conforme descrito no presente documento, por exemplo, um fluido corporal de um indivíduo que tem ou suspeita-se que tenha uma doença. Permite-se que as sondas se liguem à amos-

tra 1313, e as microvesículas sejam peletizadas 1315. O sobrenadante 1314 que compreende oligonucleotídeos não ligados é descartado. As sondas de oligonucleotídeo ligadas ao pélete 1315 são eluídas 1316 e sequenciadas 1317. O perfil 1318 gerado pelas sondas de oligonucleotídeo ligadas, conforme determinado pelo sequenciamento 1317, é usado para caracterizar a amostra 1312. Por exemplo, o perfil 1318 pode ser comparado a uma referência, por exemplo, para determinar se o perfil é similar ou diferente de um perfil de referência indicativo de uma doença ou estado saudável, ou outra caracterização fenotípica de interesse. A comparação pode indicar a presença de uma doença, fornecer um diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico ou caracterizar de outro modo um fenótipo associado à amostra 1312. A Figura 13I ilustra outro esquema para uso de determinação de perfil TOP™ para caracterizar um fenótipo. Uma amostra de paciente, tal como um fluido corporal revelado no presente documento, é coletada 1321. A amostra é colocada em contato com o conjunto de bibliotecas TOP™ 1322. As microvesículas (MVs) são isoladas da amostra colocada em contato 1323, por exemplo, com o uso de ultracentrifugação, filtração, precipitação de polímero ou outra técnica adequada ou combinação de técnicas reveladas no presente documento. Os oligonucleotídeos que se ligaram às microvesículas isoladas são coletados e a identidade é determinada 1324. A identidade dos oligonucleotídeos ligados pode ser determinada por qualquer técnica útil, tal como sequenciamento, sequenciamento de alto rendimento (por exemplo, NGS), amplificação, incluindo, sem limitação, qPCR, ou hibridização, tal como a um arranjo baseado em partícula ou plano. A identidade dos oligonucleotídeos ligados é usada para caracterizar a amostra, por exemplo, como contendo microvesículas relacionadas à doença.

[00436] Em um aspecto, a invenção fornece um método para caracterizar uma amostra colocando-se a amostra em contato com um con-

junto de oligonucleotídeos diferentes (por exemplo, um conjunto de aptâmeros) e determinar a frequência na qual vários oligonucleotídeos no conjunto ligam a amostra. Por exemplo, um conjunto de oligonucleotídeos 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 colocada em contato com o conjunto de oligonucleotídeos. Os oligonucleotídeos que ligam a amostra de teste são eluídos da amostra de teste, coletados e identificados e a composição dos oligonucleotídeos ligados é comparada àquelas conhecidas por ligar as amostras de câncer. Várias técnicas de sequenciamento, amplificação e hibridização podem ser usadas para identificar os oligonucleotídeos eluídos. Por exemplo, quando um conjunto grande de oligonucleotídeos é usado, a identificação de oligonucleotídeo pode ser realizada por métodos de alto rendimento, tal como sequenciamento next generation, ou por meio de hibridização. Se a amostra de teste for ligada pelo conjunto de oligonucleotídeos 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 oligonucleotídeos 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 oligonucleotídeos. Os Exemplos 19 e 20 do presente documento ilustram as modalidades da invenção.

[00437] Em um aspecto, 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 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.

[00438] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para identificar um conjunto de oligonucleotídeos associados com 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, identificar, desse modo, um conjunto de oligonucleotídeos associados à amostra de teste.

[00439] 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.

[00440] 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 do tipo next generation, tais como sequenciamento de assinatura massivamente paralelo (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 mé-

todos 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.

[00441] A pluralidade ou conjunto de oligonucleotídeos pode compreender qualquer número desejado de oligonucleotídeos 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.

[00442] A pluralidade de oligonucleotídeos 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 similares 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 outro modo 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.

[00443] 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, por exemplo, 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.

[00444] A Figura 16B é um esquema 1610 que mostra o uso de um conjunto de oligonucleotídeos para caracterizar um fenótipo de uma amostra, tais como aquelas listadas acima. Um conjunto de oligonucleotídeos para um alvo de interesse é fornecido 1611. Por exemplo, o

conjunto de oligonucleotídeos 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 epitopos do mesmo alvo presente nas uma ou mais microvesículas. O conjunto é colocado em contato com uma amostra de teste a ser caracterizada 1612. 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 oligonucleotídeos não ligados. Os oligonucleotídeos restantes são eluídos ou dissociados de outra maneira da amostra e coletados 1613. Os oligonucleotídeos coletados são identificados, por exemplo, por sequenciamento ou hibridização 1614. A presença e/ou número de cópia do identificado é usado para caracterizar o fenótipo 1615. Por exemplo, o conjunto de oligonucleotídeos pode ser escolhido como os oligonucleotídeos 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 oligonucleotídeos que ligam as microvesículas relacionadas a câncer, permitindo, assim, que a amostra seja caracterizada como cancerosa ou não.

[00445] A Figura 16C é um esquema 1620 que mostra uma implantação do método na Figura 16B. Um conjunto de oligonucleotídeos identificados como se ligando a uma população de microvesículas é fornecido 1621. A amostra de entrada compreende uma amostra de teste que compreende microvesículas 1622. 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 colocado em contato com as microvesículas isoladas a serem caracterizadas 1623. A população de microvesícula pode ser isolada antes ou após o contato 1623 da 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), precipitação de polímero e/ou com o uso de microfluidos. A mistura é lavada para remover oligonucleotídeos não ligados e os oligonucleotídeos restantes são eluídos ou dissociados de outra maneira da amostra e coletados 1624. Os oligonucleotídeos coletados são identificados 1625 e a presença e/ou número de cópia dos oligonucleotídeos retidos é usado para caracterizar o fenótipo 1626 conforme acima.

[00446] Conforme observado em uma modalidade da Figura 16C, o conjunto de oligonucleotídeos 1620 é colocado diretamente em contato 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 oligonucleotídeos não ligados e os oligonucleotídeos restantes são dissociados e coletados 1624. 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 colocada em contato diretamente com o conjunto de oligonucleotídeos. As microvesículas são, então, isoladas por várias técnicas reveladas no presente documento, incluindo, sem limitação, ultracentrifugação, ultrafiltração, citometria de fluxo, isolamento de afinidade, precipitação de polímero, cromatografia, várias combinações dos mesmos ou similares. Os oligonucleotídeos restantes são, então, identificados, por exemplo, por sequenciamento, hibridização ou amplificação.

[00447] 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 oligonucleotídeos para caracterizar um fenótipo. A pluralidade de oligonucleotídeos pode compreender qual-

quer um daqueles descritos no presente documento.

[00448] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para realizar 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 oligonucleotídeo 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.

[00449] 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 complexos em (b) para fornecer um subconjunto recuperado de oligonucleotídeos; e (d) perfilar o subconjunto recuperado de oligonucleotídeos por sequenciamento 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.

[00450] Em um aspecto, a invenção fornece um oligonucleotídeo pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homólogo à SEQ ID NO. 10558. Em um aspecto, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 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, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, 500.000, 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 oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga à SEQ ID NO. 10558.

[00451] Em outro aspecto, a invenção fornece um pluralidade de

oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 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, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000 ou 500.000 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga a uma sequência selecionada dentre as SEQ ID NOs. 10559 a 510558. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeo que compreende pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos 99% dos oligonucleotídeos listados nas SEQ ID NOs. 10559 a 510558.

[00452] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um oligonucleotídeo que compreende uma sequência de ácidos nucleicos ou uma porção da mesma que é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga a uma sequência selecionada dentre as SEQ ID NOs. 510559 a 510578. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga às SEQ ID NOs. 510559 a 510578.

[00453] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um oligonucleotídeo que compreende uma sequência de ácidos nucleicos ou uma porção da mesma que é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga a uma sequência selecionada dentre as SEQ ID NOs. 510579 a 510598. Em um aspecto rela-

cionado, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga às SEQ ID NOs. 510579 a 510598.

[00454] Em um aspecto, a invenção fornece um oligonucleotídeo que compreende uma sequência de ácidos nucleicos ou uma porção da mesma que é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga a uma sequência selecionada dentre as SEQ ID NOs. 510599 a 510763. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 125, 130, 140, 150, 160 ou 165 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga às SEQ ID NOs. 510599 a 510763. Em ainda outro aspecto relacionado, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 125, 130, 140, 150, 160 ou 165 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos ou uma porção das mesmas é pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga às SEQ ID NOs. em uma linha da Tabela 16.

[00455] Em um aspecto, a invenção também fornece um método que compreende colocar um oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos em contato com uma amostra e detectar a presença ou o

nível de ligação do oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos a um alvo na amostra, em que, o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos podem ser aqueles fornecidos na invenção acima. A amostra pode compreender uma amostra biológica, uma amostra orgânica, uma amostra inorgânica, um tecido, uma cultura celular, um fluido corporal, sangue, soro, uma célula, uma microvesícula, um complexo proteico, um complexo lipídico, um carboidrato ou qualquer combinação, fração ou variação dos mesmos. O alvo pode compreender uma célula, uma organela, um complexo proteico, uma lipoproteína, um carboidrato, uma microvesícula, um fragmento de membrana, uma molécula pequena, um metal pesado, uma toxina ou um fármaco.

[00456] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método que compreende: a) colocar uma amostra biológica que compreende microvesículas em contato com uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeo, em que, opcionalmente, a biblioteca de sondas de oligonucleotídeo compreende um oligonucleotídeo ou uma pluralidade de oligonucleotídeos fornecidos pela invenção acima; b) identificar oligonucleotídeos ligados a pelo menos uma porção das microvesículas; e c) caracterizar a amostra com base em um perfil dos oligonucleotídeos identificados.

[00457] Em outro aspecto, a invenção fornece um método que compreende: a) colocar uma amostra em contato com uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos que compreende 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} oligonucleotídeos de sequências de oligonucleotídeos diferentes para formar uma mistura em uma solução, em que os oligonucleotídeos têm capacidade para ligar uma pluralidade de entidades na amostra para formar complexos, em que, opcionalmente, a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos compreende um oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos, conforme fornecido pela invenção

acima; b) particionar os complexos formados na etapa (a) da mistura; e c) detectar oligonucleotídeos presentes nos complexos particionados na etapa (b) para identificar um perfil de oligonucleotídeo para a amostra. Em uma modalidade, a etapa de detecção compreende realizar sequenciamento de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos, amplificação de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos e/ou hibridização de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos a um arranjo. O arranjo pode ser qualquer arranjo útil, tal como um arranjo plano ou baseado em partícula.

[00458] Em ainda um outro aspecto, a invenção fornece um método para gerar uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos enriquecida que compreende: a) colocar uma primeira biblioteca de oligonucleotídeos em contato com uma amostra biológica de teste e uma amostra biológica de controle, em que complexos são formados entre as entidades biológicas presentes nas amostras biológicas e uma pluralidade de oligonucleotídeos presente na primeira biblioteca de oligonucleotídeos; b) particionar os complexos formados na etapa (a) e isolar os oligonucleotídeos nos complexos para produzir um subconjunto de oligonucleotídeos para cada uma dentre a amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle; c) colocar os subconjuntos de oligonucleotídeos em (b) em contato com a amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle, em que complexos são formados entre as entidades biológicas presentes nas amostras biológicas e uma segunda pluralidade de oligonucleotídeos presente nos subconjuntos de oligonucleotídeos para gerar um grupo de segundo subconjunto de oligonucleotídeos; e d) repetir, opcionalmente, as etapas b) e c), uma, duas, três ou mais vezes para produzir um respectivo terceiro, quarto, quinto ou mais grupo de subconjunto de oligonucleotídeos, produzindo, assim, a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos enriquecida. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma pluralidade de

oligonucleotídeos que 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, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 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, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000 ou 500.000 sequências de oligonucleotídeos diferentes, em que a pluralidade resulta do método nesse parágrafo, em que a biblioteca tem capacidade para distinguir um primeiro fenótipo de um segundo fenótipo. Em algumas modalidades, o primeiro fenótipo compreende uma doença ou distúrbio e o segundo fenótipo compreende um estado saudável; ou em que o primeiro fenótipo compreende uma doença ou distúrbio e o segundo fenótipo compreende uma doença ou distúrbio diferente; ou em que o primeiro fenótipo compreende um estágio ou progressão de uma doença ou distúrbio e o segundo fenótipo compreende um estágio ou progressão diferente da mesma doença ou distúrbio; ou em que o primeiro fenótipo compreende uma resposta positiva para uma terapia e o segundo fenótipo compreende uma resposta negativa para a mesma terapia.

[00459] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um método para caracterizar uma doença ou distúrbio que compreende: a) colocar uma amostra biológica de teste em contato com o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos fornecidos pela invenção; b) detectar uma presença ou nível de complexos formados na etapa (a) entre o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos fornecidos pela invenção e um alvo na amostra biológica de teste; e c) comparar a presença ou nível detectado na etapa (b) a um nível de referência de uma amostra biológica de controle, caracterizando, assim, a doença ou distúrbio. A etapa de detecção pode compreender realizar sequenciamento de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos,

amplificação de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos e/ou hibridização de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos a um arranjo. O sequenciamento pode ser sequenciamento de alto rendimento ou next generation.

[00460] Nos métodos da invenção, a amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle, cada uma, compreender uma amostra de tecido, uma cultura celular ou um fluido biológico. Em algumas modalidades, o fluido biológico compreende um fluido corporal. Os fluidos corporais dentro do método da invenção compreendem sangue periférico, soros, plasma, ascites, urina, fluido cerebrospinal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem bronqueoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de cowper ou fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido de cisto, fluido pleural e peritoneal, fluido pericardial, linfa, quimo, quilo, bílis, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreções vaginais, secreção mucosal, água de defecação, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades sinusais, aspirações broncopulmonares, fluido da cavidade blastocística ou sangue do cordão umbilical. Em algumas modalidades preferenciais, o fluido corporal compreende sangue, soro ou plasma. O fluido biológico pode compreender microvesículas. Em tal caso, complexos podem ser formados entre o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos e pelo menos uma das microvesículas.

[00461] A amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle podem compreende, ainda, microvesículas isoladas, em que, opcionalmente, as microvesículas são isoladas com o uso de pelo menos um dentre cromatografia, filtração, ultrafiltração, centrifugação, ultracentrifugação, citometria de fluxo, captura por afinidade (por exemplo, a uma superfície plana, coluna ou microesfera), precipitação de polí-

mero e uso de microfluidos. As vesículas podem ser também isoladas após o contato com o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos.

[00462] Em várias modalidades dos métodos da invenção, o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos liga um polipeptídeo ou fragmento do mesmo. O polipeptídeo ou fragmento do mesmo pode ser solúvel ou ligado à membrana, em que, opcionalmente, a membrana compreende uma membrana de microvesícula. A membrana poderia ser também de uma célula ou um fragmento de uma célula de vesícula. Em algumas modalidades, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo compreende um biomarcador na Tabela 3 ou Tabela 4. Por exemplo, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo poderia ser um marcador de vesícula geral, tal como na Tabela 3, ou um marcador relacionado a tecido ou relacionado a doença, como na Tabela 4. O oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos pode ligar-se a um antígeno de superfície de microvesícula na amostra biológica. Por exemplo, o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos pode ser enriquecido a partir de uma biblioteca virgem contra microvesículas.

[00463] A doença ou distúrbio detectado pelo oligonucleotídeo, pluralidade de oligonucleotídeos ou métodos fornecidos aqui pode compreender qualquer doença ou distúrbio adequado de interesse, incluindo, sem limitação, câncer de mama, doença de Alzheimer, asma brônquica, carcinoma de célula transicional da bexiga, osteoblastoclastoma celular gigante, tumor cerebral, adenocarcinoma colorretal, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), carcinoma de células escamosas do cérvice, infarto agudo do miocárdio (AMI)/insuficiência cardíaca aguda, doença de Chron, diabetes mellitus tipo II, carcinoma de esôfago, carcinoma de células escamosas da laringe, leucemia aguda e crônica da medula óssea, carcinoma de pulmão, linfoma maligno, esclerose múltipla, carcinoma ovariano, doença de Parkinson, adenocar-

cinoma de próstata, psoríase, artrite reumatoide, carcinoma de células renais, carcinoma de células escamosas da pele, adenocarcinoma do estômago, carcinoma da glândula tireoide, câncer de testículo, colite ulcerativa ou adenocarcinoma uterino.

[00464] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio 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 incluir, sem limitação, um dentre leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cancros relacionados à AIDS; linfoma 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, medulo-epitelioma, tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais e pineoblastoma); câncer de mama; tumores brônquica; 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 extragona-

dal; 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 de pulmão; 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 Sezary; 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. A afecção maligna pode incluir, sem limitação, Esôfago de Barrett. A doença autoimune pode incluir, sem limitação, um dentre doença inflamatória intestinal (IBD), doença de Crohn (CD), colite ulcerativa (UC), inflamação pélvica, vasculite, psoríase, diabetes, hepatite autoimune, esclerose múltipla, mastenia grave, diabetes tipo I, artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), tireoidite de Hashimoto, doença de Grave, espondilite anquilosante, doença de Sjogrens, síndrome CREST, escleroderma, doença reumática, rejeição de órgão, colangite esclerosante primária ou sepse. A doença cardiovascular pode incluir, sem limitação, um dentre aterosclerose, insuficiência cardíaca congestiva, placa vulnerável, derrame, isquemia, pressão sanguínea alta, estenose, oclusão de vaso ou um evento trombótico. A doença neurológica pode incluir, sem limitação, um dentre 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 cere-

bral), trauma cerebral, infecção microbiana ou síndrome da fadiga crônica. A dor pode incluir, sem limitação, uma dentre fibromialgia, dor neuropática crônica ou dor neuropática periférica. A doença infecciosa pode incluir, sem limitação, um dentre infecção bacteriana, infecção viral, infecção por levedura, doença de Whipple, doença de Prion, cirrose, Staphylococcus aureus resistente à meticilina, HIV, HCV, hepatite, sífilis, meningite, malária, tuberculose, influenza. O versado na técnica perceberá que o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos ou métodos da invenção podem ser usados para avaliar qualquer número dessas ou outras doenças e distúrbios relacionados.

[00465] Em algumas modalidades da invenção, o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos e métodos de uso dos mesmos são úteis para caracterizar determinadas doenças ou estados doentios. Conforme desejado, um conjunto de oligonucleotídeos úteis para caracterizar várias doenças é montado para criar um conjunto mestre que pode ser útil para caracterizar várias doenças. Por exemplo, a combinação de SEQ ID NOs. 510599 a 510763 fornecida no presente documento compreende tal conjunto. O versado na técnica também perceberá que conjuntos de oligonucleotídeos úteis para caracterizar doenças ou distúrbios específicos podem ser também criados. As sequências de fornecidas no presente documento podem ser também modificadas conforme desejado contanto que os aspectos funcionais sejam ainda mantidos (por exemplo, ligação a vários alvos ou capacidade de caracterizar um fenótipo). Por exemplo, os oligonucleotídeos podem compreender DNA ou RNA, incorporar vários nucleotídeos não naturais, incorporar outras modificações químicas ou compreender várias deleções ou inserções. Tais modificações podem facilitar a síntese, estabilidade, entrega, identificação, etc, ou pode ter pouco a nenhum efeito na prática. Em alguns casos, alguns nucleotídeos em um oligonucleotídeo podem ser substituídos enquanto mantêm aspectos

funcionais do oligonucleotídeo. Similarmente, as regiões de flanqueamento 5' e 3' podem ser substituídas. Em ainda outros casos, apenas uma porção de um oligonucleotídeo pode ser determinada para direcionar sua funcionalidade de modo que outras porções possam ser deletadas ou substituídas. Inúmeras técnicas para sintetizar e modificar nucleotídeos e polinucleotídeos são reveladas no presente documento e são conhecidas no campo.

[00466] Em uma modalidade, a doença ou distúrbio compreende um câncer de mama e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou pelo menos 40 das SEQ ID NOs. 510559 a 510598. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00467] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende doença de Alzheimer e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510604, 510605, 510608, 510609, 510612, 510614, 510629, 510632, 510633, 510634, 510641, 510642, 510643, 510646, 510648, 510649, 510651, 510652, 510653, 510655, 510661, 510667, 510673, 510675, 510676, 510677, 510678, 510679, 510681, 510683, 510685, 510687, 510688, 510690, 510694, 510696, 510702, 510707, 510709, 510726, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510732, 510737, 510740, 510748, 510749, 510751, 510752, 510754, 510756, 510757, 510758, 510761 e 510762. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende doença de Alzheimer e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,

25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510601, 510603, 510606, 510608, 510609, 510611, 510613, 510614, 510615, 510619, 510621, 510625, 510628, 510629, 510630, 510632, 510634, 510635, 510636, 510637, 510644, 510647, 510648, 510651, 510652, 510654, 510657, 510665, 510666, 510667, 510668, 510677, 510678, 510679, 510687, 510692, 510693, 510696, 510698, 510699, 510701, 510702, 510707, 510708, 510710, 510713, 510716, 510725, 510726, 510728, 510731, 510732, 510733, 510734, 510736, 510741, 510748, 510749, 510755, 510757, 510758, 510761 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00468] A doença ou distúrbio pode compreender asma brônquica e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510601, 510614, 510619, 510623, 510627, 510631, 510633, 510635, 510647, 510655, 510656, 510660, 510672, 510689, 510690, 510693, 510698, 510701, 510702, 510707, 510709, 510710, 510713, 510720, 510723, 510724, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510735, 510738, 510743, 510744, 510745, 510746, 510748, 510749, 510750, 510751, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761 e 510762. A doença ou distúrbio pode também compreender asma brônquica e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510608, 510609, 510610, 510611, 510617, 510619, 510622, 510631, 510632, 510634, 510635, 510637, 510642, 510643, 510644, 510652, 510655, 510657, 510658, 510665, 510668, 510673,

510675, 510676, 510677, 510678, 510679, 510683, 510691, 510701, 510703, 510704, 510706, 510708, 510709, 510714, 510725, 510736, 510737, 510740, 510741, 510742 e 510756. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00469] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de célula transicional da bexiga e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510607, 510619, 510623, 510631, 510632, 510635, 510641, 510642, 510647, 510656, 510657, 510658, 510659, 510673, 510674, 510683, 510686, 510693, 510695, 510701, 510702, 510707, 510708, 510711, 510716, 510722, 510725, 510726, 510728, 510731, 510734, 510737, 510744, 510748, 510749, 510751, 510752, 510753, 510756, 510757, 510758, 510761 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00470] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um osteoblastoclastoma celular gigante e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510612, 510620, 510635, 510637, 510641, 510644, 510648, 510658, 510662, 510663, 510667, 510668, 510670, 510676, 510678, 510679, 510682, 510683, 510685, 510686, 510699, 510708, 510712, 510722, 510737 e 510753. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, dele-

ções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00471] A doença ou distúrbio pode compreender um tumor cerebral e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510607, 510619, 510624, 510628, 510639, 510641, 510645, 510647, 510648, 510655, 510657, 510665, 510668, 510673, 510674, 510689, 510695, 510698, 510699, 510705, 510710, 510711, 510712, 510713, 510716, 510734, 510737, 510738 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00472] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um adenocarcinoma colorretal e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510603, 510607, 510611, 510616, 510618, 510619, 510623, 510624, 510641, 510644, 510646, 510647, 510655, 510656, 510672, 510673, 510690, 510693, 510695, 510698, 510701, 510702, 510709, 510711, 510714, 510716, 510719, 510723, 510724, 510725, 510726, 510730, 510731, 510734, 510735, 510737, 510738, 510743, 510744, 510748, 510749, 510751, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510760, 510761, 510762 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00473] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende uma doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510604, 510608, 510609, 510612, 510614, 510616, 510619, 510620, 510629, 510634, 510637, 510640, 510647, 510649, 510653, 510661, 510666, 510667, 510669, 510673, 510678, 510682, 510689, 510690, 510701, 510707, 510715, 510723, 510727, 510728, 510749, 510754, 510755, 510757, 510758, 510762 e 510763. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende uma doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510601, 510609, 510611, 510613, 510620, 510634, 510637, 510647, 510648, 510654, 510664, 510668, 510679, 510694, 510696, 510698, 510699, 510701, 510705, 510706, 510710, 510718, 510734 e 510741. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00474] A doença ou distúrbio pode ser um carcinoma de células escamosas da cérvice e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510615, 510619, 510623, 510626, 510630, 510632, 510633, 510635, 510638, 510639, 510641, 510642, 510644, 510647, 510650, 510655, 510656, 510657, 510661, 510673, 510674, 510677, 510683, 510688, 510693, 510695, 510698, 510711, 510712, 510714, 510716, 510717, 510722, 510725, 510729, 510731, 510734, 510737,

510743, 510745, 510747, 510753, 510755, 510756, 510758, 510759 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00475] A doença ou distúrbio pode compreender um infarto agudo do miocárdio (AMI) ou insuficiência cardíaca aguda ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510607, 510608, 510613, 510626, 510629, 510631, 510634, 510635, 510638, 510639, 510646, 510648, 510656, 510667, 510669, 510671, 510672, 510675, 510682, 510689, 510698, 510701, 510707, 510710, 510715, 510721, 510723, 510727, 510728, 510730, 510731, 510734, 510735, 510743, 510744, 510748, 510749, 510751, 510752, 510757, 510758, 510760, 510761 e 510762. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende um infarto agudo do miocárdio (AMI) ou insuficiência cardíaca aguda ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510601, 510606, 510607, 510608, 510609, 510611, 510614, 510616, 510619, 510622, 510624, 510626, 510635, 510636, 510637, 510640, 510641, 510643, 510644, 510648, 510651, 510665, 510668, 510669, 510672, 510675, 510677, 510678, 510679, 510682, 510692, 510695, 510696, 510698, 510699, 510701, 510703, 510707, 510710, 510725, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510733, 510734, 510736, 510743, 510750, 510751, 510752, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam in-

tensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00476] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio compreende doença de Chron e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510602, 510608, 510611, 510624, 510644, 510653, 510656, 510659, 510669, 510671, 510676, 510686, 510689, 510690, 510697, 510698, 510700, 510713, 510727, 510728, 510729, 510731, 510734, 510744, 510751 e 510757. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende doença de Chron e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510610, 510611, 510615, 510618, 510621, 510623, 510625, 510626, 510628, 510631, 510632, 510635, 510637, 510638, 510643, 510647, 510648, 510649, 510653, 510654, 510655, 510657, 510658, 510666, 510667, 510668, 510672, 510675, 510677, 510678, 510679, 510680, 510682, 510684, 510689, 510691, 510694, 510696, 510698, 510701, 510707, 510708, 510709, 510710, 510713, 510714, 510715, 510719, 510725, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510736, 510738, 510743, 510744, 510748, 510750, 510751, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761, 510762 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00477] A doença ou distúrbio pode compreender diabetes mellitus tipo II e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs.

510600, 510604, 510608, 510610, 510611, 510614, 510616, 510620, 510624, 510629, 510632, 510634, 510640, 510649, 510667, 510669, 510670, 510671, 510678, 510685, 510700, 510701, 510702, 510707, 510709, 510718, 510721, 510723, 510726, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510733, 510735, 510743, 510748, 510749, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510760, 510761, 510762 e 510763. De modo relacionado, a doença ou distúrbio pode compreender diabetes mellitus tipo II e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510613, 510632, 510635, 510636, 510641, 510645, 510647, 510648, 510654, 510660, 510664, 510667, 510668, 510670, 510675, 510684, 510691, 510695, 510696, 510706, 510710, 510734 e 510749. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00478] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de esôfago e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510602, 510619, 510623, 510632, 510635, 510638, 510641, 510644, 510653, 510656, 510661, 510671, 510682, 510689, 510693, 510698, 510714, 510722, 510725, 510731, 510734, 510738, 510753 e 510761. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00479] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende

um carcinoma de células escamosas da laringe e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510605, 510607, 510612, 510614, 510619, 510623, 510632, 510635, 510641, 510642, 510655, 510656, 510657, 510659, 510661, 510668, 510673, 510674, 510689, 510690, 510693, 510695, 510698, 510708, 510712, 510732, 510734, 510737, 510738, 510745, 510747, 510753 e 510755. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00480] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende uma leucemia crônica ou aguda da medula óssea e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510605, 510607, 510610, 510612, 510628, 510631, 510633, 510641, 510644, 510650, 510664, 510670, 510673, 510674, 510675, 510681, 510684, 510685, 510686, 510701, 510711, 510712, 510717, 510718, 510719, 510720, 510721, 510724, 510729, 510732, 510739, 510740, 510743, 510745, 510746, 510747, 510752, 510754 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00481] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de pulmão e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas den-

tre as SEQ ID NOs. 510604, 510626, 510628, 510631, 510633, 510635, 510649, 510650, 510654, 510668, 510672, 510674, 510677, 510699, 510701, 510702, 510710, 510712, 510715, 510717, 510719, 510720, 510721, 510723, 510724, 510726, 510727, 510733, 510735, 510738, 510743, 510744, 510745, 510746, 510747, 510750, 510751, 510754, 510755, 510758, 510760 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00482] A doença ou distúrbio pode compreender um linfoma maligno e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510601, 510611, 510618, 510623, 510624, 510631, 510632, 510636, 510638, 510641, 510644, 510645, 510647, 510656, 510660, 510662, 510672, 510673, 510675, 510690, 510693, 510701, 510702, 510707, 510708, 510713, 510717, 510719, 510721, 510723, 510724, 510725, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510735, 510737, 510743, 510744, 510749, 510751, 510752, 510754, 510755, 510756, 510757, 510758, 510760, 510762 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00483] A doença ou distúrbio pode também compreender esclerose múltipla e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510607, 510612, 510620, 510646, 510653, 510655, 510661, 510663,

510669, 510675, 510682, 510685, 510686, 510690, 510699, 510701, 510710, 510713, 510731, 510738, 510747, 510758 e 510762. De modo, relacionado, a doença ou distúrbio pode compreender esclerose múltipla e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510604, 510609, 510610, 510613, 510617, 510618, 510622, 510632, 510635, 510647, 510670, 510675, 510677, 510687, 510690, 510692, 510695, 510701, 510706, 510708, 510731 e 510733. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00484] Em uma modalidade, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de ovário e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510618, 510626, 510628, 510633, 510638, 510641, 510642, 510643, 510645, 510646, 510647, 510650, 510652, 510658, 510665, 510666, 510673, 510674, 510677, 510682, 510683, 510689, 510705, 510707, 510712, 510717, 510722, 510724, 510729, 510732, 510735, 510737, 510745, 510746, 510747, 510753 e 510756. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00485] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende doença de Parkinson e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as

SEQ ID NOs. 510600, 510601, 510604, 510608, 510609, 510612, 510614, 510624, 510631, 510633, 510634, 510640, 510641, 510642, 510649, 510650, 510651, 510653, 510667, 510673, 510675, 510676, 510677, 510683, 510686, 510689, 510694, 510700, 510703, 510704, 510705, 510706, 510707, 510709, 510713, 510715, 510721, 510723, 510724, 510726, 510727, 510729, 510730, 510731, 510732, 510734, 510735, 510736, 510737, 510739, 510740, 510741, 510742, 510744, 510745, 510746, 510747, 510748, 510751, 510752, 510754, 510756, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761 e 510762. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende doença de Parkinson e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510601, 510606, 510608, 510609, 510610, 510614, 510616, 510632, 510634, 510643, 510644, 510647, 510648, 510654, 510662, 510664, 510665, 510667, 510668, 510670, 510677, 510678, 510679, 510687, 510692, 510696, 510698, 510699, 510701, 510703, 510704, 510706, 510708, 510710, 510722, 510727, 510734, 510736, 510741, 510742, 510753 e 510756. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00486] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um adenocarcinoma de próstata e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510603, 510607, 510619, 510623, 510624, 510628, 510641, 510642, 510644, 510647, 510650, 510655, 510656, 510657, 510669, 510673, 510674, 510677, 510684, 510688, 510689, 510690, 510695, 510698, 510701, 510709, 510710,

510718, 510726, 510734, 510737, 510738, 510739, 510757 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00487] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende psoríase e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510601, 510608, 510609, 510611, 510614, 510620, 510624, 510626, 510631, 510633, 510634, 510635, 510638, 510647, 510649, 510650, 510653, 510656, 510665, 510666, 510667, 510669, 510672, 510674, 510675, 510680, 510685, 510689, 510698, 510702, 510707, 510711, 510712, 510715, 510717, 510719, 510720, 510721, 510723, 510724, 510726, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510735, 510743, 510744, 510745, 510746, 510747, 510748, 510749, 510750, 510751, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761, 510762 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00488] A doença ou distúrbio pode ser psoríase e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510601, 510604, 510613, 510621, 510627, 510637, 510641, 510644, 510648, 510650, 510652, 510663, 510667, 510668, 510676, 510680, 510681, 510699, 510701, 510703, 510705, 510709, 510710, 510722, 510734, 510739, 510750 e 510753. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modi-

ficações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00489] A doença ou distúrbio pode ser também artrite reumatoide e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510603, 510604, 510607, 510608, 510609, 510614, 510616, 510622, 510625, 510627, 510629, 510630, 510634, 510635, 510636, 510637, 510640, 510642, 510646, 510649, 510650, 510651, 510653, 510656, 510664, 510665, 510667, 510671, 510675, 510677, 510678, 510679, 510682, 510689, 510699, 510707, 510726, 510727, 510728, 510729, 510731, 510733, 510737, 510738, 510748, 510755, 510758, 510761 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00490] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio compreende artrite reumatoide e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510601, 510603, 510604, 510606, 510607, 510608, 510609, 510610, 510611, 510612, 510613, 510614, 510616, 510617, 510618, 510622, 510623, 510625, 510629, 510630, 510634, 510635, 510636, 510637, 510638, 510639, 510640, 510641, 510643, 510644, 510645, 510646, 510648, 510649, 510651, 510652, 510653, 510654, 510658, 510662, 510663, 510664, 510665, 510666, 510667, 510668, 510669, 510671, 510673, 510677, 510678, 510679, 510682, 510685, 510692, 510696, 510697, 510698, 510699, 510701, 510703, 510710, 510716, 510722, 510725, 510726, 510727, 510730, 510733,

510734, 510738, 510741, 510743, 510753, 510755 e 510757. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00491] Em outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de célula renal e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510603, 510604, 510606, 510608, 510614, 510616, 510622, 510628, 510629, 510630, 510632, 510634, 510635, 510640, 510644, 510645, 510646, 510652, 510653, 510656, 510664, 510665, 510666, 510667, 510671, 510675, 510677, 510683, 510685, 510687, 510690, 510701, 510722, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510732, 510733, 510734, 510738, 510748, 510749, 510752, 510753, 510758, 510761 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00492] Em ainda outra modalidade, a doença ou distúrbio compreende um carcinoma de células escamosas de pele e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510618, 510622, 510626, 510639, 510641, 510642, 510650, 510658, 510673, 510674, 510683, 510696, 510708, 510712, 510717, 510720, 510722, 510723, 510724, 510727, 510729, 510743, 510745, 510746, 510747, 510752, 510753, 510754, 510755, 510756, 510759, 510761 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, dele-

ções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00493] Em várias modalidades, a doença ou distúrbio compreende um adenocarcinoma do estômago e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510604, 510608, 510609, 510612, 510626, 510631, 510632, 510634, 510639, 510653, 510658, 510663, 510667, 510681, 510689, 510692, 510693, 510696, 510698, 510699, 510705, 510711, 510715, 510717, 510719, 510723, 510725, 510729, 510731, 510734, 510735, 510736, 510743, 510746, 510748, 510751, 510754, 510757, 510760, 510762 e 510763. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00494] A doença ou distúrbio pode compreender um carcinoma da glândula tireoide e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510602, 510603, 510614, 510626, 510638, 510641, 510644, 510646, 510653, 510658, 510659, 510661, 510662, 510674, 510689, 510693, 510695, 510698, 510699, 510701, 510704, 510705, 510708, 510717, 510718, 510722, 510727, 510731, 510734, 510736, 510739, 510740, 510741, 510747, 510753 e 510755. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00495] A doença ou distúrbio pode também compreender um câncer testicular e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510600, 510603, 510607, 510615, 510616, 510618, 510619, 510621, 510622, 510623, 510624, 510630, 510636, 510637, 510641, 510644, 510645, 510647, 510650, 510654, 510655, 510656, 510657, 510659, 510662, 510665, 510670, 510673, 510674, 510681, 510684, 510685, 510687, 510688, 510689, 510690, 510692, 510693, 510695, 510696, 510698, 510700, 510701, 510704, 510707, 510712, 510713, 510717, 510718, 510726, 510734, 510737, 510738, 510739, 510740, 510742, 510747, 510756 e 510757. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00496] A doença ou distúrbio pode ser colite ulcerativa e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510599, 510607, 510611, 510612, 510616, 510620, 510621, 510622, 510624, 510626, 510632, 510633, 510636, 510646, 510655, 510659, 510672, 510673, 510675, 510676, 510677, 510682, 510684, 510691, 510692, 510702, 510703, 510704, 510705, 510706, 510707, 510709, 510710, 510715, 510721, 510723, 510724, 510728, 510729, 510730, 510731, 510735, 510736, 510737, 510739, 510740, 510741, 510743, 510744, 510748, 510751, 510752, 510754, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761 e 510762. Em uma modalidade relacionada, a doença ou distúrbio compreende colite ulcerativa e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510610, 510611, 510612, 510619, 510622, 510623, 510634, 510635, 510641, 510647, 510648, 510654, 510657, 510664, 510668, 510670, 510671, 510676, 510677, 510678, 510679, 510689, 510691, 510696, 510701, 510703, 510704, 510710, 510722, 510734, 510742 e 510753. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00497] A doença ou distúrbio pode ser também um adenocarcinoma uterino e o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50 ou todas dentre as SEQ ID NOs. 510601, 510612, 510621, 510626, 510637, 510641, 510644, 510650, 510653, 510669, 510675, 510684, 510686, 510687, 510696, 510714, 510717, 510722, 510739, 510743, 510745, 510746, 510753, 510755 e 510762. Os oligonucleotídeos podem incorporar várias modificações químicas, adições, deleções, inserções, substituições ou outras modificações contanto que os aspectos funcionais dos oligonucleotídeos sejam intensificados ou mantidos em todo ou em parte.

[00498] Em um aspecto, a invenção fornece um kit que compreende um reagente para executar os métodos da invenção fornecida no presente documento. Em um aspecto similar, a invenção contempla o uso de um reagente para executar os métodos da invenção fornecidos no presente documento. Nas modalidades, o reagente compreende um oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos. O oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos podem ser aqueles fornecidos no presente documento. O reagente pode compreender vários outros componentes úteis, incluindo, sem limitação, um ou mais dentre: a) um reagente configurado para isolar uma microvesícula, em que, opcio-

nalmente, o pelo menos um reagente configurado para isolar uma microvesícula compreende um agente de ligação a um antígeno de microvesícula, uma coluna, um substrato, uma unidade de filtração, um polímero, polietilenoglicol, PEG4000, PEG8000, uma partícula ou uma esfera; b) pelo menos um oligonucleotídeo configurado para atuar como um iniciador ou sonda a fim de amplificar, sequenciar, hibridizar ou detectar o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos; e c) um reagente configurado para remover uma ou mais proteínas abundantes de uma amostra, em que, opcionalmente, as uma ou mais proteínas abundantes compreendem pelo menos um dentre albumina, imunoglobulina, fibrinogênio e fibrina.

Construção de Biblioteca de Oligonucleotídeos Otimizada

[00499] Conforme descrito no presente documento, aptâmeros individuais e bibliotecas de sondas de oligonucleotídeo são gerados avaliando-se e enriquecendo-se uma biblioteca de oligonucleotídeos de entrada contra um ou mais alvos de interesse. A biblioteca de entrada pode ser referida como biblioteca de oligonucleotídeos de partida ou virgem e pode compreender pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 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, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, 500.000, 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 oligonucleotídeos diferentes. A biblioteca tipicamente compreende sequências conhecidas nas extremidades 5' e/ou 3' para facilitar a ligação de iniciador, ligação de sonda, hibridização, amplificação, sequenciamento e similares. Essas regiões de flanqueamento podem circundar uma seção que compreende sequências geradas aleatoriamente que criam a densidade de biblioteca. A invenção forne-

ce sequências de oligonucleotídeos que intensificam ambas as regiões de flanqueamento e variáveis usadas para a construção da biblioteca. Tais construtos podem intensificar qualquer característica desejada da biblioteca virgem para uso em aplicações de avaliação e enriquecimento, incluindo, sem limitação, síntese, diversidade e determinação de sequência. As regiões de flanqueamento e variáveis intensificadas da invenção podem ser usadas separadamente ou em conjunto. Consultar os Exemplos 19 e 23 do presente documento para exemplos ilustrativos.

[00500] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição que compreende uma biblioteca de oligonucleotídeos de entrada para avaliar uma amostra de vesícula celular ou extracelular que compreende pelo menos dois subconjuntos de bibliotecas de oligonucleotídeos para gerar a biblioteca de oligonucleotídeos de entrada, em que um dos pelo menos dois subconjuntos de bibliotecas de oligonucleotídeos é fabricado com quantidades de nucleotídeos com um teor total de G e C que não é igual a 50%. Por exemplo, o teor total de G e C pode ser menor que 50%, ou o teor total de G e C pode ser maior que 50%. Em uma modalidade, pelo menos uma biblioteca de subconjunto é fabricada com um teor total de G e C que é maior que 50% e outra biblioteca de subconjunto é fabricada com um teor total de G e C menor que 50%. Em uma modalidade, as pelo menos duas bibliotecas de subconjunto compreendem três bibliotecas de subconjunto fabricadas com 25%, 50% e 75% de teor de G e C, respectivamente. As pelo menos duas bibliotecas de subconjunto podem ser fabricadas com quantidades de nucleotídeos similares ou iguais a pelo menos duas linhas na Tabela 13. Os nucleotídeos podem consistir em nucleotídeos de ocorrência natural ou nucleotídeos de ocorrência natural modificados, conforme desejado. Os nucleotídeos podem também compreender nucleotídeos de ocorrência não natural. Tais bibliotecas de oligonucleotí-

deos de entrada podem ser referidas como bibliotecas "GC" no presente documento. As bibliotecas GC podem ser geradas como a região variável em uma biblioteca de entrada virgem para propósitos de avaliação e enriquecimento adicionais. Consultar o Exemplo 19.

[00501] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para gerar uma biblioteca de oligonucleotídeos de entrada da invenção, que compreende colocar em contato as pelo menos duas bibliotecas de oligonucleotídeos de subconjunto para gerar a biblioteca de oligonucleotídeos de entrada. A biblioteca de oligonucleotídeos de entrada pode ser analisada ou enriquecida para fornecer vários aptâmeros ou bibliotecas de sondas de oligonucleotídeos com o uso dos métodos descritos no presente documento.

[00502] Em um aspecto, a invenção fornece, um oligonucleotídeo que tem uma sequência que compreende uma região de adaptador de transpóson 5', uma região de deslocamento que compreende 0 ou mais nucleotídeos localizados em 5' para a região de adaptador de transpóson, uma região variável localizada em 5' para a região de deslocamento e uma região de iniciador esquerda localizada em 5' para a região variável. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece uma pluralidade de oligonucleotídeos que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 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, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, 500.000, 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 oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos compreende uma região de adaptador de transpóson 5', uma região de deslocamento que compreende 0 ou mais nucleotídeos localizados em 5' para a região de

adaptador de transpóson, uma região variável localizada em 5' para a região de deslocamento e uma região de iniciador esquerda localizada em 5' para a região variável. Tais oligonucleotídeos podem ser referidos no presente documento como oligonucleotídeos "equilibrados". Consultar o Exemplo 23.

[00503] O oligonucleotídeo equilibrado ou a pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados da invenção pode ser usado de modo que: a) a região de adaptador de transpóson compreenda 20 a 40 nucleotídeos; b) a região de deslocamento compreenda 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos; c) a região variável compreenda 20 a 50 nucleotídeos; e/ou d) a região de iniciador esquerda compreenda 20 a 40 nucleotídeos. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos equilibrados são tais que: a) a região de adaptador de transpóson compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga à sequência 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG (SEQ ID NO. 510764); b) a região de deslocamento compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos que são pelo menos cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homólogos a pelo menos uma das seguintes sequências: 5'-T (SEQ ID NO. 510765), 5'-CT (SEQ ID NO. 510766) e 5'-ACT (SEQ ID NO. 510767); c) a região variável compreende 10, 11, 12, 13, 14, 15,1 6, 17, 18, 19, 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 ou mais de 50 nucleotídeos; e/ou d) a região de iniciador esquerda compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga a uma sequência selecionada dentre as SEQ ID NOs. 510768 e 510769. A região variável pode compreender sequências de biblioteca "GC", conforme fornecido no presente documento.

[00504] Em um aspecto, a invenção fornece um método para identificar um aptâmero, que compreende realizar um processo de seleção ou enriquecimento com o uso de um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados como uma biblioteca de entrada virgem. Tais processos de seleção ou enriquecimento são descritas ou fornecidas no presente documento, incluindo, sem limitação SELEX e as variações do mesmo. Em uma modalidade, o processo de seleção compreende pelo menos uma rodada de seleção positiva contra um alvo de interesse e, opcionalmente, pelo menos uma rodada de posição negativa contra um alvo diferente do alvo de interesse.

[00505] Em outro aspecto, a invenção fornece um método que compreende colocar um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados em contato com uma amostra e detectar a presença ou o nível de ligação do oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos a um alvo na amostra. A amostra pode compreender uma amostra biológica, tal como uma amostra orgânica, uma amostra inorgânica, um tecido, uma cultura celular, um fluido corporal, sangue, soro, uma célula, uma microvesícula, um complexo proteico, um complexo lipídico, um carboidrato ou qualquer combinação, fração ou variação dos mesmos. O alvo pode ser qualquer alvo útil, incluindo, sem limitação, uma célula, uma organela, um complexo proteico, uma lipoproteína, um carboidrato, uma microvesícula, um fragmento de membrana, uma molécula pequena, um metal pesado, uma toxina ou um fármaco.

[00506] Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método que compreende: a) colocar uma amostra biológica que compreende microvesículas em contato com uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeo, em que, a biblioteca de sondas de oligonucleotídeo compreende um oligonucleotídeo equilibrado ou uma pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados; b) identificar oligonucleotídeos ligados a pelo

menos uma porção das microvesículas; e c) caracterizar a amostra com base em um perfil dos oligonucleotídeos identificados.

[00507] Em outro aspecto relacionado, a invenção fornece um método que compreende: a) colocar uma amostra em contato com uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos que compreende 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} oligonucleotídeos de sequências de oligonucleotídeos diferentes para formar uma mistura em uma solução, em que os oligonucleotídeos têm capacidade para ligar uma pluralidade de entidades na amostra para formar complexos, em que, a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos compreende um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados; d) particionar os complexos formados na etapa (a) da mistura; e c) detectar oligonucleotídeos presentes nos complexos particionados na etapa (b) para identificar um perfil de oligonucleotídeo para a amostra. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para caracterizar uma doença ou distúrbio que compreende: a) colocar uma amostra biológica de teste em contato com um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados; b) detectar uma presença ou nível de complexos formados na etapa (a) entre o oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados e um alvo na amostra biológica de teste; e c) comparar a presença ou nível detectado na etapa (b) a um nível de referência de uma amostra biológica de controle, caracterizando, assim, a doença ou distúrbio. A etapa de detecção pode compreender realizar sequenciamento de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos, amplificação de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos e/ou hibridização de todos ou alguns dos oligonucleotídeos nos complexos a um arranjo. Em algumas modalidades, o sequenciamento compreende sequenciamento de alto rendimento.

[00508] Nos métodos da invenção que compreendem o uso de um

oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados, a amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle, cada uma, compreender uma amostra de tecido, uma cultura celular ou um fluido biológico. Em algumas modalidades, o fluido biológico compreende um fluido corporal. Os fluidos corporais dentro do método da invenção compreendem sangue periférico, soros, plasma, ascites, urina, fluido cerebrospinal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem bronqueoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de cowper ou fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, cabelo, lágrimas, fluido de cisto, fluido pleural e peritoneal, fluido pericardial, linfa, quimo, quilo, bílis, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreções vaginais, secreção mucosal, água de defecação, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades sinusais, aspirações broncopulmonares, fluido da cavidade blastocística ou sangue do cordão umbilical. Em algumas modalidades preferenciais, o fluido corporal compreende sangue, soro ou plasma. O fluido biológico pode compreender microvesículas. Em tal caso, complexos podem ser formados entre o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos e pelo menos uma das microvesículas. A amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle podem compreende, ainda, microvesículas isoladas, em que, opcionalmente, as microvesículas são isoladas com o uso de pelo menos um dentre cromatografia, filtração, ultrafiltração, centrifugação, ultracentrifugação, citometria de fluxo, captura por afinidade (por exemplo, a uma superfície plana, coluna ou microesfera), precipitação de polímero e uso de microfluidos. As vesículas podem ser também isoladas após o contato com o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos.

[00509] Em várias modalidades dos métodos da invenção que compreendem o uso de um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade

de oligonucleotídeos equilibrados, o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos liga um polipeptídeo ou fragmento do mesmo. O polipeptídeo ou fragmento do mesmo pode ser solúvel ou ligado à membrana, em que, opcionalmente, a membrana compreende uma membrana de microvesícula. A membrana poderia ser também de uma célula ou um fragmento de uma célula de vesícula. Em algumas modalidades, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo compreende um biomarcador na Tabela 3 ou Tabela 4. Por exemplo, o polipeptídeo ou fragmento do mesmo poderia ser um marcador de vesícula geral, tal como na Tabela 3, ou um marcador relacionado a tecido ou relacionado a doença, como na Tabela 4. O oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos pode ligar-se a um antígeno de superfície de microvesícula na amostra biológica. Por exemplo, o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos pode ser enriquecido a partir de uma biblioteca virgem contra microvesículas.

[00510] A doença ou distúrbio detectado pelo oligonucleotídeo, pluralidade de oligonucleotídeos ou métodos fornecidos no presente documento que compreendem o uso de um oligonucleotídeo equilibrado ou pluralidade de oligonucleotídeos equilibrados pode compreender qualquer doença ou distúrbio adequado de interesse. 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. Consultar, por exemplo, a seção "Fenótipos" no presente documento. A doença ou distúrbio pode incluir, sem limitação, câncer de mama, doença de Alzheimer, asma brônquica, carcinoma de célula transicional da bexiga, osteoblastoclastoma celular gigante, tumor cerebral, adenocarcinoma colorretal, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), carcinoma de células escamosas do cérvice, infarto agudo do miocár-

dio (AMI)/insuficiência cardíaca aguda, doença de Chron, diabetes mellitus tipo II, carcinoma de esôfago, carcinoma de células escamosas da laringe, leucemia aguda e crônica da medula óssea, carcinoma de pulmão, linfoma maligno, esclerose múltipla, carcinoma ovariano, doença de Parkinson, adenocarcinoma de próstata, psoríase, artrite reumatoide, carcinoma de células renais, carcinoma de células escamosas da pele, adenocarcinoma do estômago, carcinoma da glândula tireoide, câncer de testículo, colite ulcerativa ou adenocarcinoma uterino.

[00511] 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 relacionados às bibliotecas GC ou oligonucleotídeos equilibrados da invenção. Por exemplo, o reagente pode compreender um ou mais oligonucleotídeos que têm uma sequência derivada de uma biblioteca GC e/ou uma biblioteca de oligonucleotídeos equilibrados. O reagente pode compreender, ainda, outros componentes úteis revelados no presente documento, incluindo, sem limitação, pelo menos um dentre: a) um reagente configurado para isolar uma microvesícula, em que, opcionalmente, o pelo menos um reagente configurado para isolar uma microvesícula compreende um agente de ligação a um antígeno de microvesícula, uma coluna, um substrato, uma unidade de filtração, um polímero, polietilenoglicol, PEG4000, PEG8000, uma partícula ou uma esfera; b) pelo menos um oligonucleotídeo configurado para atuar como um iniciador ou sonda a fim de amplificar, sequenciar, hibridizar ou detectar o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos; e c) um reagente configurado para remover uma ou mais proteínas abundantes de uma amostra, em que, opcionalmente, as uma ou mais proteínas abundantes compreendem pelo menos um dentre albumina, imunoglobulina, fibrinogênio e fibrina.

KITS

[00512] 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 (por exemplo, por meio de cromatografia, filtração, ultrafiltração, citometria de fluxo, captura por afinidade (por exemplo, a uma superfície plana, coluna ou esfera), precipitação de polímero e/ou uso de microfluidos), 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.

[00513] 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.

[00514] 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.

[00515] 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. A doença ou distúrbio pode ser selecionado dentre uma doença ou distúrbio na Tabela 16.

EXEMPLOS

Exemplo 1: IDENTIFICAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE DNA QUE LIGAM UM ALVO

[00516] 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.

[00517] 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 timina (a "cauda de timina") na extremidade 5 ou 3 plica, juntamente com uma única molécula de biotina conjugada à cauda de timina. As moléculas adicionais de biotina pode-

riam 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 são mostradas ausentes nas caudas de timina ou caudas de iniciador.

[00518] 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.

[00519] 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).

[00520] 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 outra rodada da seleção. Esse processo é repetido conforme desejado para observar o enriquecimento de ligação.

EXEMPLO 2: ENSAIO COMPETITIVO

[00521] 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 da Santa Cruz Biotechnology, Inc. foi usado para eluir os aptâmeros do EpCAM alvo.

EXEMPLO 3: AVALIAÇÃO E ANÁLISE DE AFINIDADE

[00522] Todos 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:

[00523] Preparação de Biblioteca - os aptâmeros foram agrupados após ligar códigos de barras e sequências de adaptador (Life Technologies) de acordo com os protocolos do fabricante. Em resumo, os conjuntos equimolares dos aptâmeros foram feitos com o uso das etapas a seguir: Uma alíquota de cada biblioteca foi analisada com um instrumento Bioanalyzer™ e Kit DNA 1000 ou Kit de Alta Sensibilidade Agilent, conforme apropriado para a concentração final da biblioteca. A concentração molar (nmol/l) de cada biblioteca de amplicóns foi determinada com o uso do software comercialmente disponível (Agilent).

[00524] Um conjunto equimolar da biblioteca foi preparado na maior concentração possível.

[00525] A concentração combinada do estoque de biblioteca agrupado foi calculada.

[00526] 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).

[00527] Preparação de Modelo – Com o uso de uma biblioteca recém-diluída, o conjunto de aptâmeros resultante dos 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.

[00528] Vinte aptâmeros foram selecionados com base nos ensaios diretos ou competitivos que avaliam a ligação à EpCAM (conforme descrito acima).

[00529] 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 contro-

le T200, conforme segue:

[00530] Diluir o antígeno a uma concentração de 32 nM.

[00531] Preparar as diluições necessárias para cinética, iniciando a 32 nM, preparar diluições de duas vezes de antígeno até 0,5 nM.

[00532] O software de controle Biacore 200 é programado com as condições a seguir: Solução: HBS-EP+ Tampão; Número de ciclos: 3; Tempo de contato: 120 s; Taxa de fluxo: 30 µl/min; Tempo de dissociação: 300 s; Solução: Glicina-HC1 pH 2,5; Tempo de contato: 120 s; Taxa de fluxo: 20µl/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.

[00533] A Figura 5 mostra os dados de SPR para o aptâmero BTX176881 (SEQ ID NO: 3). 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 Kd calculados a partir das medições SPR que são ilustradas na Figura 4. 5. Adicionalmente, a Tabela 5 mostra os dados de SPR e valores calculados de K_d para BTX187269 (SEQ ID NO: 6) e Aptâmero 4 (SEQ ID NO. 1).

Tabela 5: VALORES DE K_D CALCULADOS A PARTIR DE MEDIÇÕES DE SPR

Aptâmero imobilizado	Analito	Conc (nM)	Resposta	K_d (nM)	R^2 Completo	Chi^2 Completo
BTX176881 (SEQ ID No: 3)	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: 6)	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 de K_d, R^2 e Chi^2 por ajuste Global para método de referência único.*

EXEMPLO 4: ANÁLISE DE MOTIVO

[00534] O processo dos Exemplo 3 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). Consultar a Figura 3A e a Figura 3B para previsões estruturais de exemplo. A estrutura de curso secundária compartilhada não garante uma estrutura tridimensional idêntica. Portanto, a validação "wet-lab" de aptâmeros é ainda útil já que nenhum conjunto de ferramentas *in silico* teve ainda a capacidade de prever totalmente o aptâmero ideal entre um conjunto de candidatos de aptâmero.

EXEMPLO 5: ENSAIO DE SUBTRAÇÃO DE APTÂMERO COM BASE EM MICROVESÍCULA

[00535] As microvesículas circulantes são isoladas do plasma normal (por exemplo, de indivíduos sem câncer) com o uso de um dos métodos a seguir: 1) Isolamento 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) Isolamento 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:

[00536] Posicionar seringa e filtro (1,2 µm Acrodisc Syringe Filter Versapor Membrane Non-Pyrogenic Ref: 4190, Pall Life Sciences) em coluna 150K MWCO de 7 ml (concentradores Pierce, 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.

[00537] Pipetar o plasma de paciente (900 a 1.000 µl) no PBS na seringa, pipetar a mistura duas vezes

[00538] Filtrar o plasma na coluna de 150K MWCO de 7 ml.

[00539] Centrifugar as colunas de 150K MWCO de 7 ml a 2000 x g a 20°C (16°C a 24°C) por 1 hora.

[00540] Após 1 hora de rotação, verter o fluxo passante em 10% de alvejante a ser descartado.

[00541] 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°C (16°C a 24°C) verific ando o volume após cada rotação até o concentrado de plasma estar entre 8,0 e 8,5 mls.

[00542] 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.

[00543] 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.

[00544] Adicionar a quantidade apropriada de PBS filtrado 1X para reconstituir a amostra ao Volume Alvo.

[00545] As microvesículas produzidas com o uso de quaisquer métodos de isolamento compreenderão uma mistura de tipos de vesícula e terão vários tamanhos com possível exceção dos métodos de ultracentrifugação, que podem favorecer o isolamento de partículas do tamanho de exossomo.

[00546] 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 4 graus Celsius.

[00547] 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.

[00548] 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.

[00549] 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.

[00550] 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 uma rodada de PCR para amplificar os produtos.

[00551] O processo é, então, repetido por um número definido de vezes, por exemplo, 5 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. Consultar a Figura 4.

EXEMPLO 6: DETECÇÃO DE MICROVESÍCULAS COM O USO DE APTÂMEROS ANTI-EPCAM

[00552] 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.

[00553] A Figura 6 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): Figura 6A) EGFR (receptor de fator de crescimento epidérmico); Figura 6B) PBP (proteína de ligação prostática; também conhecida como PEBP1 (proteína de ligação de fosfatidiletanolamina 1)); Figura 6C) EpCAM (molécula de adesão de célula epitelial); e Figura 6D) KLK2 (peptidase 2 relacionada à calicreína). As microvesículas nas amostras de plasma foram capturadas com o uso de anticorpos conjugados com esferas. O Aptâmero 4 identificado com fluorescência foi usado como um detector no ensaio de microesfera. A Figura 6 mostra os valores de fluorescência mediana médios (valores de MFI) detectados para as microvesículas capturadas com esfera e detectadas por Aptâmero 4. 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 7: SELEÇÃO NEGATIVA E POSITIVA DE APTÂMEROS

[00554] 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 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.

[00555] Experimentos preliminares foram realizados com cinco bibliotecas de aptâmeros de DNA com 10^{15} sequências cada, e comprimentos variáveis (60, 65, 70, 75, 80 mers) foram pré-amplificados e separados em filamento de modo que o filamento direto (não biotinilado) sirva como um aptâmero. Múltiplas rodadas da seleção negativa e seleção positiva foram realizadas. Antes de cada rodada, os produtos de aptâmero recuperados foram amplificados por PCR e o filamento separado com o uso da metodologia padrão. As seleções foram realizadas conforme segue:

SELEÇÃO NEGATIVA

[00556] 1. Preparar a Mistura de seleção negativa de esferas: Incubar 1.200 esferas não magnéticas com agente de bloqueio padrão por 20 m.

[00557] 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.

[00558] 3. Pré-umedecer a placa de filtro (1,2 µm, Millipore) com

tampão PBS-BN. Adicionar 150 µl de PBS-BN.

[00559] 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.

[00560] 5. Coletar o fluxo passante da placa de filtro em uma placa de coleta (NBS) com o uso de um coletor a vácuo.

[00561] 6. Concentrar e limpar amostras para remover materiais em excesso conforme desejado.

[00562] O processo de seleção negativa é repetido até 6 a 7 vezes.

SELEÇÃO POSITIVA

[00563] Antes do início, conjugar os biomarcadores de proteína de interesse (aqui, SSX4, SSX2, PBP, KLK2, SPDEF) às microesferas não magnéticas desejadas com o uso de condições conhecidas na técnica. O material de partida purificado combinante incluiu: 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.

[00564] 1. Bloqueio de esfera: Incubar um número desejado de cada esfera (8.400 x o número de bibliotecas de aptâmeros (5) x um fator excedente de (1,2)) com um bloco de partida por 20 m.

[00565] 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.

[00566] 3. Pré-umedecer a placa de filtro (1,2 µm, Millipore) com tampão PBS-BN. Adicionar 150 µl de PBS-BN.

[00567] 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.

[00568] 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.

[00569] A seleção positiva é repetida até 16 vezes. Determinadas rodadas da seleção positiva têm etapas adicionais para tratar o RNA recuperado (isto é, candidatos de aptâmero restantes) conforme segue:

A rodada 8 da seleção positiva foi modificada conforme segue:

[00570] 1. Após a terceira lavagem (PBS-BN), 25 µl da amostra foram coletados do topo do filtro para os tubos de 1,5 ml.

[00571] 2. A placa de filtro foi incubada a 45 ℃ p or ~10 m e lavada imediatamente com o uso de vácuo. A placa foi lavada mais três vezes com PBS-BN.

[00572] 3. 50 µl de PBS foram adicionados à placa e a etapa 2 foi repetida.

[00573] 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.

A rodada 9 da seleção positiva foi modificada conforme segue:

[00574] 1. Após a lavagem final na etapa 5), 5 µg/ml de Estreptavidina-PE foram adicionados à mistura de aptâmero e incubados por 30 m à temperatura ambiente com agitação a 550 rpm.

[00575] 2. As amostras na placa de filtro foram lavadas 3x com PBS-BN (+ NaCl a 500 mM adicional).

[00576] 3. Uma lavagem adicional com PBS-BN regular foi realizada.

[00577] 4. 50 µl de PBS foram adicionados às amostras seguidos pela coleta conforme acima para tubos de 1,5 ml.

[00578] 5. Amostras armazenadas a -20 °C.

A rodada 14 da seleção positiva foi modificada conforme segue:

[00579] Antes de começar essa rodada, os antígenos de interesse (SSX4, SSX2, PBP, KLK2, SPDEF) foram conjugados com esferas magnéticas carboxiladas com o uso de métodos conhecido na técnica.

[00580] 1. Bloqueio de esfera: tomar um número desejado de cada esfera não magnética (3.000 x o número de bibliotecas de aptâmeros (5) x um fator excedente de 1,2), adicionar bloco de partida (3:1, bloqueio por 1.200 esferas), realizar 5 misturas de 4 antígenos e suplementar cada uma com um antígeno alvo diferente conjugado às esferas magnéticas (consultar a Tabela 6 abaixo, em que os antígenos estão conjugados a esferas não magnéticas, exceto conforme indicado), incubar 20 m.

Tabela 6: 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

[00581] 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 °C com agitação a 550 rpm.

[00582] 3. Pré-umedecer a placa de filtro com tampão de PBS-BN, adicionar 150 µl de PBS-BN.

[00583] 4. Transferir as amostras dos tubos de extirpação por PCR para a placa de filtro, incubar 1 hora à temperatura ambiente com agi-

tação a 550 rpm.

[00584] 5. Após a última lavagem (padrão), adicionar 5 µg/ml de Estreptavidina-PE, incubar por 30 m à temperatura ambiente com agitação a 550 rpm;

[00585] 6. Lavar 3x com PBS-BN (+ NaCl a 500 mM adicional).

[00586] 7. Realizar uma lavagem adicional com PBS-BN regular.

[00587] 8. 50 µl de PBS foram adicionados às amostras seguidos pela coleta conforme acima para tubos de 1,5 ml.

[00588] 9. Remover as esferas magnéticas com o uso de um apoio magnético e substituir por um tampão de PBS novo.

[00589] 10. Amostras armazenadas a -20 °C para a extração de DNA subsequente e separação de filamento.

[00590] As etapas opcionais implantadas na última rodada da seleção positiva destinam-se a aumentar a severidade da ligação de aptâmero (por exemplo, calor aumentado ou concentração de sal).

EXEMPLO 8: REVELAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS ANTI-EPCAM

[00591] Nesse Exemplo, um aptâmero para EpCAM identificado com o uso da técnica no Exemplo 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 altos através de todas as sequências de leitura com produto de comprimento esperado total e (b) estrutura secundária forte (Figura 7B).

[00592] 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 rodadas iniciais contra EpCAM que foi

ligado a uma etiqueta de Fc e, após a rodada 8, a seleção foi comutada para EPCAM com uma etiqueta de Histidina. Outra porção dos aptâmeros foi selecionada em rodadas iniciais contra EpCAM que foi ligado a uma etiqueta de Histidina e, após a rodada 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.

Caracterização de Aptâmero

[00593] CAR003 é um candidato de aptâmero identificado com o uso da metodologia acima. Como um aptâmero de RNA, CAR003 com a sequência de cauda alternativa tem a sequência de RNA a seguir (SEQ ID NO. 5)

[00594] 5' -auccagagug acgcagcagu cuuuucugau ggacacgugg uggucuagua ucacuaagcc accgugucca-3'

[00595] CAR003 foi adicionalmente caracterizado. O aptâmero de EpCAM CAR003 é modificado conforme desejado por ligação de uma porção química de biotina na extremidade 5'(CAR003.2_5'-B (SEQ ID NO. 4)) ou na extremidade 3' (CAR003.2_3'-B (SEQ ID NO. 7)). 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 7B ilustra a estrutura secundária ideal de CAR003 com uma energia livre mínima (ΔG) de -30,00 kcal/mol. Para propósitos de ilustração, o aptâmero é mostrado como um aptâmero de RNA (SEQ ID NO. 5) que corresponde à sequência de DNA CAR003 (SEQ ID NOs. 4, 7).

[00596] 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 1 a 3 indicados na Figura 7C. A figura compreende um cromatograma de FPLC com todos os produtos e frações designados em conjuntos após verificar a qualidade em gel. A Figura 7D ilustra um gel manchado SYBR GOLD com diferentes frações FPLC de aptâmero CAR003 após a 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 7C.

[00597] 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 identificado com estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE). As esferas de EpCAM e aptâmeros identificados com SA-PE foram misturados. A ligação foi determinada como valor fluorescente mediano em um ensaio de esfera, conforme descrito no presente documento. Os valores de MFI (Figura 7E e F) aumentam com a ligação aumentada do aptâmero identificado com SA-PE ao EpCAM recombinante. A Figura 7E e F ilustram a ligação de CAR003 à proteína EPCAM em HEPES a 25 mM com PBS-BN (PBS, 1% de BSA, 0,05% de Azida, pH 7,4) (Figura 7E) ou em HEPES a 25 mM com $MgCl_2$ a 1 mM (Figura 7F). O aptâmero de EPCAM Aptâmero 4 (consultar acima) foi usado para comparação. Conforme mostrado nas figuras, o conjunto 3 de CAR003 se liga de modo mais eficaz a seu alvo na presença de $MgCl_2$ (Figura 7F) do que na presença de BSA (Figura 7E).

[00598] Para entender melhor seu desempenho, a ligação de CAR003 foi testada na presença de tanto BSA como $MgCl_2$ em vários tampões. A Figura 7G ilustra a ligação de CAR003 a EpCAM nos sais

indicados com e 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 MgCl2.

[00599] Outro fator que pode influenciar o desempenho do aptâmero é a desnaturação com diferentes composições de sal. A Figura 7H ilustra o efeito de desnaturação em ligação de CAR003 à proteína 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.

[00600] 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 7I ilustra a titulação de aptâmeros contra proteína recombinante 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.

[00601] A fim de avaliar a especificidade de CAR003, o mesmo foi testado com o uso de Western Blot contra proteína recombinante EPCAM e controles que compreendem albumina sérica bovina (BSA) e albumina sérica humana (HSA). A Figura 7J ilustra um Western blot com aptâmero CAR003 versus proteína etiquetada com his 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.

[00602] Teste de CAR003 com amostras de plasma. Amostras de plasma de cinco indivíduos com câncer de próstata e cinco indivíduos normais foram testadas com CAR003 para detectar microvesículas com o uso de proteínas conjugadas a esfera para capturar as microvesículas e aptâmero identificados com SA-PE para detectar as vesículas. O detector de Aptâmero 4 identificado com SA-PE foi usado como controle. As alterações em vezes de Câncer sobre Normal são mostradas na Tabela 7. 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 7: 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
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

[00603] 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.

Aptâmero de Controle

[00604] 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. 22) conforme descrito em Kaur e Yung, 2012.

Referências:

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.

2. Cerchia, L., e V. de Franciscis. "Nucleic Acid Aptamers Against Protein Kinases." *Current medicinal chemistry* 18.27 (2011): 4.152 a 4.158.

3. Wu, Jie, et al. "Identification, Characterization and Application of a G-Quadruplex Structured DNA Aptamer against Cancer Biomarker Protein Anterior Gradient Homolog 2." *PloS ONE* 7.9 (2012): e46.393

4. Mitkevich, Olga V., et al. "DNA aptamers detecting generic amyloid epitopes." *Prion* 6.4 (2012): 400 a 406.

5. Kaur H, Yung L-YL (2012) Probing High Affinity Sequences of DNA Aptamer against $VEGF_{165}$. PLoS ONE 7(2): e31.196. doi:10.1371/journal.pone.0031196.

EXEMPLO 9: IDENTIFICAÇÃO DE ALVO DE APTÂMERO

[00605] 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 9. A abordagem é usada para verificar os alvos de CAR003, um aptâmero identificado por avaliação de biblioteca para reconhecer EpCAM. Consultar a descrição acima para CAR003. Nessa abordagem, a sequência de CAR003 é aleatoriamente redisposta 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.

[00606] O protocolo usado é conforme segue:

[00607] 1) Os aptâmeros candidatos (aqui, CAR003) e os aptâmeros de controle negativo (aqui, CAR003 disposto aleatoriamente) são sintetizados com modificações para permitir a captura (aqui, os aptâmeros são biotinilados) e reticulação (aqui, com o uso do Reagente e Kit de Transferência de Identificação de Biotina Sulfo-SBED, Número de Catálogo 33073 da Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, para permitir a fotorreticulação).

[00608] 2) Cada um dos aptâmeros é individualmente misturado com microvesículas que têm o alvo de interesse (aqui, as microvesículas da linhagem celular BrCa).

[00609] 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.

[00610] 4) As microvesículas são lisadas, liberando assim o complexo de aptâmero-alvo reticulado na solução.

[00611] 5) Os complexos de aptâmero-alvo reticulados são capturados a partir da solução com o uso de um substrato revestido por estreptavidina.

[00612] 6) Os complexos aptâmero-alvo reticulados para cada aptâmero são passados individualmente em eletroforese em gel SDS-

PAGE. Os alvos de proteína capturados são visualizados com manchamento de Azul de Coomassie.

[00613] 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, CAR003), mas não os aptâmeros de controle negativo relacionados (aqui, CAR003 disposto aleatoriamente). As faixas que correspondem ao alvo são extirpadas do gel.

[00614] 8) A espectrometria de massa (MS) é usada para identificar o alvo de aptâmero das bantas extirpadas.

Exemplo 10: APTÂMEROS PARA MICROVESÍCULAS DERIVADAS DE CÂNCER DE MAMA (BrCa)

[00615] 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).

[00616] As microvesículas foram isoladas do plasma de um conjunto de 60 pacientes com câncer de mama (BrCa+). As microvesículas foram isoladas de um 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 de 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 mi-

crovesículas de modo que a remoção das proteínas altamente abundantes não seja um problema.

[00617] A biblioteca de aptâmero usada consistiu em uma biblioteca de aptâmero de RNA 2'F SUL1. A sequência é 5'-GGGAGGACGAU GCGG-N40-CAGACGACUCGCUGAGGAUCCGAGA-3' (SEQ ID NO. 23). 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.

[00618] A biblioteca de aptâmero foi incubada ou com esferas conjugadas com microvesícula de controle ou câncer. Treze rodadas de seleção positiva para aptâmeros que ligam as microvesículas foram realizados em paralelo para ambos os tipos de amostras. Consultar a Figura 11A "Seleção A" para esquemas de seleção. Consultar o Exemplo 11 abaixo para o protocolo detalhado das etapas de seleção positiva. A seleção negativa não foi realizada.

[00619] 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.

[00620] Várias sequências representativas obtidas a partir desses procedimentos são mostradas na Tabela 8. 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 8, 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 8 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 8: SEQUÊNCIAS CANDIDATAS DE APTÂMERO DE MICROVESÍCULA BrCa

ID	SEQ ID NO:	5'-Líder
BRCA_APT1_RNA	8	GGGAGGACGAUGCGG
BRCA_APT2_RNA	10	GGGAGGACGAUGCGG
BRCA_APT3_RNA	12	GGGAGGACGAUGCGG
BRCA_APT4_RNA	14	GGGAGGACGAUGCGG
BRCA_APT5_RNA	16	GGGAGGACGAUGCGG
BRCA_APT6_RNA	18	GGGAGGACGAUGCGG
BRCA_APT7_RNA	20	GGGAGGACGAUGCGG

Tabela 8: (Continuação)

Sequência Variável	Cauda-3'
CGCGUCUUCCCCGCAUUGCCGCAAUUGCCAUACAUUAAUA	CAGACGACUCGCUGAGGAUCCGAGA
GUCCGGAACGCCUCGAUCCUCGCAUAAUAUGAUACGUCUG	CAGACGACUCGCUGAGGAUCCGAGA
GUCCAUGGUACGCCUCGAUUCCGCCCAUACAUGCAUGUAA	CAGACGACUCGCUGAGGAUCCGAGA
CACUAUCCGUUUGUCCGUCCUCUUGUGGUAUUGCGCAUGC	CAGACGACUCGCUGAGGAUCCGAGA
UCUUCCAUCUGGUCGCGAUACAGAAUACGAUUAAC	CAGACGACUCGCUGAGGAUCCGAGA

AUAAA	
GAUCACGCUGCCCUUUGUUUAAGGCCUUUAUACAA ACGCA	CAGACGACUCGCUGAGGAUCCGAGA
UAUUCGCCAGUCACAUCAACUAUGAUGACGCUUGA CUGGA	CAGACGACUCGCUGAGGAUCCGAGA

[00621] Cada sequência na Tabela 8 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.

[00622] A sequência de DNA correspondente a cada sequência de RNA na Tabela 8 é fornecida na listagem de sequências, em que a sequência de DNA segue diretamente sua sequência de RNA correspondente. Por exemplo, a SEQ ID NO. 9 é a sequência de DNA correspondente à sequência de RNA SEQ ID NO. 8, etc. As formas de DNA dos aptâmeros são sintetizadas para a caracterização adicional também.

[00623] 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 11: Protocolo de seleção de biblioteca de aptâmeros

[00624] 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

[00625] O espaço de trabalho é limpo com EtOH a 80% antes do trabalho.

[00626] As esferas são esferas MagPlex (Luminex Corp., Austin, TX). Outras esferas podem ser substituídas conforme desejado.

[00627] Tampões/Reagentes para Preparar:

- água MilliQ
- $MgCl_2$ a 100 mM
- Tampão de Transcrição 5x (Tris a 200 mM pH 7,9)
- PBS 1x
- 1x PBS com $MgCl_2$ a 3 mM
- PBS 10x
- Tampão de seleção (PBS 1x com BSA 0,1% e $MgCl_2$ a 3 mM)

[00628] Antes de iniciar a seleção, remover tampão de armazenamento de esfera e lavar esferas com 1x PBS com $MgCl_2$ a 3 mM 1 vez (200 ul totais 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

[00629] Abreviações: TK- Transcrição; NTC- Sem controle de modelo.

[00630] Etapas:

1. 1ª Rodada: 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.

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.

1.2 Rodadas 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.

2. Incubar por 30 m a 37 ℃, agitar a 1.000 rpm pip etar a mistura a cada 10 minutos.

3. Lavar as esferas:

3.1 Um ciclo de lavagem compreende:

3.1.1 Remover as esferas do ímã

3.1.2 Ressuspender as esferas em 100 µl de 1x PBS + $MgCl_2$ a 3mM fora do ímã.

3.1.3 Incubar a amostra por 30 segundos fora do ímã.

3.1.4 Colocar a amostra de volta para o ímã e esperar até as esferas estiverem no lado.

3.1.5 Remover e descartar o sobrenadante.

3.1.6 Ressuspender em 100µl de 1x PBS + $MgCl_2$ a 3 mM+ 0,1% de BSA fora do ímã.

3.1.7 Incubar a amostra por 3 minutos fora do ímã.

3.1.8 Colocar a amostra de volta para o ímã e esperar até as esferas estiverem no lado.

3.1.9 Remover e descartar o sobrenadante.

3.2 1ª Rodada: Colocar a mistura de esfera em um ímã e remover o sobrenadante. Lavar uma vez com 100 µl de 1x PBS + $MgCl_2$ a 3 mM+0,1% de BSA (por mistura com pipeta das esferas) descartar o tampão.

3.3 Rodadas Seguintes: Aumentar as etapas de lavagem a cada segunda rodada em uma etapa de lavagem a amis até 3 etapas de lavagem.

4. Adicionar 55 µl de água MilliQ à amostra de esfera.

5. Eluir o RNA incubando-se a amostra de esfera por 5 m a 80℃

5.1 Verificar se há 50 µl, se não, girar a amostra para girar a água condensada para fora do topo.

5.2 Transferir o sobrenadante para um novo frasco. Trabalhar rapidamente para evitar que os filamentos se religuem às esferas.

5.2.1 Usar 50 µl de eluato para a RT-PCR seguinte e armazenar o restante a -20 °C

RT-PCR DE CANDIDATOS DE APTÂMERO RECUPERADOS

[00631] Dicas

- O restante da amostra de RT-PCR e da amostra de TK-PCR é armazenado a -20 °C
- RNA pode ser armazenado a 4°C por ~1 hora
- O produto de RT-PCR pode ser armazenado de um dia para o outro a 4 °C
- Proceder para o próximo ciclo de seleção para a qualidade de RNA ideal após a transcrição.
- Evitar a centrifugação de RNA
- Misturar em gelo
- Usar tubos de PCR de 0,5 ml
- Cada RT-PCR deve ter um controle sem modelo (NTC) com água ao invés de modelo
- Não congelar-descongelar DTT mais de uma vez

6. Preparar uma Mistura Mestre antes da primeira rodada, verificar a mesma com 0,5 pmol de RNA e armazenar alíquotas de 48 µl a -20°C até o uso.

Tabela 9: MISTURA MESTRE DE RT-PCR

Reagente	Volume (µl)/ reação	Concentração final
Tampão Promega cat nº M890A GoTaq Flexi Incolor 5x	20	1x
Tampão de primeiro filamento 5x lote nº 1300427 (Invitrogen)	4	0,2 x
DTT a 100 mM	2	2 mM

100 µM de iniciador SUL1 F	1	1 µM
100 µM de iniciador SUL1 R	1	1 µM
100 mM de $MgCl_2$	1,5	1,5 mM
25 mM (cada) dNTPs	1,2	300 µM
Água MilliQ	17,3	
Total	48	

7. Adicionar 50 µl de água MilliQ como controle negativo (NTC) (pipetar essa primeira) ou 50 µl de eluato de seleção. Pipetar a mistura.

8. Incubar a 65 °C por 5 m.

9. Após resfriamento a 4°C, adicionar:

9.1 1 µl de Transcriptase Reversa Superscript II (Invitrogen, cat nº 18064) (200 U/µl)

9.2 1 µl de DNA polimerase GoTaqFlexi (5 unidades/µl) Promega cat nº M8305.

PCR –Programa (SARTPCR)

a) 10 m 54 °C

(Essa etapa é apenas para transcriptase reversa, mais rodadas podem ser necessárias, não repetir a etapa A.)

b) 1 m 95 °C

c) 1 m 60 °C

d) 1 m 72 °C

10. Etapas de ciclo b a d para

10.1 1ª rodada b a d 4 ciclos. Executar 5 µl de produtos de PCR em um gel de agarose 4%.

10.1.1 Rodadas 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.

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

[00632] Toda mistura realizada em gelo. Preparar Mistura Mestre de transcrição e armazenar alíquotas de 85,7 µl a -20°C até o uso.

11. Verificar pH de estoque 200 mM Tris pH 7,9 antes do uso. Uma alteração no pH ao longo do tempo pode causar problemas com a transcrição.

Tabela 10: 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	1,700 µl	

12. Adicionar 10 µl de produto de RT-PCR à mistura mestre.

13. Adicionar 1 µl de RNasina (40 unidades /µl)

13.1 Inibidor de RNasina Ribonuclease Recombinante Promega cat nº N2515/N2511

14. Adicionar 4 µl de polimerase T7 Y639F mutante (25 U/µl uso: 100 U total por reação)

15. Realizar a reação por 30 m a 37 ℃

16. Usar o produto de transcrição diretamente para a rodada de seleção seguinte. Se a próxima etapa não for possível, congelar o produto de transcrição a -20℃.

RODADAS SUBSEQUENTES

[00633] 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 as rodadas conforme notado acima.

ENSAIO DE LIGAÇÃO

[00634] Um ensaio de ligação é realizado após as rodadas desejadas 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.

[00635] Protocolo de Cherenkov: Realizado com o uso de biblioteca de aptâmeros identificada radioativamente com ^{32}P.

[00636] Concentração final do tampão de seleção: PBS 1x + $MgCl_2$ a 3mM + BSA 0,01% pH 7,4

[00637] Tampão de lavagem: PBS 1x + $MgCl_2$ a 3mM pH 7,4

1. Remover amostras de microvesícula de congelador a -80ºC e descongelar.

2. Colocar esferas em ímã (200.000 por experimento de amostra), remover tampão de armazenamento de esfera.

3. Lavar 1x 200µl por 1 minuto cada uma com tampão 1x PBS, $MgCl_2$ a 3 mM. Agrupar esferas para produzir 200.000 em um tubo.

4. Ressuspender as esferas em 70 µl do tampão de sele-

ção. (10 µl de 10x PBS, 1% de BSA + 3 µl de $MgCl_2$ a 100 mM+5 µl de H_2O por amostra).

5. Adicionar 30 µl de biblioteca de aptâmeros de RNA identificadas radioativamente a sua amostra respectiva.

6. Incubar com agitação a 1.000 rpm a 37 ºC por 30 m.

7. Colocar amostras em um ímã.

8. Remover e guardar sobrenadante.

9. Lavar esferas com 200 µl de tampão de lavagem 1x PBS $MgCl_2$ a 3 mM pH 7,4, incubando fora do ímã por 3 minutos.

10. Colocar amostras no ímã, remover e guardar a solução de lavagem.

11. Repetir as etapas 9, 10.

12. Adicionar 100 µl de água à amostra, pipetar a mistura.

13. Aquecer a 80 ºC por 5 minutos.

14. Colocar amostras em um ímã, remover sobrenadante e guardar.

15. Ressuspender esferas em 100 µ l de água.

16. Medir radioatividade de cada fração com o uso de um contador de cintilação.

17. Analisar a quantidade de ligação de plano de fundo presente.

SELEÇÃO NEGATIVA

[00638] Conforme desejado, uma etapa de seleção negativa é adicionada antes de incubar a biblioteca de aptâmeros com as esferas conjugadas às microvesículas alvo (isto é, procedimento "Ligar conjunto de 2'F SUL1 RNA 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 micro-

vesícula", "amostras depletadas de microvesícula" ou similar). As etapas são:

1) Iniciar com o produto de biblioteca de aptâmero da rodada desejada 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:

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.

3) Incubar por 30 m a 37 ℃, agitar a 1.000 rpm.

4) Remover o sobrenadante e adicionar o mesmo às esferas de seleção positiva (diretamente), que são esferas revestidas com microvesícula lavadas.

[00639] Continuar com a incubação de seleção positiva. Consultar Ligar conjunto de 2'F SUL1 RNA a esferas magnéticas revestidas com microvesícula acima, início na etapa 2. As etapas adicionais através da transcrição são conforme detalhadas acima.

Exemplo 12: APTÂMEROS ADICIONAIS PARA MICROVESÍCULAS DERIVADAS DE CÂNCER DE MAMA (BrCa)

[00640] 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 usou as mesmas amostras e biblioteca de aptâmeros que no Exemplo 10 acima. O procedimento nesse Exemplo difere pelo fato de que a seleção negativa

foi realizada antes de cada seleção positiva iniciando após a terceira rodada da seleção positiva.

[00641] 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 BrCa+ conforme segue: (i) com o uso de microesferas conjugadas com o sobrenadante da etapa de ultracentrifugação de plasma BrCa+ (que não deve conter microvesículas); (ii) com o uso de microesferas conjugadas com o sobrenadante da etapa de ultracentrifugação de plasma BrCa- (que não deve conter microvesículas); (iii) o uso de microesferas conjugadas com microvesículas BrCa-. A seleção negativa pode também ser realizada nos candidatos de aptâmero selecionados contra as microvesículas BrCa- conforme segue: (i) com o uso de microesferas conjugadas com o sobrenadante da etapa de ultracentrifugação de plasma BrCa+ (que não deve conter microvesículas); (ii) com o uso de microesferas conjugadas com o sobrenadante da etapa de ultracentrifugação de plasma BrCa- (que não deve conter microvesículas); (iii) o uso de microesferas conjugadas com microvesículas BrCa+. As rodadas da seleção negativa são realizadas entre as rodadas da seleção positiva conforme descrito no presente documento.

[00642] As microvesículas foram isoladas do plasma de um conjunto de 60 pacientes com câncer de mama (BrCa+). As microvesículas foram isoladas de um 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).

[00643] A biblioteca de aptâmero usada consistiu em uma biblioteca de aptâmero de RNA 2'F SUL1. A sequência é 5'-GGGAGGACG AUGCGG-N40-CAGACGACUCGCUGAGGAUCCGAGA-3' (SEQ ID NO. 23). 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.

[00644] A biblioteca de aptâmero foi incubada ou com esferas conjugadas com microvesícula de controle ou câncer. Nove rodadas de seleção positiva para aptâmeros que ligam as microvesículas foram realizadas em paralelo para ambos os tipos de amostras. A seleção negativa contra as esferas conjugadas ao sobrenadante de plasma de entrada após a ultracentrifugação antes da seleção positiva nas rodadas 4 a 9. Consultar a Figura 11A "Seleção B" e Figuras 11D e 11E para esquemas de seleção positiva/negativa. Consulte o Exemplo 11 acima para o protocolo das etapas de seleção positiva e seleção negativa.

[00645] 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.

[00646] Os dados de sequenciamento foram analisados de acordo com o procedimento a seguir:

[00647] Etapa 1: As sequências foram classificadas de acordo com

as frequências no conjunto de aptâmeros inteiro recuperado na rodada 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.

[00648] Etapa 2: As alterações de dobra foram calculadas entre a amostra indicada 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.

[00649] Etapa 3: As sequências foram 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.

[00650] Etapa 4: As sequências mutantes possíveis (por exemplo, devido à PCR ou outros erros) foram removidas com base nos resultados da análise de consolidação.

[00651] Etapa 5: As sequências foram 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).

[00652] Os mesmos esquemas de seleção que nas etapas 1 a 5 foram realizados para os aptâmeros selecionados contra as esferas conjugadas a microvesículas de não câncer.

[00653] Várias sequências representativas obtidas a partir desses procedimentos são mostradas na Tabela 11. 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 11, as sequências são mostradas 5' a 3' da esquerda para a direita, em que cada sequência completa consiste na sequência 5' líder indicada se-

guida 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 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 microvesícula ou fragmentos funcionais do mesmo.

Tabela 11: SEQUÊNCIAS CANDIDATAS DE APTÂMERO DE MICROVESÍCULA BRCA

ID (Figura)	SEQ ID NO:	5'-Líder
BCE8 A Figura 10Ai)	24	GGGAGGACGAUGCGG
BCE9 A Figura 10Aii)	25	GGGAGGACGAUGCGG
BCE10 A Figura 10Aiii)	26	GGGAGGACGAUGCGG
BCE11 A Figura 10Aiv)	27	GGGAGGACGAUGCGG
BCE12 A Figura 10Av)	28	GGGAGGACGAUGCGG
BCE13 A Figura 10Avi)	29	GGGAGGACGAUGCGG
BCE14 A Figura 10Avii)	30	GGGAGGACGAUGCGG
BCE15 A Figura 10Aviii)	31	GGGAGGACGAUGCGG
BCE16 A Figura 10Aix)	32	GGGAGGACGAUGCGG
BCE17 A Figura 10Bi)	33	GGGAGGACGAUGCGG
BCE18 A Figura 10Bii)	34	GGGAGGACGAUGCGG
BCE19 A Figura 10Biii)	35	GGGAGGACGAUGCGG
BCE20 A Figura 10Biv)	36	GGGAGGACGAUGCGG

BCE21 A Figura 10Bv)	37	GGGAGGACGAUGCGG
BCE22 A Figura 10Bvi)	38	GGGAGGACGAUGCGG
BCE23 A Figura 10Bvii)	39	GGGAGGACGAUGCGG
BCE24 A Figura 10Bviii)	40	GGGAGGACGAUGCGG
BCE25 A Figura 10Bix)	41	GGGAGGACGAUGCGG
BCE26 A Figura 10Ci)	42	GGGAGGACGAUGCGG
BCE27 A Figura 10Cii)	43	GGGAGGACGAUGCGG

Tabela 11: (Continuação)

Sequência Variável	Cauda-3'
UACCGCCUCAUCAUCGGACACGACG UGUAUCAGUUGGCUG	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
GUUCUCGCCUCUGUCCUCAUGGUUC GAACCGGUAUGCAUG	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
GCGGUUUCUUCUCCUGACUACAUGA GAUUAAUAAACGCGC	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
CCGCCUCGAACACUGACGUCGUGGA ACCUUCGAUUGCUAG	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
AAUCACAGUAAUUCUGCCCCUCUGAU GAAACCGGUUACUU	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
CUUAGUGAUUUCGCCGCCCCUCUGU UUAGUGGCCAUUGGA	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
ACACUAUUCCGGUAAGUCAUCGUUU AACCGUUUGUUGCAA	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
UGCGCAACGCCUUGAUUCACUCCUA CAGUGUGUCUAUAGA	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
AAUGUUAAGCUUACAUACGCCUGGG UCACUCUUUGUUCUG	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
GUAAAUAUUCACGUUGAAUCGCCUU GCUCCUCUUAGUCUG	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA

CCGCCUCGGAUCGUUCCCAAUGGUG GUACCCCUAUUAAUG	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
UGUAGAUCGUUCUUAUCCGCCUCGG UCUUCCCCAGGUUAA	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
AUCGUCGGGCCCCUUUUAUGAAACU UACAUGAAAGCGCAC	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
UAAGAGUGCACAGUACUGCCUCGAU CCUCCAUGGCUUAAG	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
GAAUUAGUACUGACGGCCGCCUUGA UCCUCCGUUAGUCUG	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
GCCCGCCUCCGAAGCCCUCCUAAGU GCACUUUAAACCGCG	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
CCGCCUGGGAUCACUCUCUACGCG UAUAAAUGCUCUGUCA	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
AGUCUGACCCUGUUAUGGACUACCA UAUCAGAAAGGUACU	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
GGUGAUCCUCCCCCCCGCCUCGAAG AUUUGUGCACAUAUC	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA
GCUACCAUCGUCUAGUGAGUCACCC UUAGUUCAUCAAGGC	CAGACGACUCGCUGAGGAU CCGAGA

[00654] Cada sequência na Tabela 11 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. Os aptâmeros podem também ser sintetizados como a sequência de DNA que corresponde a cada sequência de RNA na Tabela 11. As bibliotecas de aptâmero podem também ser filtradas com base na sequência secundária prevista, energia livre e outros parâmetros conforme descrito no presente documento.

[00655] As Figuras 10A a C mostram a ligação dos aptâmeros na

Tabela 11 contra microesferas conjugadas a várias amostras de entrada. O aptâmero é indicado acima para cada gráfico, e o gráfico para cada aptâmero é indicado na coluna ID na Tabela 11. Consultar a Tabela 11. 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. Conforme mostrado nas Figuras 10A a C, os aptâmeros tiveram, cada um, 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 11 foram observadas como ligando-se mais abundantemente a microvesículas derivadas de câncer em comparação a microvesículas derivadas de não câncer com a exceção de BCE10 e BCE14, que foram observadas como ligando-se mais abundantemente a microvesículas derivadas de não câncer em comparação a microvesículas derivadas de câncer.

[00656] As SEQ ID NOs. 44 a 10527 compreendem uma listagem de sequências identificadas nesse Exemplo como ligação microesferas conjugadas a microvesículas isoladas de amostras de plasma de pacientes com câncer de mama, de preferência, em relação às outras amostras descritas nesse Exemplo (por exemplo, esferas conjugadas

a controles de sobrenadante ou microvesículas de não câncer). Essas sequências compreende a conjunção de sequências selecionadas na Etapa 2 descrita acima (isto é, selecionadas contra microesferas conjugadas a microvesículas de pacientes com câncer de mama assim como: (i) a mesma após a seleção negativa adicional contra o plasma de câncer depletado de microvesícula; (ii) a mesma após a seleção negativa adicional contra as microvesículas de não câncer; (iii) a mesma após a seleção adicional contra o plasma de não câncer depletado de microvesículas. As SEQ ID NOs. 44 a 10527 indicam as 40 regiões variáveis de nucleotídeo da biblioteca de partida com caudas 5' e 3' conforme descrito acima (consultar, por exemplo, a SEQ ID NO. 23 e Tabela 11). Esses aptâmeros podem ser usados para detectar microvesículas que são derivadas de células de câncer de mama ou de células de não câncer de mama. Em várias aplicações descritas no presente documento, os aptâmeros podem ser usados para diagnóstico, prognóstico ou teragnóstico de um câncer.

[00657] 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.

[00658] As bibliotecas de aptâmero nesse Exemplo são adicionalmente submetidos a quatro rodadas de seleção negativa e positiva adicional. Consultar a Figura 11G "SELEX C" para esquemas de seleção positiva/negativa. A seleção positiva é realizada conforme descrito

nesse Exemplo. As rodadas de seleção negativa são realizadas 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, as rodadas de seleção negativa são realizadas 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 13: DIAGNÓSTICO DE DOENÇA

[00659] Esse exemplo ilustra o uso dos aptâmeros da presente invenção para diagnosticar a doença proliferativa.

[00660] Uma quantidade adequada de um aptâmero que liga uma microvesícula derivada de BrCa, tal como identificada no Exemplo 10 ou no Exemplo 12, 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.

[00661] 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 mama. 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.

[00662] 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.

[00663] Os resultados mostram que os aptâmeros da presente in-

venção são úteis no diagnóstico de doenças proliferativas.

EXEMPLO 14: APTÂMEROS TERAPÊUTICOS

[00664] Esse exemplo ilustra o uso dos aptâmeros da presente invenção para tratar a doença proliferativa em um camundongo.

[00665] Uma quantidade adequada de um aptâmero que liga uma microvesícula derivada de BrCa, tal como identificada no Exemplo 10 ou no Exemplo 12, é sintetizada por meios químicos conhecidos na técnica. Os aptâmeros são conjugados com um agente quimioterapêutico, tal como Doxil, com o uso de um método de conjugação conhecido na técnica. O conjugado é formulado em uma composição aquosa.

[00666] A composição é administrada por via intravenosa, em uma ou mais doses a uma coorte de teste de camundongos que sofrem de uma doença proliferativa associada à superexpressão de microvesículas, por exemplo, um modelo de câncer de mama. 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.

[00667] A análise patológica de amostras de tumor e/ou sobrevida de camundongo indica que a mortalidade e/ou morbidez são melhoradas na coorte de teste em relação à coorte de controle.

[00668] Os resultados mostram que os aptâmeros da presente invenção são úteis no tratamento de doenças proliferativas.

[00669] Os aptâmeros úteis podem ser usados para tratar o câncer em outros organismos, por exemplo, um humano.

EXEMPLO 15: OLIGONUCLEOTÍDEO - MÉTODO DE DETECÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

[00670] Esse exemplo ilustra o uso de um conjunto de oligonucleotídeos para detectar as microvesículas que são indicativas de um fenótipo de interesse. O método faz uso de um conjunto de oligonucleotídeos 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 biblioteca de oligonucleotídeos para reconhecer, de preferência, uma entidade alvo.

[00671] 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 a outros tipos de entidade alvo (por exemplo, células, proteínas e vários outros complexos biológicos), amostra (por exemplo, tecido, cultura celular, biópsia e outros fluidos corporais) e outros fenótipos (outros cânceres, outras doenças, etc.) enriquecendo-se uma biblioteca de oligonucleotídeos contra as amostras de entrada desejadas.

Fluxo de trabalho geral:

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.

2) Expor a amostra pré-tratada a um conjunto de oligonucleotídeos que carrega determinada especificidade contra o alvo de interesse. Conforme descrito no presente documento, um conjunto de oligonucleotídeos 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 oligonucleotídeos de DNA ou RNA podem ser usados conforme desejado.

3) Contatar a biblioteca de oligonucleotídeos com a amostra.

4) Eluir quaisquer oligonucleotídeos ligados ao alvo.

5) Sequenciar os oligonucleotídeos eluídos. Os métodos de sequenciamento Next generation podem ser usados.

6) Analisar o perfil de oligonucleotídeos a partir do sequenciamento. Um perfil de oligonucleotídeos 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:

[00672] Várias configurações do ensaio podem ser realizadas. Abaixo estão quatro protocolos exemplificativos que servem para o propósito de ensaio de sequenciamento de oligonucleotídeos. As amostras podem ser qualquer amostra biológica.

Protocolo 1:

[00673] 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.

[00674] Medir a concentração de proteína total da amostra recuperada que contém as microvesículas isoladas.

[00675] Conjugar as microvesículas isoladas a esferas magnéticas (por exemplo, esferas MagPlex (Luminex Corp. Austin TX)).

[00676] Incubar as microvesículas conjugadas com o conjunto de oligonucleotídeos de interesse.

[00677] Lavar os oligonucleotídeos não ligados retendo as esferas com o uso do ímã.

[00678] Eluir os oligonucleotídeos ligados às microvesículas.

[00679] Amplificar e purificar os oligonucleotídeos eluídos.

[00680] Sequenciamento de oligonucleotídeo (por exemplo, métodos Next generation; Ion Torrent: PCR de fusão, PCR de emulsão, sequenciamento).

[00681] Avaliar o perfil de oligonucleotídeo.

Protocolo 2:

[00682] Esse protocolo alternativo não inclui uma etapa de isolamento de microvesícula, a conjugação de microvesículas com as esferas ou etapa de divisão separada. Isso pode apresentar a ligação não específica dos oligonucleotídeos contra a amostra de entrada.

[00683] Remover células/detritos da amostra de fluido corporal e diluir a amostra com PBS contendo $MgCl_2$ (2 mM).

[00684] Pré-misturar a amostra preparada acima com a biblioteca de oligonucleotídeos.

[00685] Ultracentrifugação da mistura de oligonucleotídeos/amostra (120K x g, sem sacarose). Lavar as microvesículas precipitadas.

[00686] Recuperar o precipitado e eluir os oligonucleotídeos ligados às microvesículas.

[00687] Amplificar e purificar os oligonucleotídeos eluídos.

[00688] Sequenciamento de oligonucleotídeo (por exemplo, métodos Next generation; Ion Torrent: PCR de fusão, PCR de emulsão, sequenciamento).

[00689] Avaliar o perfil de oligonucleotídeo.

Protocolo 3:

[00690] Esse protocolo usa a filtração em vez da ultracentrifugação e deve exigir menos tempo e volume de amostra.

[00691] Remover células/detritos da amostra de fluido corporal e diluir a mesma com PBS contendo $MgCl_2$ (2 mM).

[00692] Pré-misturar a amostra preparada acima com a biblioteca de oligonucleotídeos.

[00693] Carregar a amostra no filtro (isto é, filtro MWCO de 150K ou 300K ou qualquer outro que pode eliminar os oligonucleotídeos não ligados ou indesejados). Centrifugar a amostra para concentrar. A amostra concentrada deve conter microvesículas.

[00694] 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 acima para o volume original e transferir o concentrado para uma nova unidade de filtro e centrífuga. Repetir duas vezes.

[00695] Recuperar o concentrado e eluir os oligonucleotídeos ligados às microvesículas.

[00696] Amplificar e purificar os oligonucleotídeos eluídos.

[00697] Sequenciamento de oligonucleotídeo (por exemplo, métodos Next generation; Ion Torrent: PCR de fusão, PCR de emulsão, sequenciamento).

[00698] Avaliar o perfil de oligonucleotídeo.

Protocolo 4:

[00699] 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.

[00700] Pré-misturar as microvesículas com conjunto de oligonucleotídeos.

[00701] Carregar a amostra em um filtro MWCO de 300K, unir e centrifugar (2.000xg). A taxa de concentração é ~3x.

[00702] 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

[00703] Recuperar o concentrado e eluir os oligonucleotídeos ligados às microvesículas.

[00704] Amplificar e purificar os oligonucleotídeos eluídos.

[00705] Sequenciamento de oligonucleotídeo (por exemplo, métodos Next generation; Ion Torrent: PCR de fusão, PCR de emulsão, se-

quenciamento).

[00706] Avaliar o perfil de oligonucleotídeo.

[00707] Nas alterações dos protocolos acima, a precipitação de polímero é usada para isolar as microvesículas das amostras de paciente. Por exemplo, os oligonucleotídeos são adicionados à amostra e, então, PEG4000 ou PEG8000 a 4% ou 8% de concentração é usado para precipitar e, assim, isolar as microvesículas. A análise de eluição, recuperação e sequência continua conforme acima.

EXEMPLO 16: DETECÇÃO DE MICROVESÍCULA DERIVADA DE CÂNCER DE MAMA COM O USO DO SEQUENCIAMENTO DE OLIGONUCLEOTÍDEO

[00708] O método no Exemplo 15 acima é usado para detectar microvesículas em uma amostra de fluido corporal que são derivadas de células de câncer de mama. A biblioteca de oligonucleotídeos compreende um subconjunto de oligonucleotídeos descrito no Exemplo 12 acima que se liga, de preferência, às microvesículas de pacientes com câncer de mama versus indivíduos sem câncer. As sequências são listadas no presente documento como SEQ ID NOs. 24 a 10527. O método é usado para detectar a presença ou ausência de microvesículas que são indicativas de câncer de mama.

[00709] A amostra de teste compreende amostras de plasma que são coletadas de pacientes a serem submetidos a uma biópsia da mama. 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 de mama.

EXEMPLO 17: SELEÇÃO DE APTÂMERO PARA MICROVESÍCULAS

[00710] 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 moléculas não alvo (competidores) é minimizada. Entretanto, várias apli-

cações 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 mais 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.

[00711] 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 e vários 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.

[00712] Variante 1: seleção de aptâmero com base em microvesícula em competição com o plasma depletado das microvesículas. Fluxo de trabalho:

-> 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.

-> Capturar/conjugar as microvesículas isoladas com esferas magnéticas.

-> 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 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 rodada consiste em seleções negativas e positivas conforme desejado.

[00713] 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.

[00714] 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:

-> As microvesículas são isoladas de amostras de plasma de câncer e normais com o uso de ultracentrifugação.

-> Capturar/conjugar as microvesículas derivadas de câncer isoladas com esferas magnéticas.

-> Iniciar o processo de seleção e triagem de aptâmero com o uso de esferas conjugadas a 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.

[00715] 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.

[00716] 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:

-> As microvesículas são isoladas de amostras de plasma de câncer com o uso de ultracentrifugação.

-> Capturar/conjugar as microvesículas derivadas de câncer isoladas com esferas magnéticas.

-> Iniciar o processo de seleção e triagem de aptâmero com o uso de esferas conjugadas a 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.

[00717] Essa abordagem combina as vantagens das Variantes 1 e 2 acima. Cada rodada 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.

[00718] Variante 4: Seleção de aptâmero de Câncer/Normal paralela em esferas misturas. Fluxo de trabalho:

-> Capturar/conjugar as microvesículas derivadas de câncer com esferas magnéticas.

-> Capturar/conjugar as microvesículas normais (não câncer) com esferas não magnéticas

-> Misturar ambos os conjuntos de esferas e realizar o processo de seleção e avaliação de aptâmero com a biblioteca de aptâmero inicial

-> 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.

-> Lavar as esferas separadas magnéticas e não magnéticas separadamente.

-> Eluir e reamplificar os aptâmeros de ambos os tipos de esferas separadamente.

-> Rodada 2: misturar os conjuntos de aptâmeros amplificados de ambos os tipos de esferas e adicionar as esferas misturadas

-> Repetir a partir de cima

[00719] As vantagens potenciais 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 rodada; (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 18: IDENTIFICAÇÃO DE APTÂMEROS ADICIONAIS PARA MICROVESÍCULAS DERIVADAS DE CÂNCER DE MAMA (BrCa)

[00720] 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 usou as amostras similares, biblioteca de aptâmeros de partida e rodadas de seleção positiva e negativa como no Exemplo 12 acima. O procedimento nesse Exemplo difere-se na lógica de análise e fluxo de trabalho apresentados abaixo:

Lógica de Análise

[00721] Uma variante alternativa de análise de dados de sequenciamento versus está no Exemplo 12 foi aplicada aos dados da biblioteca de SUL1 RNA enriquecido de câncer/não câncer após 10 rodadas de seleção positiva e negativa (R10) sondada em exossomos de Câncer/Não Câncer e plasma depletado de microvesícula correspondente (consulte o Exemplo 12). As modificações específicas para analisar os dados de sequenciamento usados nesse Exemplo são conforme segue:

[00722] - A frequência do aptâmero particular foi usada em vez das contagens de leitura brutas que podem ser impactadas pela recuperação total e reamplificações. A normalização da contagem de leitura do aptâmero particular à contagem total (todo o comprimento de aptâmero com iniciadores corretos) leva em consideração a abundância relativa do aptâmero particular na população inteira que pode intensificar a consistência em todas as etapas entre a eluição do alvo e sequenciamento.

[00723] - Enriquecimento do aptâmero particular (frequência do aptâmero eluído a partir do alvo/frequência do mesmo aptâmero na biblioteca de entrada) usado pela primeira vez como um critério para a seleção de aptâmero, que permite a estimativa rápida da capacidade de ligação para todos os aptâmeros não levando em consideração a contagem. Nota, todas as estratégias de seleção de aptâmero aplicadas anteriormente estavam considerando os aptâmeros de maior frequência apenas.

[00724] - A alteração em vezes é usada para medir a diferença na ligação ao alvo versus não alvo. Aqui, as alterações em vezes são aplicadas apenas às frequências de aptâmeros que demonstraram enriquecimento.

[00725] - RNA versus DNA: já que a seleção foi feita com a mistura de dsDNA e RNA. Cada uma das formas de aptâmero pode ser um ligante. Para abordar isso, quatro amostras foram sondadas com uma biblioteca de aptâmero de dsDNA (precursor à seleção de rodada 10), e a frequência do aptâmero de RNA particular foi dividida pela frequência do mesmo aptâmero na versão de DNA.

Fluxo de trabalho de análise

[00726] 1) Calcular a frequência de cada aptâmero com iniciadores corretos no número total de leituras.

[00727] 2) Sobrepor as sequências recuperadas a partir da ligação a microvesículas de câncer com a biblioteca de entrada assim como com aquelas recuperadas a partir da ligação a outros três tipos de amostras (sobrenadante plasmática de câncer depletado de microvesículas, microvesículas de não câncer, sobrenadante de não câncer depletado de microvesículas) assim como aquelas recuperadas a partir da ligação de dsDNA.

[00728] 3) Calcular o "Enriquecimento" de aptâmeros particulares na biblioteca de RNA ligada a microvesículas de câncer em comparação à biblioteca de entrada. Considerar a diferença com base em três classes limite na frequência de aptâmero entre as poluções ligadas e de entrada: frequência 2 a 5 vezes, 5 a 10 vezes e mais do que 10 vezes mais alta em comparação à entrada.

[00729] 4) Calcular as "Alterações em vezes" dos aptâmeros particulares na biblioteca de RNA ligada a microvesículas de câncer em comparação às mesmas sequências na biblioteca ligada ao plasma de câncer depletado de microvesículas, microvesículas de não câncer e

plasma de não câncer depletado de microvesículas. Considerar as alterações em vezes iguais ou maiores do que 2.

[00730] 5) Calcular a diferença nas frequências de aptâmeros de RNA particulares em microvesículas de câncer em comparação ao enriquecimento dos aptâmeros de DNA correspondentes. Os aptâmeros que têm razões de frequências de RNA/dsDNA entre 0,5 e 1,5 podem ser microvesículas de ligação em ambas as versões dsDNA e RNA. Os aptâmeros que têm razões de frequências de RNA/dsDNA iguais ou excedendo 2 podem se ligar mais eficazmente coo aptâmeros de RNA.

[00731] 6) Filtrar os dados no "Enriquecimento" maiores do que 10, as alterações em vezes com três tipos de controle de amostras (sobrenadante de plasma de câncer depletado de microvesículas, microvesículas de não câncer, sobrenadante de não câncer depletado de microvesículas) são >=2. Isso fornece uma primeira lista de aptâmeros. Repetir a filtração no "Enriquecimento" na faixa de 5 a 10 e 2 a 5 irá gerar a segunda e a terceira listas de aptâmeros, consequentemente.

[00732] 7) Considerar a razão de RNA/dsDNA na lista final de aptâmeros para identificar qual versão de aptâmero (isto é, DNA ou RNA) pode ter ligação mais eficaz.

[00733] Várias sequências representativas obtidas a partir desses procedimentos são mostradas na Tabela 12. As sequências na tabela foram identificadas com o uso do fluxo de trabalho acima para ligar seletivamente as microvesículas isoladas do plasma de BrCa em comparação a outros componentes de plasma ou plasma de não câncer. 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 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 12 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 12: SEQUÊNCIAS CANDIDATAS DE APTÂMERO DE MICROVESÍCULA BRCA

ID	SEQ ID NO:	5'-Líder
BCE28_rna	10528	GGGAGGACGAUGCGG
BCE28_dna	10529	GGGAGGACGATGCGG
BCE29_rna	10530	GGGAGGACGAUGCGG
BCE29_dna	10531	GGGAGGACGATGCGG
BCE30_rna	10532	GGGAGGACGAUGCGG
BCE30_dna	10533	GGGAGGACGATGCGG
BCE31_rna	10534	GGGAGGACGAUGCGG
BCE31_dna	10535	GGGAGGACGATGCGG
BCE32_rna	10536	GGGAGGACGAUGCGG
BCE32_dna	10537	GGGAGGACGATGCGG
BCE33_rna	10538	GGGAGGACGAUGCGG
BCE33_dna	10539	GGGAGGACGATGCGG
BCE34_rna	10540	GGGAGGACGAUGCGG
BCE34_dna	10541	GGGAGGACGATGCGG
BCE35_rna	10542	GGGAGGACGAUGCGG
BCE35_dna	10543	GGGAGGACGATGCGG
BCE36_rna	10544	GGGAGGACGAUGCGG
BCE36_dna	10545	GGGAGGACGATGCGG
BCE37_rna	10546	GGGAGGACGAUGCGG
BCE37_dna	10547	GGGAGGACGATGCGG

BCE38_rna	10548	GGGAGGACGAUGCGG
BCE38_dna	10549	GGGAGGACGATGCGG
BCE39_rna	10550	GGGAGGACGAUGCGG
BCE39_dna	10551	GGGAGGACGATGCGG
BCE40_rna	10552	GGGAGGACGAUGCGG
BCE40_dna	10553	GGGAGGACGATGCGG
BCE41_rna	10554	GGGAGGACGAUGCGG
BCE41_dna	10555	GGGAGGACGATGCGG
BCE42_rna	10556	GGGAGGACGAUGCGG
BCE42_dna	10557	GGGAGGACGATGCGG

Tabela 12: (Continuação)

Sequência Variável	Cauda-3'
GCGGUUUUCUUCUCCUGACUACA UGAGAUUAAUAAACGCGC	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
GCGGTTTTCTTCTCCTGACTACAT GAGATTAATAAACGCGC	CAGACGACTCGCTGAGGATC CGAGA
CACUAUCCGUUUGUCCCGUCCUC UUGUGGUAUUGCGCAUGC	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
CACTATCCGTTTGTCCCGTCCTCT TGTGGTATTGCGCATGC	CAGACGACTCGCTGAGGATC CGAGA
CACUAUCCGUUUUGUCCCGUCCU CUUGUGGUAUUGCGCAUGC	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
CACTATCCGTTTTGTCCCGTCCTC TTGTGGTATTGCGCATGC	CAGACGACTCGCTGAGGATC CGAGA
AAACCGGGGCCCGCCUCAAGUC UAGCUACCUCCAUUGUCGUG	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
AAACCGGGGCCCGCCTCAAGTCT AGCTACCTCCATTGTCGTG	CAGACGACTCGCTGAGGATCC GAGA
AAAACCGGGGGCCCCGCCUCAAA GCUAGCUACCUCCAUUGUCUG	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA

AAAACCGGGGGCCCCGCCTCAAA GCTAGCTACCTCCATTGTCTG	CAGACGACTCGCTGAGGATC CGAGA
CGACCUAUCCGUUUGUCCGUCCU CUUGUGGUAUUGCGCAUGC	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
CGACCTATCCGTTTGTCCGTCCTC TTGTGGTATTGCGCATGC	CAGACGACTCGCTGAGGATCC GAGA
GUCCAUGGUACGCCUCGAUUUCC GCCCAUCACAUGCAUUGUAA	CAGACGACUCGCUGAGGAUC-CGAGA
GTCCATGGTACGCCTCGATTTCCG CCCATCACATGCATTGTAA	CAGACGACTCGCTGAGGATC CGAGA
AAACCGGGCCCGCCUCAAGUCUA GCUACCUCCAUUGUCGUG	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
AAACCGGGCCCGCCTCAAGTCTAG CTACCTCCATTGTCGTG	CAGACGACTCGCTGAGGATC CGAGA
AUGGUCCAUGAGUCUUCUCGGCA CUAUCCAGUUGACGCUCA	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
ATGGTCCATGAGTCTTCTCGGCAC TATCCAGTTGACGCTCA	CAGACGACTCGCTGAGGATCC GAGA
AAACCGGGGCCCGCCUCAAGCU UAGCUACCUCCAUUGUCCUG	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
AAACCGGGGCCCGCCTCAAGCTT AGCTACCTCCATTGTCCTG	CAGACGACTCGCTGAGGATC CGAGA
GACGGGUUUCCUUCUCCUGACUA CAUGAGAUUAAUAAACGCGC	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
GACGGGTTTCCTTCTCCTGACTAC ATGAGATTAATAAACGCGC	CAGACGACTCGCTGAGGATC CGAGA
CACUAUCCGUUUGUCCCGUCCUC UCGUGGUAUUGCGCAUGC	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
CACTATCCGTTTGTCCCGTCCTCT CGTGGTATTGCGCATGC	CAGACGACTCGCTGAGGATC CGAGA
CACUAUCCGUUUCGUCCGUCCUC UUGUGGUAUUGCGCAUGC	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA

CACTATCCGTTTCGTCCGTCCTCT TGTGGTATTGCGCATGC	CAGACGACTCGCTGAGGATC CGAGA
CACUAUCGUUUGUCCGUCCUCUU GUGGUAUUGCGCAUGC	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
CACTATCGTTTGTCCGTCCTCTTGT GGTATTGCGCATGC	CAGACGACTCGCTGAGGAT CCGAGA
UAUGGGGGCUUUUUAAGCACUUC UCGGUAAACUUGGGCAGUUAC	CAGACGACUCGCUGAGGAUC CGAGA
TATGGGGGCTTTTTAAGCACTTCT CGGTAAACTTGGGCAGTTAC	CAGACGACTCGCTGAGGATC CGAGA

[00734] Os aptâmeros na Tabela 12 foram identificados como tendo enriquecimento em comparação à biblioteca de entrada de pelo menos 10 vezes e pelo menos 5 vezes mais prevalente nos conjuntos de aptâmero selecionados contra microvesículas de câncer versus microvesículas de não câncer.

[00735] Cada sequência na Tabela 12 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. A sequência de DNA correspondente a cada sequência de RNA na Tabela 12 é fornecida na tabela, em que a sequência de DNA segue diretamente sua sequência de RNA correspondente. Por exemplo, uma SEQ ID NO. 10529 é a sequência de DNA correspondente à sequência de RNA de SEQ ID NO. 10528, etc. Conforme notado, ambas as formas dos aptâmeros são sintetizadas para caracterização adicional.

EXEMPLO 19: Geração de Biblioteca de Aptâmeros

[00736] Nesse Exemplo, uma biblioteca de aptâmeros com alta densidade é gerada com o uso de concentrações variadas de nucleo-

tídeos em vez de concentrações molares iguais típicas. Consultar a Figura 12. Fornecendo-se tais concentrações de nucleotídeo variadas, a biblioteca de sequências aleatória resultante compreende oligonucleotídeos que têm uma razão diferente entre A/T e G/C dependendo das concentrações particulares da entrada de nucleotídeos. Ademais, a biblioteca resultante fornece maior diversidade química e estrutural de moléculas de oligonucleotídeo com o benefício de fornecer parceiros de ligação mais potenciais para uma pluralidade de alvos que estaria presente em uma amostra de entrada de complexo (por exemplo, tecido ou componentes de tecido, células ou componentes de células, vesículas extracelulares, etc.). Tais bibliotecas aleatórias altamente diversas são usadas como uma entrada para enriquecer oligonucleotídeos que têm alta afinidade para alvos desejados presentes em uma amostra de entrada. Inesperadamente, os aptâmeros que exibem ligação diferencial às amostras de doença versus não doença (por exemplo, câncer versus não câncer) são revelados não disponíveis ao utilizar concentrações molares iguais padrão de nucleotídeos.

[00737] Conforme descrito no presente documento, uma biblioteca de entrada de aptâmeros de partida é processada através de diversas rodadas de seleção para enriquecer uma biblioteca de subconjuntos que fornece uma leitura diferencial, tal como através de sequenciamento. A própria biblioteca de entrada de partida pode compreender múltiplas bibliotecas de subconjuntos em que cada uma das bibliotecas de subconjuntos é gerada com o uso de uma concentração diferente de nucleotídeos G e C, a fim de gerar ácidos nucleicos com teor de GC final maior ou menor. Nesse aspecto da invenção, as concentrações variadas de nucleotídeos além de 25% cada (por exemplo, 12,5% cada A/T e 37,5% cada G/C, apenas como um exemplo) podem incluir concentrações crescentes/decrescentes de A/T em relação aos nucleotídeos G/C. Por exemplo, uma ou mais bibliotecas de sequên-

cias aleatórias são geradas, com o uso de uma concentração de nucleotídeo G e/ou C para uma biblioteca particular que está em qualquer lugar entre cerca de 5 a cerca de 95 por cento (incluindo qualquer unidade única de medição entre a faixa de 5 a 95) da concentração total de nucleotídeo. As concentrações de nucleotídeo exemplificativas, mas não limitantes são mostradas na Tabela 13.

Tabela 13: Porcentagens de nucleotídeo exemplificativas para geração de biblioteca de aptâmeros

A	T	C	G
5	5	45	45
10	10	40	40
15	15	35	35
20	20	30	30
25	25	25	25
30	30	20	20
35	35	15	15
40	40	10	10
45	45	5	5
5	5	5	85
10	10	10	70
15	15	15	55
20	20	20	40
25	25	25	25
30	30	30	10
5	5	85	5
10	10	70	10
15	15	55	15
20	20	40	20
25	25	25	25
30	30	10	30
5	85	5	5
10	70	10	10
15	55	15	15
20	40	20	20
25	25	25	25
30	10	30	30
85	5	5	5
70	10	10	10
55	15	15	15
40	20	20	20
25	25	25	25
10	30	30	30

[00738] Uma biblioteca de entrada de partida para a seleção de um ou um grupo de aptâmeros pode compreende pelo menos uma (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) biblioteca de subconjunto que tem diferente teor de nucleotídeo. Cada biblioteca de subconjunto pode compreender, por exemplo, 10^{12} diferentes oligonucleotídeos (para 1,7 pmol de biblioteca de 80 bases). Em um exemplo não limitante, uma biblioteca de entrada compreende três bibliotecas de subconjuntos, cada uma tendo um teor de GC de 25%, 50% e 75%, respectivamente. Com base nos ensinamentos do Requerente no presente documento, será aparente a um versado na técnica que tanto o número de bibliotecas de subconjuntos quanto o teor de GC de cada biblioteca de subconjuntos podem ser variados conforme revelado no presente documento para fornecer diferentes bibliotecas de entrada. Uma biblioteca de subconjuntos usada em uma biblioteca de entrada pode ser gerada com o uso de nucleotídeos que são menores, iguais ou maiores do que 50% de G e/ou C.

[00739] Portanto, a invenção fornece um método para gerar uma biblioteca de oligonucleotídeos de partida com alta diversidade. Tais bibliotecas fornecem avanço na avaliação de uma doença ou afecção com o uso de uma biblioteca de aptâmeros como a base para diferenciação entre duas amostras/estados. Isso é claramente distinguível a partir de técnicas convencionais para identificar aptâmero(s) que são específicas para um alvo conhecido ou desconhecido específico. Em várias modalidades, os nucleotídeos usados podem ser nucleotídeos naturais, nucleotídeos modificados, uso de nucleotídeos não naturais ou combinações dos mesmos. Tais espécies de nucleotídeos modificados ou não naturais são conhecidas.

EXEMPLO 20: biblioteca de sondas de oligonucleotídeos

[00740] Nesse Exemplo, o método de detecção de oligonucleotídeo (consultar, por exemplo, o Exemplo 15 acima) é aplicado para distin-

guir as amostras de paciente com câncer de mama das amostras biológicas normais (isto é, não câncer de mama conforme confirmado pela biópsia negativa). A biblioteca de oligonucleotídeos usada para detectar e/ou distinguir as amostras pode ser referida no presente documento como uma "biblioteca de sondas de oligonucleotídeos" ou "biblioteca de perfilagem de oligonucleotídeo". Uma biblioteca de oligonucleotídeos randomizada foi treinada contra microvesículas derivadas do sangue dos pacientes com câncer de mama e indivíduos normais (sem câncer). A abordagem descrita acima em relação à Figura 13D foi aplicada. Consultar a Figura 14A.

[00741] A biblioteca de oligonucleotídeos de entrada virgem consistiu em uma biblioteca de oligonucleotídeos de ssDNA fosforilados em 3' com a sequência a seguir: 5'-ATCCAGAGTGACGCAGCA-30n-TG GACACGGTGGCTTAGT-3' (SEQ ID NO. 10558), em que n compreende A, T, C, G, U ou outro nucleotídeo. Conforme mostrado, cada oligonucleotídeo tem 18 regiões de iniciador de nucleotídeo com uma região varável central de 30 nucleotídeos. A única modificação é o nucleotídeo fosforilado em 3' único. A seleção positiva foi realizada em que as amostras dos pacientes com câncer de mama foram colocadas em contato com a biblioteca de entrada não treinada. As microvesículas nas amostras foram coletadas por ultracentrifugação, e os oligos que foram retidos com as microvesículas foram eluídos e coletados. Essas etapas foram repetidas com o uso dos oligos retidos como a entrada para a próxima rodada de seleção. A biblioteca parcialmente treinada foi, então, submetida à seleção negativa colocando a biblioteca em contato com o plasma de paciente sem câncer. As microvesículas nas amostras foram coletadas por ultracentrifugação, e os oligos que ligam as microvesículas de não câncer foram descartados e aqueles encontrados no sobrenadante de ultracentrifugação (isto é, aqueles que não ligam as microvesículas de não câncer) foram retidos. A sele-

ção positiva contra microvesículas de pacientes com câncer foi realizada novamente com repetição. A biblioteca treinada foi processada para remover PCR e outros artefatos não específicos. Os oligos restantes compreenderam a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos que reconheceram, de preferência, as microvesículas derivadas de câncer. Esse mesmo processo foi repetido em inverso para identificar uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos treinada que reconheceu, de preferência, microvesículas derivadas de não câncer (isto é, seleção positiva contra amostras de não câncer e seleção negativa contra amostras de câncer). Uma biblioteca associada foi criada misturando-se metade de cada biblioteca em peso. Com o uso desse processo e determinando a composição de biblioteca por meio do sequenciamento Next generation (plataforma Illumina HiSeq), um conjunto de oligonucleotídeos de 1.395.706 sequências exclusivas foi criado. Dentre os mesmos, 843.729 sequências foram detectadas em uma única vez. As 500.000 sequências de ocorrência mais comum no conjunto de oligonucleotídeos classificadas na ordem de maior para menor ocorrência são incorporadas no presente documento nas SEQ ID NOs. 10559 a 510558.

[00742] O protocolo para testar as amostras com a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos é descrito abaixo no Exemplo 21. Resumidamente, as amostras de plasma foram colocadas em contato com a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos treinada. As microvesículas foram isoladas das amostras de plasma contatadas com o uso da ultracentrifugação. Os oligos que foram retidos com as microvesículas foram eluídos e sequenciados com o uso da metodologia de sequenciamento Next generation. A frequência de oligos retidos que ligam as microvesículas foi determinada.

[00743] A biblioteca de sondas de oligonucleotídeos desenvolvida com o uso da abordagem acima mostrou boa recuperação, sinal para

ruído e reprodutibilidade. A Figura 14B mostra uma plotagem do número de oligonucleotídeos que se ligam à amostra de entrada (isto é, microvesículas de plasma). Uma relação linear (r^2 = 0,99) foi observada entre a amostra de entrada (rotulada "Plasma") e o número de oligonucleotídeos ligados. Em contraste, poucos, se algum, oligonucleotídeos se ligam às amostras de controle que compreendem albumina sérica humana (rotulada "HSA") ou sobrenadante de plasma sem microvesículas (rotulado "SN"). A Figura 14C mostra que o método foi altamente reproduzível com múltiplas execuções de sequenciamento exibindo alta correlação. Nessa Figura, as microvesículas de uma única amostra foram sondadas a uma concentração de 1x e 2x. Uma relação linear foi observada com duas vezes mais oligos ligando a entrada 2x. Essa figura é uma de muitos tais exemplos. Uma relação linear similar foi observada ao comparar diferentes execuções de sequenciamento na mesma amostra ou preparação de ultracentrifugação diferente da mesma amostra de plasma. Em contraste, um grande espalhamento foi observado ao comparar os perfis de sequenciamento entre diferentes amostras de paciente. Assim, as diferenças entre as amostras de paciente foram significativamente maiores do que as fontes de variância técnica mostrando que esse método tem a capacidade de medir as diferenças no sistema biológico subjacente. A Figura 14D mostra a formação de uma curva padrão comparando-se a entrada real conhecida versus a saída medida. A inclusão de uma curva padrão com cada amostra permite a quantificação e a normalização absolutas entre as amostras.

[00744] Com importância, observou-se que a variância do método é uma função da profundidade de sequenciamento e, portanto, pode ser controlada pelo número de execuções de sequenciamento realizadas. A Figura 14E ilustra esse ponto. Os resultados foram obtidos pelo sequenciamento da biblioteca de sondas que liga as amostras de entra-

da. A figura mostra o coeficiente de variação (CV) plotado contra o número de oligonucleotídeos ligados detectados. Conforme visto, um maior número de oligonucleotídeos sequenciados permite a detecção de sequências com CV menor. Consequentemente, o ensaio é reproduzível na medida em que a variância pode ser controlada aumentando-se a quantidade ou dados de sequenciamento coletados. A Figura 14F revela a distribuição de oligonucleotídeos de alta frequência detectados. Os aptâmeros dentro da caixa indicam um subconjunto de oligos reproduzíveis (CV < 0,2). Esses oligos têm uso potencial como marcadores individuais.

[00745] Com base nos resultados nas Figuras 14B a 14F, a detecção da biblioteca de sondas de oligonucleotídeos treinada contra câncer de mama e amostras normais foi reproduzível com baixo ruído. Membros individuais da biblioteca de sondas de oligonucleotídeos foram identificados que mostraram a melhor separação de amostras de câncer de mama e normais. A Figura 14G mostra uma plotagem do perfil de sequenciamento (frequência versus contagem) da biblioteca de sondas de oligonucleotídeos enriquecidos para microvesículas de câncer de mama em plasma. Múltiplas subpopulações de marcadores foram observadas na plotagem. A Figura 14H mostra plotagens de quatro oligonucleotídeos individuais que mostraram diferenças entre pacientes com câncer de mama e controles negativos para biópsia. Esses oligonucleotídeos foram identificados como ligando, de preferência, as amostras de câncer. Múltiplos oligonucleotídeos individuais podem também ser combinados. A Figura 14I mostra plotagens da combinação de 20 oligonucleotídeos individuais que ligam, de preferência, as amostras de câncer. Conforme visto na plotagem, a separação completa foi observada entre os pacientes com câncer de mama e os controles negativos para biópsia. As sequências desses 20 oligonucleotídeos individuais são mostradas na Tabela 14. Similarmente, a

Figura 14J mostra os resultados obtidos por quatro oligonucleotídeos individuais representativos que ligam, de preferência, as amostras normais, e a Figura 14K mostra plotagens da combinação de 20 oligonucleotídeos individuais que ligam, de preferência, as normais. As sequências desses 20 oligonucleotídeos individuais são mostradas na Tabela 14. Como na Figura 14I, a separação completa foi observada entre os pacientes com câncer de mama e os controles negativos para biópsia.

Tabela 14: Uso de biblioteca de sondas de oligonucleotídeo para detectar câncer de mama

Detectar preferencialmente	Sequências (5'->3')	SEQ ID NO:
Microvesículas de câncer de mama	CGGGGCTGTTTGTCGGGACCTGGGTCCCTG	510559
	GTCTAGCACGCCCACCTCCAGGCAGGCTGA	510560
	CAGTGACATGTAAATTCAATGCCCTGCATA	510561
	TGATAATCGTTTGTTTGTAGCAAAGCGCAG	510562
	GGGGAACACGCATATTGAGTACAAATGATG	510563
	TCGTTGTAGGATATCGGCCCGCCGTACACA	510564
	GCCAATCCGCAGCATCGGAGGGCTAAGGAA	510565
	CTTGAGCGCTGGTCCCCGGTTCAGCATGAT	510566
	GGTACGTTTGATTTAACTACGGGTTATACT	510567
	AGAGTATATTCGGGACCAATAGTACGATGG	510568
	CGTACATCGGATTGCTCTAGAATGCAGAAT	510569
	GATTGTAACGCCAACCTTATATCCATTCAG	510570
	TAAAGCATGCTACAATTCACGCAGTAGTAA	510571
	TCCGATCGGTTGGTCACCGAGTGATTTCGA	510572
	GAAACGATCGCCTGTACAATTAGGTTAAGG	510573
	ATGCAGTTCTATACAATGCCAGTGGGATAG	510574
	CAAAAATGTCACGAGAAAAGGAAAGGTTGG	510575
	TAACCAGTGGGGGGATCTAAAAGATAAACG	510576
	GAATACCCGGCAGGGATGGTTGATACTCAG	510577
	ATCGGACGGAAGTAGCAGTTCACGCGTAAC	510578
Microvesículas de Não Câncer de Mama	TCCTGAATTGCCTCAGTCGAAAGGTCAGTC	510579
	AACTTAGCGCGAGTTGAAAAGACGGTTTAC	510580
	AATTGATACGATGAAATTCGGTCGGTTGCA	510581
	GGCGGGCAAAGGGGGTAATGAGTCCGAAGG	510582

	TAGCTACGTACGCATAGGATTTGAGCCGGT	510583
	TAGGGATGTGACCAAGGATTATCCAGGTGG	510584
	TCCGAAATCTCCTCCGCAATGGACGCGTCG	510585
	GGGCCTACGCCCTGTGACGATGCTCCCAAG	510586
	GGAGGGGTGTTAGTTCAGTGTTGAGAGTTT	510587
	TTGTAATAATGGTCCGCGGTGGAGTTTCGA	510588
	GGGTCGGTAAACCAGGGTGGTATCTGTAAA	510589
	GATGTTAAACTACTTCGTAAGAGTTGGTGA	510590
	AGCATGAGGGAGGATGGGTCGTGGGGGGCC	510591
	GACAGCTCACAATGAGACAGTATCAGCTAC	510592
	CATCCTTGAGTGAGATCGTCTGTCCCACTA	510593
	AGGTTTAGGAGGATGGCGGGAGTAGATTAG	510594
	AATTACGTGAGAATCCCGGTGACCCTAAGC	510595
	AACTTGCCTTCCGCAATGACAAATACATGT	510596
	CATTGTCGAGGCCACGTGCGGATAAATAGT	510597
	CGGACTCGAGGGGGAGGACATCGGAGGCAA	510598

[00746] Os resultados de qualquer número de oligonucleotídeos individuais podem ser combinados. Por exemplo, a Figura 14L mostra os resultados obtidos combinando-se 46 oligonucleotídeos individuais que ligam, de preferência, as amostras de câncer (C1-10) versus normal (NC1-9). Esses 46 oligonucleotídeos foram selecionados como mostrando uma alteração em vezes na frequência entre cânceres e normal de 2,2. Como acima, a sensibilidade e a especificidade observadas foram ambas 100% nessas amostras.

[00747] Esse Exemplo ilustra o desenvolvimento e o uso de uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos para distinguir amostras de plasma e câncer ou não câncer. Conforme mostrado acima, o método forneceu 100% de separação entre as amostras. Um versado na técnica apreciará que o método pode ser aplicado para distinguir outros tipos de entidades biológicas (por exemplo, células, complexos de proteína) e fenótipos (por exemplo, diferentes cânceres, diferentes doenças).

EXEMPLO 21: Biblioteca de Sondas de Oligonucleotídeos para Múlti-

plas Indicações

[00748] Nesse Exemplo, uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos conforme descrito acima no Exemplo 20 foi testada quanto à sua capacidade de distinguir entre múltiplos tipos de cânceres e outras doenças versus amostras normais (isto é, sem doenças). Para esse Exemplo, o plasma e o soro foram usados como amostras de entrada com base na disponibilidade de amostra.

[00749] A abordagem geral ao enriquecimento de biblioteca é conforme segue. A biblioteca virgem de partida foi baseada na SEQ ID NO. 10558 conforme descrito acima no Exemplo 20. Essa biblioteca compreende ~10^{12} representativos exclusivos (por exemplo, oligonucleotídeos de DNA de filamento único, ssDNA). Diversas etapas de enriquecimento positivo (ligação) assim como de contraenriquecimento (subtrativas) foram realizadas. Para o enriquecimento de oligonucleotídeos que se ligam a microvesículas de uma população de amostra específica (por exemplo, pacientes com câncer de mama nesse Exemplo), a biblioteca de partida foi misturada com um conjunto de plasma obtido a partir das amostras de paciente e incubada. Uma etapa de centrifugação é realizada para isolar as microvesículas na amostra. A ultracentrifugação ou precipitação de polímero (por exemplo, PEG4000, PEG8000) com centrifugação de baixa velocidade foi usada de modo bem-sucedido. Os oligonucleotídeos com afinidade e especificidade às microvesículas permanecem ligados durante a centrifugação enquanto que a ligação não específica é suprimida pela adição de competidores (por exemplo, DNA de esperma de salmão, tRNA, S1, CM-D, combinações dos mesmos ou similares). Os oligonucleotídeos de não ligação e os ligantes a proteínas não exossomais (tal como HSA) são removidos quando o sobrenadante é descartado. Os oligonucleotídeos ligados são recuperados (eluídos) do pélete de microvesícula ressuspenso. Para a depleção da biblioteca de ligantes a uma

segunda população de amostra (por exemplo, controle saudável tal como pacientes sem câncer), o conjunto de oligo recuperado é misturado com um conjunto de amostras da segunda população de amostra, e os ligantes às microvesículas nas amostras de controle são removidos descartando-se o pélete resultante da centrifugação. Em um segundo enriquecimento positivo, o sobrenadante (que compreende agora oligos que ligam a primeira população de amostra, mas não a segunda população de amostra) é misturado com as microvesículas isoladas de outra alíquota da primeira população de amostra, e os ligantes são recuperados representando uma biblioteca enriquecida de rodada única. Esse esquema pode ser repetido múltiplas vezes para enriquecer adicionalmente a biblioteca e reduzir sua complexidade. Em uma etapa final, a biblioteca é amplificada por PCR e invertida para ssDNA pela digestão de lambda exonuclease e limpa. O mesmo procedimento realizado para enriquecer ligantes para a segunda população (controle) em oposição à primeira população (câncer). Uma combinação das duas bibliotecas enriquecidas compreende ligantes a alvos característicos de ambas as populações de amostra, por exemplo, ligantes a marcadores de câncer regulados ascendente e descendentemente. A combinação de bibliotecas enriquecidas é, então, usada como a biblioteca de sondagem de oligonucleotídeo. O curso do enriquecimento (números de espécie e cópia contidos em uma biblioteca) é seguido por qPCR e sequenciamento de alto rendimento.

[00750] A biblioteca de sondas de oligonucleotídeos enriquecida foi testada contra amostras individuais como no Exemplo 20. O protocolo é descrito abaixo no Exemplo 22. Resumidamente, as amostras de plasma ou soro foram colocadas em contato com a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos treinada. As microvesículas foram isoladas das amostras contatadas com o uso da ultracentrifugação. Os oligos que foram retidos com as microvesículas foram eluídos e sequencia-

dos com o uso da metodologia de sequenciamento Next generation. A frequência de oligos retidos que ligam as microvesículas foi determinada. O método foi usado para distinguir soro ou plasma normal do soro ou plasma de uma variedade de indicações conforme indicado na Tabela 16. Os mapas de calor foram criados com o uso da análise de agrupamentos e são mostrados para as indicações nas Figuras 15A a AN. Os oligonucleotídeos foram selecionados como aqueles que têm $p < 0,1$ entre as condições e amostras normais e também como aparecendo pelo menos 100 vezes em todas as amostras (como uma medição de qualidade). Após essa filtração, 165 sequências permaneceram, conforme mostrado na Tabela 15. Nas plotagens nas Figuras 15A a AN, os oligonucleotídeos individuais são mostrados no eixo geométrico Y, e as amostras são mostradas no eixo geométrico X (normais são indicadas como tais). As sequências na Tabela 15 são regiões variáveis da biblioteca de entrada sem flanquear as regiões de iniciador de sequenciamento. A Tabela 16 indica as sequências da Tabela 15 que são mostradas nos mapas de calor correspondentes nas Figuras 15A a AN para as várias indicações.

Tabela 15: Seleção filtrada de biblioteca de sondas de oligonucleotídeo para detectar várias afecções

Sequência (5'->3')	SEQ ID NO:
AAAGAATCGCCAACCAACACGACCTGAGAG	510599
AAAGGCGATTGTATATCCAGGTGCCGCCAA	510600
AACGTAGATAACCAAAAGAGTGATACAAAG	510601
ACAACAACGAATACAATGCGTAAGAGTGCA	510602
ACACACCCGGAAGAGAGAGCGGAAACCGAA	510603
ACCCAAACAACAACCTTGGAATCCAGCAGA	510604
ACGACAGTATCTAAGAGAGAACCGAAGTAA	510605
ACGTCCACCGAAAAAACTCGCCACGGCAGA	510606
ACTCTAACCAGAGAGATCCAGCCAACCGAA	510607
AGAAACAATGCCACCCATCCAAACCAATAG	510608

AGACCACAACTCGACCCTTTCACAGAAGAG	510609
AGATCCCTAGCAATGAATGAAGTATCCAGG	510610
AGATCGTTGGTGCGACTTATCAGGGTGAAT	510611
AGCAAAGGAATCACAGAGTATAGGACCACA	510612
AGCCTGGCGCCCCGGGGAGGGTGAACCTGT	510613
AGCGCACCACGAAGACAACCACAATTAGCA	510614
AGGAAAGAAGAGGAGGTCCGACACACCAGG	510615
AGGAAGAACCAACAACTGAAACGTCTAGAG	510616
AGGCGTGAACTACACACAATGAGTGACTAA	510617
AGGGCACACCAAGATAGCGGTAACGTGAGT	510618
AGGGCCATCACATACAGCAACGAATTAGAG	510619
AGGGGCACAGTGAAAAACATGCTAACCAGG	510620
AGGTGTAGAAGTCAATCTGAGAATCCTAGA	510621
ATAACCAGAAGACAGGAAGAACGAGACGAG	510622
ATGCCCAGATAGCAGAGCACAACGGGAGGA	510623
ATGCCGAGAGACGCCGATCTGCGTGGTTGG	510624
ATTGAACAGAAACCACATGCCAATCCAGTG	510625
ATTGTATATCCCTGTTGGCATTACGCCAT	510626
ATTTAACGCAGTTTATCCGTTCACCTAACT	510627
CAAAAGGGTAACCAACAGAAATAGAGGACG	510628
CAAGTAGACCACACTGACACACCAGCAGAG	510629
CACACCCCAAGATCGATAAACGAGTAGCCA	510630
CACTAGAACTTCTCAGAGATCGTCGCCCAA	510631
CAGGGCGTGTATATGATGGTGTTGTATGGT	510632
CATAACAAGACTTCATTCTTTCGCTCCATT	510633
CATGCAATACAACCATCCTAACAGAACCAG	510634
CATTAAGAACAAACACAAGAAAAGAGGGCG	510635
CCAAAAAACAAGTCGAATATGTCACACAGA	510636
CCAACAAGACGCAAAAACAAAAGTACCAGA	510637
CCACACAACGCAACAGAGTGATCTAACGCG	510638
CCATCACGAAAAATAAGCGCAGAGAAAGCA	510639
CCATTAACCATTATCAGAGGACCGCGAATC	510640

CCCCCCTCTGTCTCTTGTTTCTCTTTTCTA	510641
CCCCTCTCGCTTTCTATTCCTTTGTGCCCT	510642
CCCGCCTGATCCAAA GTACTGACTCTGTTA	510643
CCGAAAACAGGAGCCAAAAGGGTAAGAGGA	510644
CCGAATCCAGACAGGAGCGAGCCCAACAGG	510645
CCGACACCAGAACTAGGAGCATCGAGCACA	510646
CCGGACGGAAGATAGGAGGAACAGCTGCAG	510647
CCGTAAAGGAGGGGGAGGATCCAGCGAATT	510648
CCTATCGAAAACCCCCCTCATCACA	510649
CCTTTTGTTGAAAATGAATCCGCTCTTTAT	510650
CGAACAAATCGATACAATACGGATCAAGGG	510651
CGACACAAACCAGTGGGAAAGCACTAAGCA	510652
CGACCAACCTACCACGAACACTCCCCTGGA	510653
CGAGCCGTCGGAGGGAAAAAGCTAAGGGAG	510654
CGAGGAAAGATCATGACTCCATACCAGATG	510655
CGAGGAACAACTCACAGATAGAAAAGGAGG	510656
CGATCAGCCGAGAAAGAAGGAAGAGTGGCA	510657
CGCAAGAAGAGGACGCATATAGTACTACCG	510658
CGCATTGCAAGAGGGAAAATACAGAGTGCC	510659
CGCCGTCAAAACAGGATGAACGTATAAGAG	510660
CGCGTTAGACCAGAGGACAAATAGCATGAA	510661
CGGGACATGCAGAAACCAGAGAGGAACGCG	510662
CGGGCACACAAGAAGCAAAGAGAGGATGCA	510663
CGGTAAGGAGGGTCACCGACGTCGCGCCGT	510664
CGTAATACATCACACCGAAACAAGGCCAGA	510665
CGTCACCAATCCCAGAACAAGGAAGCCTCG	510666
CGTCCCACAAAGAACACCTACCTGCCAAGA	510667
CGTCGGGCAATCGAGGAGGGGGAGTTCGCA	510668
CGTGCAGTAAATACCAGGAGTACCGCACAC	510669
CGTGTCAAGGAAGGTAACCAGGGAGACGAA	510670
CTAGAAAGAACCACCGAAGAGTTACGCGTG	510671
CTCGCAGTTACCGCCTTGTCATCCAAATCA	510672

CTCTTCTCTGCCCCCTGTTTTTCTATCTCT	510673
CTGGAACTATTACTATACTGATCTCTAAAT	510674
CTGGACAAACAGCGAAATGAAGAGGGATCG	510675
CTTATTTCTTTTATAAGTCGTTTACTCAGA	510676
CTTCTCTATCCAGATTGCCCCTTTATTCTT	510677
GATACTAGACCACCACGTGTCCATCACAAAAGAC	510678
GATACTAGACCACCACGTGTCCATCAGAAAAGAC	510679
GCAGAGTAATCGACCGTCTACCTTCCAGCG	510680
GCCACGAAGAAAGAGGGAATCAAGCAGAGA	510681
GCCAGAAGCGAACACACAACCAGATATGAG	510682
GCCCTATTCCCTCGCT TTCTCCCCTTTTGT	510683
GCCGAGGGATACCGGAAACAAAGGGAAGCA	510684
GCGGAAAATTTACCAGAGTGAGGATAACAA	510685
GCGGAACAAGCAGAAACCAGGAGTAGCACC	510686
GCGTCAATACCAGAGGGCGATAGTCGTTAG	510687
GGAGCGCCAAAATAAACGAATCCTCCATAG	510688
GGAGGAGAGGTAAGGAACACAACAGAACCA	510689
GGATGGCGTCGACAAACCTCAACTCCAGAA	510690
GGCAACGTCTACCGAAACAGAGGAGCACTA	510691
GGCACAACAACGAATAACTACGAAGATACG	510692
GGCATCAATAAACACGATCCCCGCAAGGAG	510693
GGCCAAAATGAACCAGAAAGCATCGAGCGA	510694
GGCGAAGGAAGGATAACAAGATTCGGGTGGA	510695
GGGAACGGGAACAATGAATAGGAAGCTGAG	510696
GGGAACGGTAGAATAACACTTAAGAACAGA	510697
GGGTGGGCGCGGGAGGAGGTGGGGGAGGGT	510698
GTACACCAAACACCGCATATCCGCGCCAGA	510699
GTAGTCAATGGGAAACAGAGTTACGATCGA	510700
GTGATGTATTTGCCTGTGTTTATCGCTTTT	510701
TACGTCTTTTTTCGCTTTTGATCATCTCTG	510702
TACTTATCCAGGAGGATAAGTCGATTACTA	510703
TACTTATCCCCTCATGATAAGTCGAGTACT	510704

TACTTATTCCATTAAATAAGTCGATTACTT	510705
TACTTATTCTTATAAGTCGAGTACTTCCCA	510706
TATTGAGTTGTGTATTCTTTTTGGTGCTCC	510707
TCAACAGAGGATGCAGTAATAAAGCCGCAA	510708
TCACACACCGGGATTCGGACCTACTACCTT	510709
TCACGCAAGAGGAGGAGGAGGGACACACGA	510710
TCATAAGACCGAGCCAGAAGCGTACCCGAG	510711
TCATATCTGTTGTGTTTTCCTCTTGTGTAT	510712
TCATTCAAACAGAGGGCATAGCACATTCGA	510713
TCCGTAAAAGAGAGTAGACGTCCAGACCCA	510714
TCCTTACACCATACCTATCTACAATTTACT	510715
TCGACCACCTTCAGAACTAACCGCACTGAG	510716
TCGATATATGGTCGGGTATTCGATATTT	510717
TCGGAACGTAATTCAGGACCAGAGCACGCA	510718
TCTATGCCGCAATGTTTCGAAACGTTGCTT	510719
TCTCATGAGTGTCTTTCAACCTCTCATTCT	510720
TCTTATCTGTTGTGTTTTCCTATTGTGTAT	510721
TCTTATCTGTTGTGTTTTCCTCTTGTGTAG	510722
TCTTATCTGTTGTGTTTTCCTCTTGTGTAT	510723
TCTTCACCGTTTATTCTAAGGATTTTTTTC	510724
TCTTTCGTCTTGTTATGTATTGCTGCGTCACTCT	510725
TCTTTCTTTTGTGTAGTCCTCTTTTCTTGT	510726
TGACCCCAACCATACCAACAACATCCATAG	510727
TGATCTGTTGTGTTTTCCTCTTGTGTAT	510728
TGATCTGTTGTGTTTTCCTTTGGGTTTTCT	510729
TGATGTGTAGGTTTACTCCCGTATAAA	510730
TGATGTGTAGGTTTACTCCTCTACCTTGCG	510731
TGCGCATAAAATAAGAAAAGAGGGGTGCAC	510732
TGGACAAGACCACCGAAAAAATAGCAGAGT	510733
TGGGAGGGTAGTGGTGGCGGTGGGGGAGGG	510734
TGTGCCTGTTTCCTTATTGTTGTGTTTTCC	510735
TGTTTTCCTTCTTACCTTTATGCTGCGTCACTCT	510736

TGTTTTCTCTTTCTACTCTTCCCCCCTCTG	510737
TTACGATAAGAAAATAAGGAAGATAACAGA	510738
TTACTTATTACTGAGAATAAGTCGTTTACT	510739
TTACTTATTCAAGGTATAAGTCGTTTACTG	510740
TTACTTATTCACCGTAATAAGTCGAGTACT	510741
TTACTTATTTTGTAATAAGTTGATTACTTG	510742
TTATGTGTAGGTTCACTCATATATTTCTTT	510743
TTATGTGTAGGTTTACTCCTCTACCTTGCG	510744
TTCCACTTTCCCTTCGTTGTATTCTCCTTT	510745
TTCCCTTGTTTCCTGTTGTGTTGTCCTCCT	510746
TTCCTTTTGTGTAGTCCTCTTCTCTTTACT	510747
TTGCGCTTTTGTGTAGGTTTACTCCCTTTT	510748
TTGTGTAGGTTTACTCCTCTACCTTGCG	510749
TTGTGTGTTTCTTTGCTGGGTGAATCCCTT	510750
TTGTTGTGTAGGTTTACTCCCGTATAAA	510751
TTGTTGTGTAGGTTTACTCCTCTACCTTGCG	510752
TTGTTGTGTTCTCTTTTTGTGTTTTCCTAG	510753
TTGTTGTGTTCTCTTTTTGTGTTTTCCTAT	510754
TTGTTGTGTTCTCTTTTTTTGTTTTCCTAT	510755
TTTCTATTCCCCCCTGCCCTTTTGTCTCGC	510756
TTTGTGTAGGTTTACTCCCGTATAAA	510757
TTTGTGTAGGTTTACTCCTCTACCTTGCG	510758
TTTGTTGTGTAGGTTCACTCATATATTTCTTT	510759
TTTGTTGTGTAGGTTTACTCCCGTATAAA	510760
TTTGTTGTGTAGGTTTACTCCCTTTT	510761
TTTGTTGTGTAGGTTTACTCCTCTACCTTGCG	510762
TTTGTTGTGTTCTCTTTTTGTGTTTTCCTAT	510763

Tabela 16: Uso de biblioteca de sondas de oligonucleotídeo para detectar várias afecções

Indicação	Tipo de amostra	Figura	SEQ ID NOs.
Doença de Alzheimer	Plasma	Figura 15A	510600, 510604, 510605, 510608, 510609, 510612, 510614, 510629, 510632, 510633, 510634, 510641, 510642, 510643, 510646, 510648, 510649, 510651, 510652, 510653, 510655, 510661, 510667, 510673, 510675, 510676, 510677, 510678, 510679, 510681, 510683, 510685, 510687, 510688, 510690, 510694, 510696, 510702, 510707, 510709, 510726, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510732, 510737, 510740, 510748, 510749, 510751, 510752, 510754, 510756, 510757, 510758, 510761, 510762
Doença de Alzheimer	Soro	Figura 15B	510599, 510601, 510603, 510606, 510608, 510609, 510611, 510613, 510614, 510615, 510619, 510621, 510625, 510628, 510629, 510630, 510632, 510634, 510635, 510636, 510637, 510644, 510647, 510648, 510651, 510652, 510654, 510657, 510665, 510666, 510667, 510668, 510677, 510678, 510679, 510687, 510692, 510693, 510696, 510698, 510699, 510701, 510702, 510707, 510708, 510710, 510713, 510716, 510725, 510726, 510728, 510731, 510732, 510733, 510734, 510736, 510741, 510748, 510749, 510755, 510757, 510758, 510761, 510762
Asma brônquica	Plasma	Figura 15C	510601, 510614, 510619, 510623, 510627, 510631, 510633, 510635, 510647, 510655, 510656, 510660, 510672, 510689, 510690, 510693, 510698, 510701, 510702, 510707, 510709, 510710, 510713, 510720, 510723, 510724, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510735, 510738, 510743, 510744, 510745, 510746, 510748, 510749, 510750, 510751, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761,

			510762
Asma brônquica	Soro	Figura 15D	510600, 510608, 510609, 510610, 510611, 510617, 510619, 510622, 510631, 510632, 510634, 510635, 510637, 510642, 510643, 510644, 510652, 510655, 510657, 510658, 510665, 510668, 510673, 510675, 510676, 510677, 510678, 510679, 510683, 510691, 510701, 510703, 510704, 510706, 510708, 510709, 510714, 510725, 510736, 510737, 510740, 510741, 510742, 510756
Carcinoma de célula transicional da bexiga	Plasma	Figura 15E	510607, 510619, 510623, 510631, 510632, 510635, 510641, 510642, 510647, 510656, 510657, 510658, 510659, 510673, 510674, 510683, 510686, 510693, 510695, 510701, 510702, 510707, 510708, 510711, 510716, 510722, 510725, 510726, 510728, 510731, 510734, 510737, 510744, 510748, 510749, 510751, 510752, 510753, 510756, 510757, 510758, 510761, 510762
Osteoblastoclastoma celular gigante	Soro	Figura 15F	510612, 510620, 510635, 510637, 510641, 510644, 510648, 510658, 510662, 510663, 510667, 510668, 510670, 510676, 510678, 510679, 510682, 510683, 510685, 510686, 510699, 510708, 510712, 510722, 510737, 510753
Tumor cerebral	Plasma	Figura 15G	510607, 510619, 510624, 510628, 510639, 510641, 510645, 510647, 510648, 510655, 510657, 510665, 510668, 510673, 510674, 510689, 510695, 510698, 510699, 510705, 510710, 510711, 510712, 510713, 510716, 510734, 510737, 510738, 510762
Adenocarcinoma colorretal	Plasma	Figura 15H	510603, 510607, 510611, 510616, 510618, 510619, 510623, 510624, 510641, 510644, 510646, 510647, 510655, 510656, 510672, 510673, 510690, 510693, 510695, 510698, 510701, 510702, 510709, 510711, 510714, 510716, 510719, 510723, 510724, 510725, 510726, 510730, 510731, 510734, 510735, 510737, 510738, 510743, 510744, 510748,

			510749, 510751, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510760, 510761, 510762, 510763
Doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD)	Plasma	Figura 15I	510604, 510608, 510609, 510612, 510614, 510616, 510619, 510620, 510629, 510634, 510637, 510640, 510647, 510649, 510653, 510661, 510666, 510667, 510669, 510673, 510678, 510682, 510689, 510690, 510701, 510707, 510715, 510723, 510727, 510728, 510749, 510754, 510755, 510757, 510758, 510762, 510763
Doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD)	Soro	Figura 15J	510601, 510609, 510611, 510613, 510620, 510634, 510637, 510647, 510648, 510654, 510664, 510668, 510679, 510694, 510696, 510698, 510699, 510701, 510705, 510706, 510710, 510718, 510734, 510741
Carcinoma de células escamosas da cérvice	Plasma	Figura 15K	510615, 510619, 510623, 510626, 510630, 510632, 510633, 510635, 510638, 510639, 510641, 510642, 510644, 510647, 510650, 510655, 510656, 510657, 510661, 510673, 510674, 510677, 510683, 510688, 510693, 510695, 510698, 510711, 510712, 510714, 510716, 510717, 510722, 510725, 510729, 510731, 510734, 510737, 510743, 510745, 510747, 510753, 510755, 510756, 510758, 510759, 510763
Infarto agudo do miocárdio (AMI)/insuficiência cardíaca aguda	Plasma	Figura 15L	510607, 510608, 510613, 510626, 510629, 510631, 510634, 510635, 510638, 510639, 510646, 510648, 510656, 510667, 510669, 510671, 510672, 510675, 510682, 510689, 510698, 510701, 510707, 510710, 510715, 510721, 510723, 510727, 510728, 510730, 510731, 510734, 510735, 510743, 510744, 510748, 510749, 510751, 510752, 510757, 510758, 510760, 510761, 510762
Infarto agudo do miocárdio (AMI)/insuficiência cardíaca aguda	Soro	Figura 15M	510599, 510601, 510606, 510607, 510608, 510609, 510611, 510614, 510616, 510619, 510622, 510624, 510626, 510635, 510636, 510637, 510640, 510641, 510643, 510644,

			510648, 510651, 510665, 510668, 510669, 510672, 510675, 510677, 510678, 510679, 510682, 510692, 510695, 510696, 510698, 510699, 510701, 510703, 510707, 510710, 510725, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510733, 510734, 510736, 510743, 510750, 510751, 510752, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761, 510762
Doença de Chron	Plasma	Figura 15N	510600, 510602, 510608, 510611, 510624, 510644, 510653, 510656, 510659, 510669, 510671, 510676, 510686, 510689, 510690, 510697, 510698, 510700, 510713, 510727, 510728, 510729, 510731, 510734, 510744, 510751, 510757
Doença de Chron	Soro	Figura 15O	510600, 510610, 510611, 510615, 510618, 510621, 510623, 510625, 510626, 510628, 510631, 510632, 510635, 510637, 510638, 510643, 510647, 510648, 510649, 510653, 510654, 510655, 510657, 510658, 510666, 510667, 510668, 510672, 510675, 510677, 510678, 510679, 510680, 510682, 510684, 510689, 510691, 510694, 510696, 510698, 510701, 510707, 510708, 510709, 510710, 510713, 510714, 510715, 510719, 510725, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510736, 510738, 510743, 510744, 510748, 510750, 510751, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761, 510762, 510763
Diabetes mellitus tipo II	Plasma	Figura 15P	510600, 510604, 510608, 510610, 510611, 510614, 510616, 510620, 510624, 510629, 510632, 510634, 510640, 510649, 510667, 510669, 510670, 510671, 510678, 510685, 510700, 510701, 510702, 510707, 510709, 510718, 510721, 510723, 510726, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510733, 510735, 510743, 510748, 510749, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510760, 510761, 510762, 510763

Diabetes mellitus tipo II	Soro	Figura 15Q	510613, 510632, 510635, 510636, 510641, 510645, 510647, 510648, 510654, 510660, 510664, 510667, 510668, 510670, 510675, 510684, 510691, 510695, 510696, 510706, 510710, 510734, 510749
Carcinoma do esôfago	Plasma	Figura 15R	510602, 510619, 510623, 510632, 510635, 510638, 510641, 510644, 510653, 510656, 510661, 510671, 510682, 510689, 510693, 510698, 510714, 510722, 510725, 510731, 510734, 510738, 510753, 510761
Carcinoma de células escamo-sas da laringe	Plasma	Figura 15S	510605, 510607, 510612, 510614, 510619, 510623, 510632, 510635, 510641, 510642, 510655, 510656, 510657, 510659, 510661, 510668, 510673, 510674, 510689, 510690, 510693, 510695, 510698, 510708, 510712, 510732, 510734, 510737, 510738, 510745, 510747, 510753, 510755
Leucemia aguda e crônica da medula óssea	Plasma	Figura 15T	510600, 510605, 510607, 510610, 510612, 510628, 510631, 510633, 510641, 510644, 510650, 510664, 510670, 510673, 510674, 510675, 510681, 510684, 510685, 510686, 510701, 510711, 510712, 510717, 510718, 510719, 510720, 510721, 510724, 510729, 510732, 510739, 510740, 510743, 510745, 510746, 510747, 510752, 510754, 510763
Carcinoma de pulmão	Plasma	Figura 15U	510604, 510626, 510628, 510631, 510633, 510635, 510649, 510650, 510654, 510668, 510672, 510674, 510677, 510699, 510701, 510702, 510710, 510712, 510715, 510717, 510719, 510720, 510721, 510723, 510724, 510726, 510727, 510733, 510735, 510738, 510743, 510744, 510745, 510746, 510747, 510750, 510751, 510754, 510755, 510758, 510760, 510763
Linfoma maligno	Plasma	Figura 15V	510601, 510611, 510618, 510623, 510624, 510631, 510632, 510636, 510638, 510641, 510644, 510645, 510647, 510656, 510660, 510662, 510672, 510673, 510675, 510690, 510693, 510701, 510702, 510707, 510708,

			510713, 510717, 510719, 510721, 510723, 510724, 510725, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510735, 510737, 510743, 510744, 510749, 510751, 510752, 510754, 510755, 510756, 510757, 510758, 510760, 510762, 510763
Esclerose Múltipla	Plasma	Figura 15W	510607, 510612, 510620, 510646, 510653, 510655, 510661, 510663, 510669, 510675, 510682, 510685, 510686, 510690, 510699, 510701, 510710, 510713, 510731, 510738, 510747, 510758, 510762
Esclerose Múltipla	Soro	Figura 15X	510599, 510604, 510609, 510610, 510613, 510617, 510618, 510622, 510632, 510635, 510647, 510670, 510675, 510677, 510687, 510690, 510692, 510695, 510701, 510706, 510708, 510731, 510733
Carcinoma de ovário	Plasma	Figura 15Y	510618, 510626, 510628, 510633, 510638, 510641, 510642, 510643, 510645, 510646, 510647, 510650, 510652, 510658, 510665, 510666, 510673, 510674, 510677, 510682, 510683, 510689, 510705, 510707, 510712, 510717, 510722, 510724, 510729, 510732, 510735, 510737, 510745, 510746, 510747, 510753, 510756
Doença de Parkinson	Plasma	Figura 15Z	510600, 510601, 510604, 510608, 510609, 510612, 510614, 510624, 510631, 510633, 510634, 510640, 510641, 510642, 510649, 510650, 510651, 510653, 510667, 510673, 510675, 510676, 510677, 510683, 510686, 510689, 510694, 510700, 510703, 510704, 510705, 510706, 510707, 510709, 510713, 510715, 510721, 510723, 510724, 510726, 510727, 510729, 510730, 510731, 510732, 510734, 510735, 510736, 510737, 510739, 510740, 510741, 510742, 510744, 510745, 510746, 510747, 510748, 510751, 510752, 510754, 510756, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761, 510762
Doença de	Soro	Figura 15AA	510601, 510606, 510608, 510609, 510610,

Parkinson			510614, 510616, 510632, 510634, 510643, 510644, 510647, 510648, 510654, 510662, 510664, 510665, 510667, 510668, 510670, 510677, 510678, 510679, 510687, 510692, 510696, 510698, 510699, 510701, 510703, 510704, 510706, 510708, 510710, 510722, 510727, 510734, 510736, 510741, 510742, 510753, 510756
Adenocarcinoma de próstata	Plasma	Figura 15AB	510600, 510603, 510607, 510619, 510623, 510624, 510628, 510641, 510642, 510644, 510647, 510650, 510655, 510656, 510657, 510669, 510673, 510674, 510677, 510684, 510688, 510689, 510690, 510695, 510698, 510701, 510709, 510710, 510718, 510726, 510734, 510737, 510738, 510739, 510757, 510762
Psoríase	Plasma	Figura 15AC	510600, 510601, 510608, 510609, 510611, 510614, 510620, 510624, 510626, 510631, 510633, 510634, 510635, 510638, 510647, 510649, 510650, 510653, 510656, 510665, 510666, 510667, 510669, 510672, 510674, 510675, 510680, 510685, 510689, 510698, 510702, 510707, 510711, 510712, 510715, 510717, 510719, 510720, 510721, 510723, 510724, 510726, 510727, 510728, 510729, 510730, 510731, 510734, 510735, 510743, 510744, 510745, 510746, 510747, 510748, 510749, 510750, 510751, 510752, 510754, 510755, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761, 510762, 510763
Psoríase	Soro	Figura 15AD	510600, 510601, 510604, 510613, 510621, 510627, 510637, 510641, 510644, 510648, 510650, 510652, 510663, 510667, 510668, 510676, 510680, 510681, 510699, 510701, 510703, 510705, 510709, 510710, 510722, 510734, 510739, 510750, 510753
Artrite reumatoide	Plasma	Figura 15AE	510599, 510603, 510604, 510607, 510608, 510609, 510614, 510616, 510622, 510625, 510627, 510629, 510630, 510634, 510635,

			510636, 510637, 510640, 510642, 510646, 510649, 510650, 510651, 510653, 510656, 510664, 510665, 510667, 510671, 510675, 510677, 510678, 510679, 510682, 510689, 510699, 510707, 510726, 510727, 510728, 510729, 510731, 510733, 510737, 510738, 510748, 510755, 510758, 510761, 510762
Artrite reumatoide	Soro	Figura 15AF	510599, 510601, 510603, 510604, 510606, 510607, 510608, 510609, 510610, 510611, 510612, 510613, 510614, 510616, 510617, 510618, 510622, 510623, 510625, 510629, 510630, 510634, 510635, 510636, 510637, 510638, 510639, 510640, 510641, 510643, 510644, 510645, 510646, 510648, 510649, 510651, 510652, 510653, 510654, 510658, 510662, 510663, 510664, 510665, 510666, 510667, 510668, 510669, 510671, 510673, 510677, 510678, 510679, 510682, 510685, 510692, 510696, 510697, 510698, 510699, 510701, 510703, 510710, 510716, 510722, 510725, 510726, 510727, 510730, 510733, 510734, 510738, 510741, 510743, 510753, 510755, 510757
Carcinoma de célula renal	Plasma	Figura 15AG	510600, 510603, 510604, 510606, 510608, 510614, 510616, 510622, 510628, 510629, 510630, 510632, 510634, 510635, 510640, 510644, 510645, 510646, 510652, 510653, 510656, 510664, 510665, 510666, 510667, 510671, 510675, 510677, 510683, 510685, 510687, 510690, 510701, 510722, 510726, 510728, 510729, 510730, 510731, 510732, 510733, 510734, 510738, 510748, 510749, 510752, 510753, 510758, 510761, 510762
Carcinoma de células escamo-sas de pele	Plasma	Figura 15AH	510618, 510622, 510626, 510639, 510641, 510642, 510650, 510658, 510673, 510674, 510683, 510696, 510708, 510712, 510717, 510720, 510722, 510723, 510724, 510727, 510729, 510743, 510745, 510746, 510747, 510752, 510753, 510754, 510755, 510756,

			510759, 510761, 510763
Adenocarcinoma do estômago	Plasma	Figura 15AI	510600, 510604, 510608, 510609, 510612, 510626, 510631, 510632, 510634, 510639, 510653, 510658, 510663, 510667, 510681, 510689, 510692, 510693, 510696, 510698, 510699, 510705, 510711, 510715, 510717, 510719, 510723, 510725, 510729, 510731, 510734, 510735, 510736, 510743, 510746, 510748, 510751, 510754, 510757, 510760, 510762, 510763
Carcinoma da glândula tireoide	Plasma	Figura 15AJ	510602, 510603, 510614, 510626, 510638, 510641, 510644, 510646, 510653, 510658, 510659, 510661, 510662, 510674, 510689, 510693, 510695, 510698, 510699, 510701, 510704, 510705, 510708, 510717, 510718, 510722, 510727, 510731, 510734, 510736, 510739, 510740, 510741, 510747, 510753, 510755
Câncer testicular	Plasma	Figura 15AK	510600, 510603, 510607, 510615, 510616, 510618, 510619, 510621, 510622, 510623, 510624, 510630, 510636, 510637, 510641, 510644, 510645, 510647, 510650, 510654, 510655, 510656, 510657, 510659, 510662, 510665, 510670, 510673, 510674, 510681, 510684, 510685, 510687, 510688, 510689, 510690, 510692, 510693, 510695, 510696, 510698, 510700, 510701, 510704, 510707, 510712, 510713, 510717, 510718, 510726, 510734, 510737, 510738, 510739, 510740, 510742, 510747, 510756, 510757
Colite ulcerativa	Plasma	Figura 15AL	510599, 510607, 510611, 510612, 510616, 510620, 510621, 510622, 510624, 510626, 510632, 510633, 510636, 510646, 510655, 510659, 510672, 510673, 510675, 510676, 510677, 510682, 510684, 510691, 510692, 510702, 510703, 510704, 510705, 510706, 510707, 510709, 510710, 510715, 510721, 510723, 510724, 510728, 510729, 510730, 510731, 510735, 510736, 510737, 510739,

			510740, 510741, 510743, 510744, 510748, 510751, 510752, 510754, 510757, 510758, 510759, 510760, 510761, 510762
Colite ulcerativa	Soro	Figura 15AM	510610, 510611, 510612, 510619, 510622, 510623, 510634, 510635, 510641, 510647, 510648, 510654, 510657, 510664, 510668, 510670, 510671, 510676, 510677, 510678, 510679, 510689, 510691, 510696, 510701, 510703, 510704, 510710, 510722, 510734, 510742, 510753
Adenocarcinoma uterino	Plasma	Figura 15AN	510601, 510612, 510621, 510626, 510637, 510641, 510644, 510650, 510653, 510669, 510675, 510684, 510686, 510687, 510696, 510714, 510717, 510722, 510739, 510743, 510745, 510746, 510753, 510755, 510762

[00751] Os dados nas Figuras 15A a AN mostram que a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos teve a capacidade de distinguir entre as amostras de doença e normais. Isso pode ser visto pelo agrupamento das amostras com doença nas figuras. Por exemplo, na Figura 15A, as amostras de Alzheimer são agrupadas à esquerda na plotagem enquanto que as amostras normais são agrupadas à direita. Resultados similares são mostrados na Figura 15H para câncer colorretal, na Figura 15L para doença cardiovascular e na Figura 15X para esclerose múltipla. Na Figura 15E, todas menos uma das amostras de câncer de bexiga foram encontradas em um agrupamento central. A Figura 15K é similar para câncer cervical. Um versado na técnica apreciará que a natureza universal da biblioteca de sondas de oligonucleotídeos pode ser intensificada treinando-se contra múltiplas amostras de entrada e combinando grupos de oligonucleotídeo resultantes.

[00752] Nesse Exemplo, a biblioteca de sondas de oligonucleotídeos treinada no cenário de câncer de mama foi usada como a sonda universal para distinguir amostras normais contra uma variedade de amostras com doença (por exemplo, câncer, autoimune, neurológica e

cardiovascular). Inesperadamente, a biblioteca foi eficazmente diferenciada, a maioria das amostras com doença das normais. Sem ater-se à teoria, é possível que essa abordagem funcione porque a biblioteca de oligonucleotídeos foi treinada contra diversas populações de microvesícula e contém ainda bastante diversidade.

EXEMPLO 22: Sondagem de fluido corporal com biblioteca de sondas de oligonucleotídeos

[00753] O protocolo a seguir é usado para sondar um fluido corporal tal como uma amostra de plasma ou soro com o uso de uma biblioteca de sondas de oligonucleotídeos, por exemplo, como nos Exemplos 15 e 20 e 21 acima.

Biblioteca de oligonucleotídeos de entrada:

[00754] Usar 2 ng de entrada da biblioteca de oligonucleotídeos por amostra.

[00755] A biblioteca de oligonucleotídeos de entrada é uma mistura de duas bibliotecas, enriquecidas com câncer e não câncer, a concentração é 16,3 ng/ul.

[00756] Diluir a 0,2 ng/ul de estoque de trabalho com o uso do Tampão de aptâmero ($MgCl_2$ a 3mM em 1X PBS)

[00757] Adicionar 10 ul do estoque de trabalho (igual a 2 ng de biblioteca) a cada tubo optiseal

Materiais:

[00758] PBS, Hyclone SH30256.01, LN: AYG165629, frasco nº 8237, exp. 7/2015

[00759] Tubos de Centrífuga de Fundo Redondo, Beckman 326820, LN:P91207

[00760] Tubos de Centrífuga OptiSeal e plugues, polialômero Konical, Beckman 361621, lote nº Z10804SCA

[00761] Rotor de ultracentrífuga: 50.4 TI

[00762] Rotor de ultracentrífuga: 50.4 TI, Beckman Caris ID nº 0478

Protocolo:

1 Pré-resfriar a centrífuga de mesa, ultracentrífuga, baldes e rotor a 4°C.

2 Degelar as amostras de plasma ou soro

3 Diluir 1 ml de amostras com 1:2 com Tampão de aptâmero ($MgCl_2$ a 3 mM em 1X PBS)

4 Girar a 2.000 xg, 30 min, 4° C para remover os d etritos (centrífuga de mesa)

5 Transferir os sobrenadantes para todas as amostras a uma cônica de fundo redondo

6 Girar a 12.000 xg, 45 min, 4° C em in ultracentr ífuga para remover os detritos adicionais.

7 Transferir o sobrenadante cerca de 1,8 ml para todas as amostras em tubos OptiSeal bell top novos (exclusivamente marcados).

8 Adicionar 2 ng (em 10 ul) de biblioteca de sondagem de DNA a cada tubo optiseal

9 QS a 4,5 ml com Tampão de aptâmero

10 Fixar as tampas nos tubos OptiSeal bell top

11 Aplicar Parafilme ao redor das tampas para impedir vazamentos

12 Incubar biblioteca de sondas de oligonucleotídeos e plasma por 1 hora à temperatura ambiente com rotação

13 Remover o parafilme (mas não as tampas)

14 Colocar o espaçador correto no topo de cada tubo tampado

15 Marcar a área de pélete nos tubos, garantir que essa marcação esteja voltada para fora do centro.

16 Girar os tubos a 120.000 x g, 2 h, 4° C (linha interna, 33.400 rpm) para peletizar as microvesículas.

17 Verificar que a marcação ainda está apontada para longe do centro.

18 Remover completamente o sobrenadante do pélete, coletando o líquido do lado oposto do marcador de pélete e com o uso de um tambor de seringa de 10 ml e agulha 21G2

19 Descartar o sobrenadante em um recipiente de refugo de risco biológico apropriado

20 Adicionar 1 ml de MgCl2 a 3 mM diluído com 1X PBS

21 Turbilhonar gentilmente, 1.600 rpm por 5 segundos e incubar 5 m à TA.

22 QS a ~4,5 ml com Mg Cl2 a 3 mM diluído com 1X PBS

23 Fixar as tampas nos tubos OptiSeal bell top.

24 Colocar o espaçador correto no topo de cada tubo tampado.

25 Marcar a área de pélete nos tubos, garantir que essa marcação esteja voltada para fora do centro.

26 Girar os tubos a 120.000 x g, 70 min, 4° C (lin ha interna, 33.400 rpm) para peletizar as microvesículas.

27 Verificar que a marcação ainda está apontada para longe do centro.

28 Remover completamente o sobrenadante do pélete, coletando o líquido do lado oposto do marcador de pélete e com o uso de um tambor de seringa de 10 ml e agulha 21G2

29 Descartar o sobrenadante em um recipiente de refugo de risco biológico apropriado

30 Adicionar 1 ml de MgCl2 a 3 mM diluído com 1X PBS

31 Turbilhonar gentilmente, 1.600 rpm por 5 segundos e incubar 5 m à TA.

32 QS a ~4,5 ml com Mg Cl2 a 3 mM diluído com 1X PBS

33 Fixar as tampas nos tubos OptiSeal bell top.

34 Colocar o espaçador correto no topo de cada tubo tampado.

35 Marcar a área de pélete nos tubos, garantir que essa marcação esteja voltada para fora do centro.

36 Girar os tubos a 120.000 x g, 70 min, 4° C (lin ha interna, 33.400 rpm) para peletizar as microvesículas.

37 Verificar que a marcação ainda está apontada para longe do centro.

38 Salvar uma alíquota do sobrenadante (100 ul em um tubo de 1,5 ml)

39 Remover completamente o sobrenadante do pélete, coletando o líquido do lado oposto do marcador de pélete e com o uso de um tambor de seringa de 10 ml e agulha 21G2

40 Adicionar 50 ul de água livre de Rnase ao lado do pélete

41 Deixar por 15 m de incubação no topo da bancada

42 Cortar os topos dos tubos com o uso de tesouras limpas.

43 Pélete ressuspenso, pipeta para cima e para baixo no lado de pélete

44 Medir o volume, tomar nota do volume a fim de normalizar todas as amostras

45 Transferir as microvesículas eluídas ressuspensas medidas com oligonucleotídeos ligados para um tubo Eppendorf de 1,5 ml livre de Rnase

46 Normalizar todas as amostras a 100 ul para manter a uniformidade através das amostras e entre os experimentos.

Preparação de Amostra de Sequenciamento Next generation:

I) Usar 50 ul da amostra acima, ressuspensa em 100 ul de H2O e contendo complexos de oligo/microvesícula, como o modelo

em Transpóson de PCR, 14 ciclos.

II) Produto de PCR de transpóson AMPure, usar a recuperação inteira para indexar a PCR, 10 ciclos.

III) Verificar a indexação do produto de PCR em gel, proceder com AMPure se a banda for visível. Adicionar 3 ciclos se a banda for invisível, verificar em gel. Após a purificação quantificar o produto com QuBit e proceder com a desnaturação e diluição para o carregamento em célula de fluxo HiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA).

IV) 5 amostras serão multiplexadas por uma célula de fluxo. 10 amostras por HiSeq.

Análise de Dados (por exemplo, como no Exemplo 21):

[00763] Todas as leituras de sequências da análise HiSeq que correspondem com ambas as sequências iniciadoras são comparadas entre si. As contagens para cada leitura de sequência exclusiva são calculadas e usadas como sinal para ligação. As contagens de sequência são normalizadas pelo número total de leituras de sequência para cada amostra. As contagens normalizadas para cada sequência exclusiva são comparadas para identificar os oligonucleotídeos que mostram um nível diferente de ligação às amostras entre uma condição de doença ao controle normal do mesmo tipo de amostra, isto é, soro e plasma. Apenas as sequências com contagens médias de todas as amostras maiores do que 100 são consideradas. Os dados de oligonucleotídeos dos aptâmeros com ligação diferencial são agrupados com o uso do agrupamento hierárquico e o grau de similaridade entre as amostras é mostrado nos mapas de calor e dendrogramas.

EXEMPLO 23: Projeto de aptâmero biblioteca otimizado para sequenciamento de alto rendimento

[00764] Na construção de biblioteca aptâmeros clássica, por exemplo, para propósitos de seleção tal como SELEX, cada membro da biblioteca compreende uma região de sequência de nucleotídeos variá-

vel inserida entre duas sequências de flanqueamento conservadas. Dentre vários usos, as regiões conservadas podem ser usadas como sítios de iniciação para a amplificação, tal como para a amplificação por PCR entre rodadas de seleção, sítios de iniciação para o sequenciamento e para hibridização. Os iniciadores diretos e inversos podem ser referidos no presente documento como os iniciadores finais esquerdo (5') e direito (3'). Na medida em que ambas as extremidades das sequências de biblioteca de aptâmero são idênticas, a biblioteca é considerada como sendo de baixa diversidade para propósitos de sequenciamento. Isso pode resultar na introdução de desvio na amplificação ou outros tais desvios. No caso de alguns métodos de sequenciamento de alto rendimento, por exemplo, para o sequenciamento Next generation com base em Illumina (NGS), as primeiras leituras de sequenciamento estabelecem agrupamentos na superfície da célula de fluxo após a amplificação clonal. Ter regiões de bases idênticas no começo de um membro de biblioteca torna mais difícil distinguir sinais fluorescentes e, correspondentemente, proceder com o sequenciamento. Illumina sugere várias soluções para sequenciar bibliotecas de baixa diversidade: (i) misturar a biblioteca que contém a amostra com 50% de genoma de PhiX de bacteriófago para introduzir diversidade; (ii) adiciona a amostra de controla a uma faixa diferente na mesma célula de fluxo; e (iii) alternar as bibliotecas dentro de uma amostra. As opções (i) e (ii) reduzem a saída de sequenciamento total pela metade e, assim, não são ideais. A opção (iii) mostra resultados variáveis: a mesma foi usada de modo bem-sucedido em um instrumento MiSeq NGS, mas não em um instrumento HiSeq NGS.

[00765] Esse Exemplo descreve um projeto de biblioteca de aptâmeros alternativo que permite o sequenciamento mais eficaz de bibliotecas de aptâmeros introduzindo-se diversidade à própria biblioteca. O projeto de biblioteca de aptâmeros nesse Exemplo aborda o seguinte:

1) sequenciamento de bibliotecas de aptâmeros em instrumentos de sequenciamento de alto rendimento sem picos na amostra de controle PhiX; 2) sequenciamento de bibliotecas de aptâmeros em instrumentos de sequenciamento de alto rendimento em capacidade máxima; e 3) sequenciamento de bibliotecas de aptâmeros em instrumentos de sequenciamento de alto rendimento com qualidade máxima. Como uma ilustração, esse método foi aplicado nesse Exemplo para facilitar o uso de um instrumento HiSeq em sua capacidade máxima. Embora esse Exemplo foque na plataforma HiSeq para propósitos ilustrativos, a abordagem pode ser usada em qualquer cenário apropriado, por exemplo, quando a diversidade de biblioteca de oligonucleotídeos pode apresentar um problema.

[00766] Uma biblioteca de oligonucleotídeos virgem (isto é, biblioteca candidata de aptâmeros) foi projetada de modo que o ponto de partida de sequenciamento desviasse da região externa conservada (iniciador) para a região variável. O iniciador esquerdo da biblioteca foi substituído por um adaptador de transpóson, que é complementar ao iniciador de sequenciamento. Inseridos entre o adaptador de transpóson e a região variável de 35 nucleotídeos estão 0, 1, 2 ou 3 nucleotídeos que servem para criar um deslocamento no projeto de biblioteca. A Figura 17A mostra o iniciador de braço direito da biblioteca de aptâmeros que segue a região variável (isto é, SEQ ID NO. 510768). Adicionalmente à intensificação de diversidade, uma única rodada de PCR pode ser usada para preparar uma amostra para NGS com essa abordagem (por exemplo, adicionando índices e adaptador para a hibridização à célula de fluxo). Isso leva a uma preparação de amostra mais eficaz e pode diminuir o número de mutantes potenciais gerados por PCR.

[00767] Essa alteração no projeto de biblioteca para incorporar o deslocamento e adaptador de transpóson melhorou a qualidade de

sequenciamento na região variável da biblioteca sequenciada. Comparar as Figuras 17C e D conforme discutido abaixo. Para melhorar adicionalmente a biblioteca, a sequência do iniciador esquerdo foi também projetada para reduzir sobreposições de sequência potenciais, por exemplo, conforme indicado pelas caixas na Figura 17A, que indicam 14 posições com nucleotídeos sobrepostos no projeto alternado com o uso da única sequência (SEQ ID NO. 510768) na figura. A sequência iniciadora reprojetada com projeto balanceado contém apenas cinco posições em que duas bases estão se sobrepondo. Consultar a Figura 17B (que mostra a SEQ ID NO. 510769).

[00768] As Figuras 17C a 17F ilustram a qualidade de sequenciamento refletida em %>Q30 por cada ciclo de sequenciamento HiSeq SBS. Q30 é equivalente à probabilidade de uma nomeação de base incorreta 1 em 1.000 vezes. A Figura 17C apresenta um exemplo de um sequenciamento de qualidade mais baixa de uma biblioteca de oligonucleotídeos com o projeto de partida em que o sequenciamento foi iniciado a partir da parte conservativa (idêntica) da biblioteca. Nenhum PhiX DNA foi adicionado à execução de sequenciamento. Embora a biblioteca tenha um projeto alternado, o software de nomeação de base teve dificuldade em nomear essas regiões.

[00769] A Figura 17D mostra um exemplo da qualidade de sequenciamento de uma biblioteca padrão em que um adaptador de transpóson foi incorporado na biblioteca como um iniciador de braço direito. Nesse caso, o sequenciamento está começando diretamente na região variável, resultando na qualidade de sequenciamento significativamente melhorada. Entretanto, uma vez que o sequenciamento alcança o iniciador de braço esquerdo, a qualidade cai.

[00770] A Figura 17E mostra um exemplo de qualidade de sequenciamento com a biblioteca após a introdução do projeto alternado da Figura 17A. Conforme visto na figura, a qualidade de sequenciamento

é melhorada em comparação ao projeto não alternado anterior. Entretanto, diversas bases no meio da região de iniciador são potencialmente nomeadas erroneamente.

[00771] Para o ajuste final da qualidade de sequenciamento, a sequência do iniciador de braço esquerdo foi rebalanceada conforme mostrado na Figura 17B. A Figura 17F mostra que, para a maioria das bases de pontuação Q30 inferiores na Figura 17E, a qualidade foi melhorada a cerca de 50%. Esse projeto melhorou a nomeação de base da sequência iniciadora e permitiu a correspondência mais eficaz ao padrão de biblioteca aptâmeros de partida.

[00772] A comparação dos gráficos na Figura 17C (original) e na Figura 17F (projeto otimizado) demonstra a melhora no projeto de biblioteca de aptâmeros e qualidade/saída de sequenciamento correspondentemente.

[00773] As vantagens adicionais do projeto de biblioteca de aptâmeros melhorado são demonstradas pela eficácia do enriquecimento de sequências de aptâmero contra alvos biológicos de interesse e pela possibilidade de gerenciar a biblioteca eficazmente com capacidade atual de sequenciamento de alto rendimento. As Figuras 17G a H mostram o projeto de biblioteca de aptâmeros clássico ("NP1m-30n"; Figura 17G) em comparação a um novo projeto de biblioteca balanceado de uma etapa ("F-TRin-35n-B"; Figura 17H) após o enriquecimento contra exossomos de plasma de câncer de mama. Conforme mostrado nessas figuras, o projeto melhorado permite um enriquecimento mais eficaz conforme demonstrado pela: (i) presença de população distinta com distribuição normal de número de espécie através das contagens de leitura diferentes; (ii) separação melhorada das espécies com contagens baixas do resto da biblioteca, o que permite excluir as sequências da análise na medida em que, mais provavelmente, as mesmas foram criadas por desvio por PCR ou durante as etapas de HiSeq

SBS; (iii) contagem de leitura média por espécie na população enriquecida está na faixa de 2.000 a 3.000 cópias, o que permite o rendimento de sequenciamento aumentado; e (iv) variabilidade técnica minimizada durante a sonda de espécimes biológicos.

[00774] A biblioteca de aptâmeros resultantes pode ser usada para desenvolver aptâmeros individuais ou biblioteca de sondas de oligonucleotídeos conforme descrito no presente documento, por exemplo, para desenvolver ensaios de diagnóstico.

[00775] 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 às modalidades da invenção descritas no presente documento podem ser empregadas na prática da invenção. Entende-se que as reivindicações a seguir definem o escopo da invenção e que os métodos e as estruturas dentro do escopo dessas reivindicações e seus equivalentes podem ser convertidos assim.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para caracterizar uma doença ou distúrbio, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) colocar uma amostra biológica de teste em contato com uma pluralidade de oligonucleotídeos, em que a pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos 20 sequências de oligonucleotídeos diferentes, e em que cada membro diferente da pluralidade de oligonucleotídeos compreende uma sequência que é pelo menos 90 por cento homóloga a qualquer uma das SEQ ID NOs. 510599 a 510763;

(b) detectar uma presença ou nível de complexos formados na etapa (a) entre a pluralidade de oligonucleotídeos e um alvo na amostra biológica de teste; e

(c) comparar a presença ou nível detectado na etapa (b) a um nível de referência de uma amostra biológica de controle, caracterizando, assim, a doença ou distúrbio.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a detecção na etapa (b) compreende realizar pelo menos um de sequenciamento, amplificação, e hibridização dos membros da pluralidade de oligonucleotídeos dentro dos complexos.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a detecção na etapa (b) compreende sequenciamento de alto rendimento.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica de teste e a amostra biológica de controle, cada uma, compreendem uma amostra de tecido, uma cultura celular, ou um fluido biológico, em que opcionalmente o fluido biológico compreende um fluido corporal.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o fluido corporal compreende sangue periférico, so-

ros, plasma, ascites, urina, fluido cerebrospinal (CSF), esputo, saliva, medula óssea, fluido sinovial, humor aquoso, fluido amniótico, cerume, leite materno, fluido de lavagem bronqueoalveolar, sêmen, fluido prostático, fluido de cowper ou fluido pré-ejaculatório, ejaculação feminina, suor, matéria fecal, lágrimas, fluido de cisto, fluido pleural e peritoneal, fluido pericardial, linfa, quimo, quilo, bílis, fluido intersticial, menstruação, pus, sebo, vômito, secreções vaginais, secreção mucosal, água de defecação, suco pancreático, fluidos de lavagem de cavidades sinusais, aspirações broncopulmonares, fluido da cavidade blastocística ou sangue do cordão umbilical.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o fluido corporal compreende sangue, soro ou plasma.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de que o fluido biológico compreende microvesículas, em que opcionalmente os complexos são formados entre o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos e pelo menos uma das microvesículas.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que as microvesículas são isoladas com o uso de pelo menos um dentre cromatografia, filtração, ultrafiltração, centrifugação, ultracentrifugação, citometria de fluxo, captura por afinidade (por exemplo, a uma superfície plana, coluna ou microesfera), precipitação de polímero, e uso de microfluidos.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a pelo menos um membro da pluralidade de oligonucleotídeos liga um polipeptídeo ou fragmento do mesmo, opcionalmente em que o polipeptídeo ou fragmento do mesmo é solúvel ou ligado à membrana, em que, opcionalmente, a membrana compreende uma membrana de microvesícula.

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 liga um antígeno de superfície de microvesícula.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio compreende câncer de mama, doença de Alzheimer, asma brônquica, carcinoma de célula transicional da bexiga, osteoblastoclastoma celular gigante, tumor cerebral, adenocarcinoma colorretal, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), carcinoma de células escamosas da cérvice, infarto agudo do miocárdio (AMI)/insuficiência cardíaca aguda, doença de Chron, diabetes mellitus tipo II, carcinoma de esôfago, carcinoma de células escamosas da laringe, leucemia aguda e crônica da medula óssea, carcinoma de pulmão, linfoma maligno, esclerose múltipla, carcinoma ovariano, doença de Parkinson, adenocarcinoma de próstata, psoríase, artrite reumatoide, carcinoma de células renais, carcinoma de células escamosas da pele, adenocarcinoma do estômago, carcinoma da glândula tireoide, câncer de testículo, colite ulcerativa ou adenocarcinoma uterino.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio compreende um câncer, uma afecção pré-maligna, uma doença inflamatória, uma doença imunológica, uma doença ou distúrbio autoimune, uma doença ou distúrbio cardiovascular, doença ou distúrbio neurológico, doença infecciosa ou dor.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que pelo menos um membro da pluralidade de oligonucleotídeos compreende pelo menos uma modificação funcional.

14. Kit caracterizado pelo fato de que compreende pelo

menos um reagente para executar o método, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que o pelo menos um reagente compreende a pluralidade de oligonucleotídeos.

15. Kit, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um reagente compreende ainda pelo menos um dentre:

a) um reagente configurado para isolar uma microvesícula, em que opcionalmente o pelo menos um reagente configurado para isolar uma microvesícula compreende um agente de ligação para um antígeno de microvesícula, uma coluna, um substrato, uma unidade de filtração, um polímero, polietilenoglicol, PEG4000, PEG8000, uma partícula ou uma microesfera;

b) pelo menos um oligonucleotídeo configurado para atuar como um iniciador ou sonda a fim de amplificar, sequenciar, hibridizar ou detectar o oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos; e

c) um reagente configurado para remover uma ou mais proteínas abundantes da amostra biológica de teste, em que, opcionalmente, as uma ou mais proteínas abundantes compreendem pelo menos uma dentre albumina, imunoglobulina, fibrinogênio e fibrina.

16. Composição caracterizada pelo fato de que compreende uma biblioteca de oligonucleotídeos de entrada para avaliar uma amostra de vesícula celular ou extracelular que compreende pelo menos duas bibliotecas de oligonucleotídeos de subconjunto para gerar a biblioteca de oligonucleotídeos de entrada, em que pelo menos uma das pelo menos duas bibliotecas de oligonucleotídeos de subconjunto é fabricada com quantidades de nucleotídeos com um teor total de G e C que não é igual a 50%.

17. Composição, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o teor total de G e C é menor que 50%, em que o teor total de G e C é maior que 50%, em que pelo menos uma

biblioteca de subconjunto é fabricada com um teor total de G e C que é maior que 50% e outra biblioteca de subconjunto é fabricada com um teor total de G e C menor que 50%, em que as pelo menos duas bibliotecas de subconjunto compreendem três bibliotecas de subconjunto fabricadas com 25%, 50% e 75% de teor de G e C, respectivamente, ou em que as pelo menos duas bibliotecas de subconjunto são fabricadas com quantidades de nucleotídeos similares ou iguais a pelo menos duas linhas na Tabela 13.

18. Composição, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que os nucleotídeos consistem em nucleotídeos de ocorrência natural, em que os nucleotídeos compreendem nucleotídeos de ocorrência natural modificados, e/ou em que os nucleotídeos compreendem nucleotídeos de ocorrência não natural.

19. Método para gerar uma biblioteca de entrada, como definida em qualquer uma das reivindicações 16 a 18, caracterizado pelo fato de que compreende colocar em contato as pelo menos duas bibliotecas de subconjunto para gerar a biblioteca de entrada.

20. Oligonucleotídeo caracterizado pelo fato de que tem uma sequência que compreende uma região de adaptador de transpóson 5', uma região de deslocamento que compreende 0 ou mais nucleotídeos localizados em 5' para a região de adaptador de transpóson, uma região variável localizada em 5' para a região de deslocamento, e uma região de iniciador de esquerda localizada em 5' para a região variável.

21. Pluralidade de oligonucleotídeos caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 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, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000,

100.000, 200.000, 300.000, 400.000, 500.000, 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 oligonucleotídeos diferentes, em que cada uma das sequências de oligonucleotídeos compreende uma região de adaptador de transpóson 5', uma região de deslocamento que compreende 0 ou mais nucleotídeos localizados em 5' para a região de adaptador de transpóson, uma região variável localizada em 5' para a região de deslocamento, e uma região de iniciador de esquerda localizada em 5' para a região variável.

22. Oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 e 21, caracterizado pelo fato de que:

(a) a região de adaptador de transpóson compreende de 20 a 40 nucleotídeos;

(b) a região de deslocamento compreende 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos;

(c) a região variável compreende de 20 a 50 nucleotídeos; e/ou

(d) a região de iniciador esquerda compreende de 20 a 40 nucleotídeos.

23. Oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22, caracterizado pelo fato de que:

(a) a região de adaptador de transpóson compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga à sequência 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG (SEQ ID NO. 510764);

(b) a região de deslocamento compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos que são pelo menos cerca de 50, 55, 60, 65,

70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homólogos a pelo menos uma das seguintes sequências: 5'-T (SEQ ID NO. 510765), 5'-CT (SEQ ID NO. 510766) e 5'-ACT (SEQ ID NO. 510767);

(c) a região variável compreende 15,1 6, 17, 18, 19, 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 ou 50 nucleotídeos;

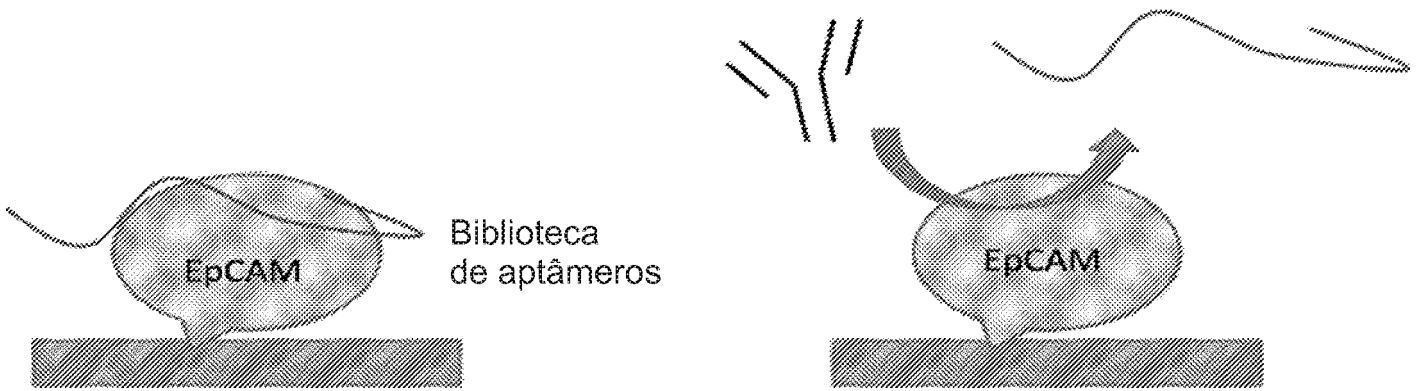
(d) a região variável compreende uma biblioteca de oligonucleotídeos de entrada, como definido em qualquer uma das reivindicações 16 a 18; e/ou

(e) a região de iniciador esquerda compreende uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos cerca de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 por cento homóloga a uma sequência selecionada dentre as SEQ ID NOs. 510768 e 510769.

24. Método para identificar um aptâmero caracterizado pelo fato de que compreende realizar um processo de seleção SELEX com o uso de um oligonucleotídeo ou pluralidade de oligonucleotídeos, como definido em qualquer uma das reivindicações 20 a 23.

Petição 870160014920, de 20/04/2016, pág. 484/595

Estratégia de seleção



Rodada única de ligação com lavagem extensiva "Rnd1 direta"

Rodada adicional de ligação, lavagem e deslocamento competitivo com anticorpo anti-EpCAM "Rnd2 competitiva"

FIG. 1

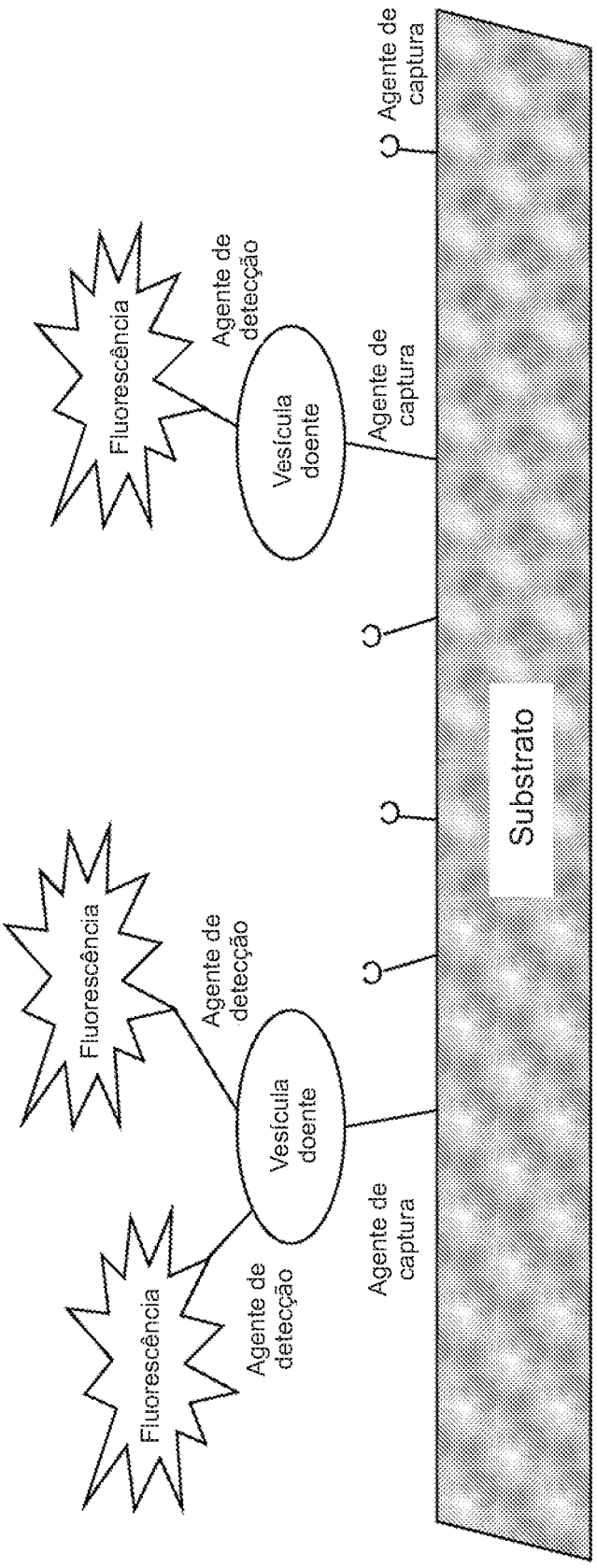

Agente de captura
Agente de captura
Agente de captura
Agente de captura
Substrato
Vesícula doente
Vesícula doente
Agente de detecção
Agente de detecção
Agente de detecção
Fluorescência
Fluorescência
Fluorescência

FIG. 2A

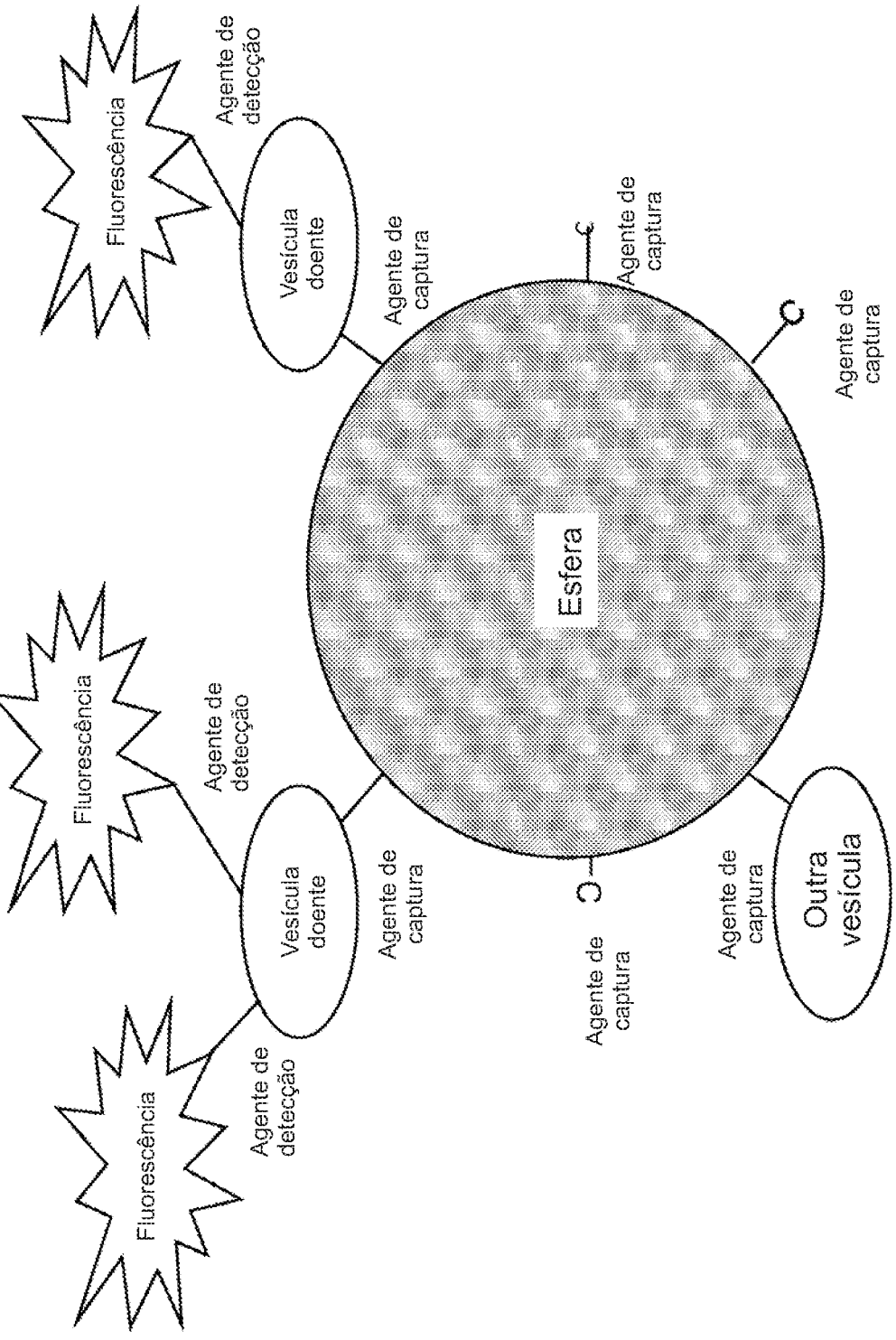

Fluorescência
Agente de detecção
Vesícula doente
Agente de captura
Agente de captura
Agente de captura
Esfera
Agente de captura
Agente de captura
Outra vesícula
Fluorescência
Agente de detecção
Vesícula doente
Agente de captura
Fluorescência
Agente de detecção

FIG. 2B

Petição 870160014920, de 20/04/2016, pág. 487/595

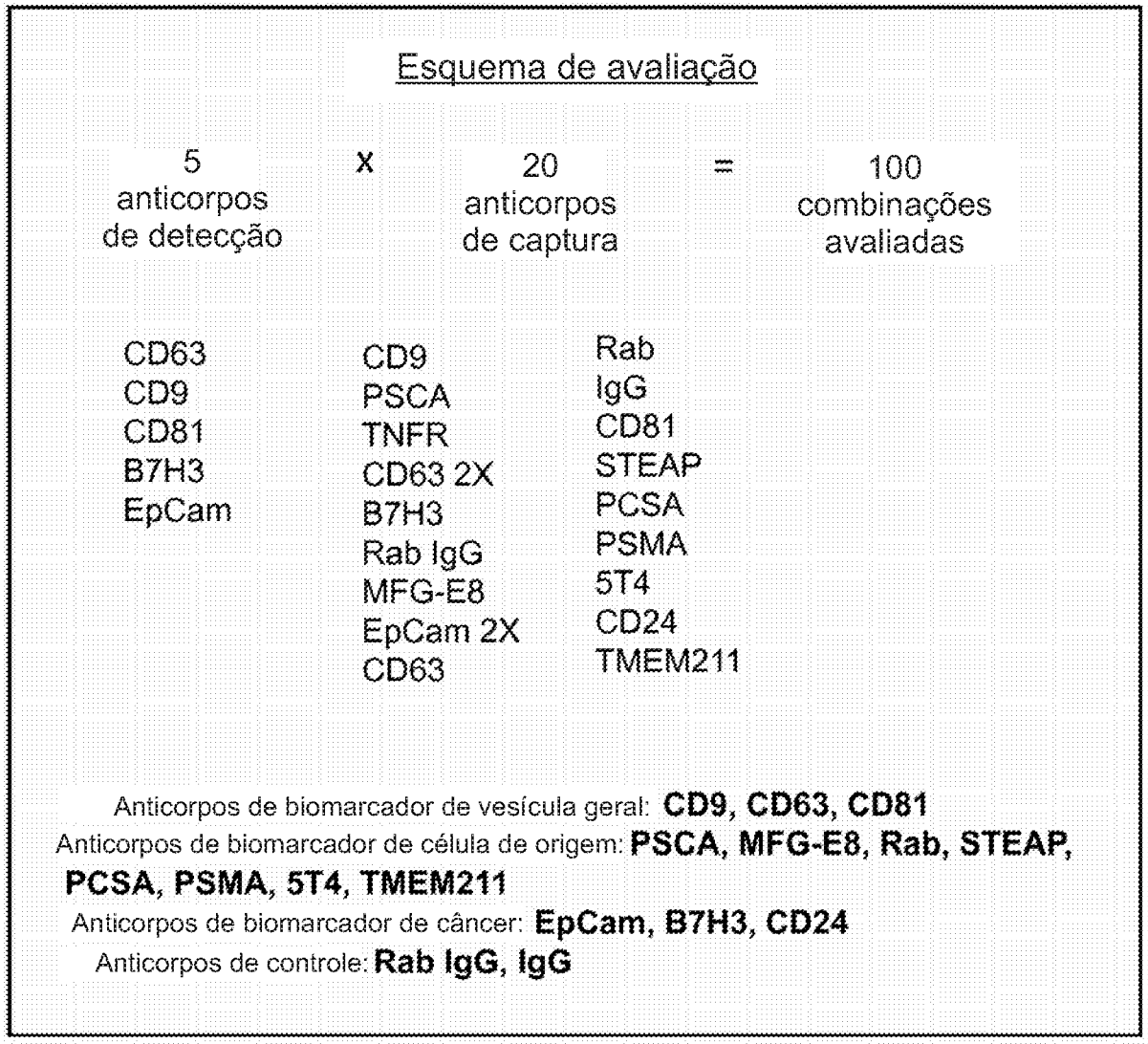


FIG. 2C

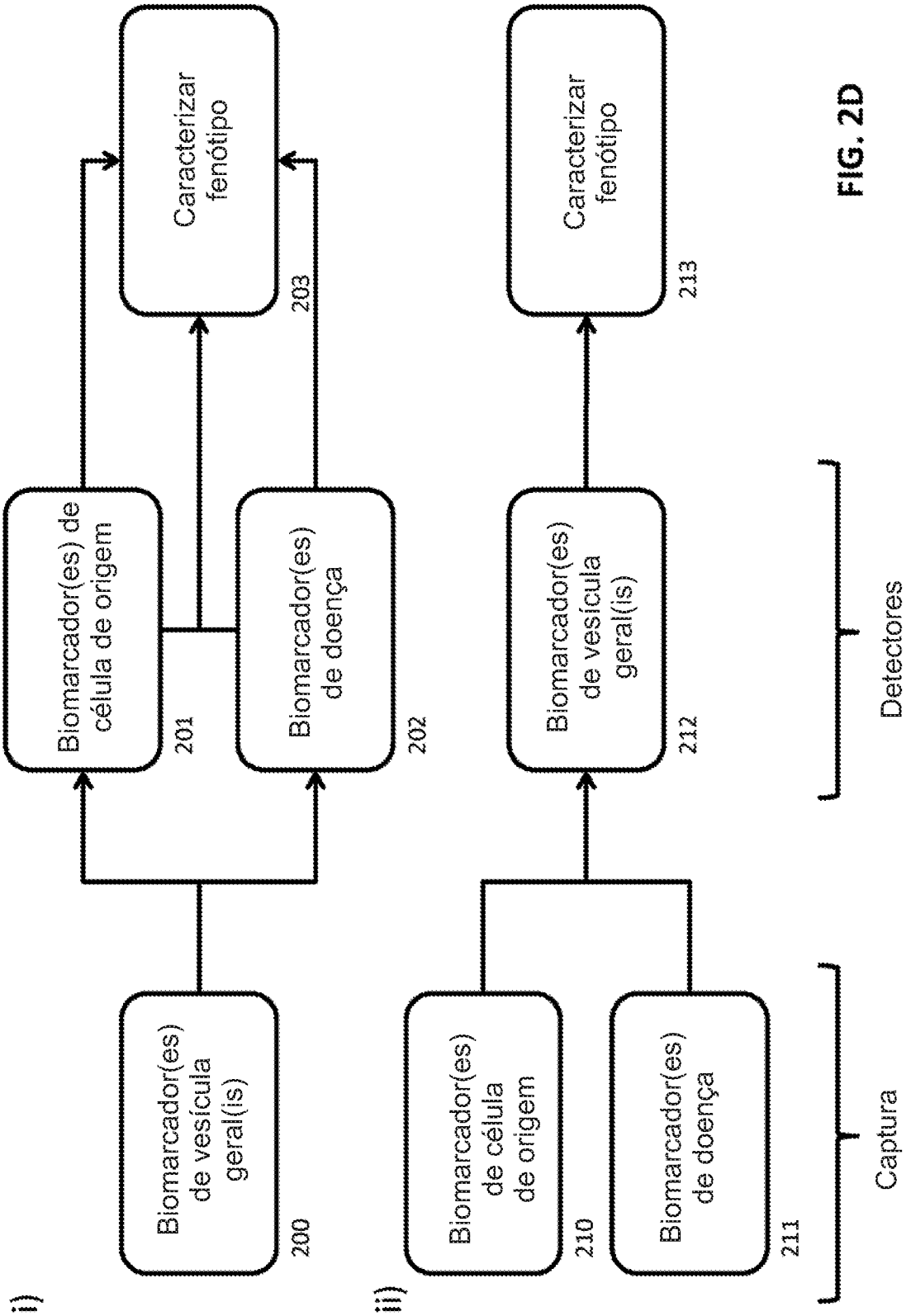

i)
Biomarcador(es) de vesícula geral(is)
200
Biomarcador(es) de célula de origem
201
Biomarcador(es) de doença
202
203
Caracterizar fenótipo
ii)
Biomarcador(es) de célula de origem
210
Biomarcador(es) de doença
211
Biomarcador(es) de vesícula geral(is)
212
Caracterizar fenótipo
213
Captura
Detectores

FIG. 2D

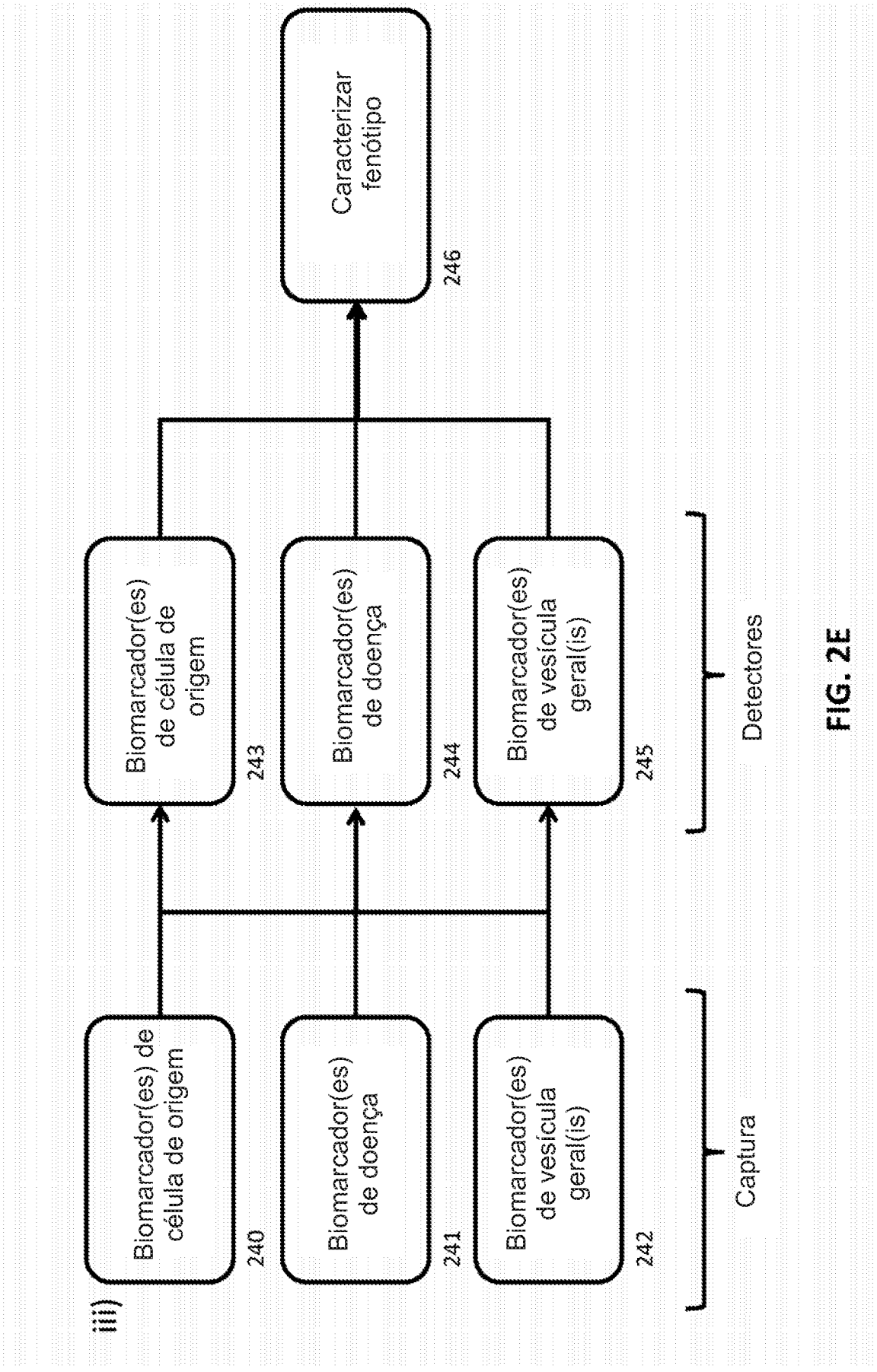

iii)
Biomarcador(es) de célula de origem
240
Biomarcador(es) de doença
241
Biomarcador(es) de vesícula geral(is)
242
Captura
Biomarcador(es) de célula de origem
243
Biomarcador(es) de doença
244
Biomarcador(es) de vesícula geral(is)
245
Detectores
Caracterizar fenótipo
246

FIG. 2E

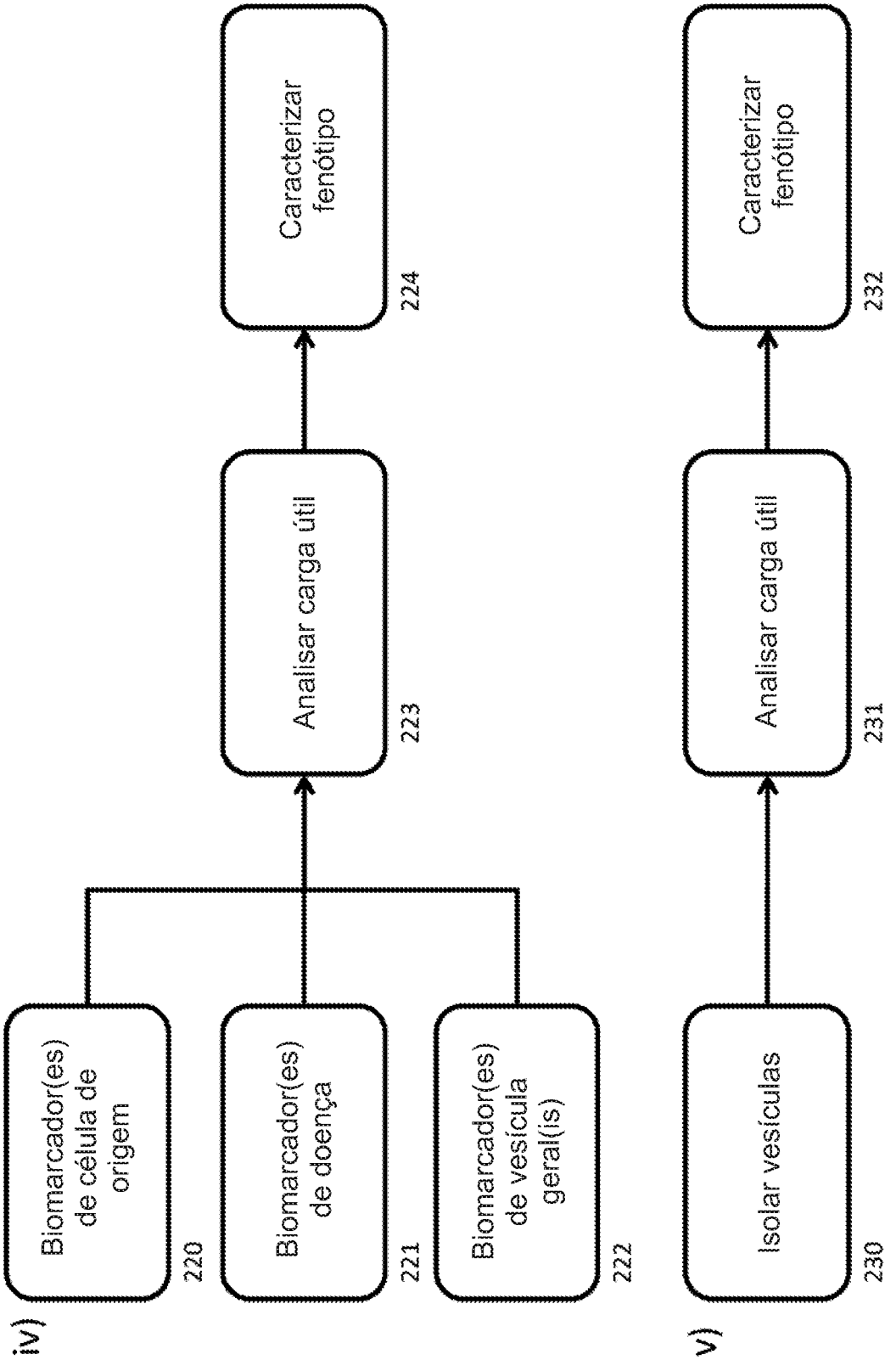
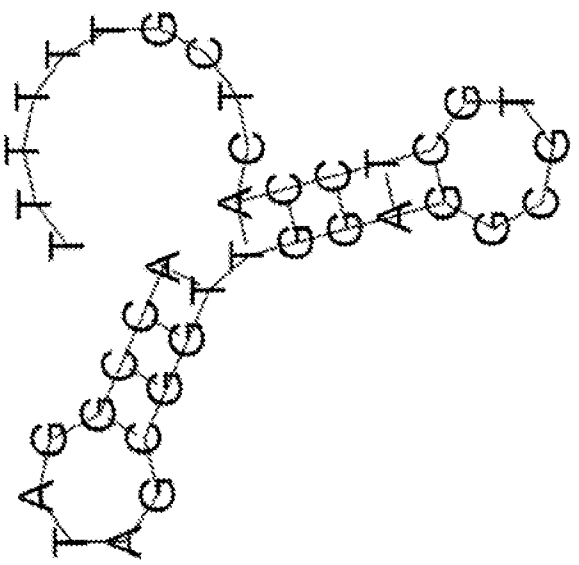
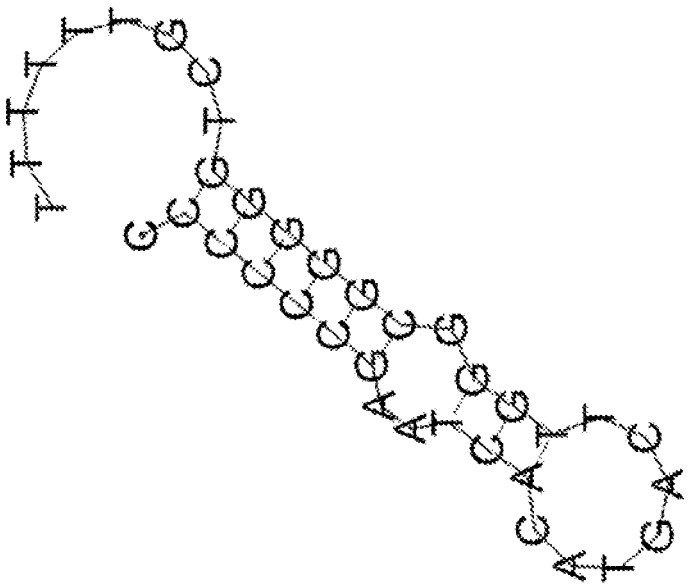

iv)
Biomarcador(es) de célula de origem
220
Biomarcador(es) de doença
221
Biomarcador(es) de vesícula geral(is)
222
Analisar carga útil
223
Caracterizar fenótipo
224
v)
Isolar vesículas
230
Analisar carga útil
231
Caracterizar fenótipo
232

FIG. 2F



SEQ ID NO. 3840

FIG. 3B



SEQ ID NO. 1

FIG. 3A

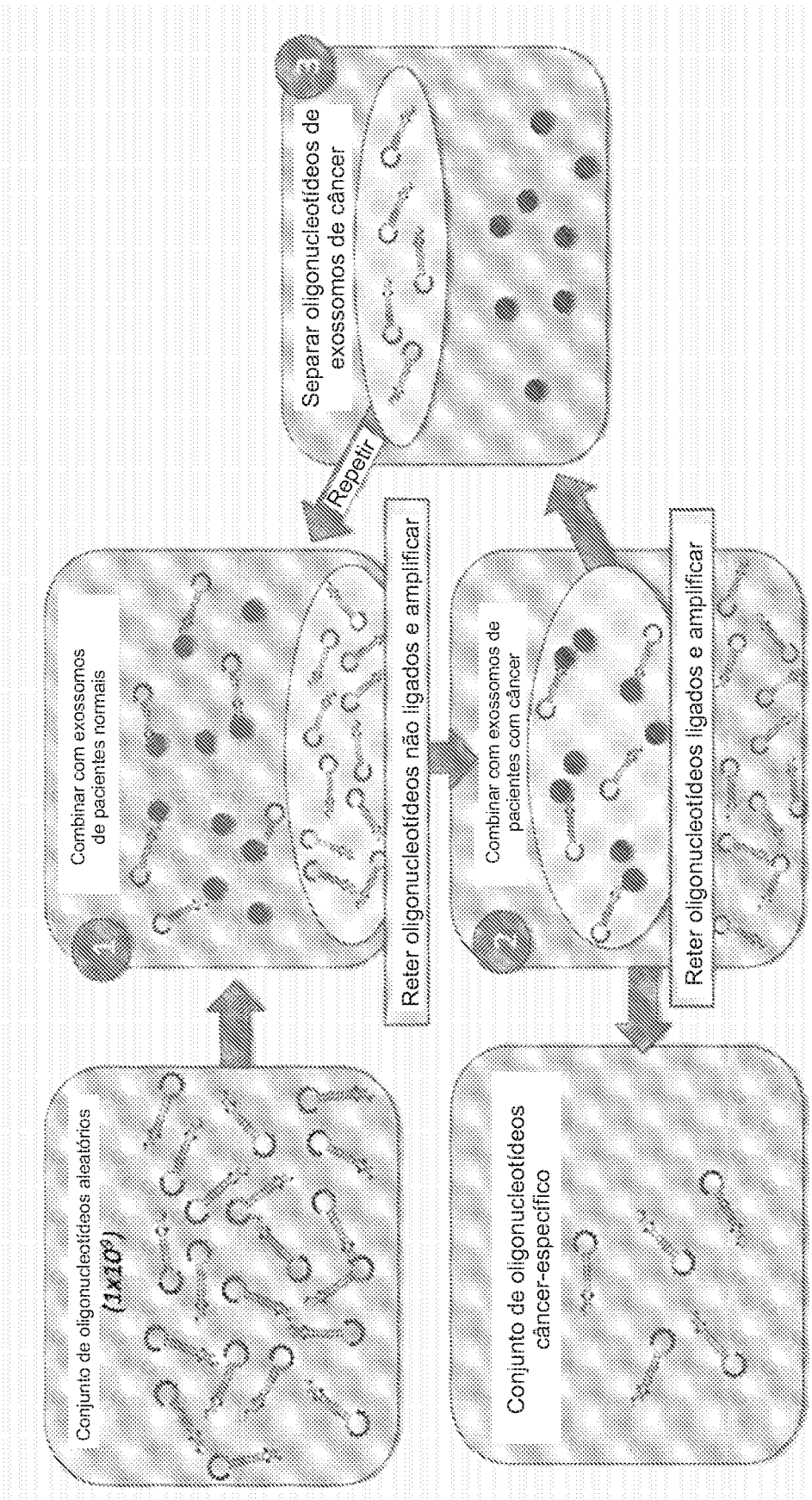

Conjunto de oligonucleotídeos aleatórios
(1x10^9)
Combinar com exossomos de pacientes normais
Reter oligonucleotídeos não ligados e amplificar
Separar oligonucleotídeos de exossomos de câncer
Repetir
Combinar com exossomos de pacientes com câncer
Reter oligonucleotídeos ligados e amplificar
Conjunto de oligonucleotídeos câncer-específico

FIG. 4

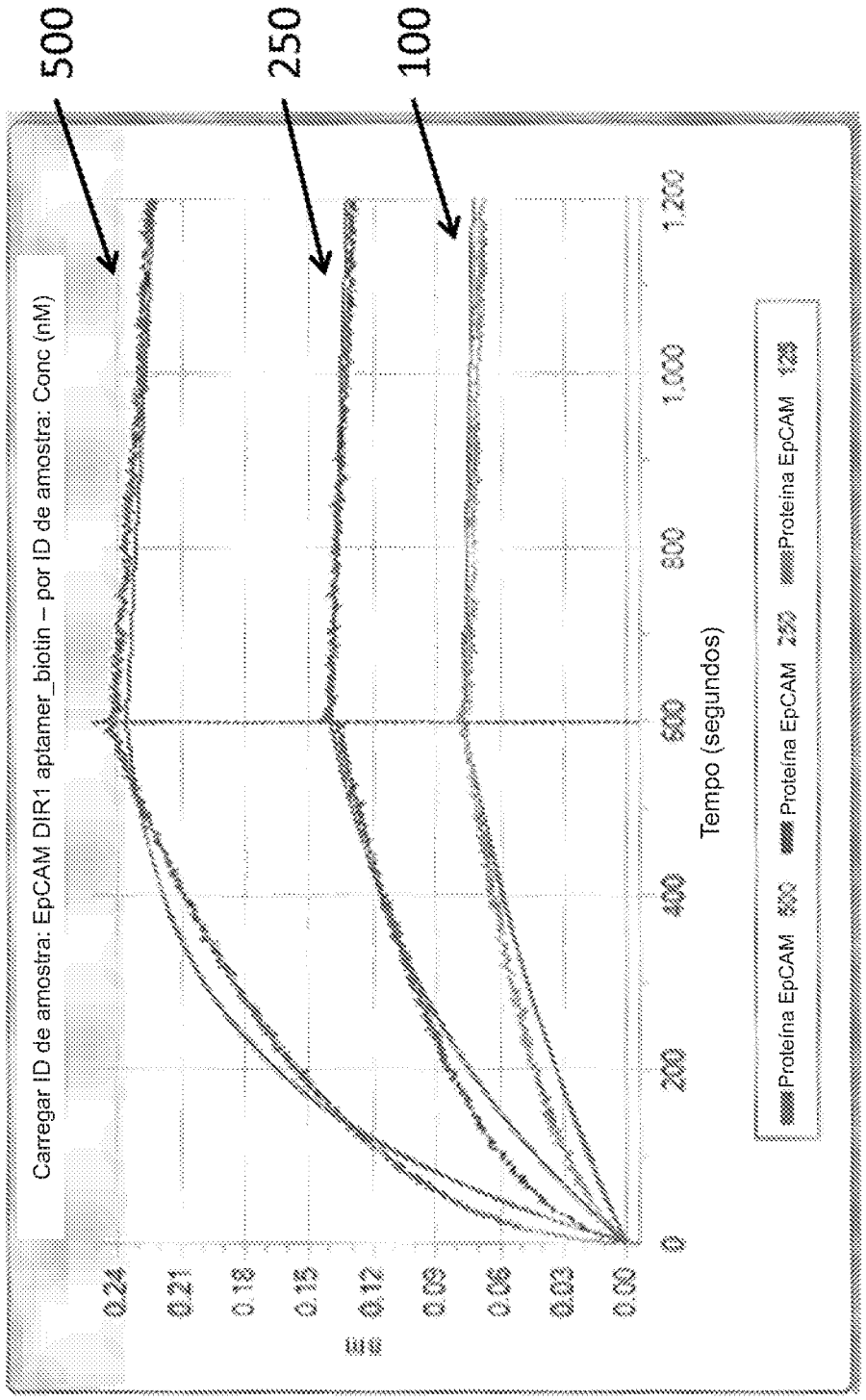

500
250
100
Carregar ID de amostra: EpCAM DIR1 aptamer_biotin – por ID de amostra: Conc (nM)
0.24
0.21
0.18
0.15
0.12
0.09
0.06
0.03
0.00
0
200
400
600
800
1,000
1,200
Tempo (segundos)
Proteína EpCAM 500
Proteína EpCAM 250
Proteína EpCAM 100

FIG. 5

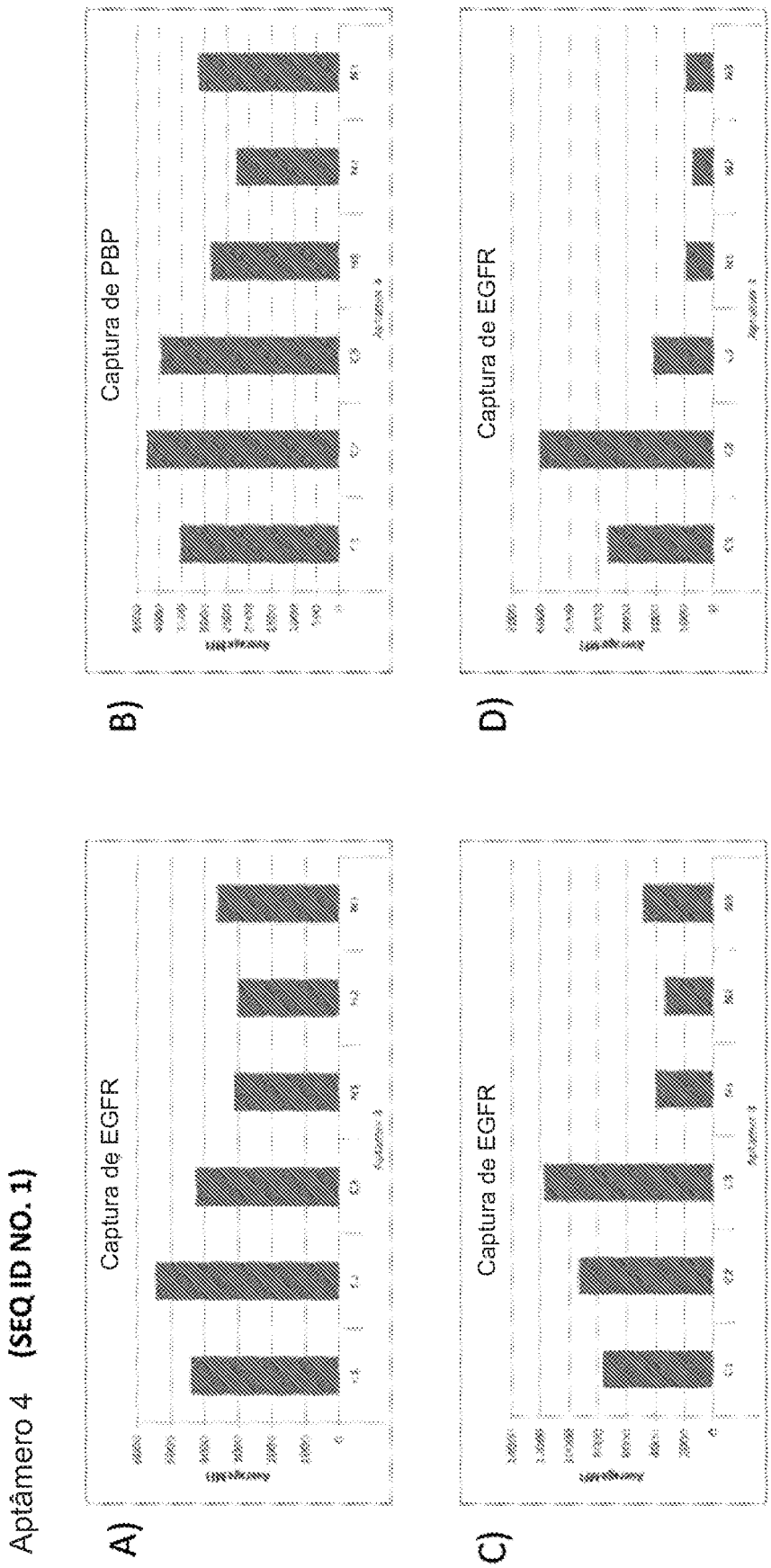

Aptâmero 4 (SEQ ID NO. 1)
A)
Captura de EGFR
B)
Captura de PBP
C)
Captura de EGFR
D)
Captura de EGFR

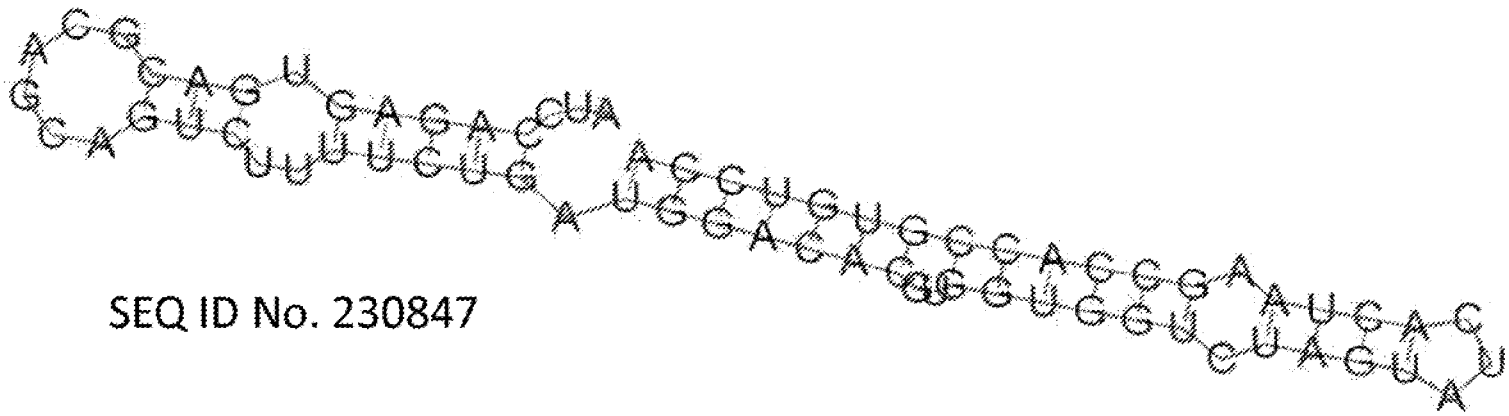
FIG. 6

Petição 870160014920, de 20/04/2016, pág. 495/595

A) SEQ ID No. 230822

5′-ATCCAGAGTGACGCAGCAGTCTTTTCTGATGGACAC
GTGGTGGTCTAGTATCTGGACACGGTGGCTTAGT

B)



SEQ ID No. 230847

FIGs. 7A-B

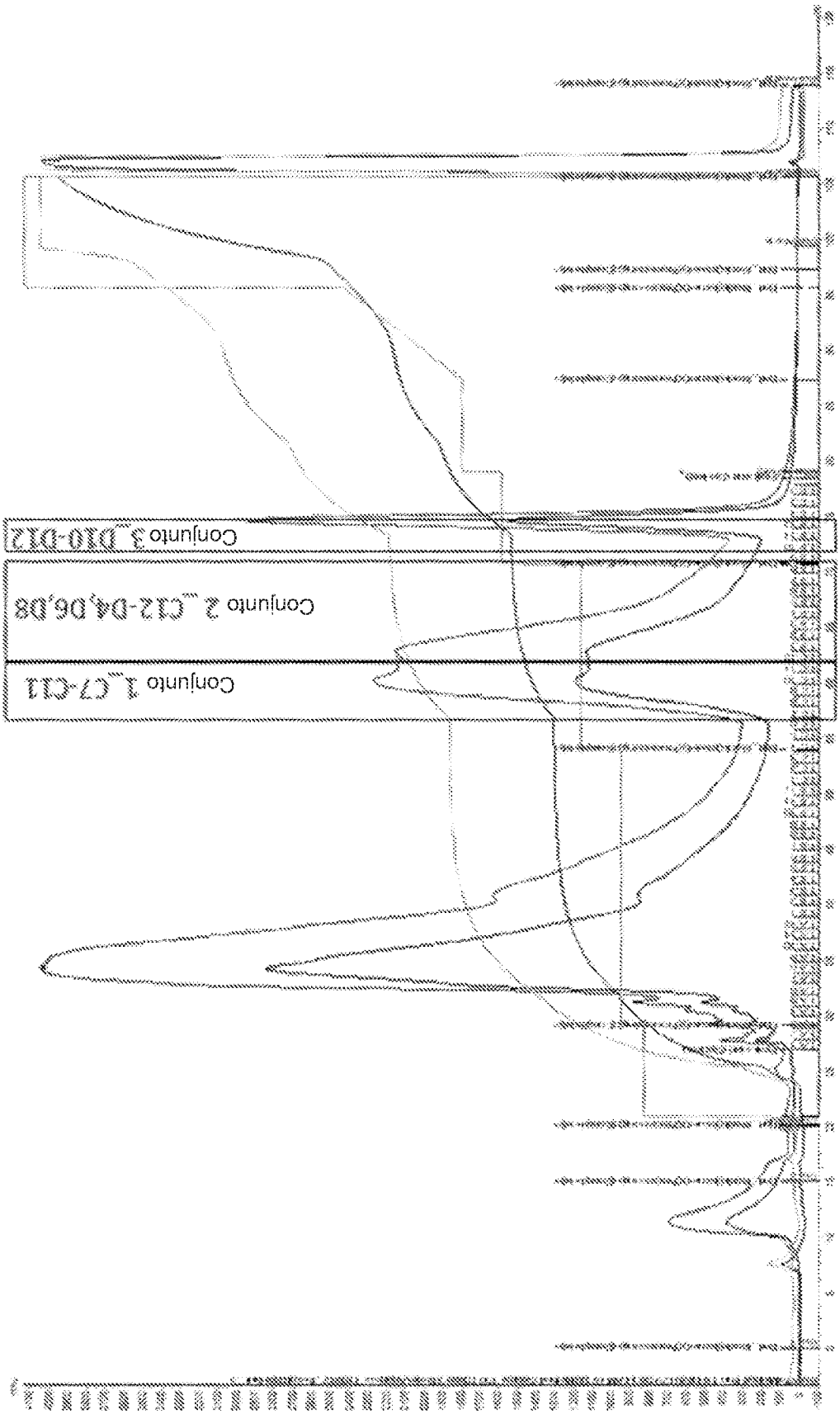


FIG. 7C

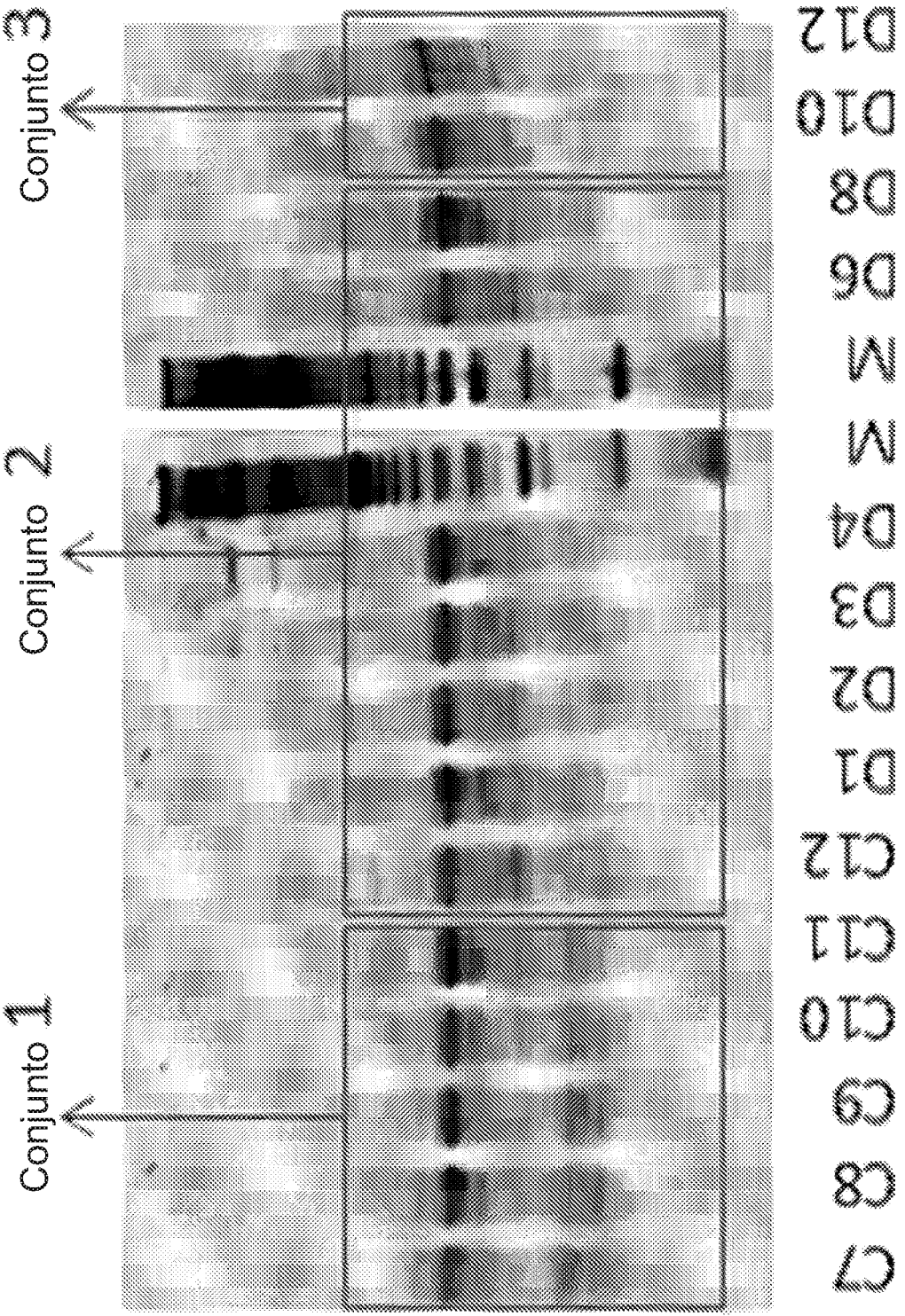

Conjunto 3
Conjunto 2
Conjunto 1
C7
C8
C9
C10
C11
C12
D1
D2
D3
D4
M
M
D6
D8
D10
D12

FIG. 7D

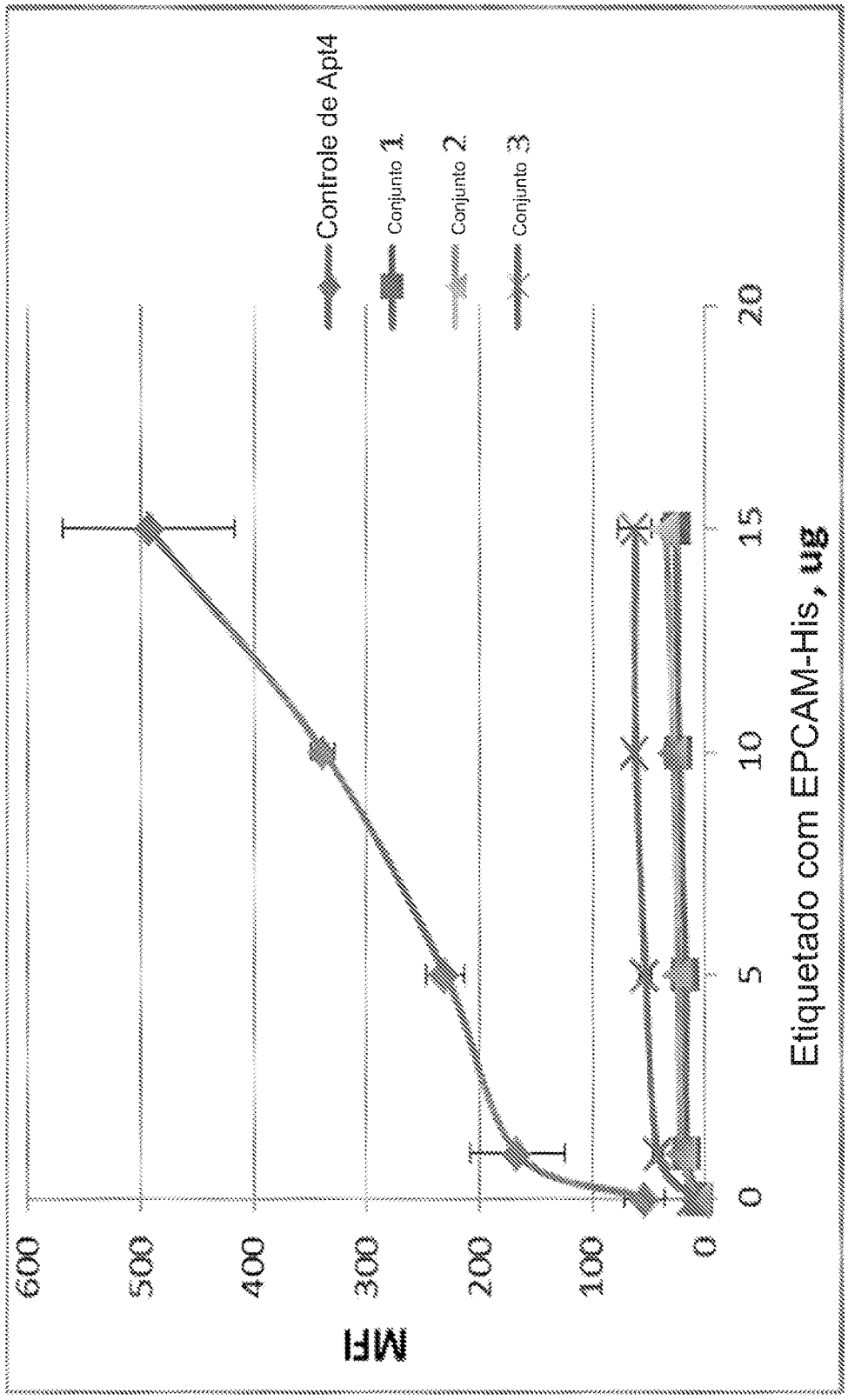

MFI
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
Etiquetado com EPCAM-His, ug
Controle de Apt4
Conjunto 1
Conjunto 2
Conjunto 3

FIG. 7E

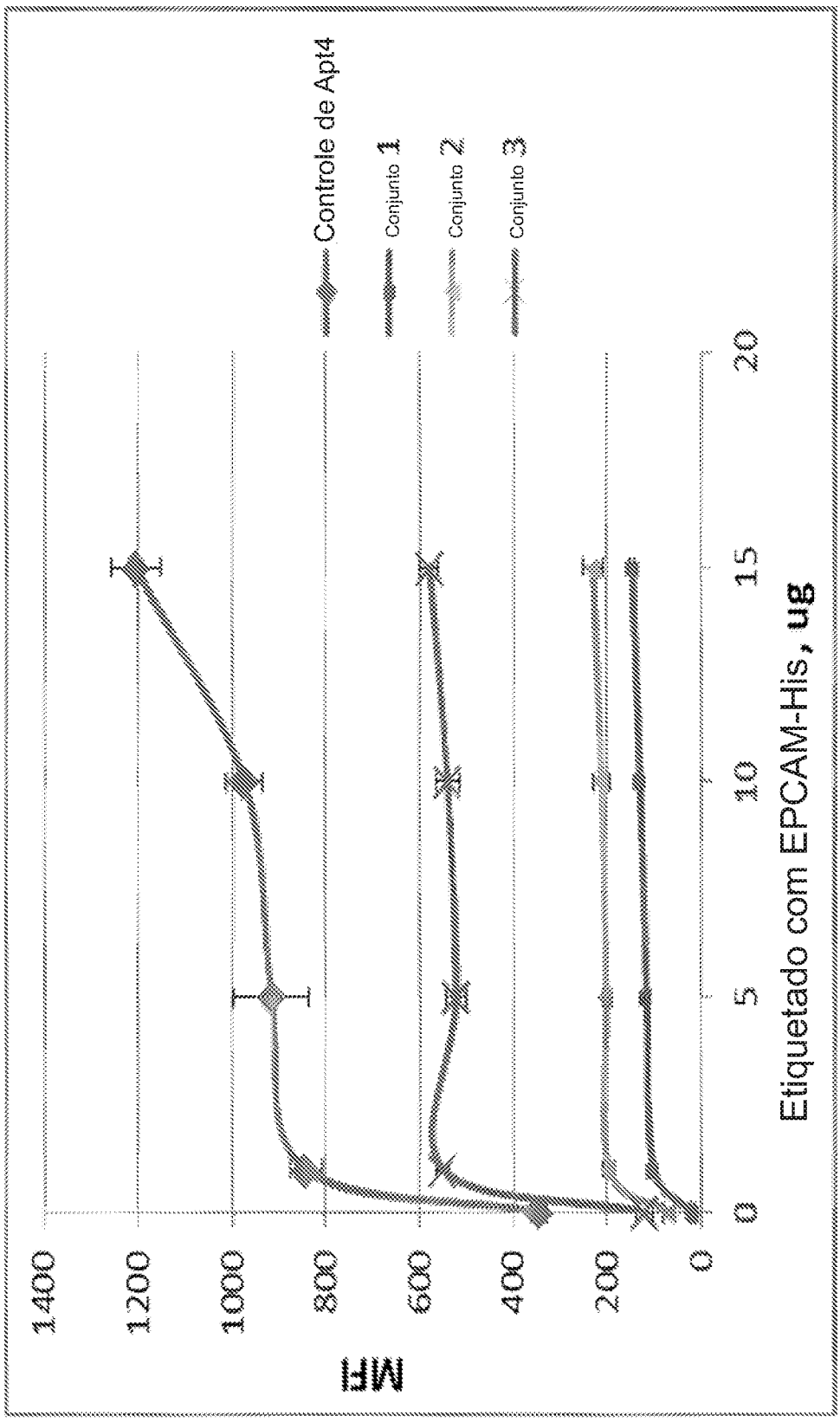

MFI
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
Etiquetado com EPCAM-His, ug
Controle de Apt4
Conjunto 1
Conjunto 2
Conjunto 3

FIG. 7F

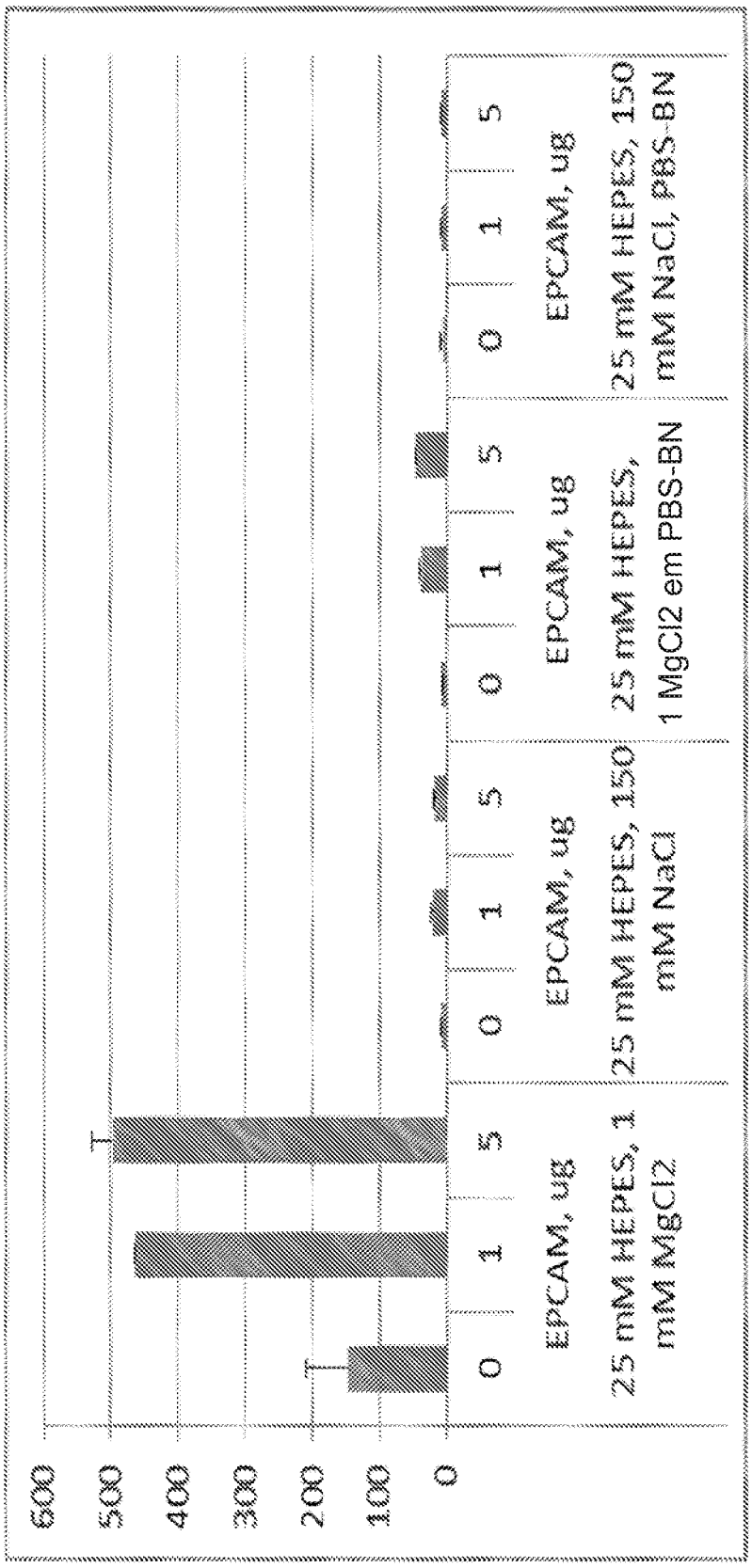

600
500
400
300
200
100
0
0
1
5
EPCAM, ug
25 mM HEPES, 1 mM MgCl2
0
1
5
EPCAM, ug
25 mM HEPES, 150 mM NaCl
0
1
5
EPCAM, ug
25 mM HEPES, 1 MgCl2 em PBS-BN
0
1
5
EPCAM, ug
25 mM HEPES, 150 mM NaCl, PBS-BN

FIG. 7G

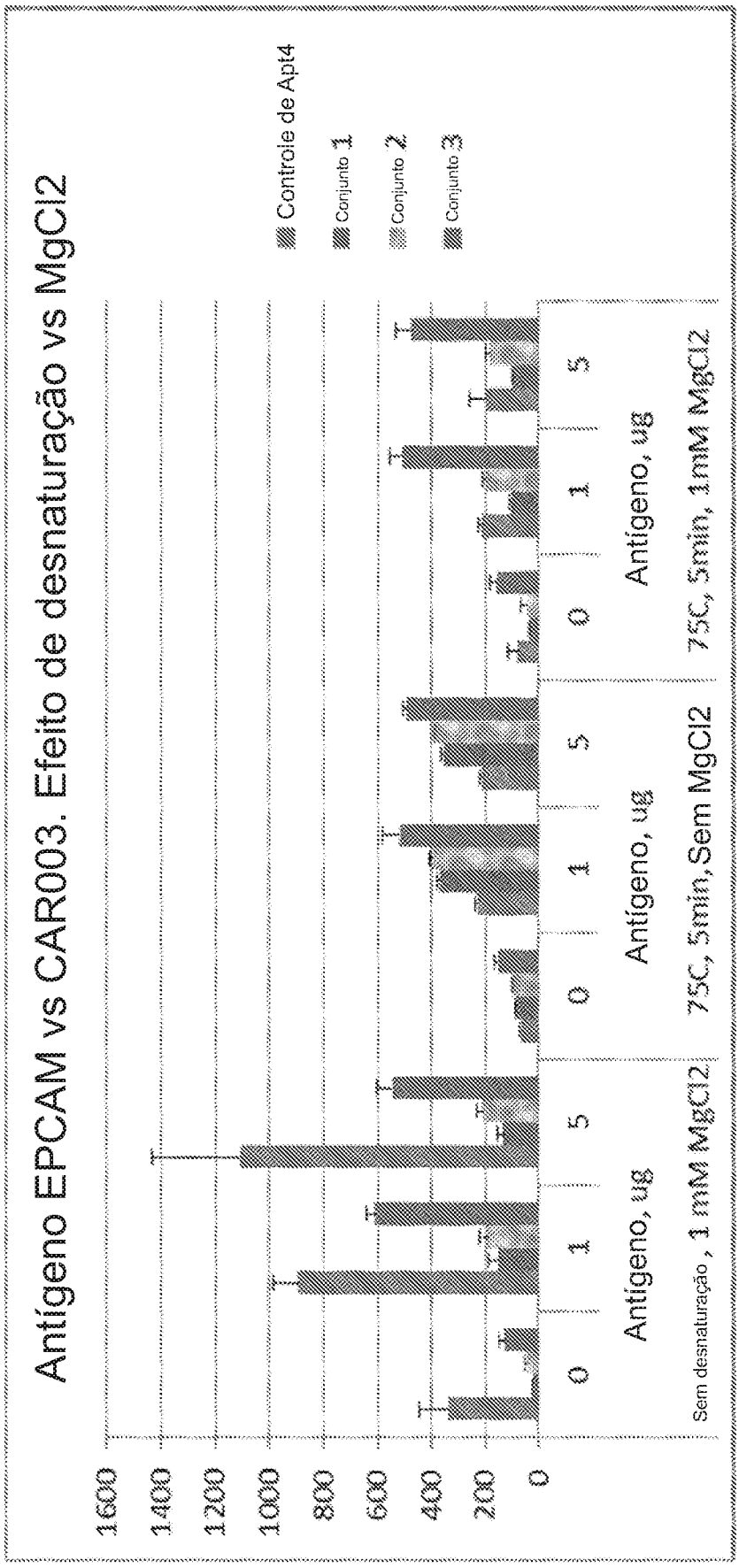

Antígeno EPCAM vs CAR003. Efeito de desnaturação vs MgCl2
Controle de Apt4
Conjunto 1
Conjunto 2
Conjunto 3
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Sem desnaturação , 1 mM MgCl2
75C, 5min,Sem MgCl2
75C, 5min, 1mM MgCl2
Antígeno, ug
0
1
5

FIG. 7H

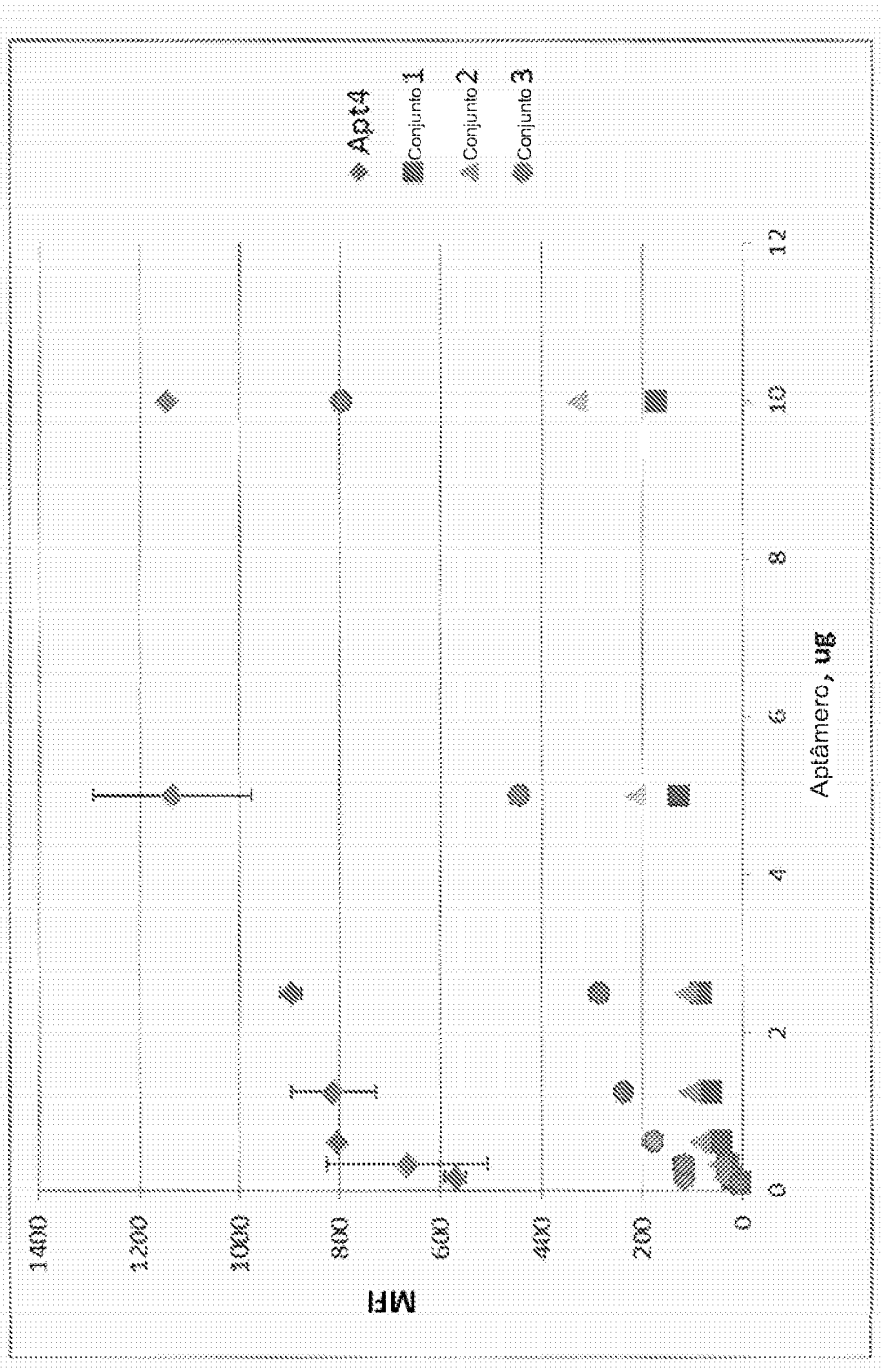

Apt4
Conjunto 1
Conjunto 2
Conjunto 3
MFI
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
12
Aptâmero, ug

FIG. 7I

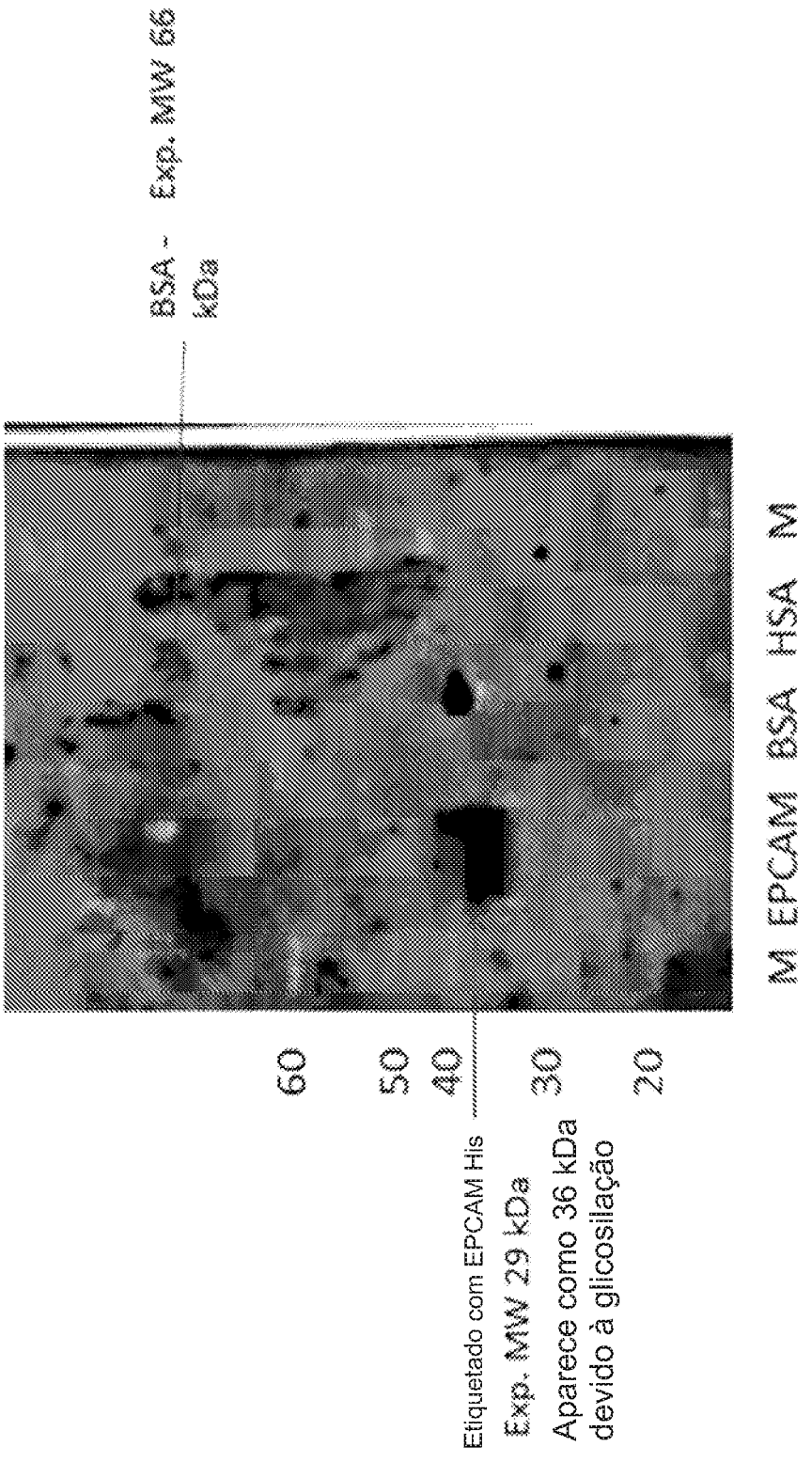
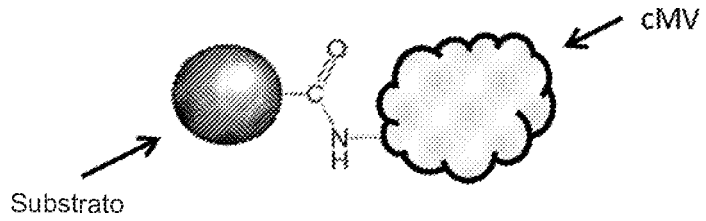

BSA - Exp. MW 66 kDa
M EPCAM BSA HSA M
60
50
40
30
20
Etiquetado com EPCAM His
Exp. MW 29 kDa
Aparece como 36 kDa
devido à glicosilação

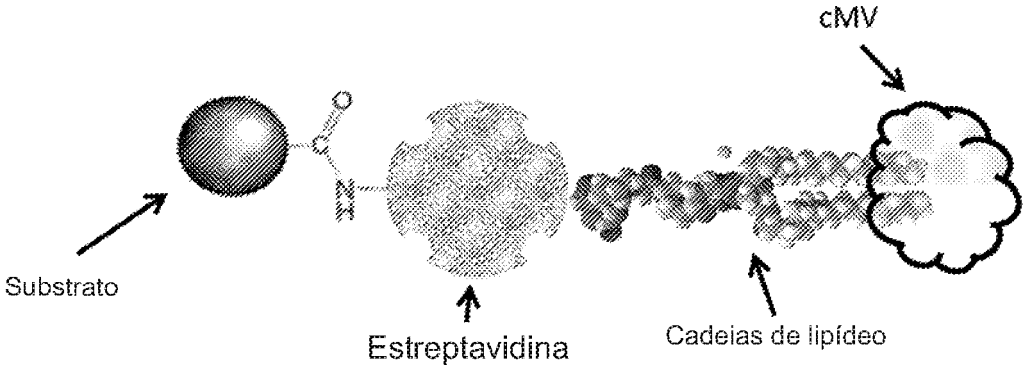
FIG. 7J

Petição 870160014920, de 20/04/2016, pág. 504/595

A) conjugação direta
de cMVs a um substrato



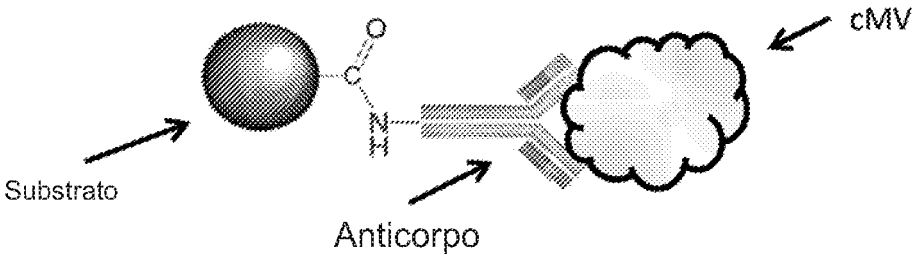
B) reticulação de lipídeo
funcionalizada por biotina
de cMVs a um substrato



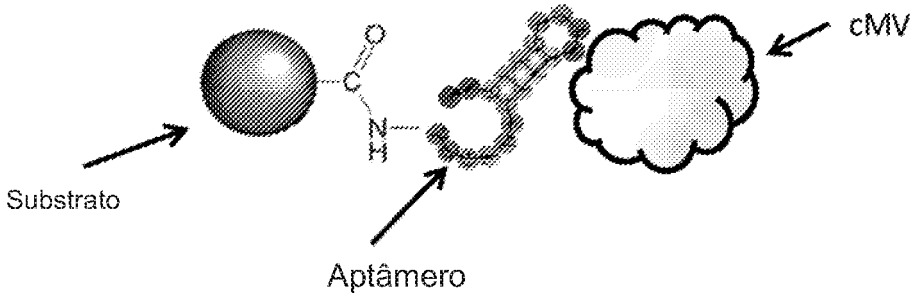
FIGs. 8A-B

Petição 870160014920, de 20/04/2016, pág. 505/595

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. 8C-D

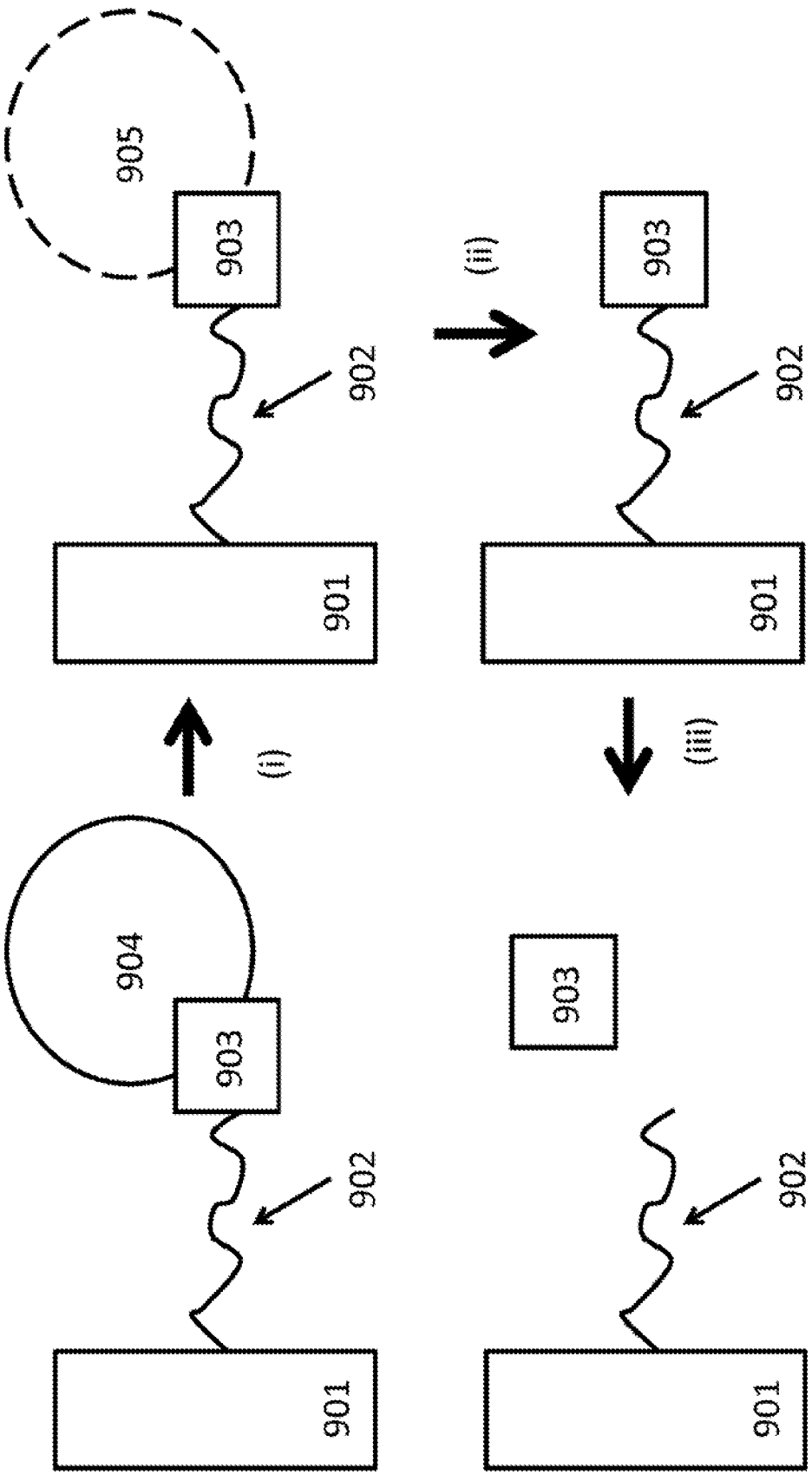

905
903
902
901
(ii)
904
903
902
901
(iii)
903
902
901
(iiii)
903
902
901

FIG. 9

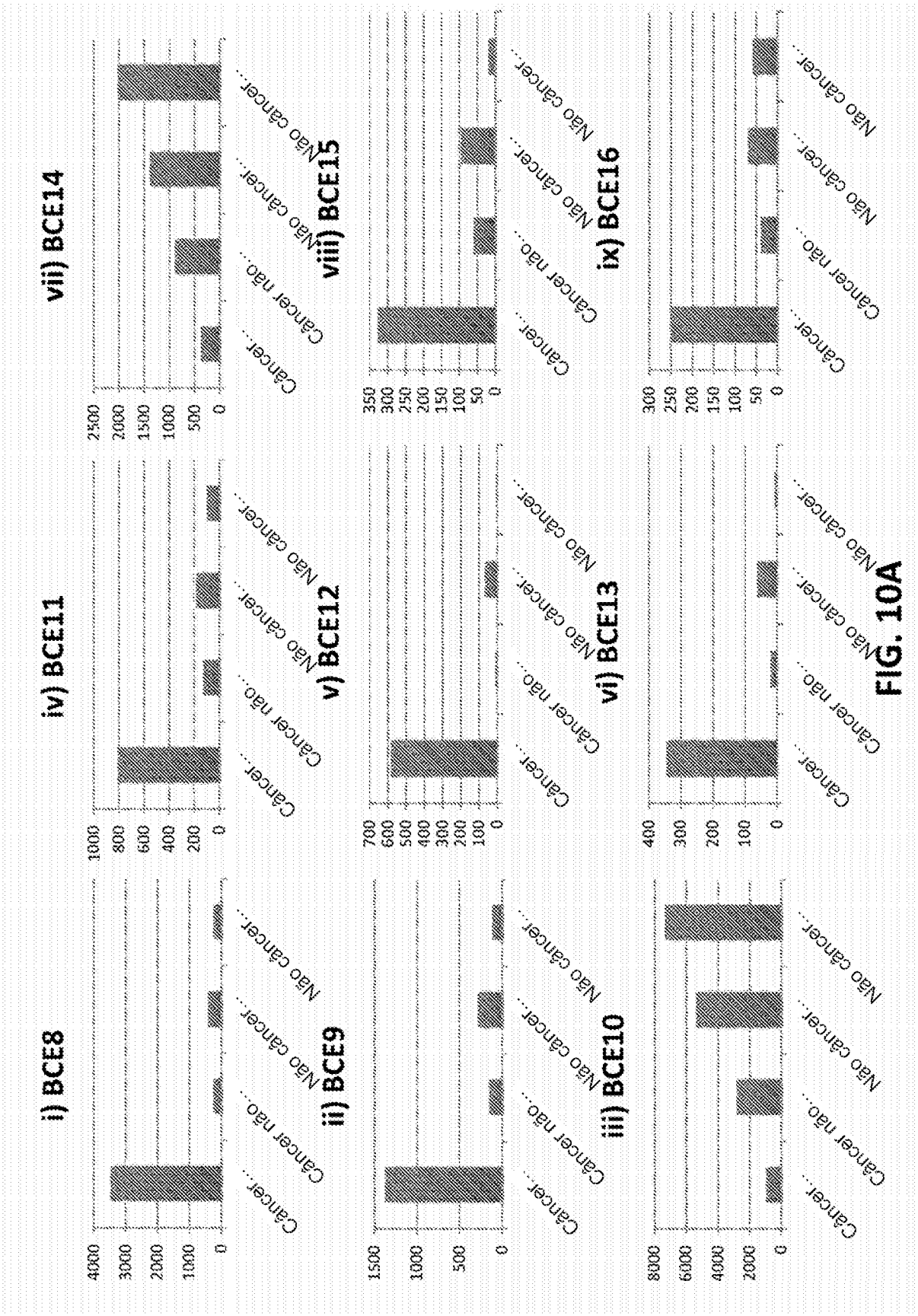

i) BCE8
ii) BCE9
iii) BCE10
iv) BCE11
v) BCE12
vi) BCE13
vii) BCE14
viii) BCE15
ix) BCE16
Cancer...
Cancer nao...
Não cancer...
Não cancer...

FIG. 10A

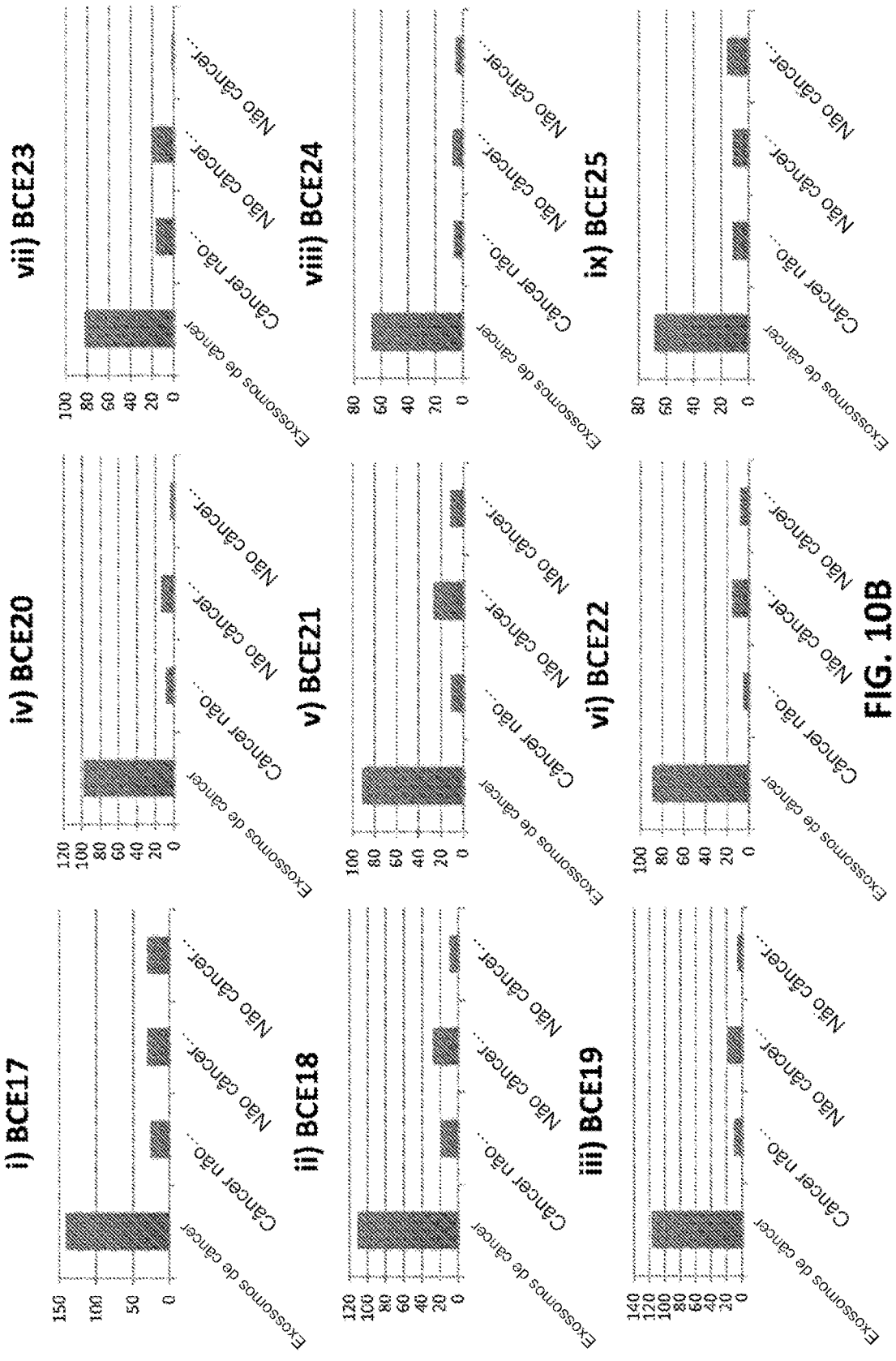

i) BCE17
ii) BCE18
iii) BCE19
iv) BCE20
v) BCE21
vi) BCE22
vii) BCE23
viii) BCE24
ix) BCE25
Exossomos de cancer
Cancer nao...
Nao cancer...
Nao cancer...

FIG. 10B

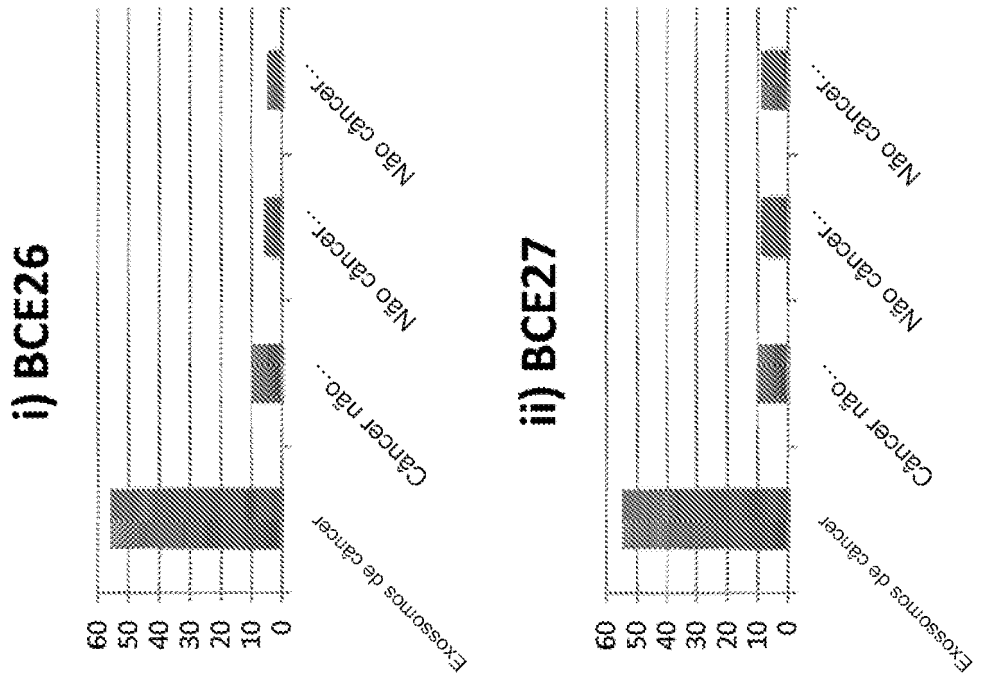

i) BCE26
ii) BCE27
Exossomos de cancer
Cancer nao...
Não cancer...
Não cancer...
0
10
20
30
40
50
60

FIG. 10C

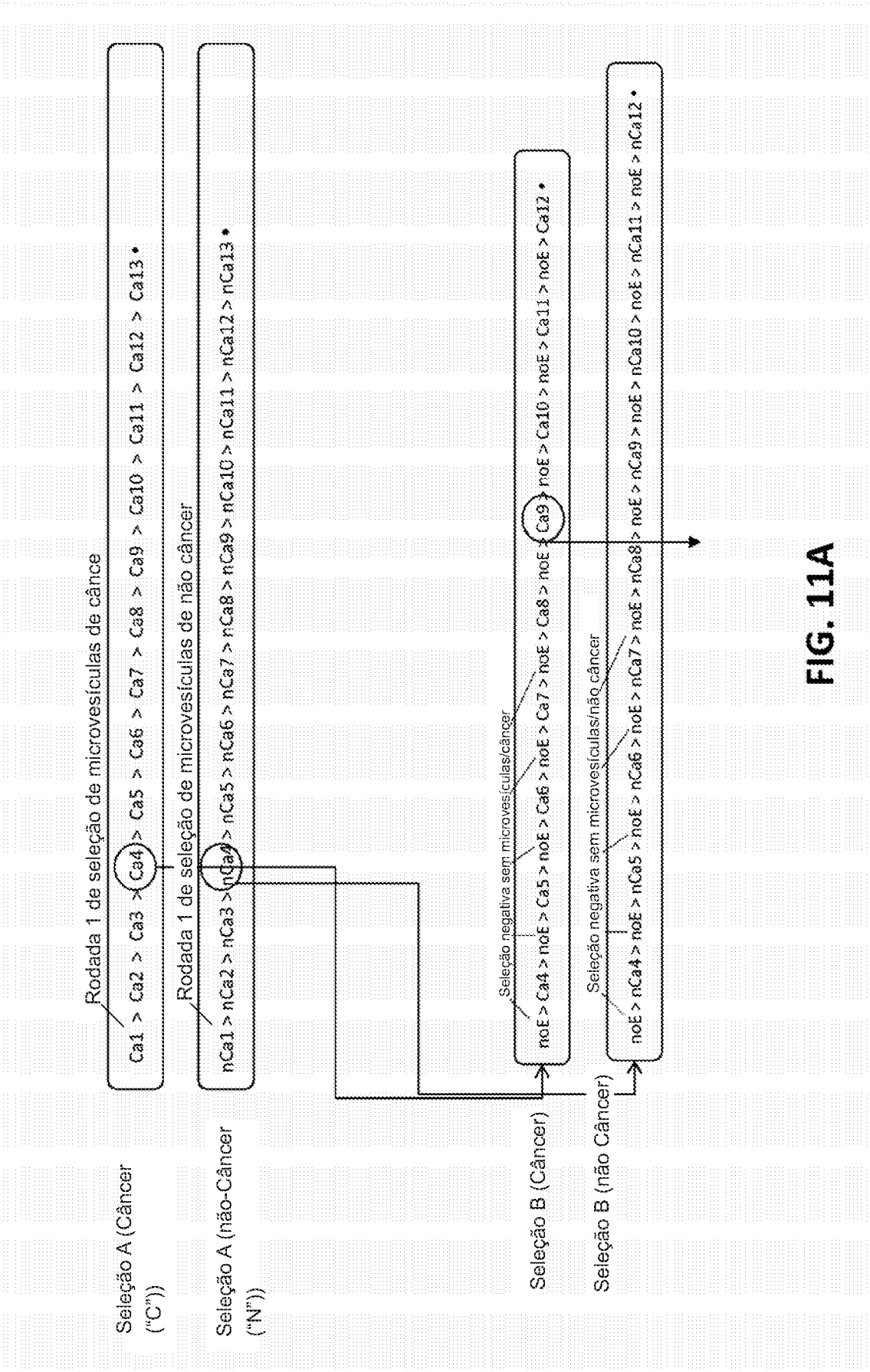

Rodada 1 de seleção de microvesículas de câncer
Ca1 > Ca2 > Ca3 > Ca4 > Ca5 > Ca6 > Ca7 > Ca8 > Ca9 > Ca10 > Ca11 > Ca12 > Ca13 •
Rodada 1 de seleção de microvesículas de não câncer
nCa1 > nCa2 > nCa3 > nCa4 > nCa5 > nCa6 > nCa7 > nCa8 > nCa9 > nCa10 > nCa11 > nCa12 > nCa13 •
Seleção A (Câncer ("C"))
Seleção A (não-Câncer ("N"))
Seleção negativa sem microvesículas/câncer
noE > Ca4 > noE > Ca5 > noE > Ca6 > noE > Ca7 > noE > Ca8 > noE > Ca9 > noE > Ca10 > noE > Ca11 > noE > Ca12 •
Seleção B (Câncer)
Seleção negativa sem microvesículas/não câncer
noE > nCa4 > noE > nCa5 > noE > nCa6 > noE > nCa7 > noE > nCa8 > noE > nCa9 > noE > nCa10 > noE > nCa11 > noE > nCa12 •
Seleção B (não Câncer)

FIG. 11A

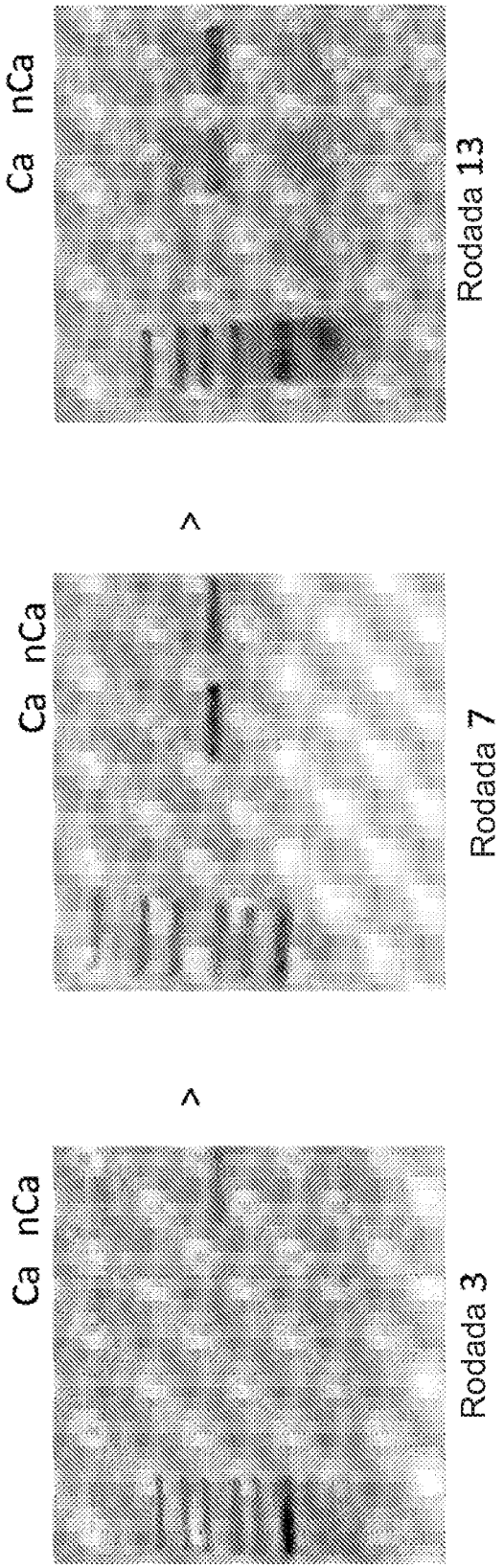


FIG. 11B

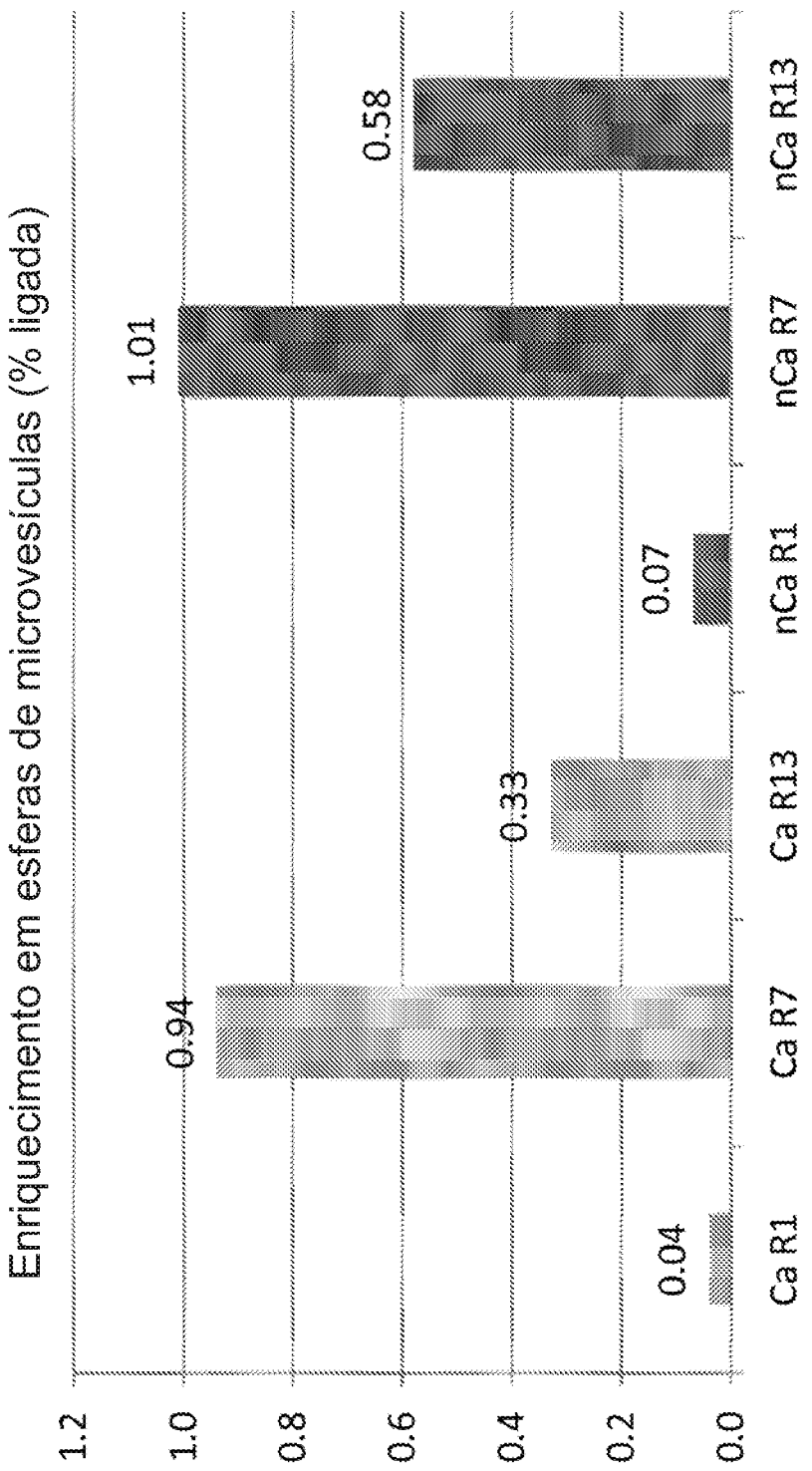

Enriquecimento em esferas de microvesículas (% ligada)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.94
1.01
0.33
0.58
0.04
0.07
Ca R1
Ca R7
Ca R13
nCa R1
nCa R7
nCa R13

FIG. 11C

Petição 870160014920, de 20/04/2016, pág. 513/595

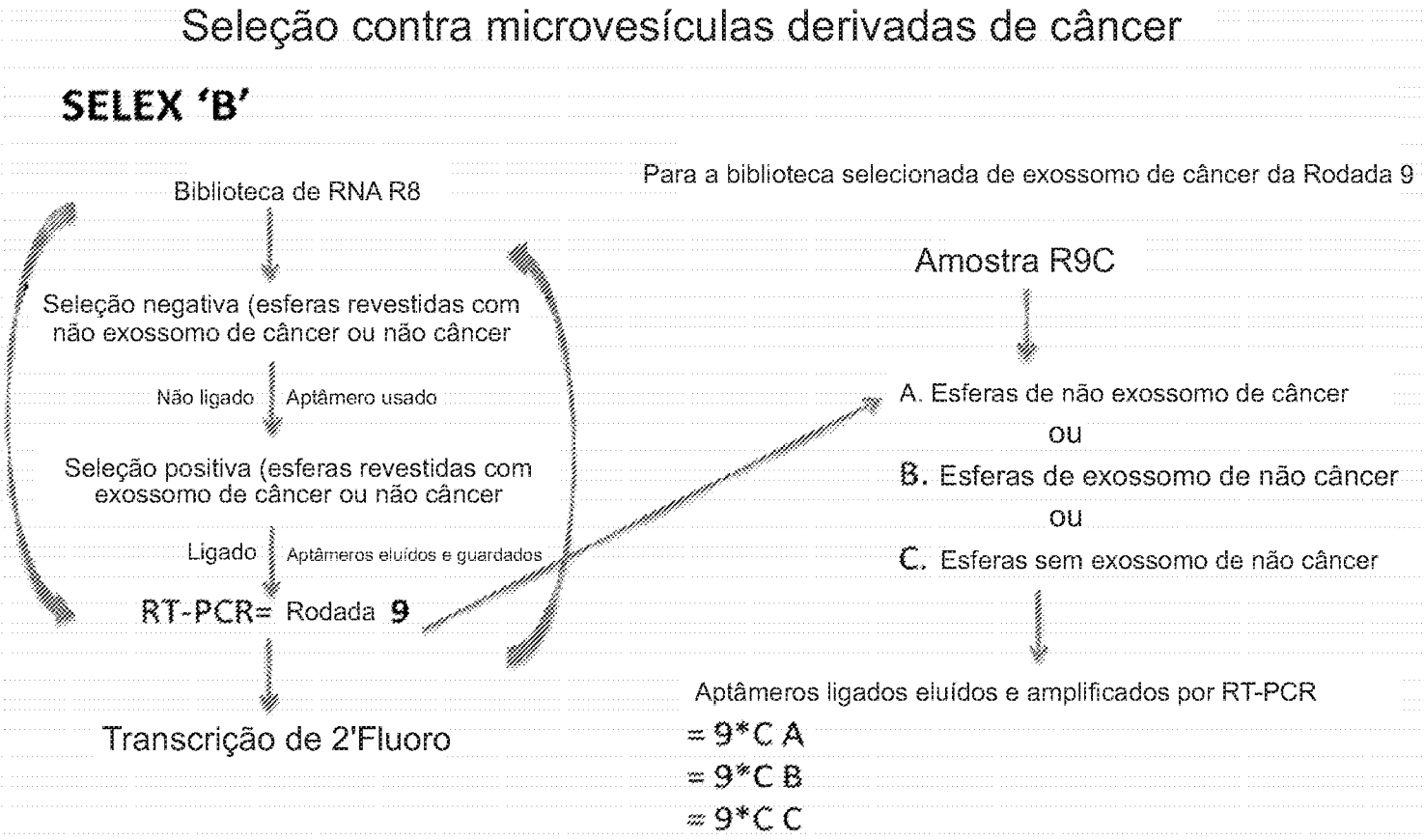


FIG. 11D

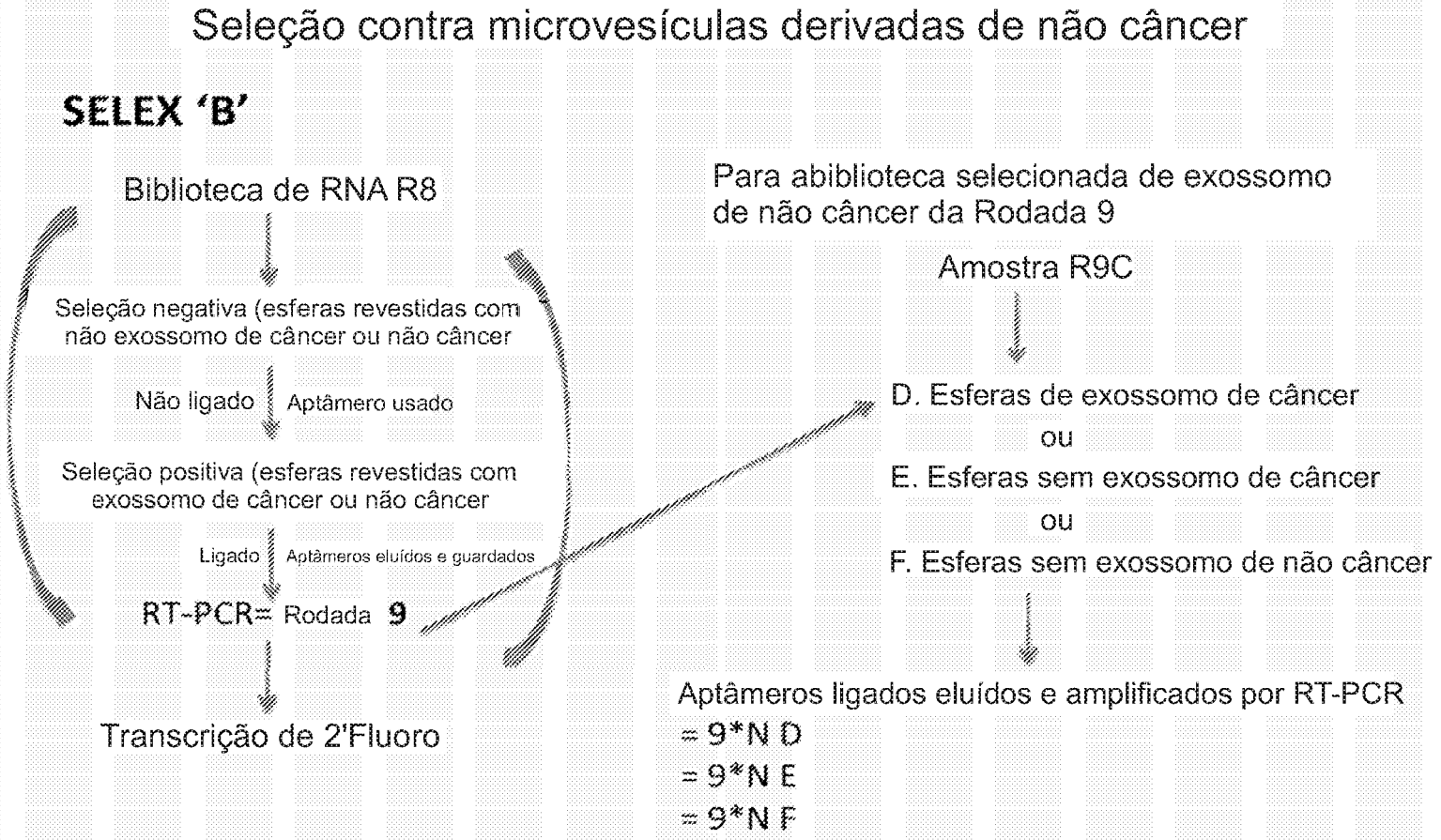

Seleção contra microvesículas derivadas de não câncer
SELEX 'B'
Biblioteca de RNA R8
Seleção negativa (esferas revestidas com não exossomo de câncer ou não câncer
Não ligado
Aptâmero usado
Seleção positiva (esferas revestidas com exossomo de câncer ou não câncer
Ligado
Aptâmeros eluídos e guardados
RT-PCR= Rodada 9
Transcrição de 2'Fluoro
Para abiblioteca selecionada de exossomo de não câncer da Rodada 9
Amostra R9C
D. Esferas de exossomo de câncer
ou
E. Esferas sem exossomo de câncer
ou
F. Esferas sem exossomo de não câncer
Aptâmeros ligados eluídos e amplificados por RT-PCR
= 9*N D
= 9*N E
= 9*N F
Biblioteca de RNA SUL1

FIG. 11E

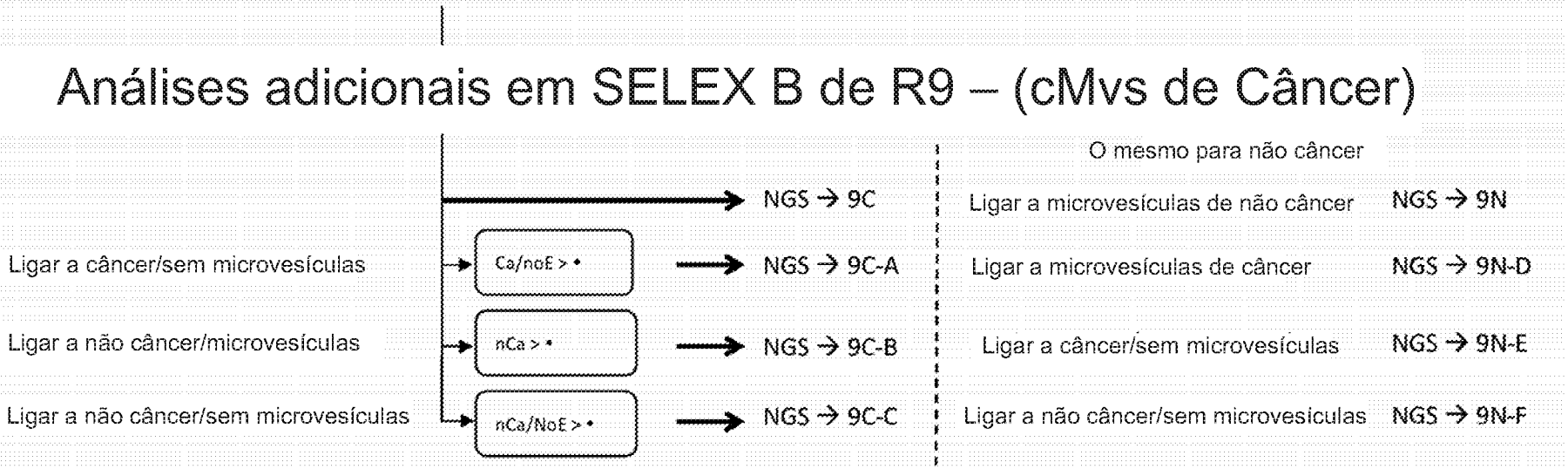

Análises adicionais em SELEX B de R9 – (cMvs de Câncer)
NGS → 9C
Ligar a câncer/sem microvesículas
Ca/noE > •
NGS → 9C-A
Ligar a não câncer/microvesículas
nCa > •
NGS → 9C-B
Ligar a não câncer/sem microvesículas
nCa/NoE > •
NGS → 9C-C
O mesmo para não câncer
Ligar a microvesículas de não câncer
NGS → 9N
Ligar a microvesículas de câncer
NGS → 9N-D
Ligar a câncer/sem microvesículas
NGS → 9N-E
Ligar a não câncer/sem microvesículas
NGS → 9N-F

FIG. 11F

Petição 870160014920, de 20/04/2016, pág. 516/595



• Contrasseleção com microvesículas de não câncer

FIG. 11G

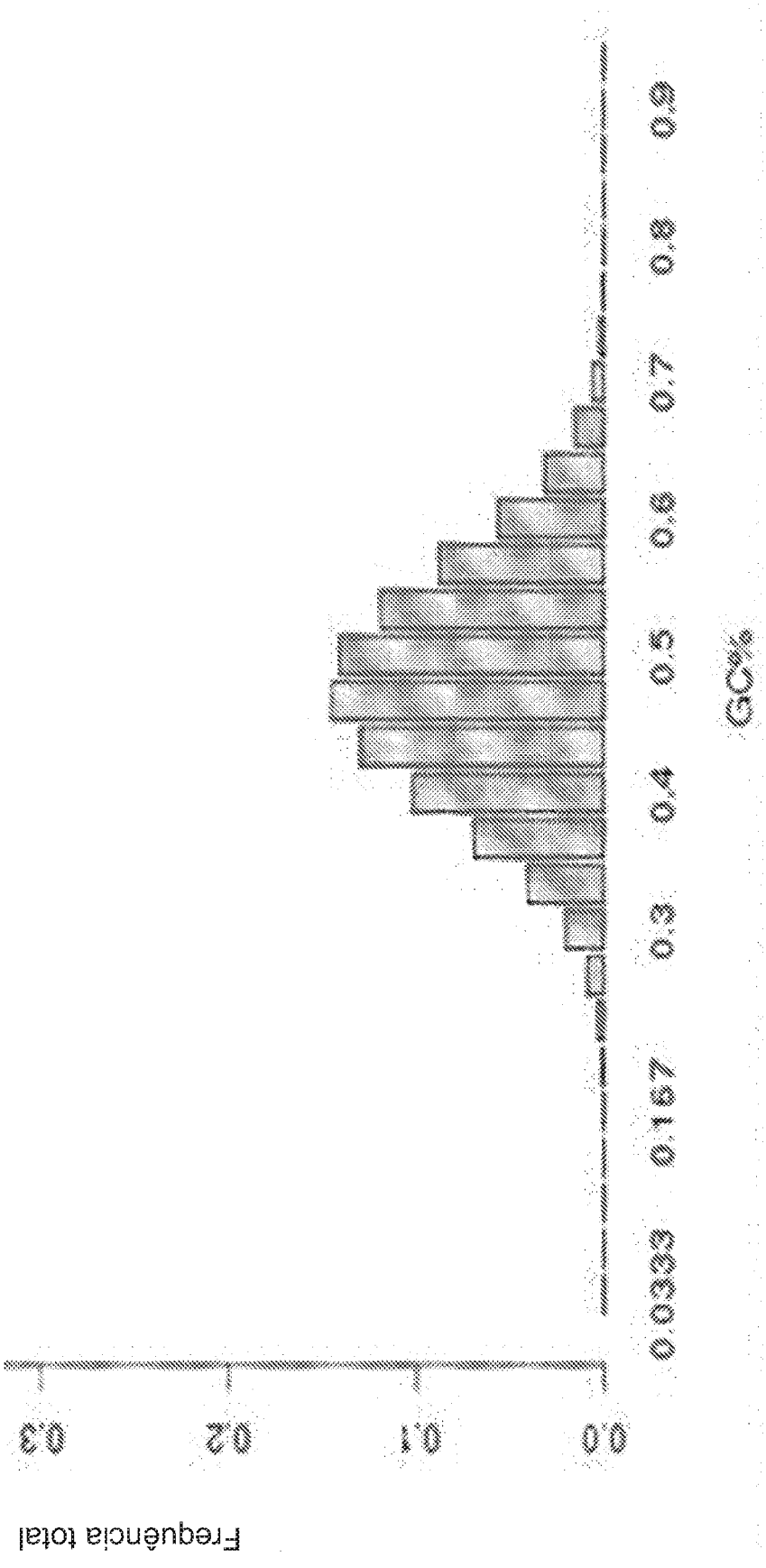


FIG. 12

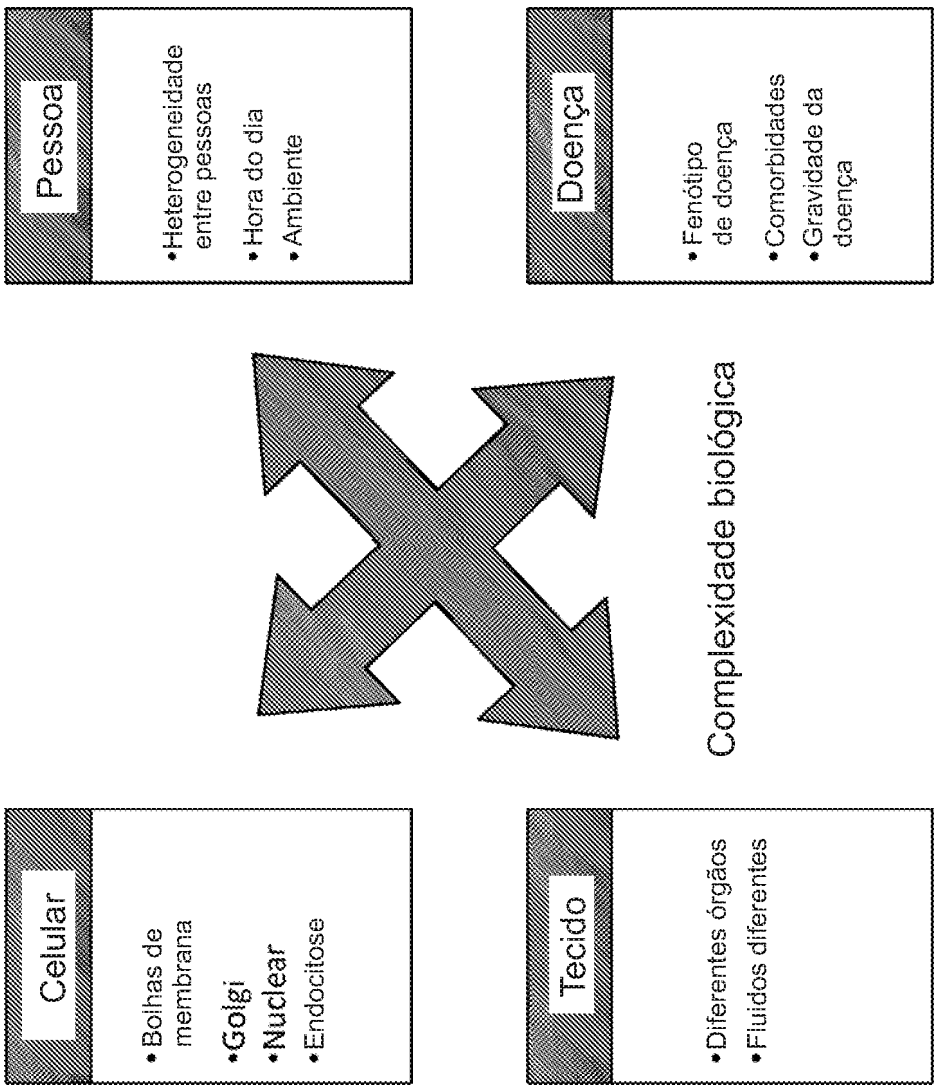

Pessoa
•Heterogeneidade entre pessoas
•Hora do dia
•Ambiente
Doença
•Fenótipo de doença
•Comorbidades
•Gravidade da doença
Complexidade biológica
Celular
•Bolhas de membrana
•Golgi
•Nuclear
•Endocitose
Tecido
•Diferentes órgãos
•Fluidos diferentes

FIG. 13A

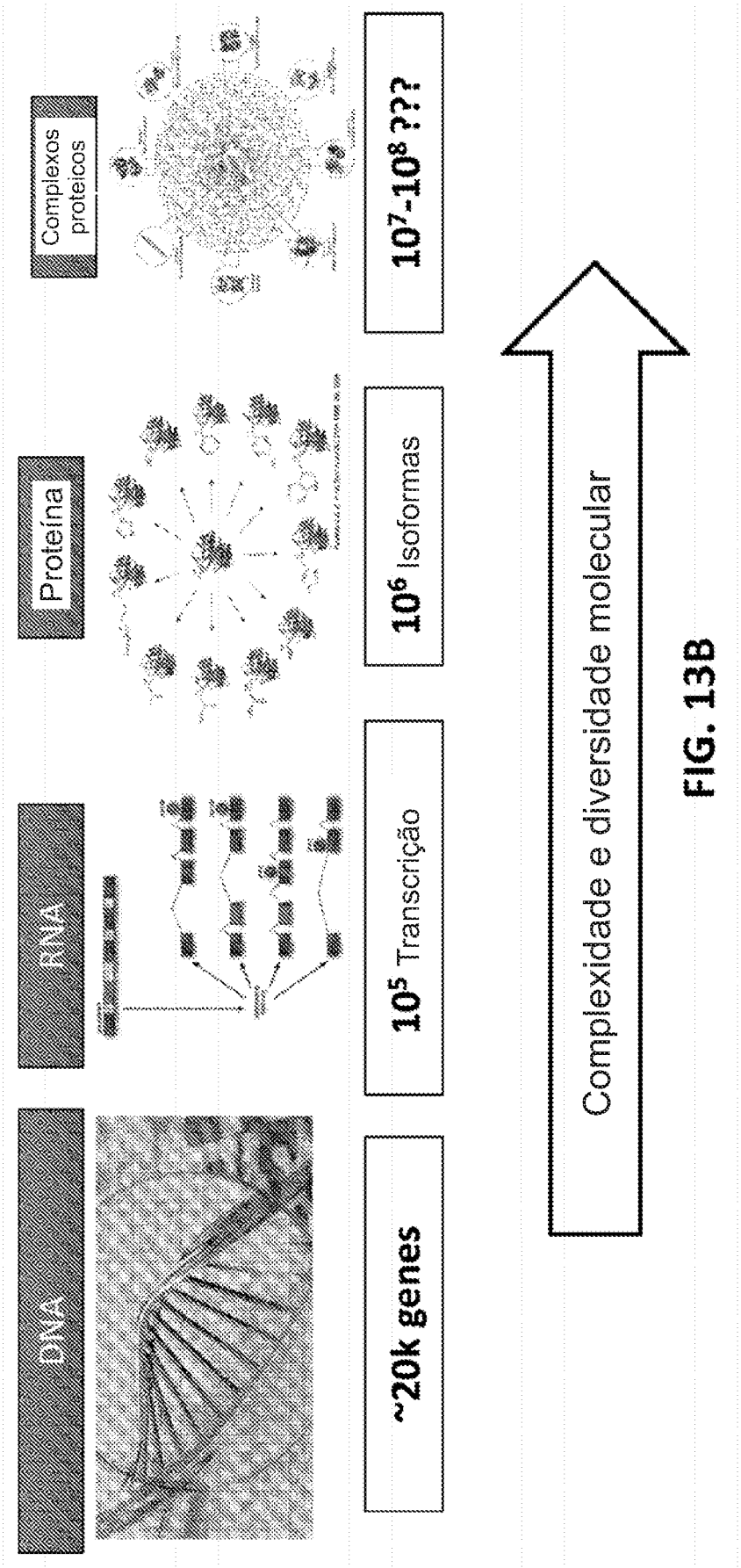

DNA
RNA
Proteína
Complexos proteicos
~20k genes
10^5 Transcrição
10^6 Isoformas
10^7-10^8 ???
Complexidade e diversidade molecular

FIG. 13B

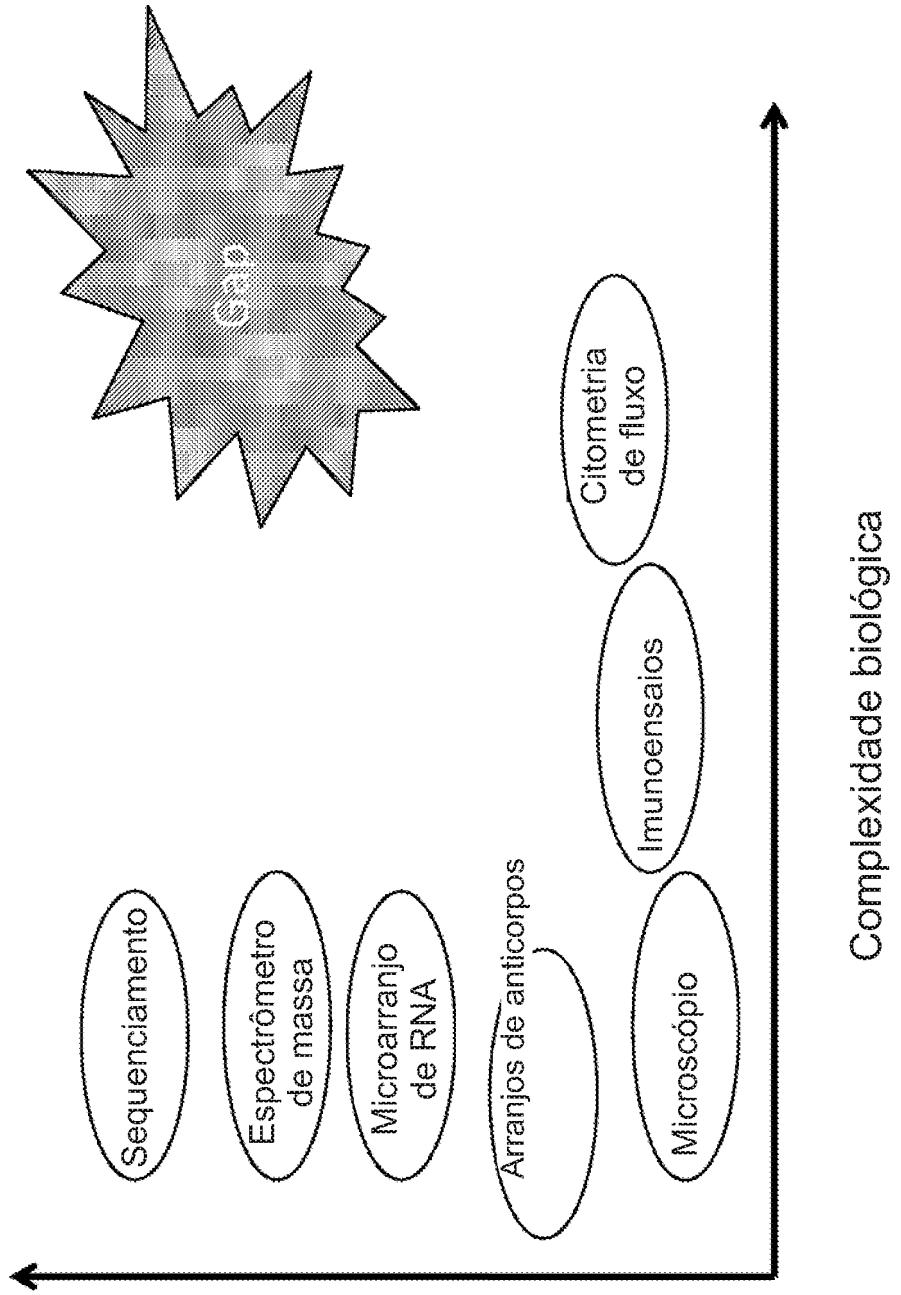

Diversidade de alvo molecular
Complexidade biológica
Sequenciamento
Espectrômetro de massa
Microarranjo de RNA
Arranjos de anticorpos
Microscópio
Imunoensaios
Citometria de fluxo
Grau

FIG. 13C

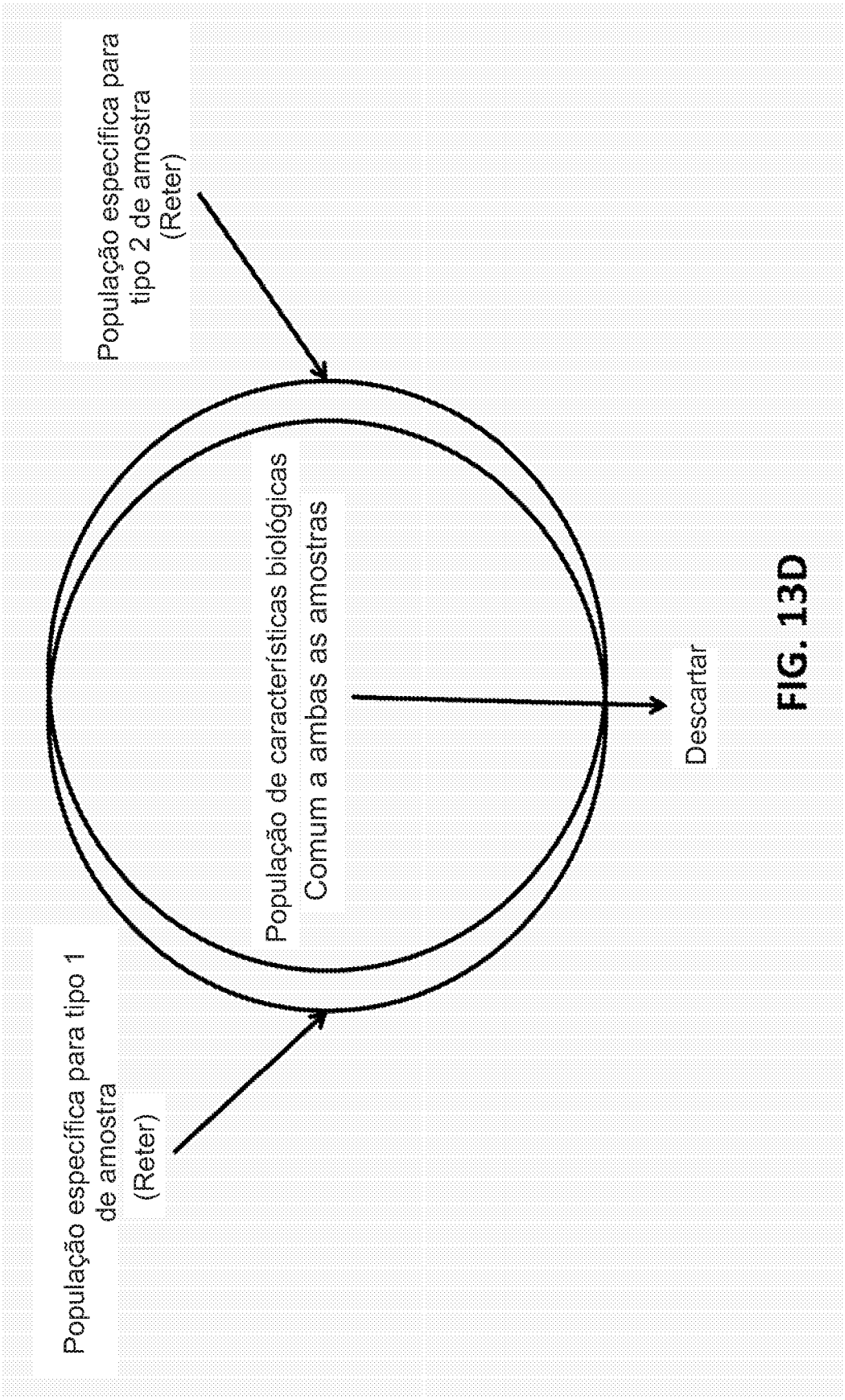

População específica para tipo 2 de amostra (Reter)
População específica para tipo 1 de amostra (Reter)
População de características biológicas Comum a ambas as amostras
Descartar

FIG. 13D

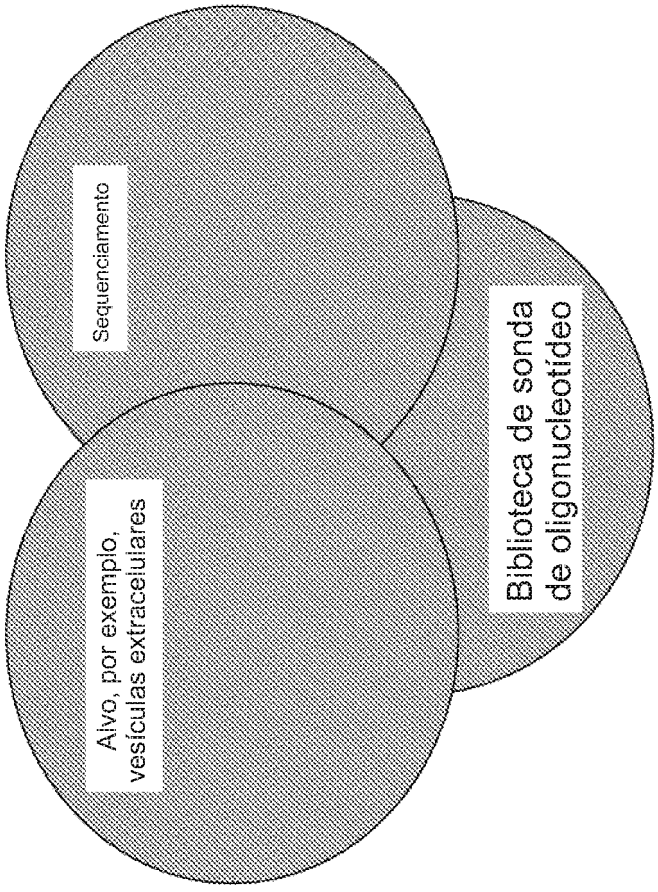

Sequenciamento
Alvo, por exemplo, vesículas extracelulares
Biblioteca de sonda de oligonucleotídeo

FIG. 13E

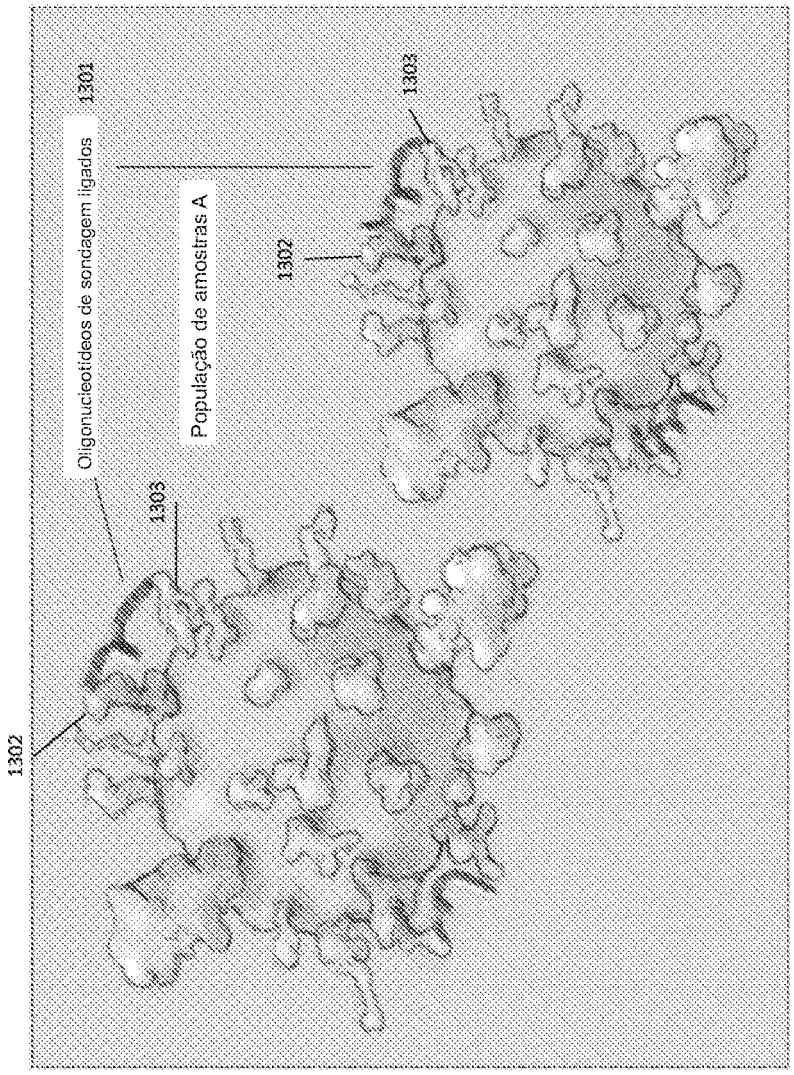

1301
Oligonucleotídeos de sondagem ligados
População de amostras A
1302
1303
1303
1302

FIG. 13F

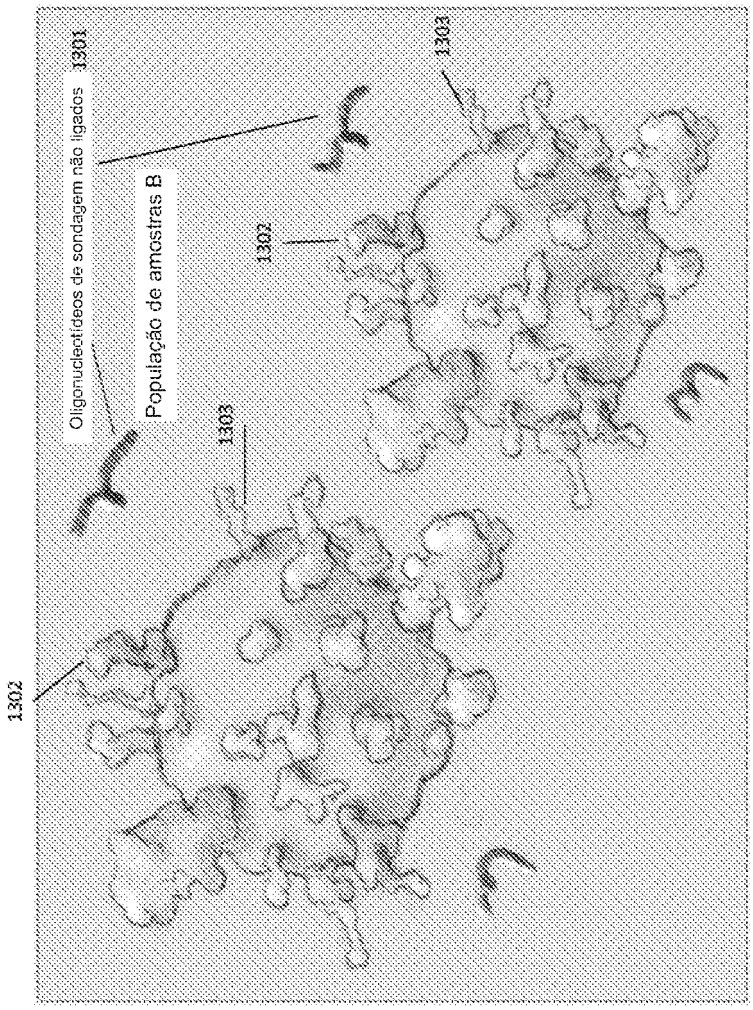

Oligonucleotídeos de sondagem não ligados
1301
População de amostras B
1302
1303
1303
1302

FIG. 13G

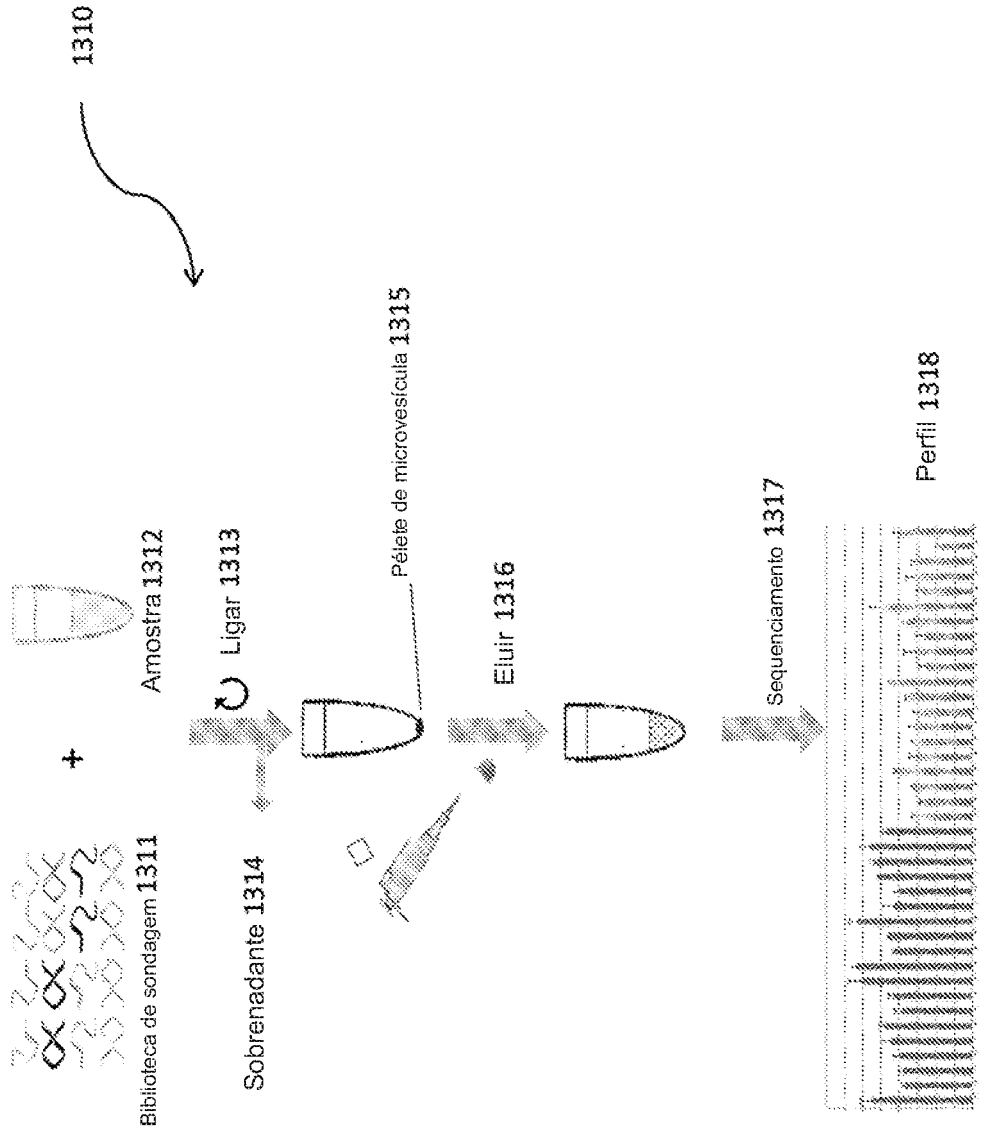

1310
Amostra 1312
Ligar 1313
Péiete de microvesícula 1315
Eluir 1316
Sequenciamento 1317
Perfil 1318
Biblioteca de sondagem 1311
Sobrenadante 1314

FIG. 13H

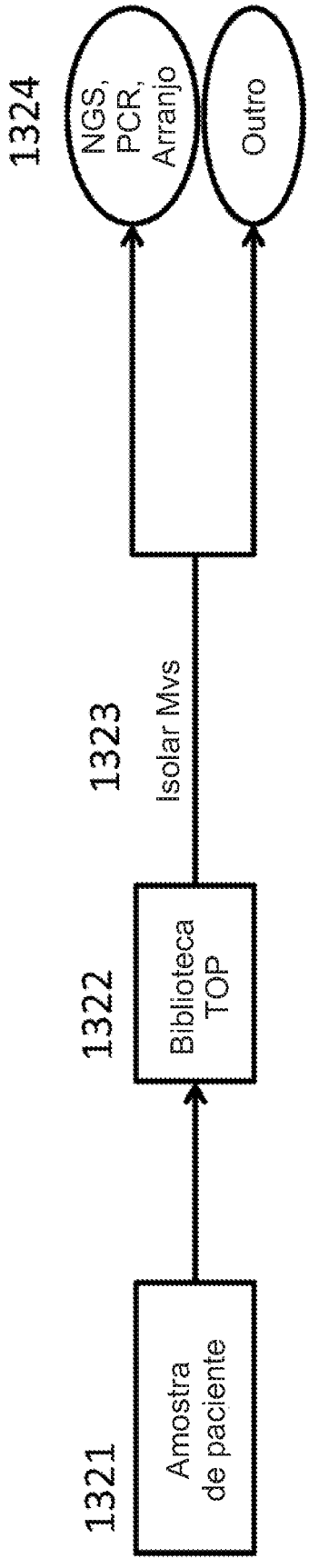

1321
Amostra de paciente
1322
Biblioteca TOP
1323
Isolar Mvs
1324
NGS, PCR, Arranjo
Outro

FIG. 13I

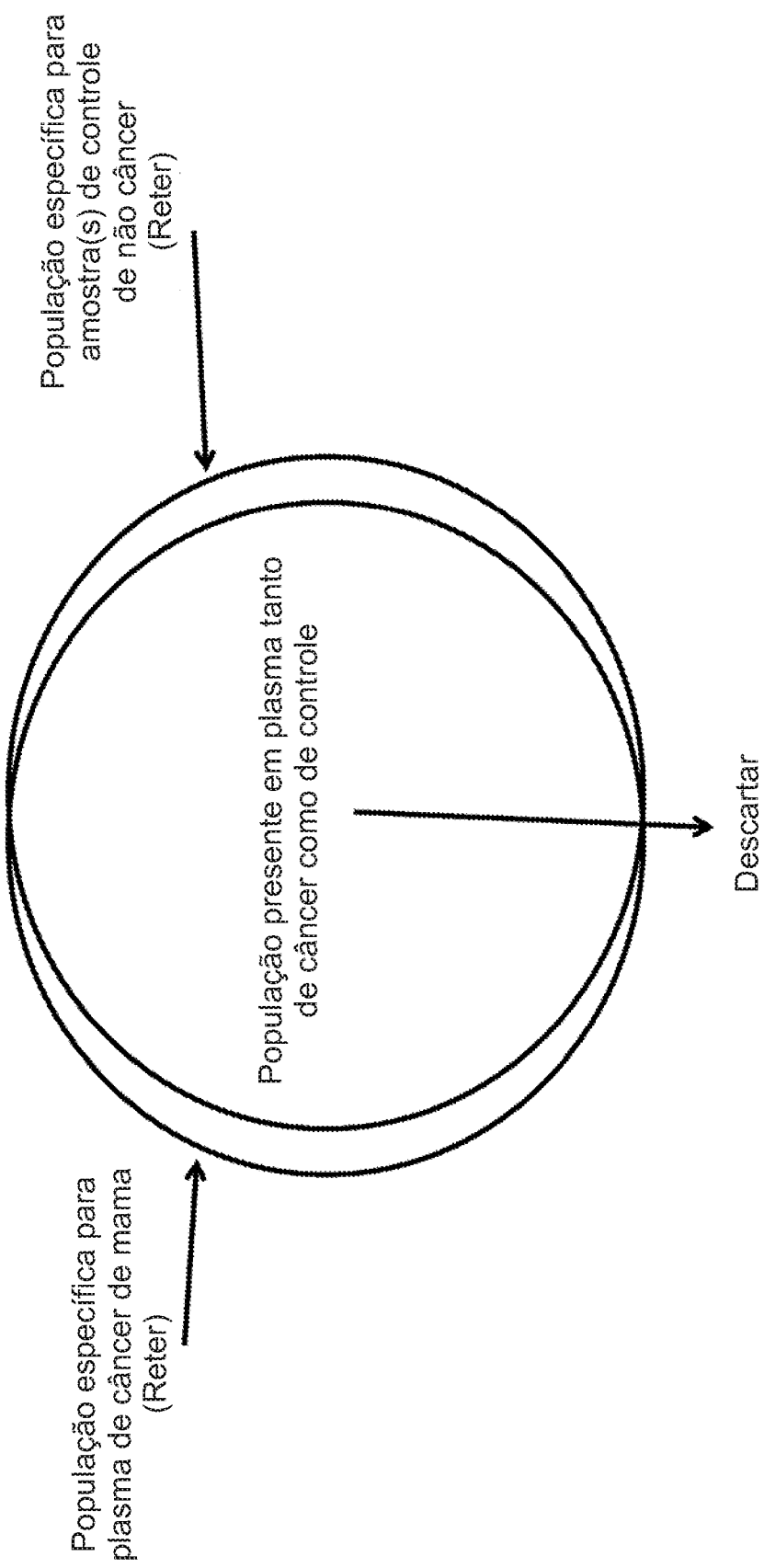

População específica para amostra(s) de controle de não câncer (Reter)
População presente em plasma tanto de câncer como de controle
Descartar
População específica para plasma de câncer de mama (Reter)

FIG. 14A

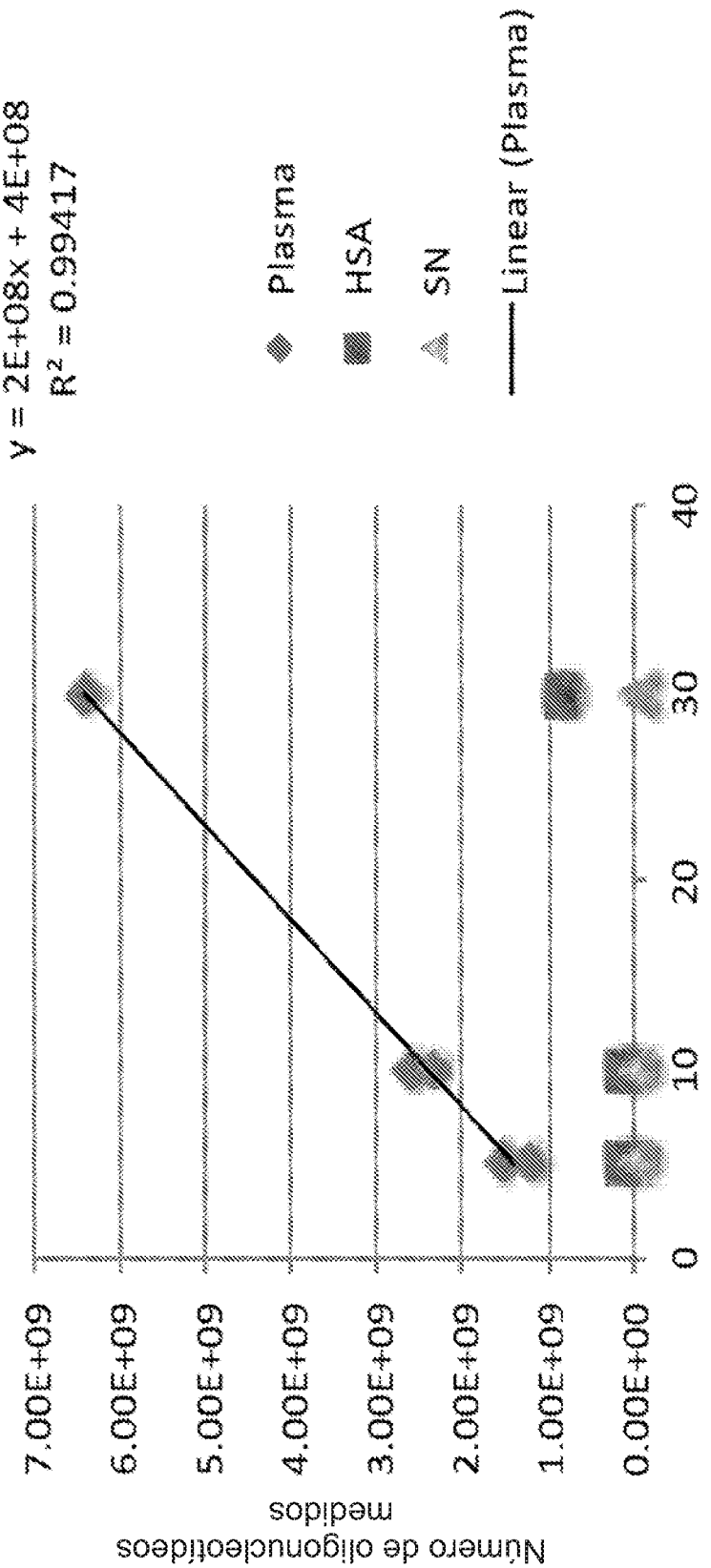

y = 2E+08x + 4E+08
R² = 0.99417
Plasma
HSA
SN
Linear (Plasma)
Número de oligonucleotídeos medidos
7.00E+09
6.00E+09
5.00E+09
4.00E+09
3.00E+09
2.00E+09
1.00E+09
0.00E+00
0
10
20
30
40
Entrada

FIG. 14B

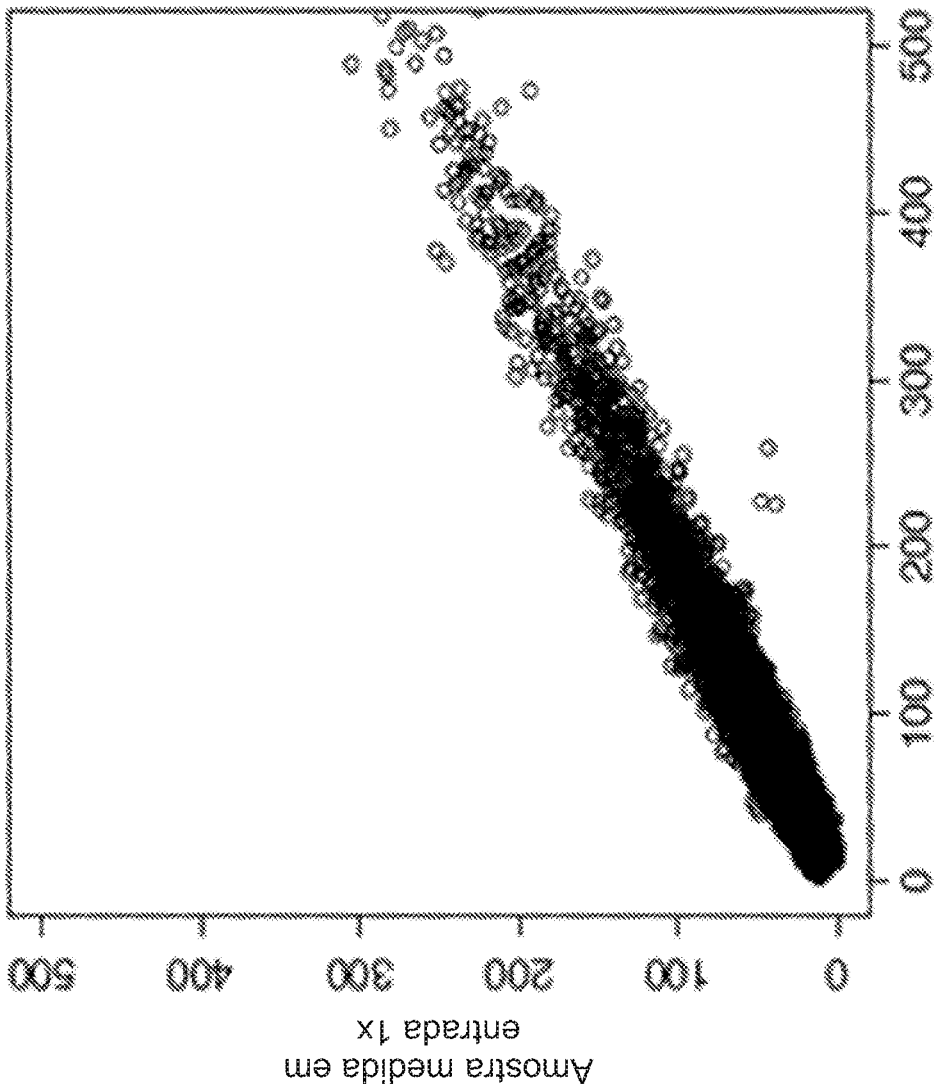

Amostra medida em entrada 1x
0
100
200
300
400
500
Amostra medida em entrada 2x
0
100
200
300
400
500

FIG. 14C

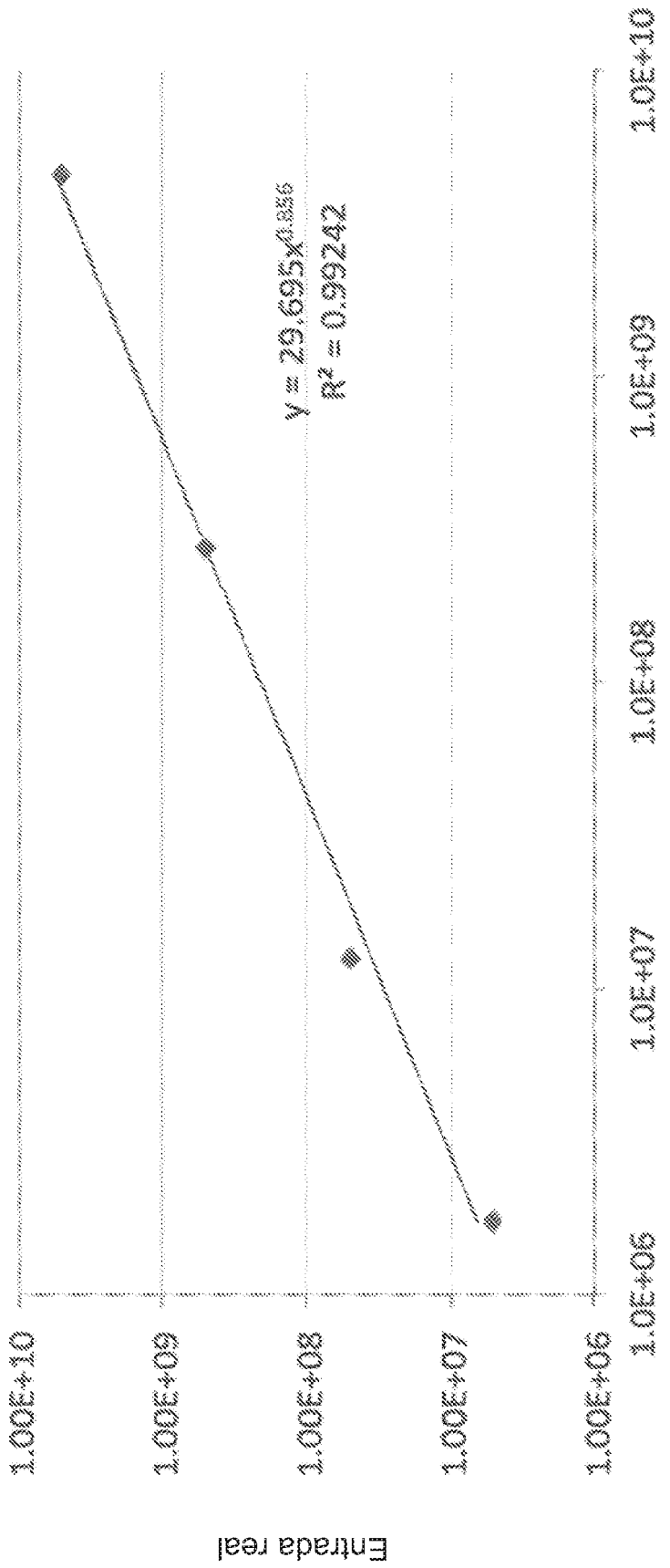

1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
Entrada real
1.0E+06
1.0E+07
1.0E+08
1.0E+09
1.0E+10
Saída medida
y = 29.695x^0.8356
R² = 0.99242

FIG. 14D

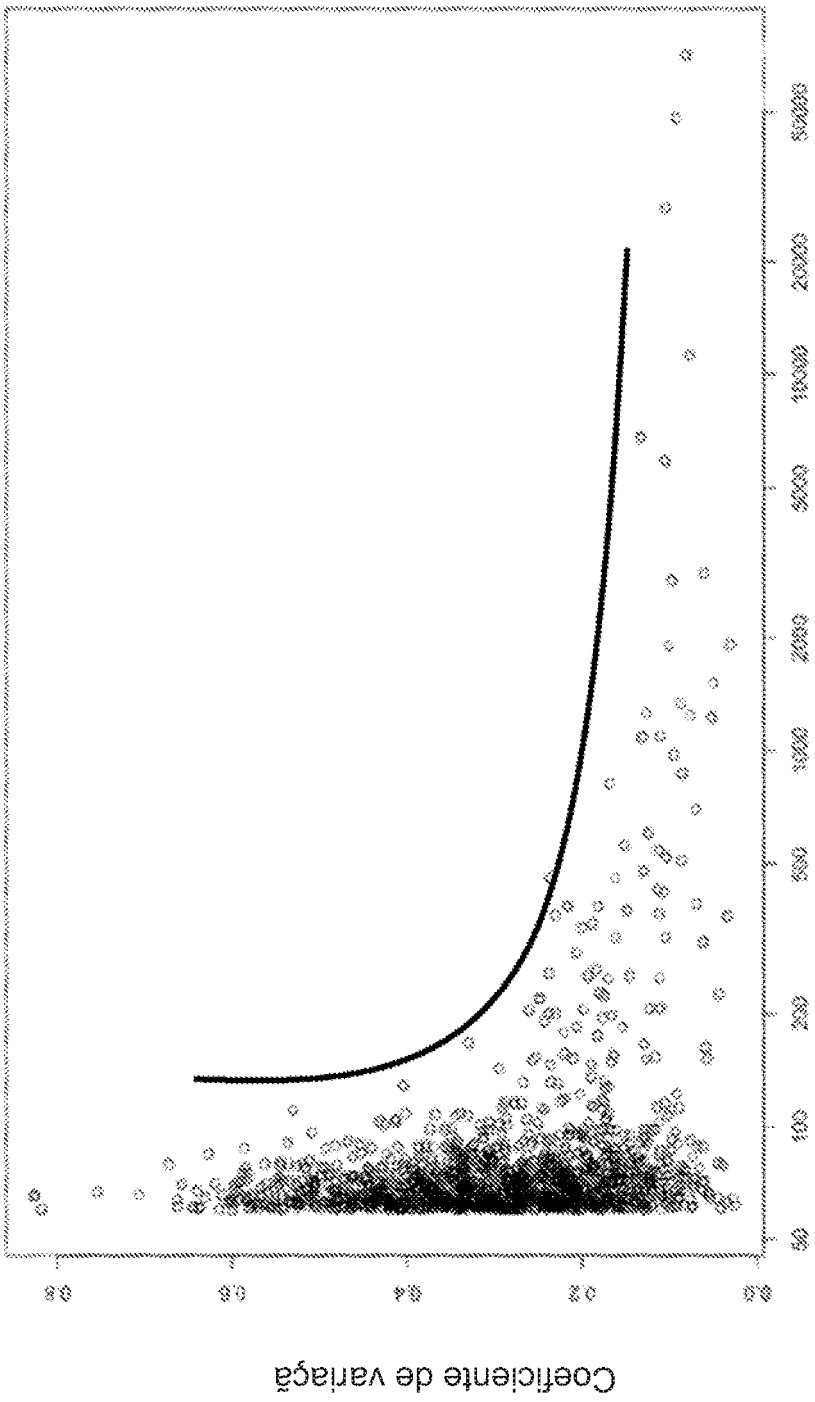

Coeficiente de variação
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
Número de oligonucleotídeos detectados
50
100
200
500
1000
2000
5000
10000
20000
50000

FIG. 14E

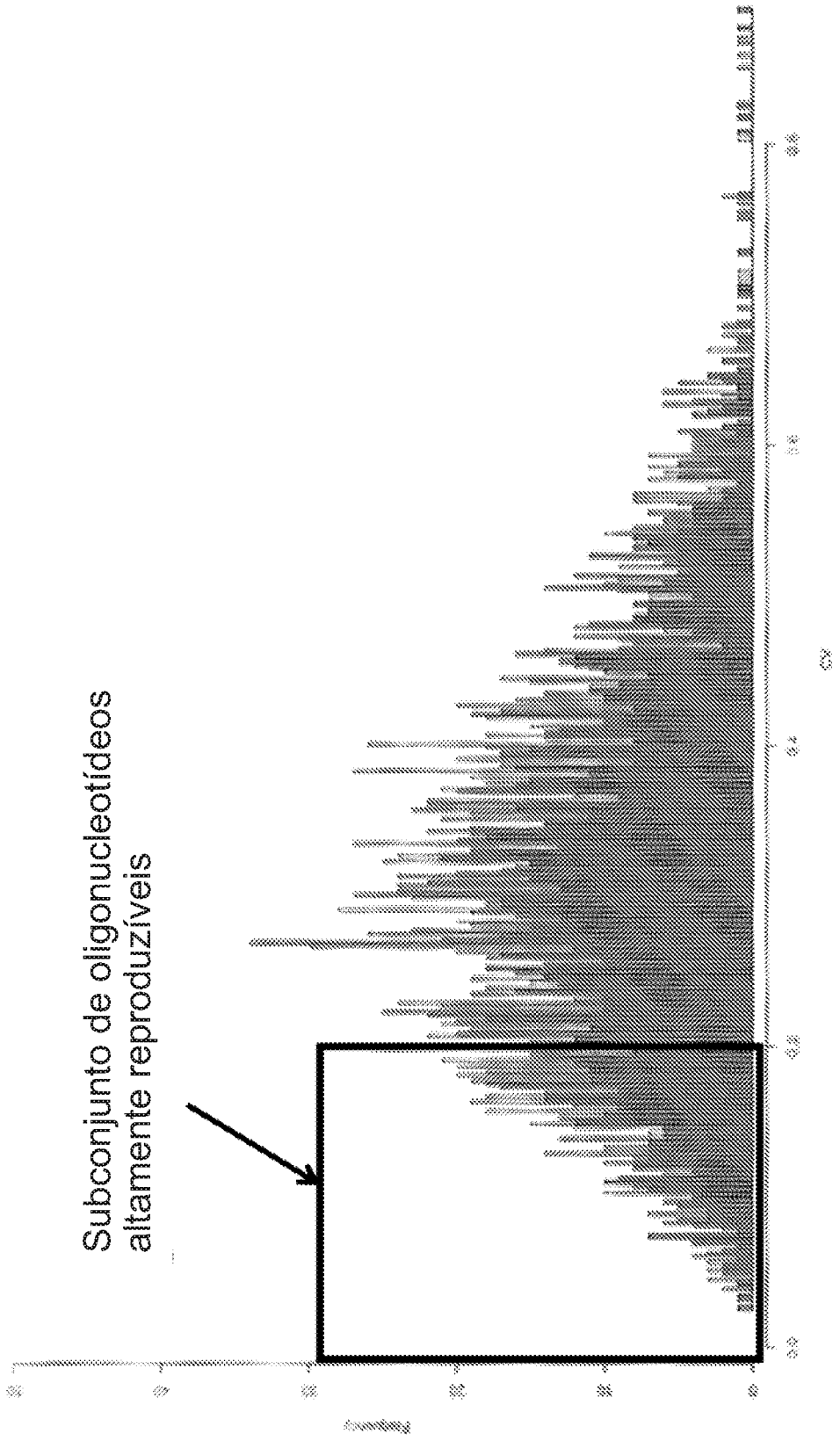

Subconjunto de oligonucleotídeos altamente reproduzíveis

FIG. 14F

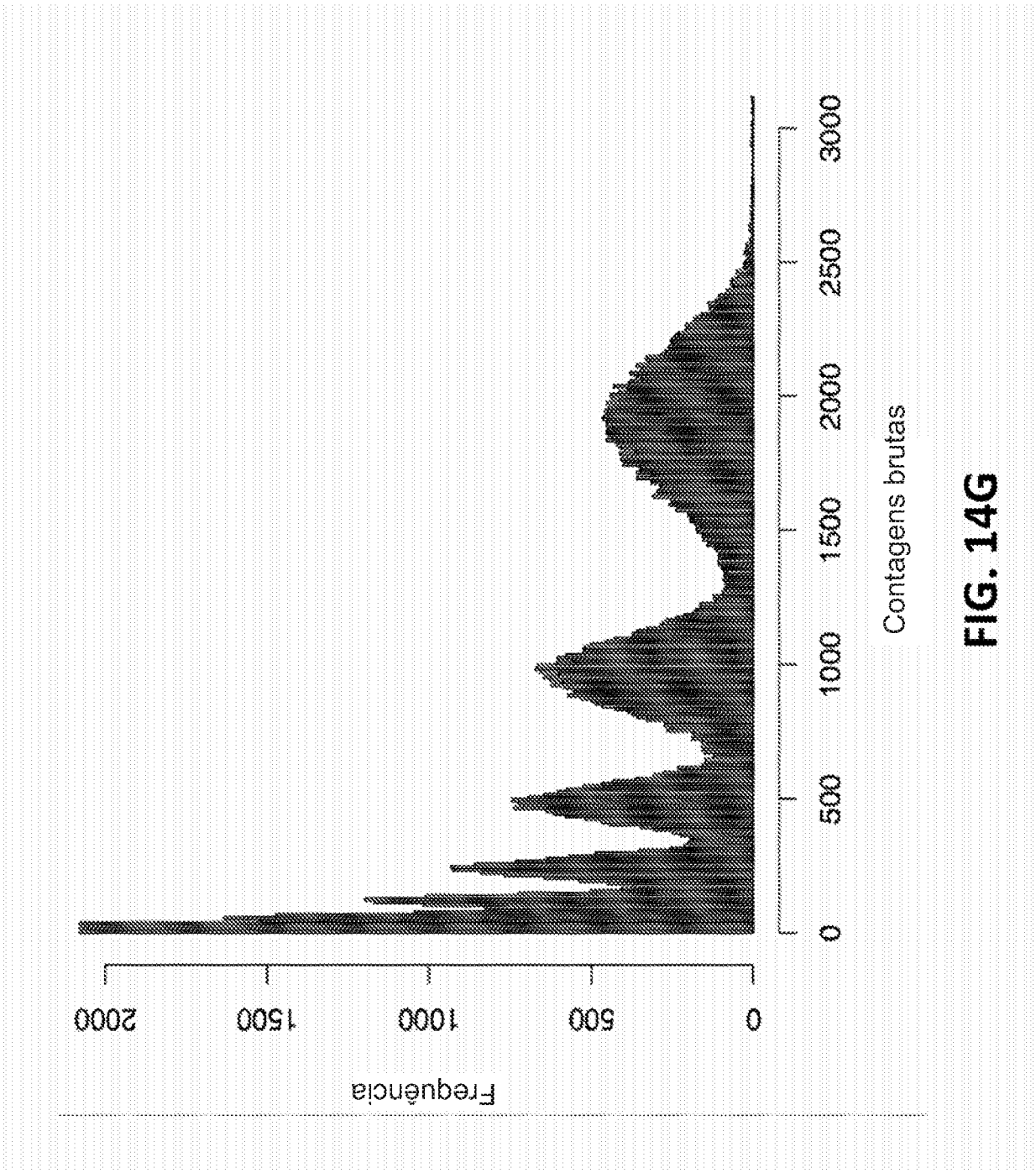

Frequência
0
500
1000
1500
2000
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
Contagens brutas

FIG. 14G

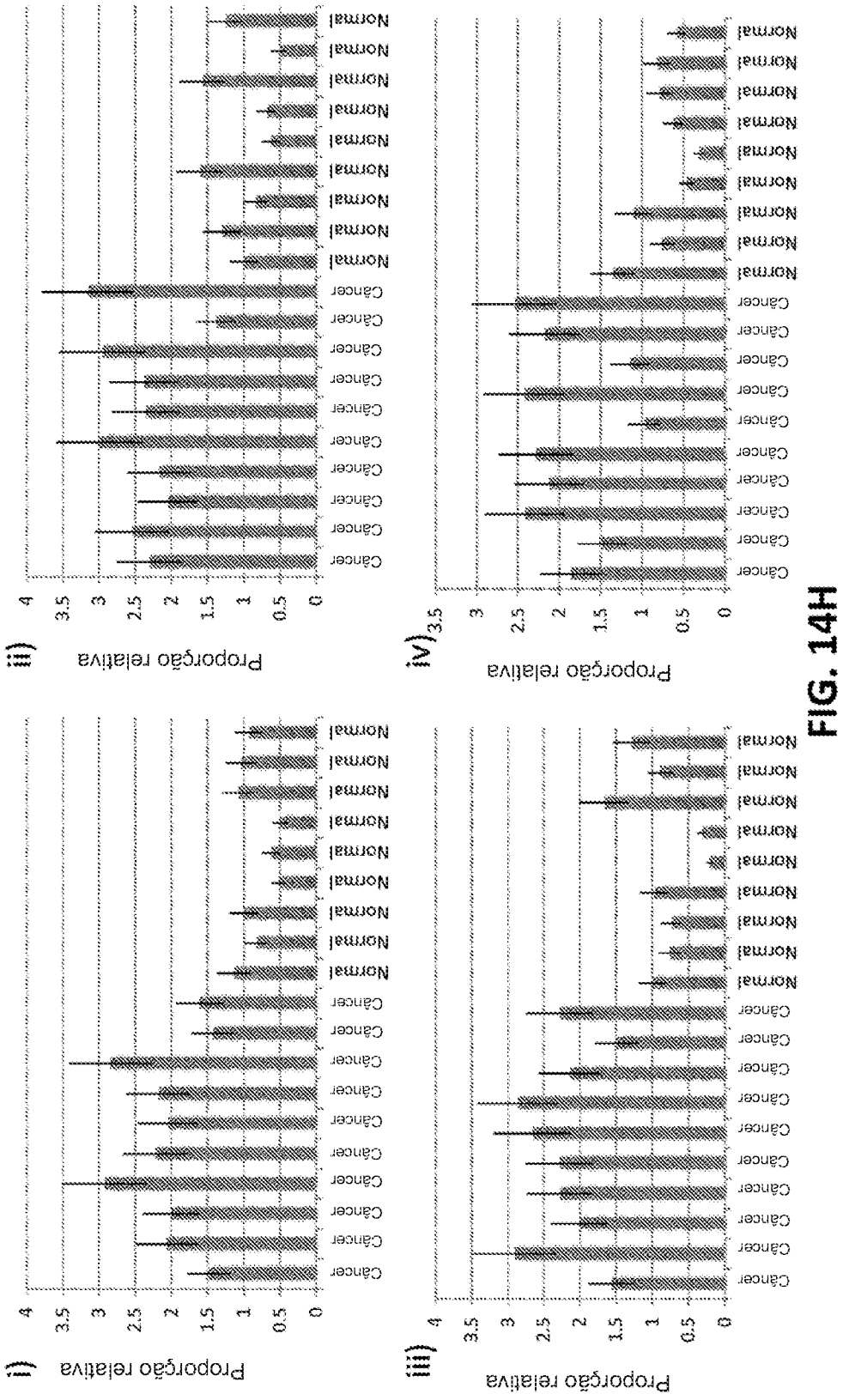


FIG. 14H

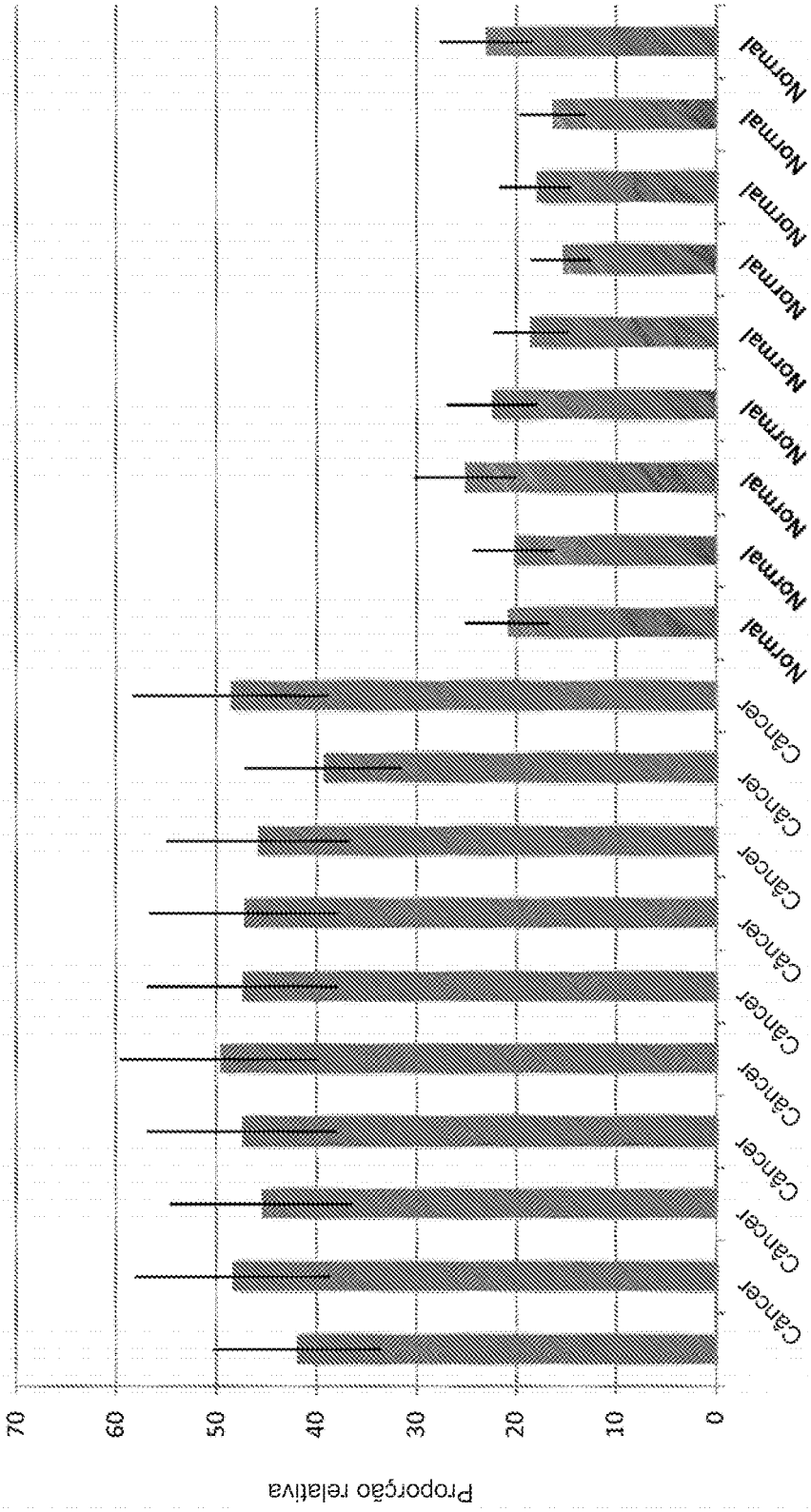

Proporção relativa
70
60
50
40
30
20
10
0
Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer

FIG. 14I

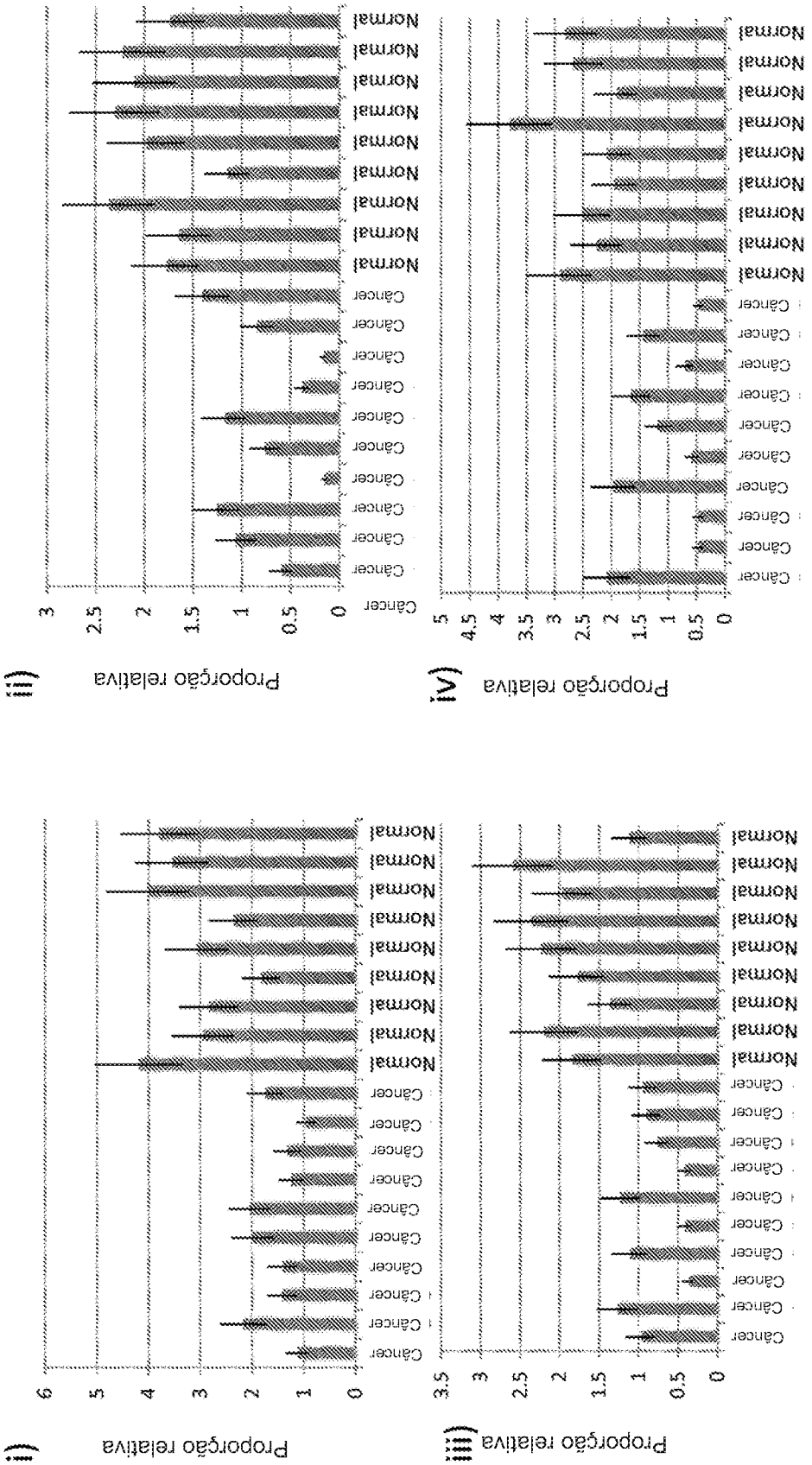

i)
Proporção relativa
ii)
Proporção relativa
iii)
Proporção relativa
iv)
Proporção relativa
Cancer
Normal

FIG. 14J

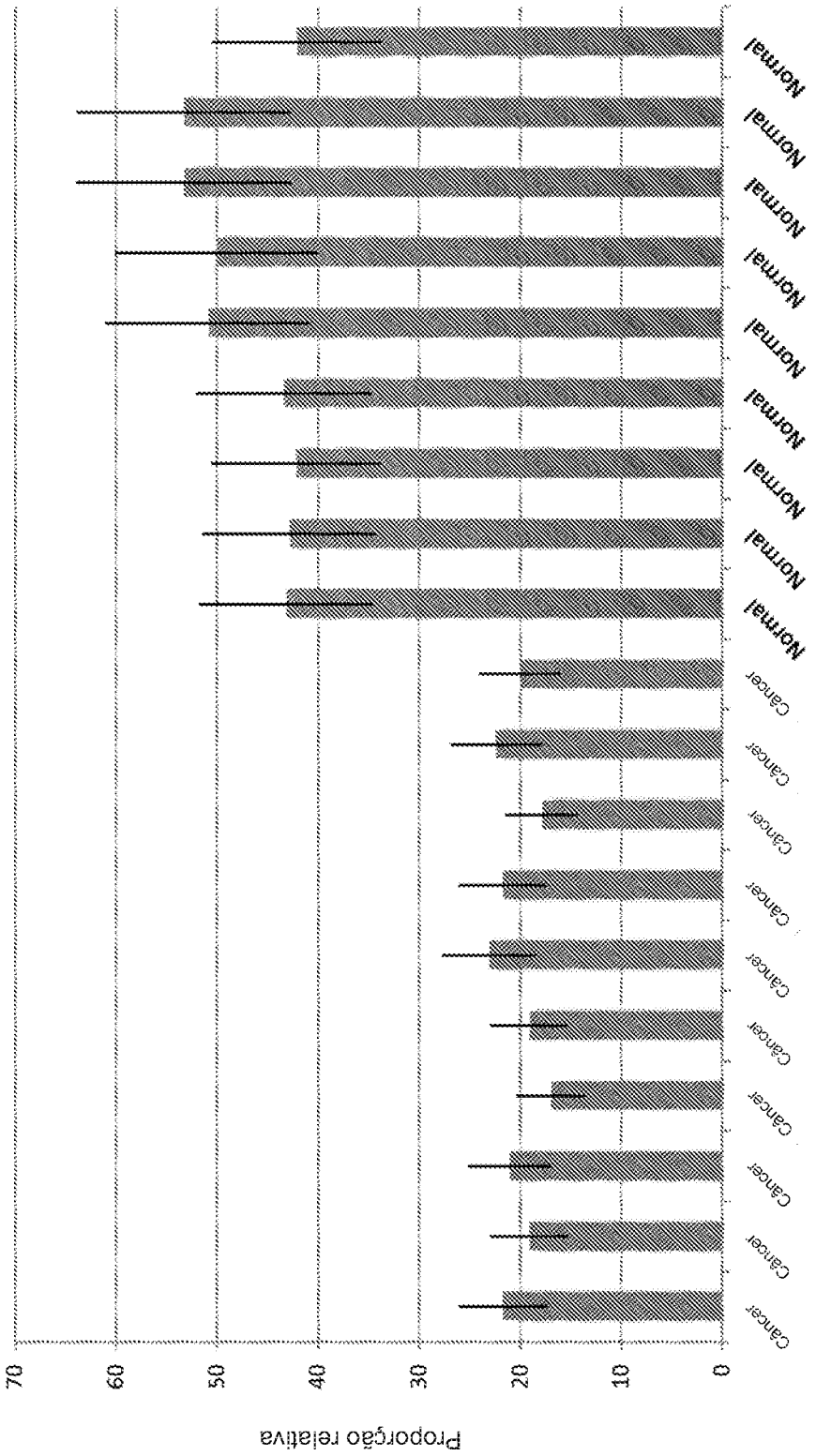

Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Normal
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
Cancer
70
60
50
40
30
20
10
0
Proporção relativa

FIG. 14K

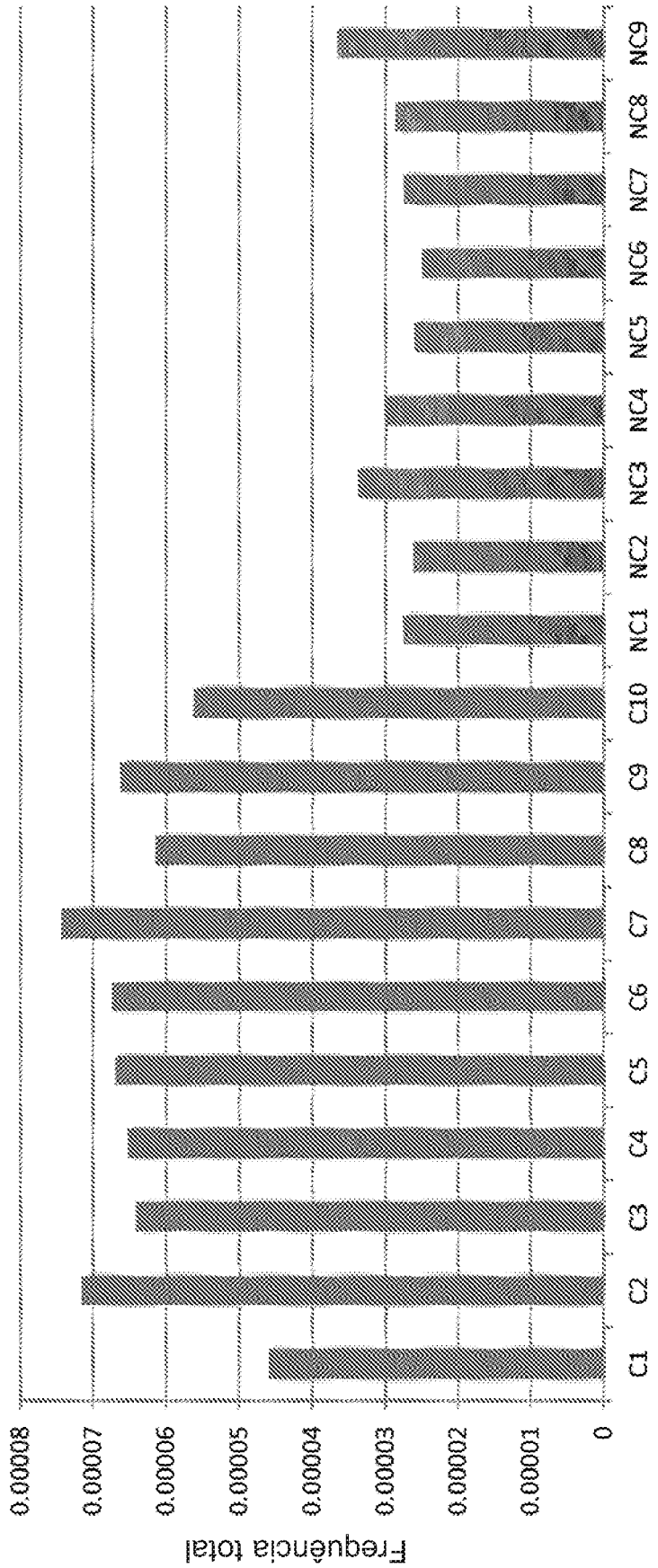

Frequência total
0.00008
0.00007
0.00006
0.00005
0.00004
0.00003
0.00002
0.00001
0
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9
C10
NC1
NC2
NC3
NC4
NC5
NC6
NC7
NC8
NC9

FIG. 14L

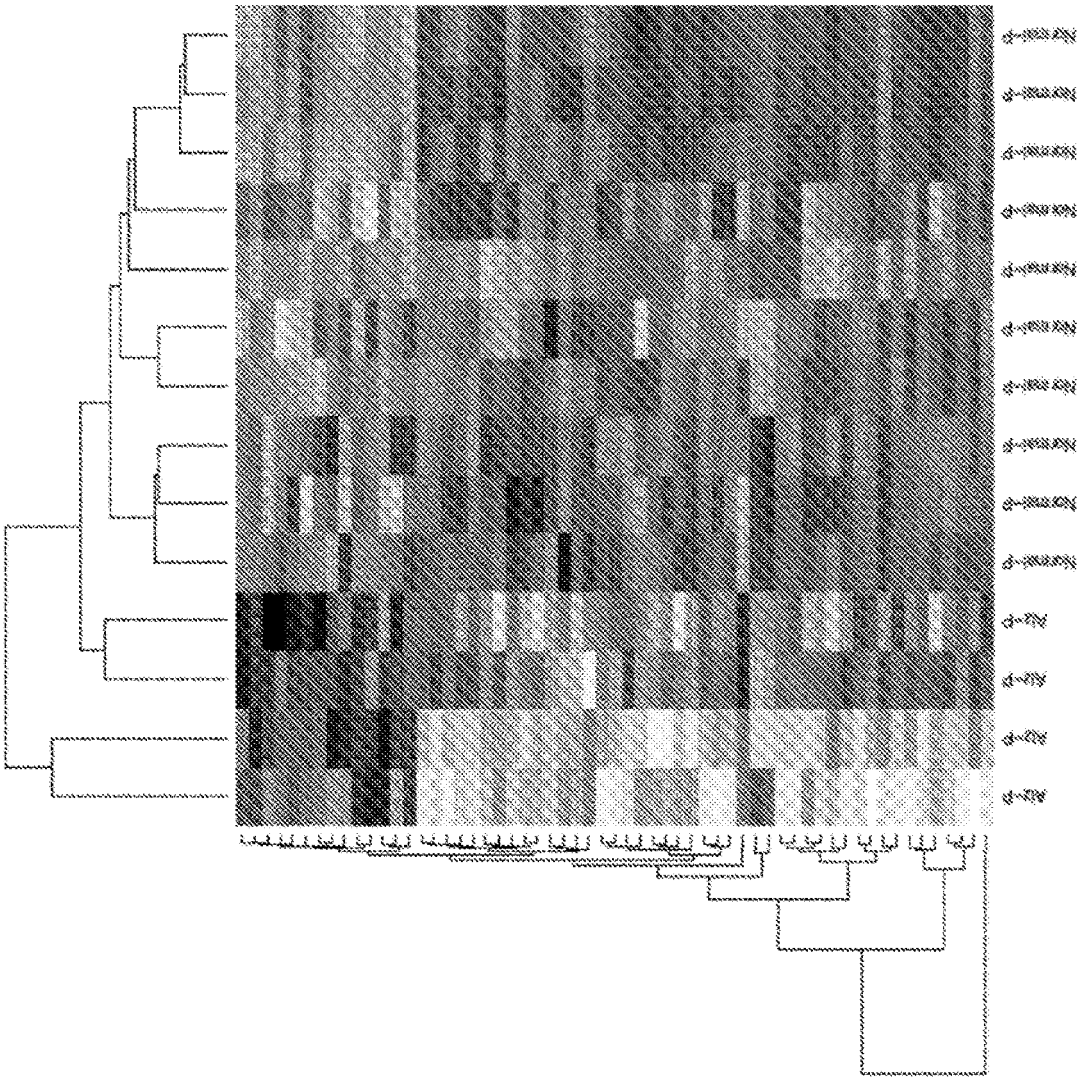


FIG. 15A

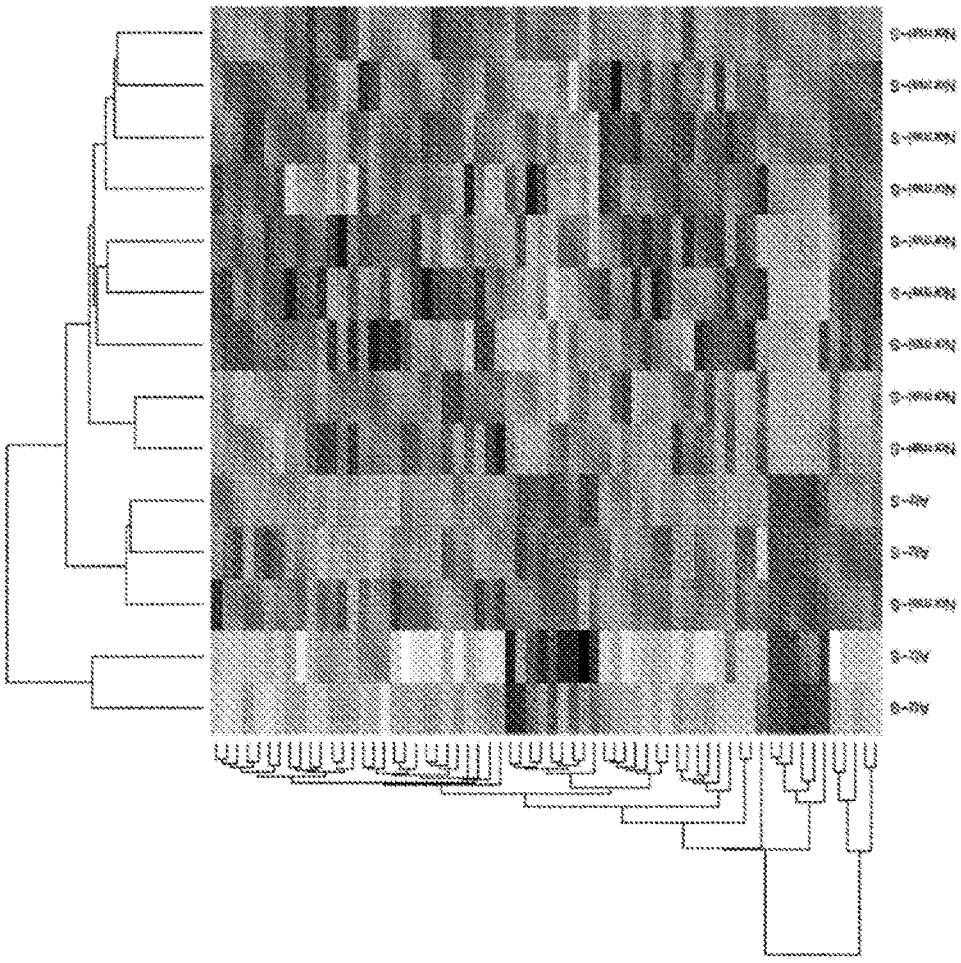


FIG. 15B

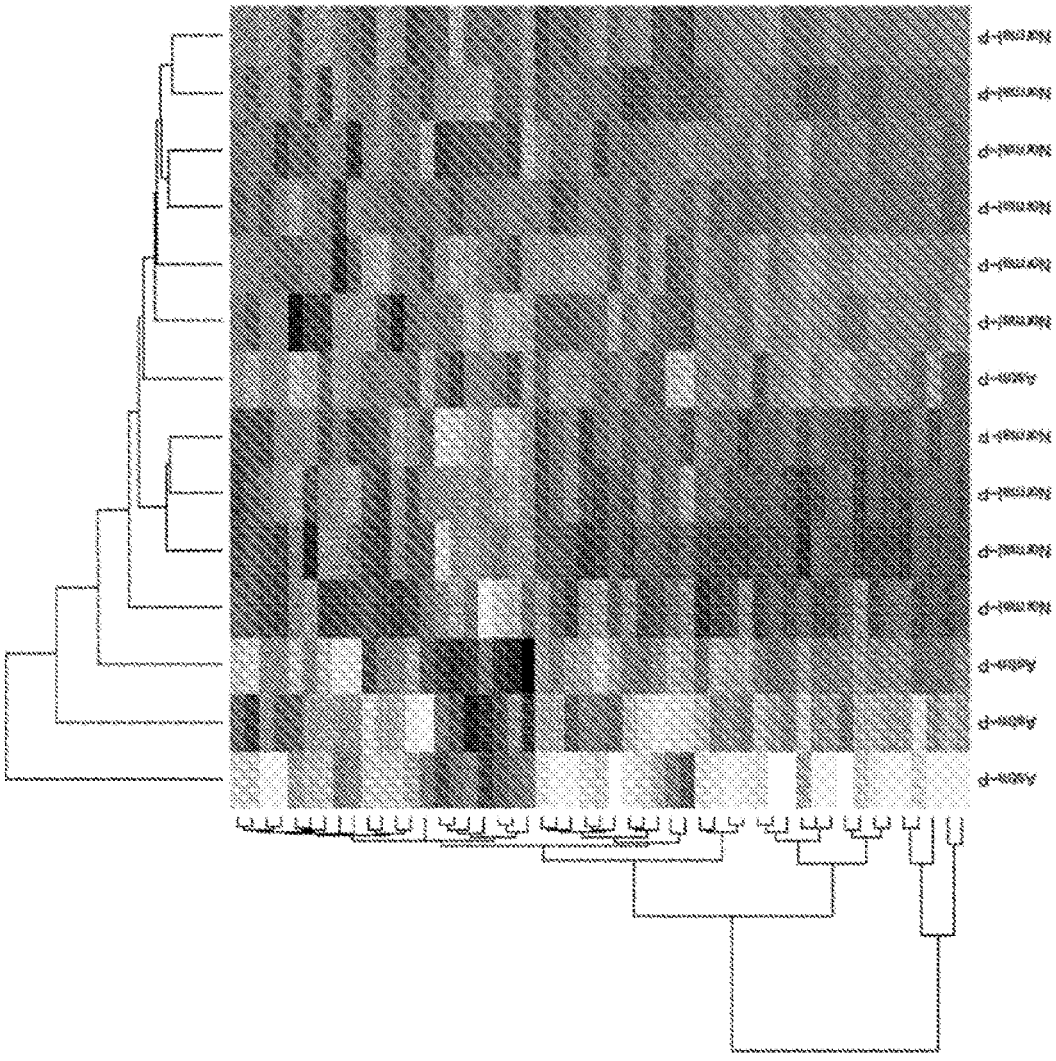


FIG. 15C

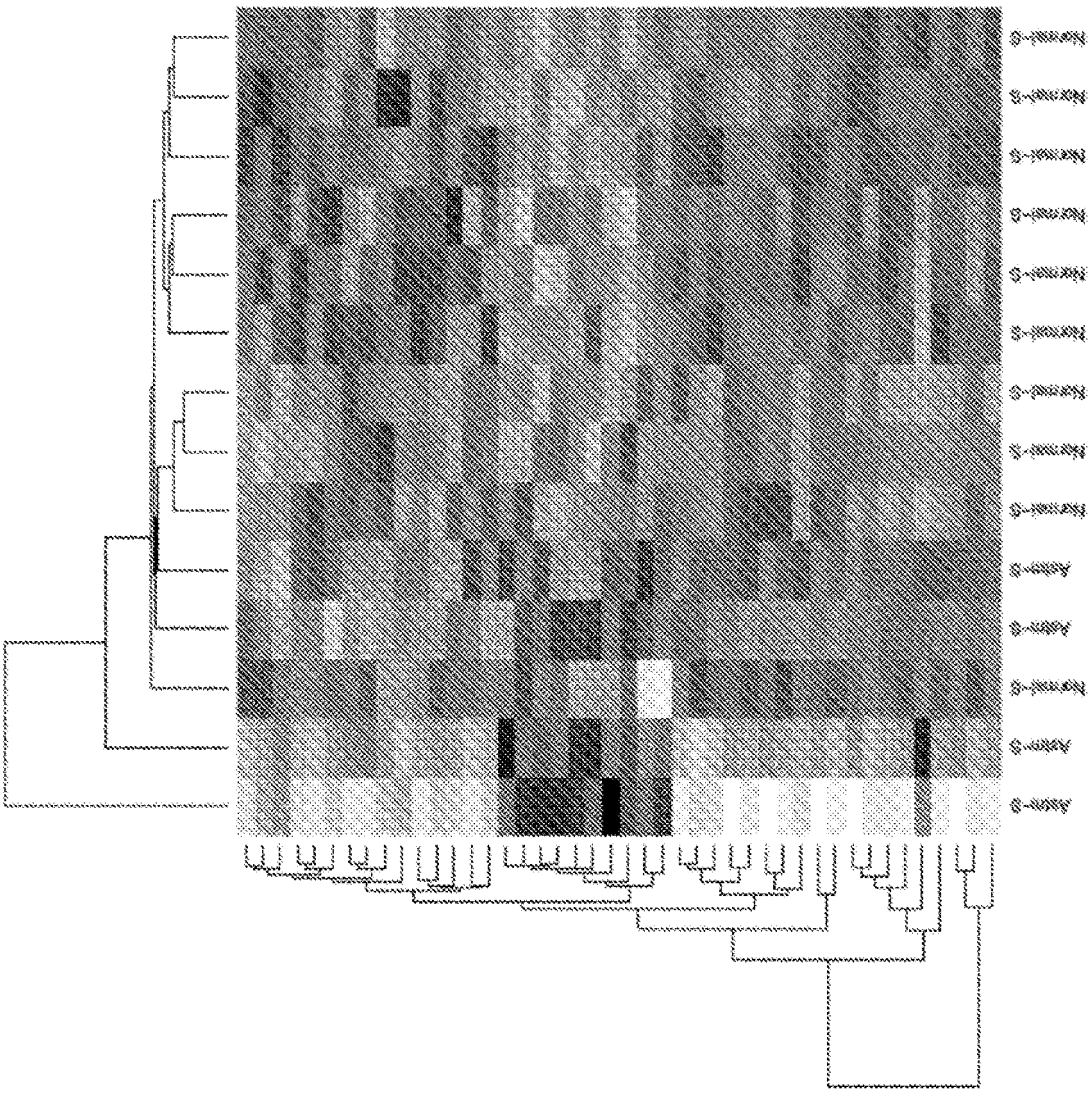


FIG. 15D

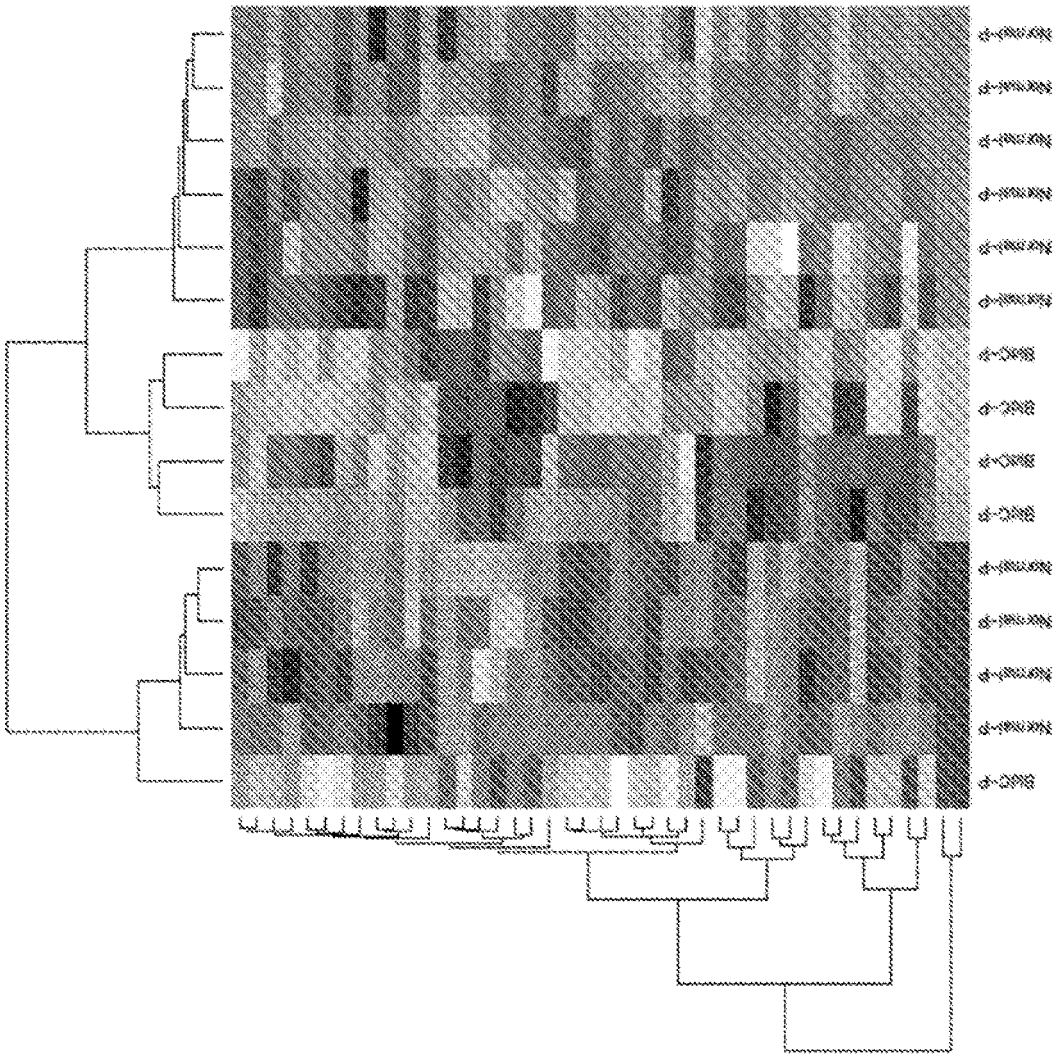


FIG. 15E

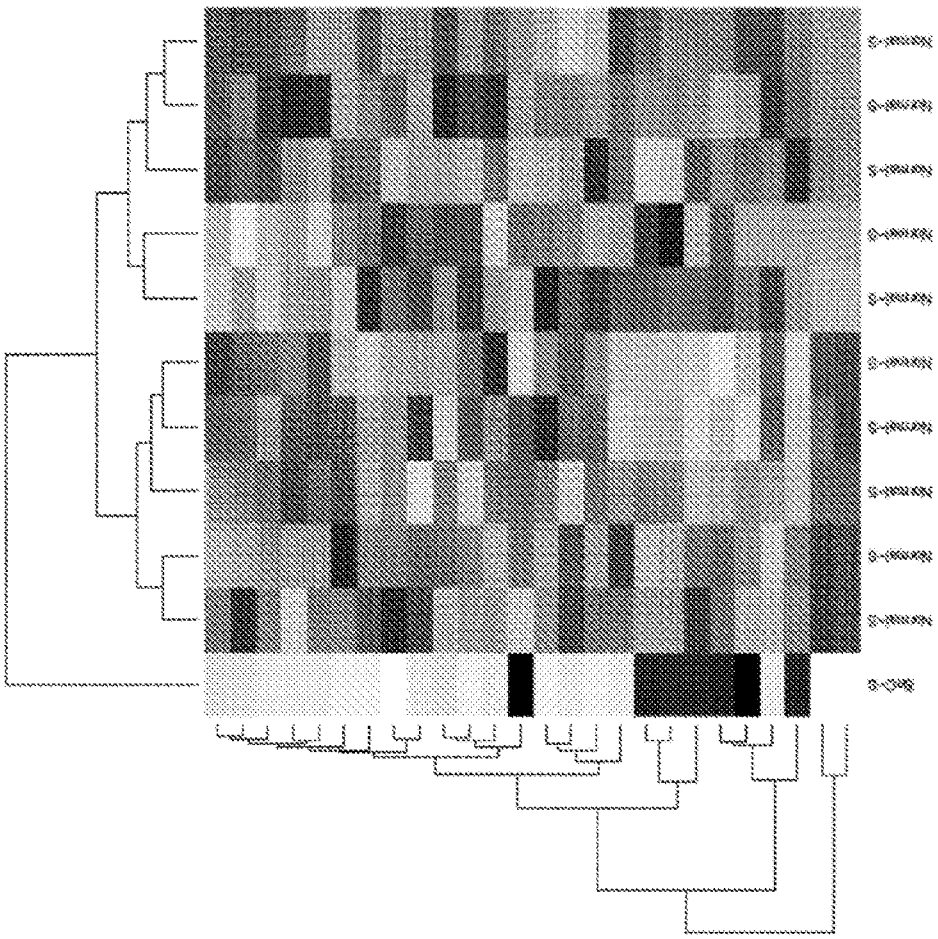


FIG. 15F

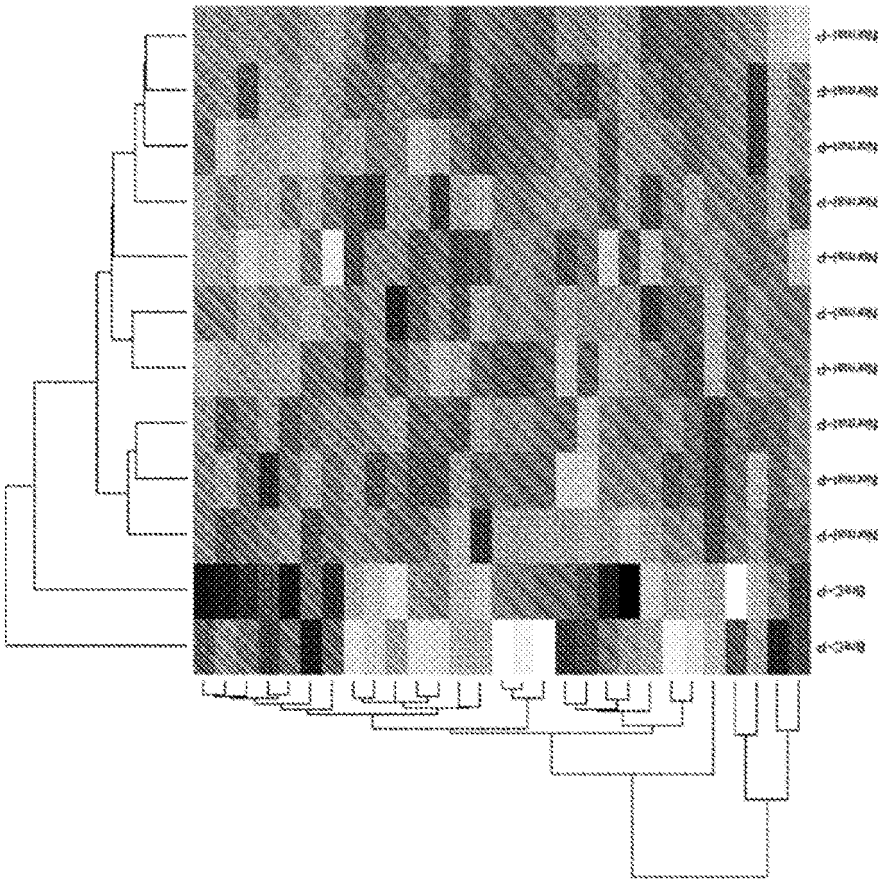


FIG. 15G

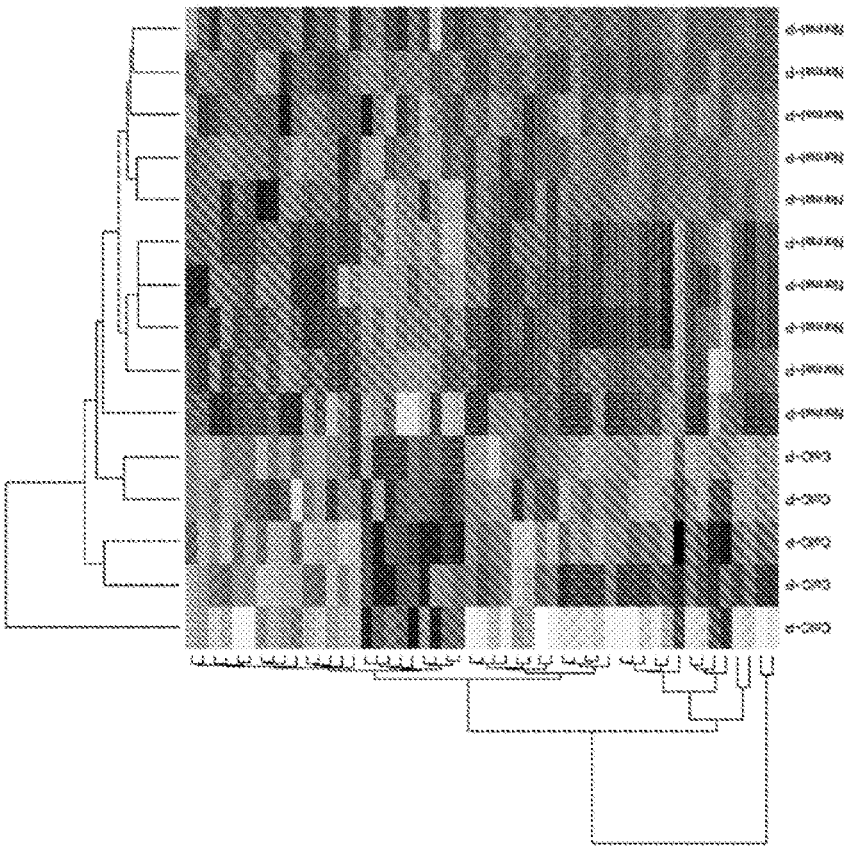


FIG. 15H

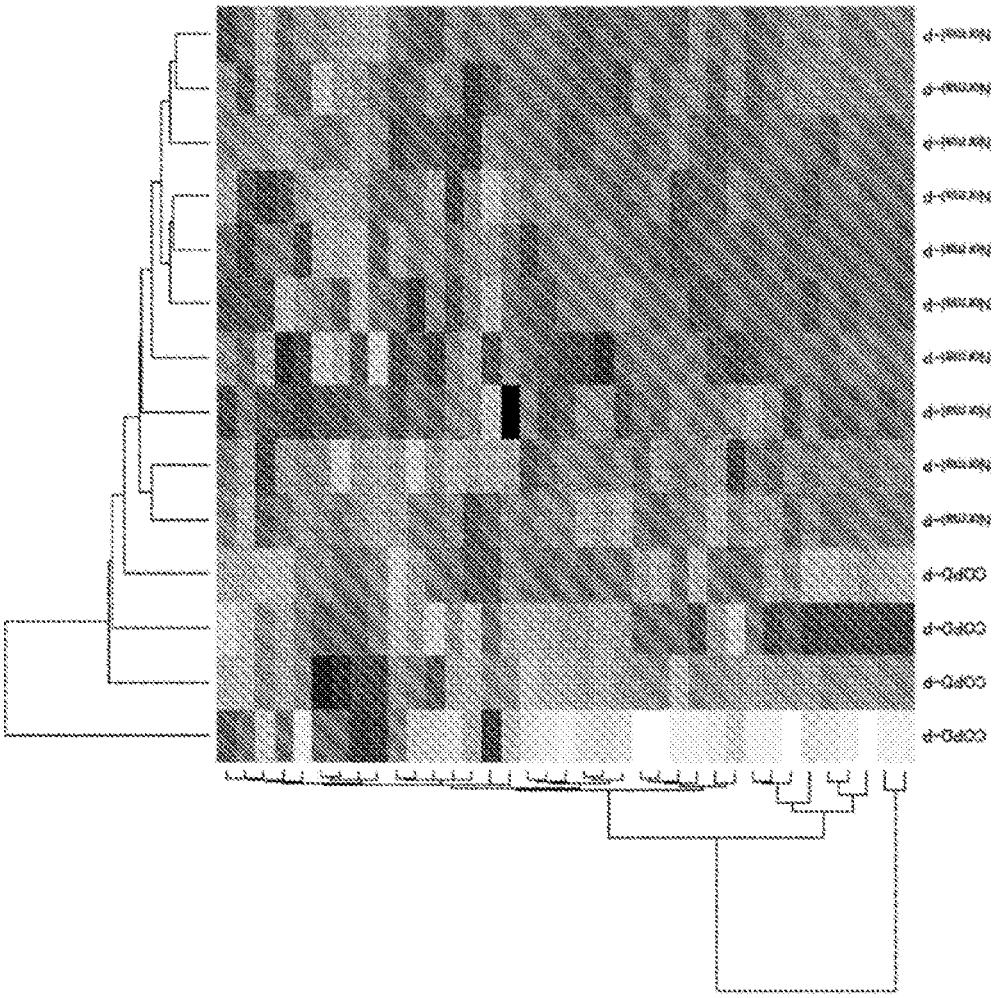


FIG. 15I

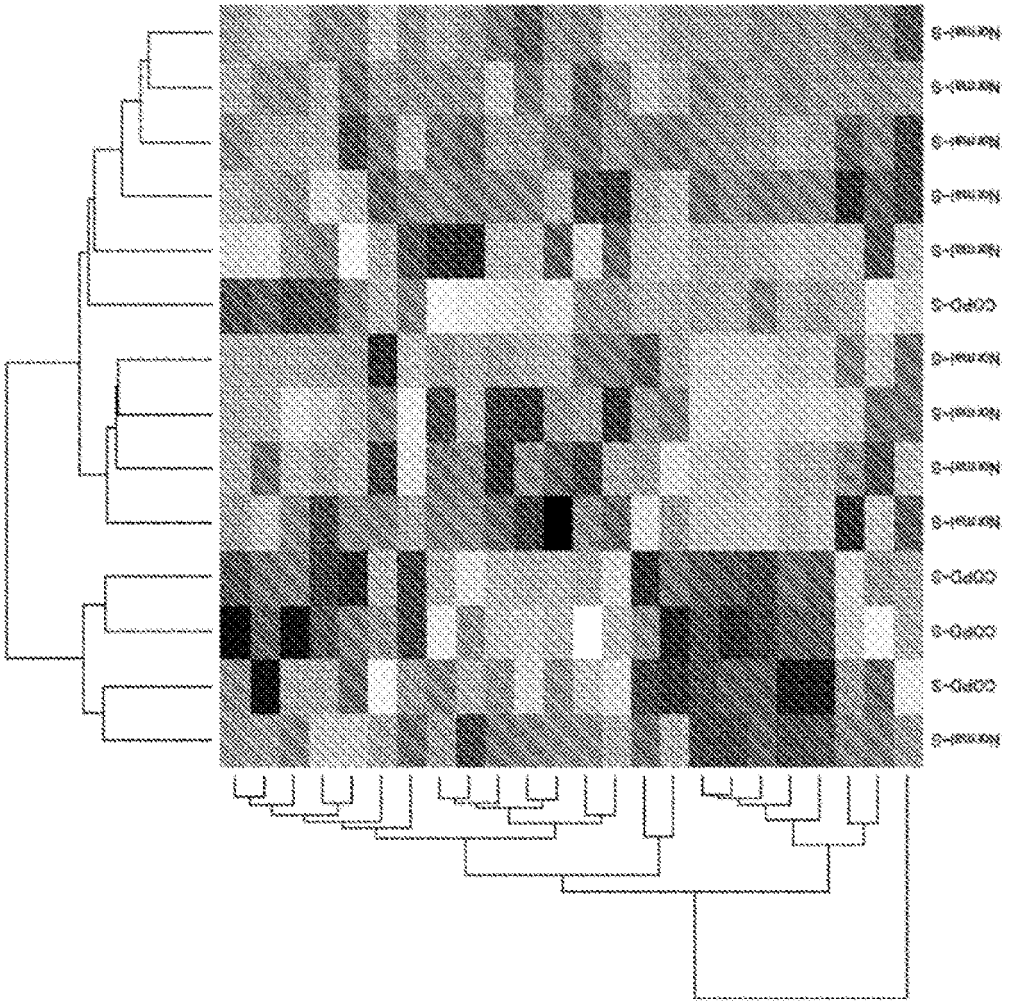


FIG. 15J

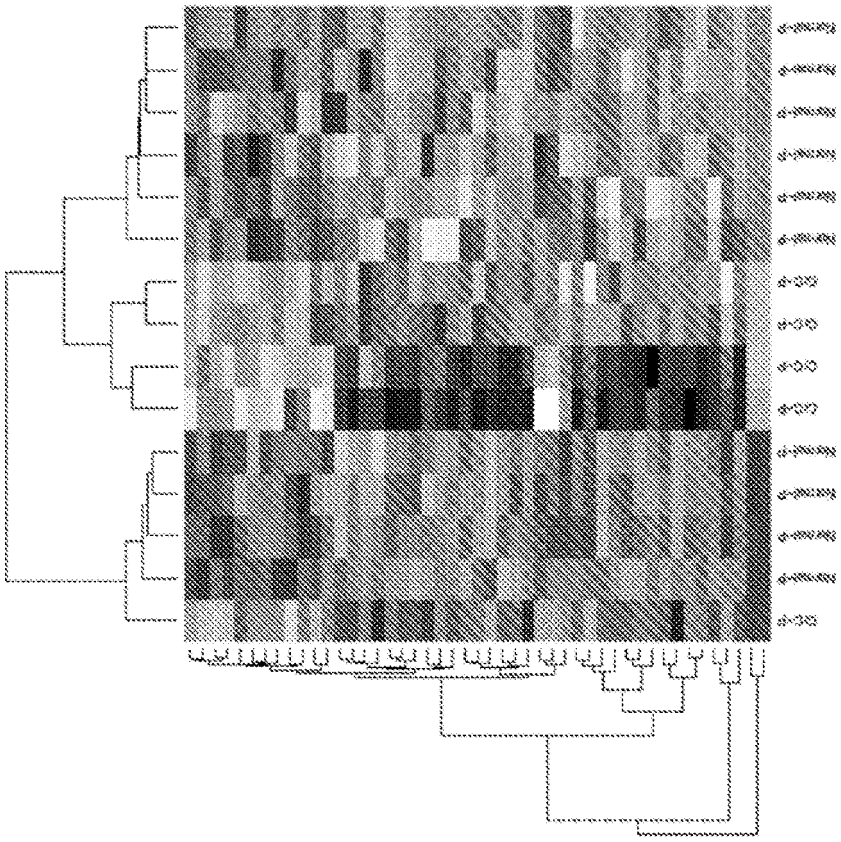


FIG. 15K

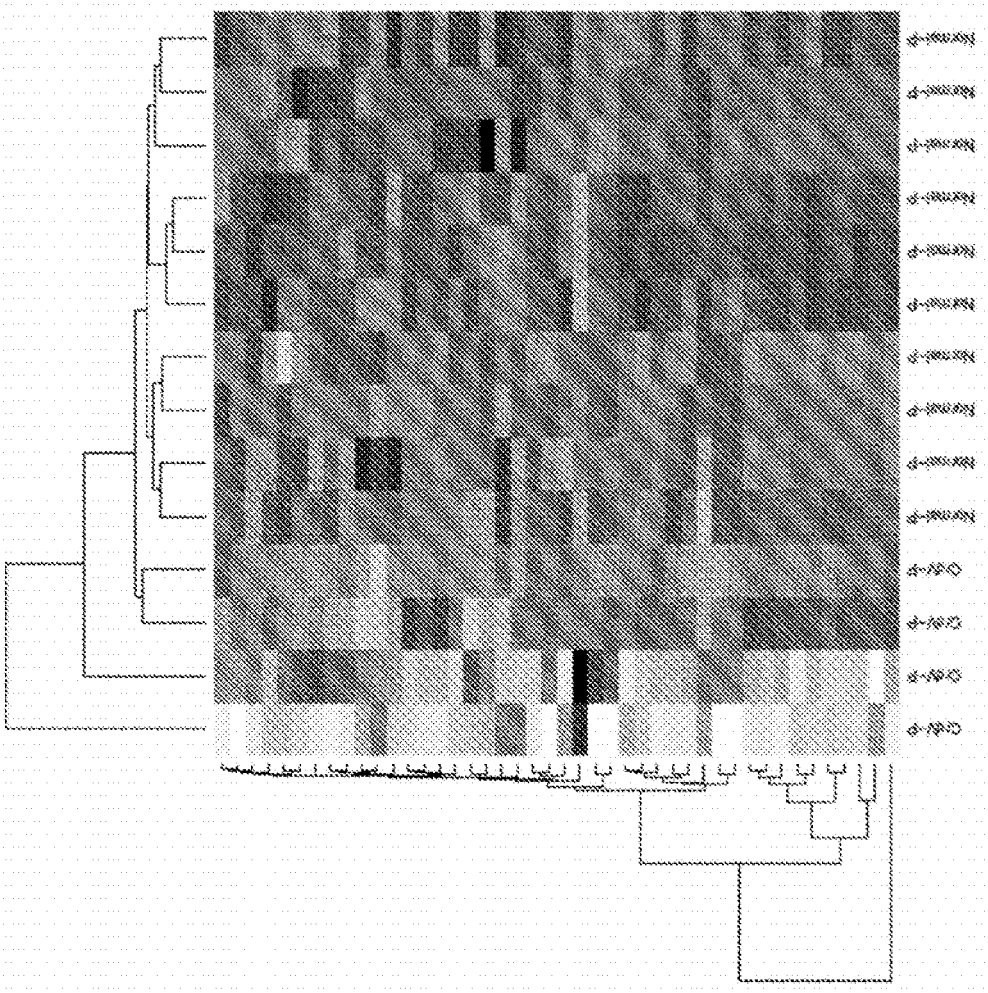


FIG. 15L

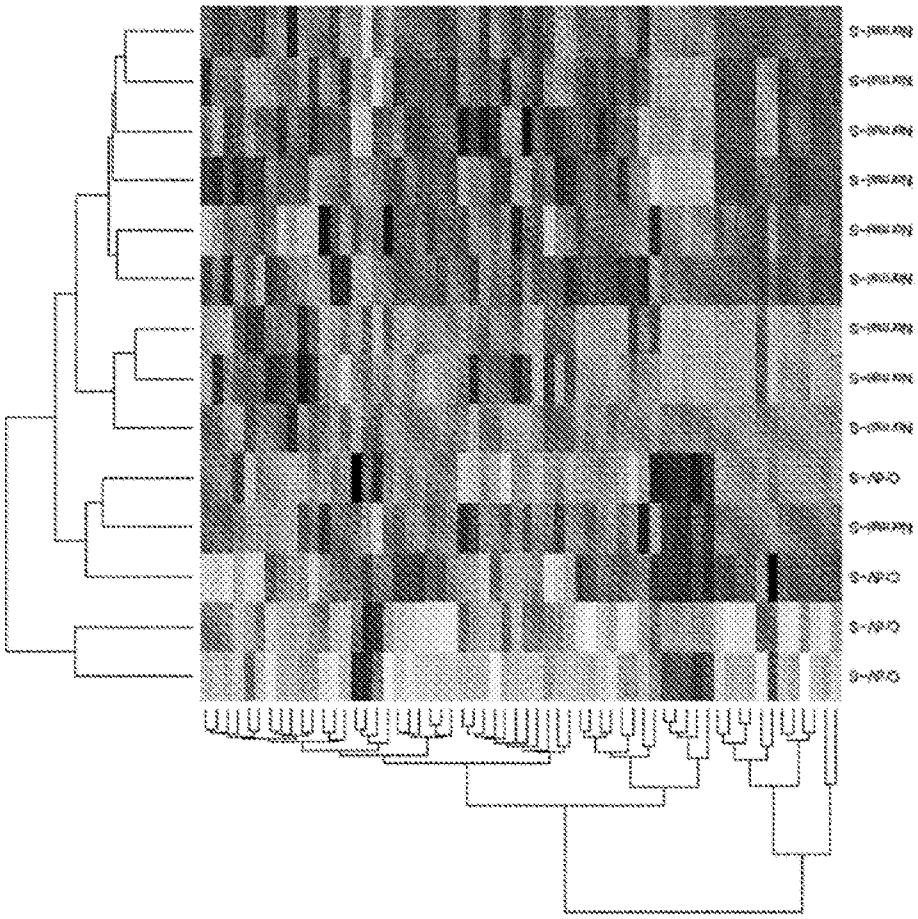


FIG. 15M

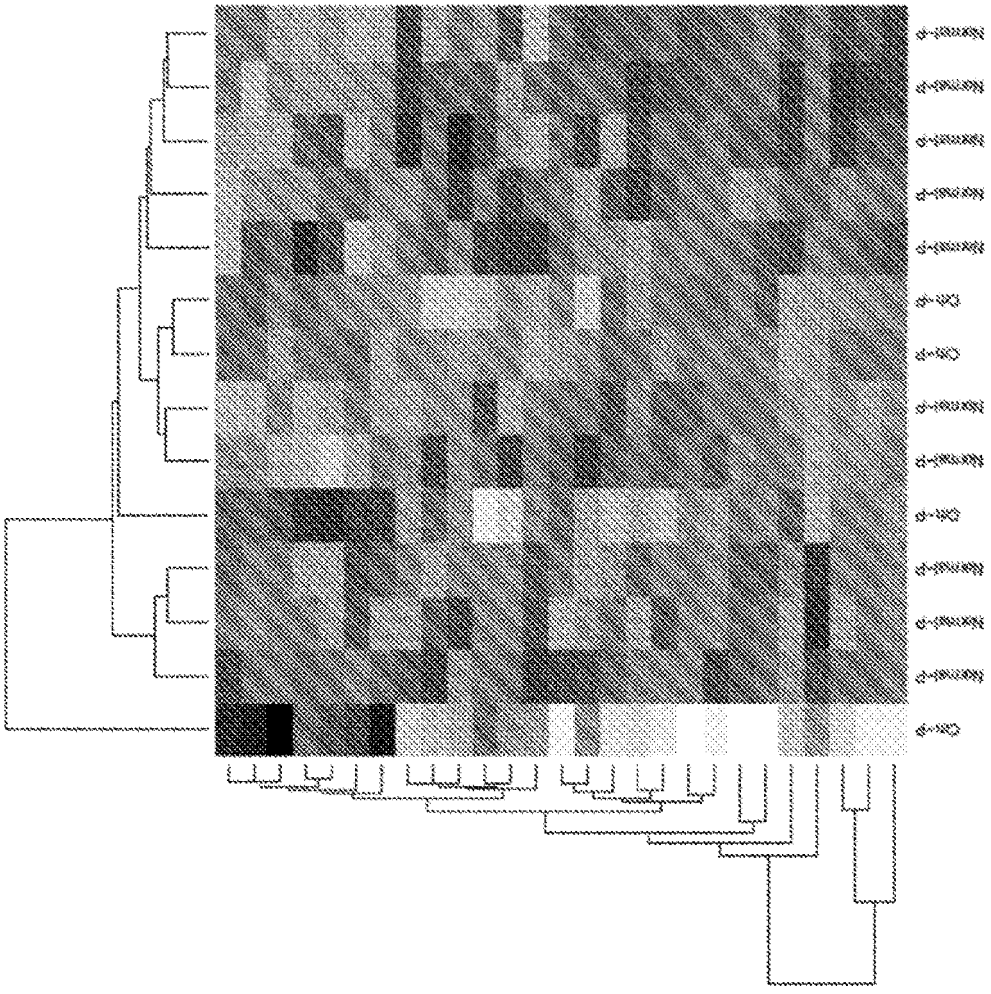


FIG. 15N

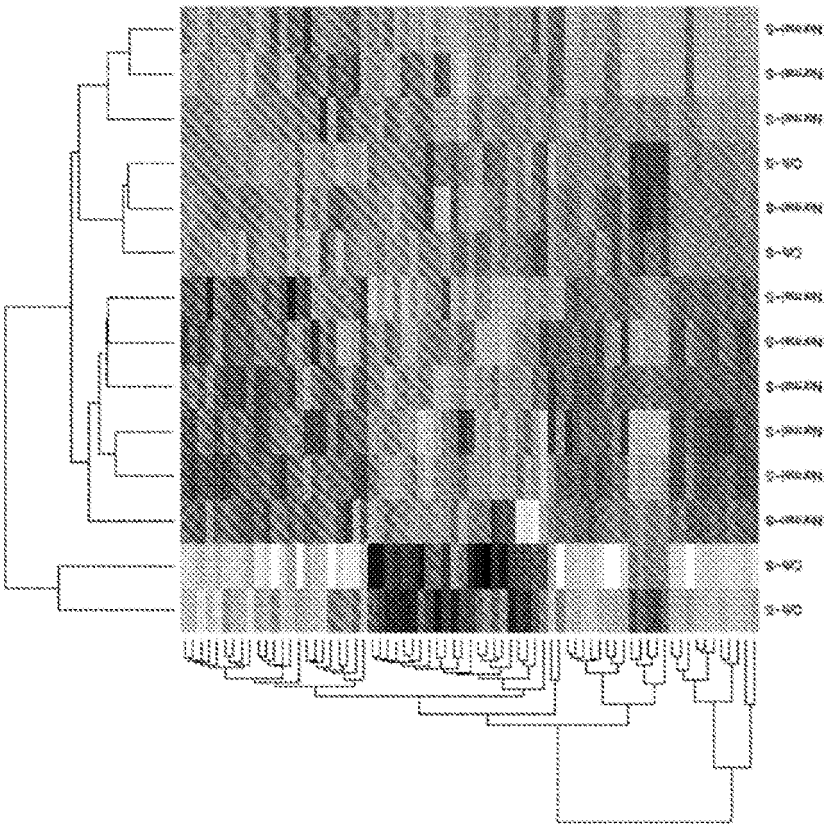


FIG. 15O

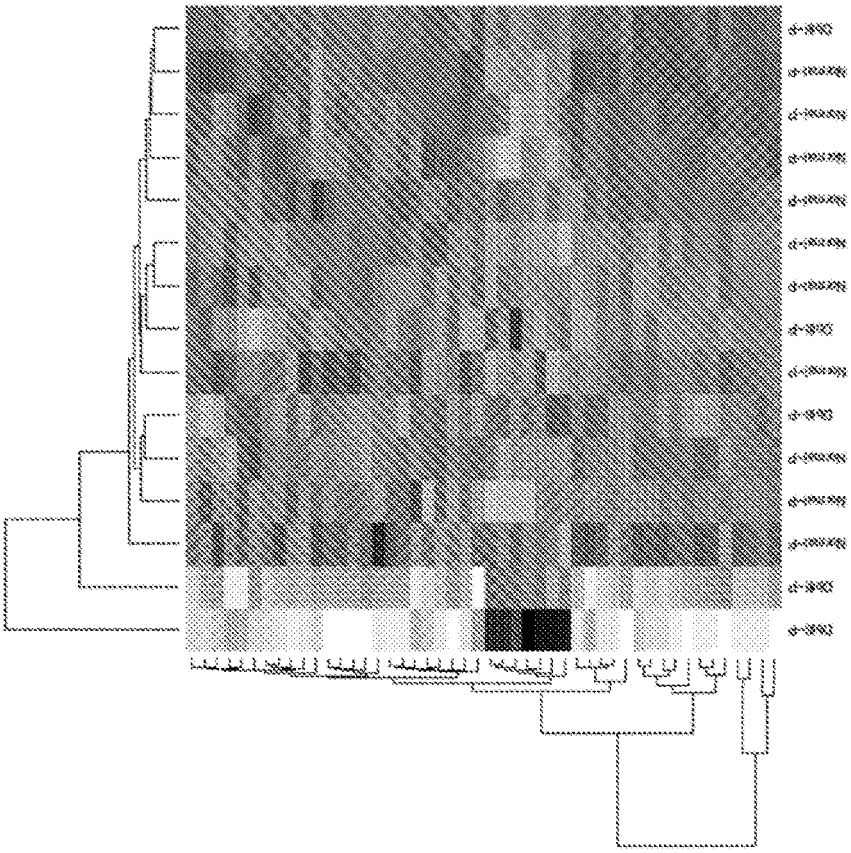


FIG. 15P

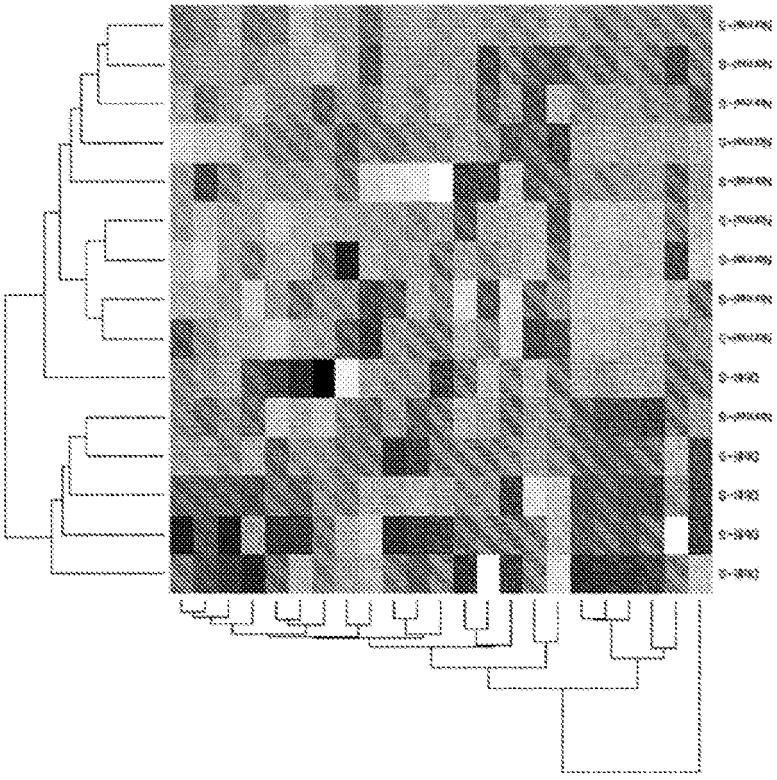


FIG. 15Q

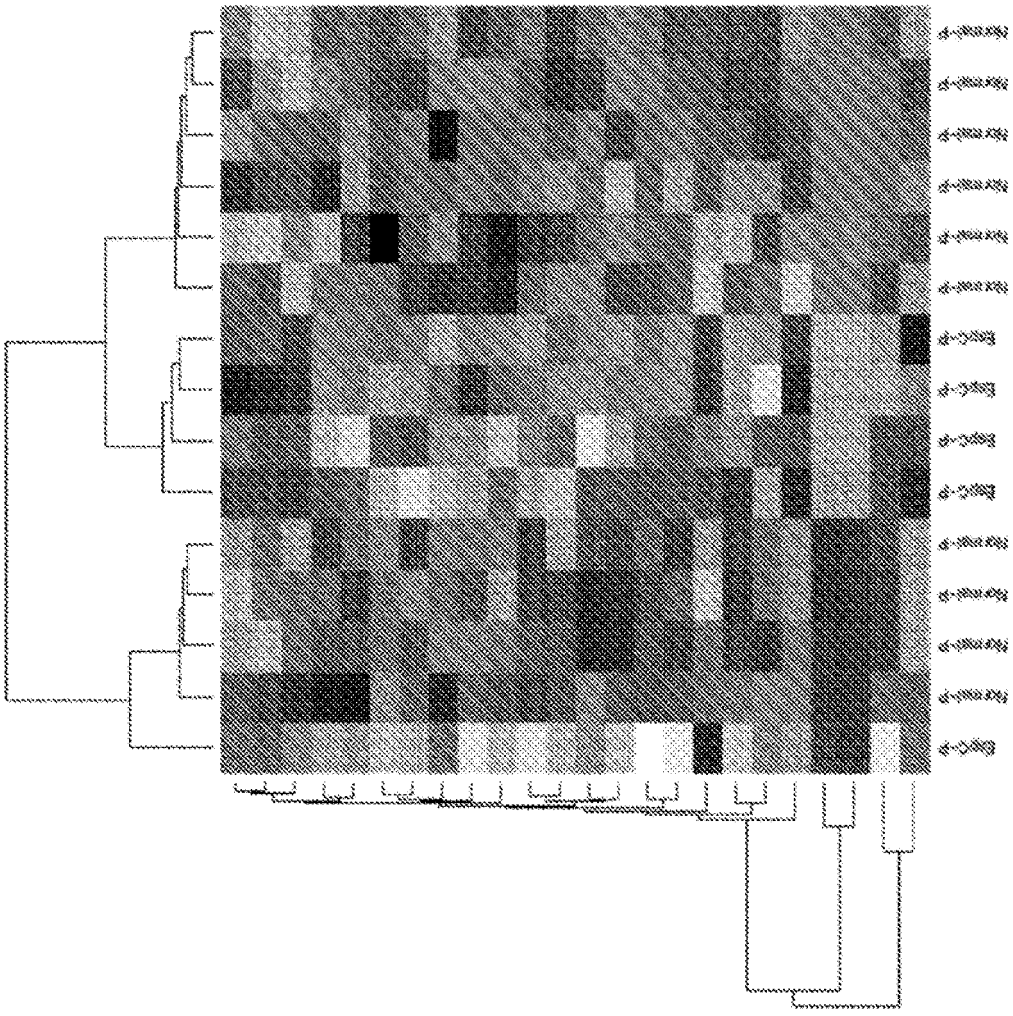


FIG. 15R

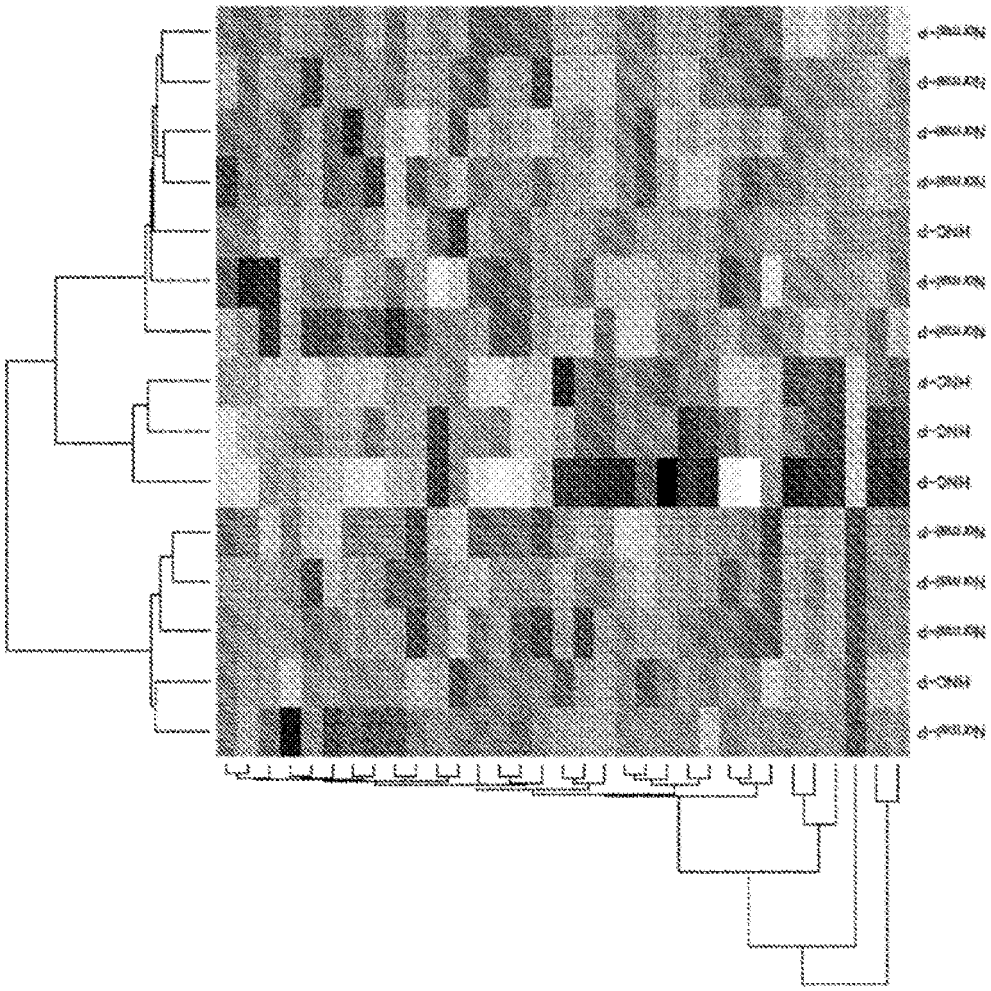


FIG. 15S

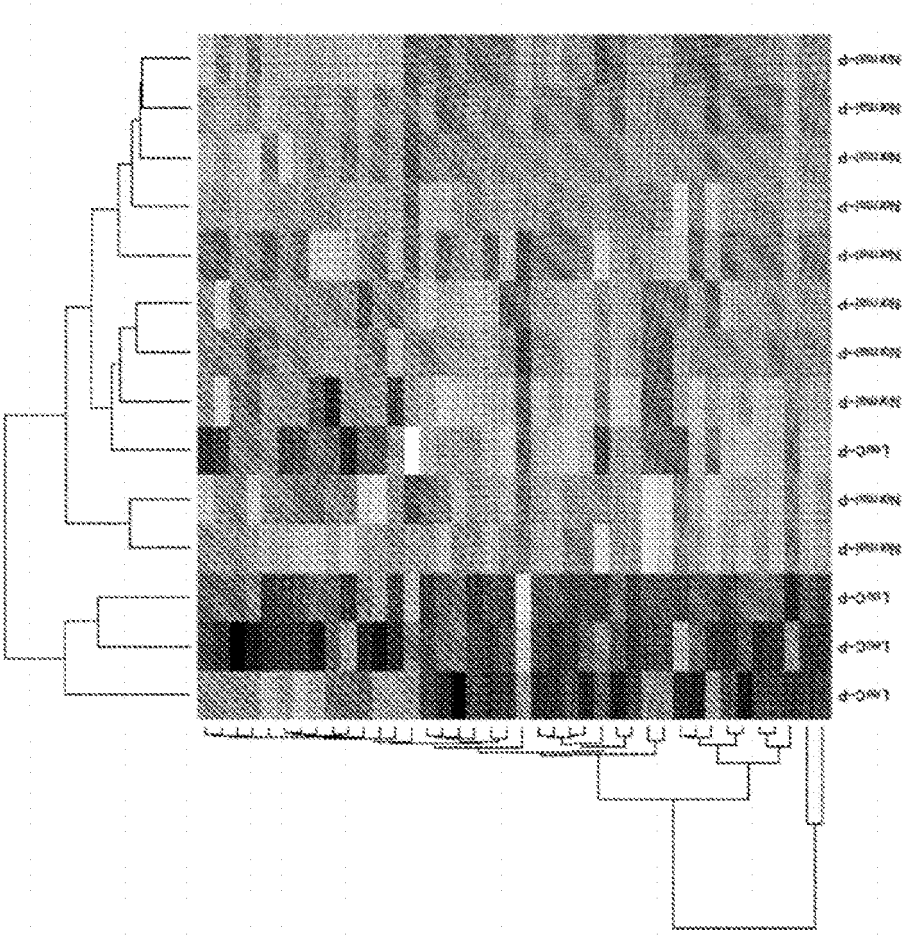


FIG. 15T

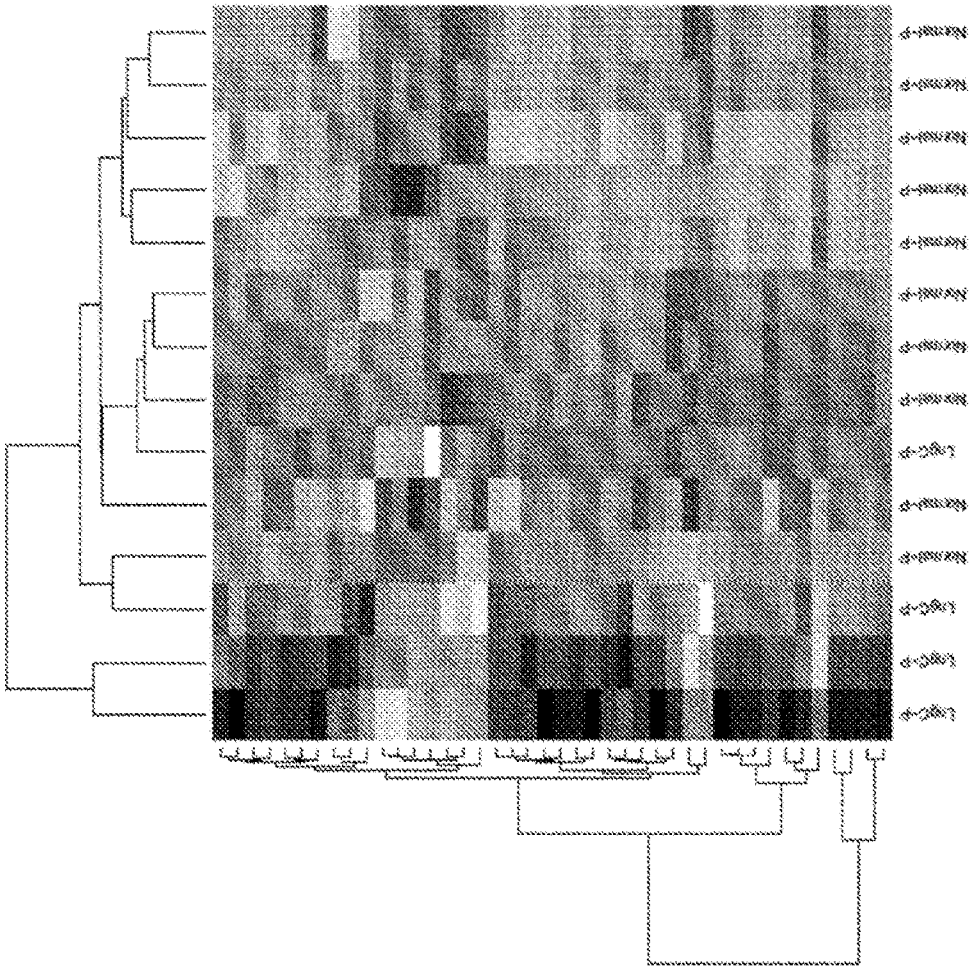


FIG. 15U

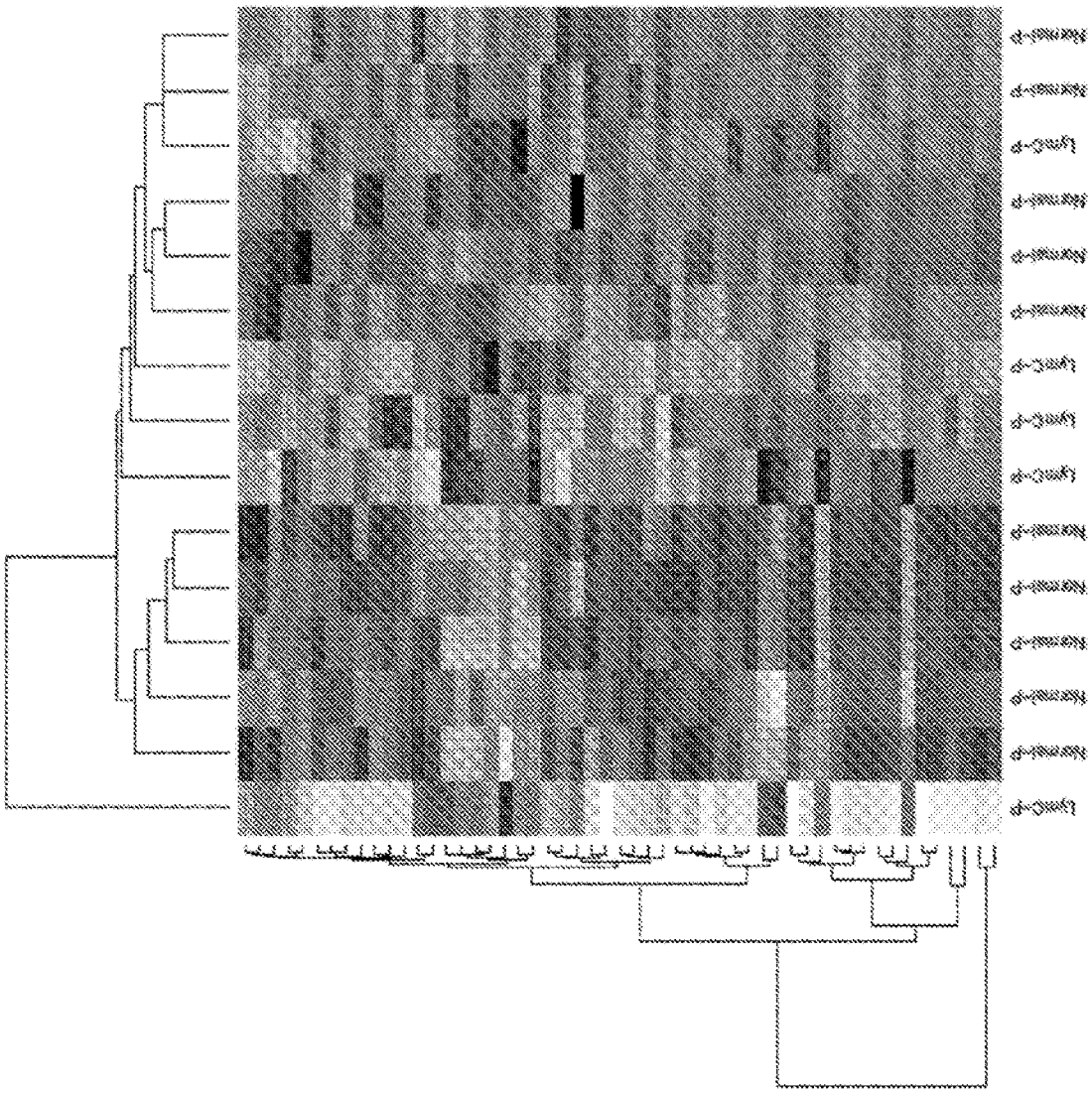


FIG. 15V

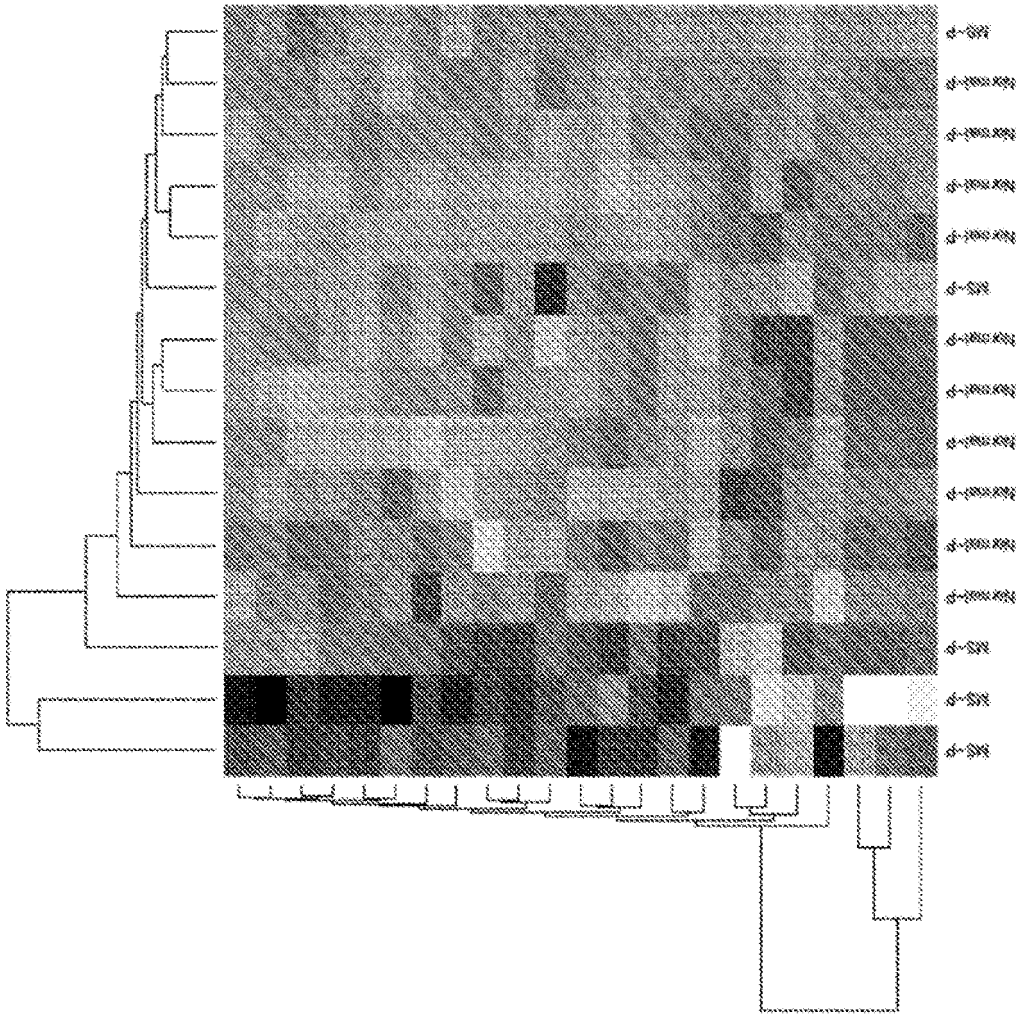


FIG. 15W

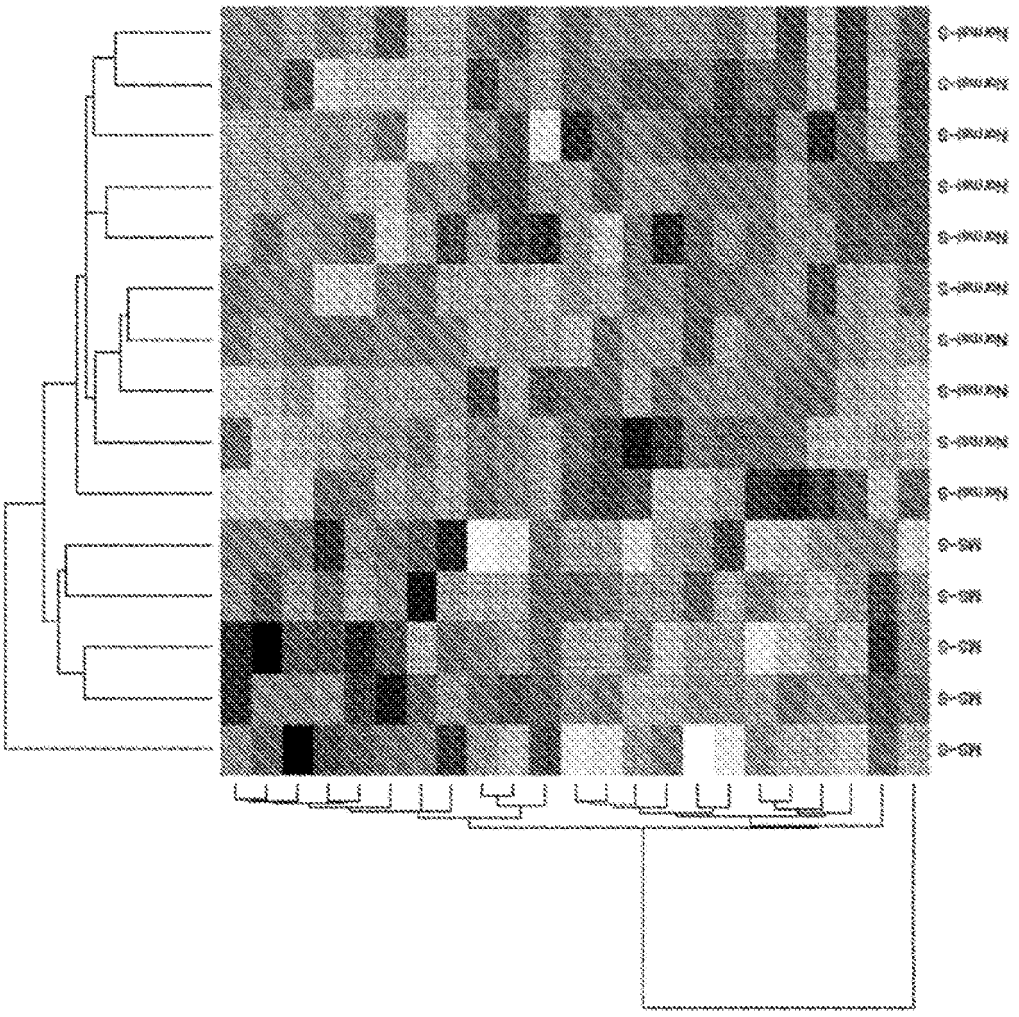


FIG. 15X

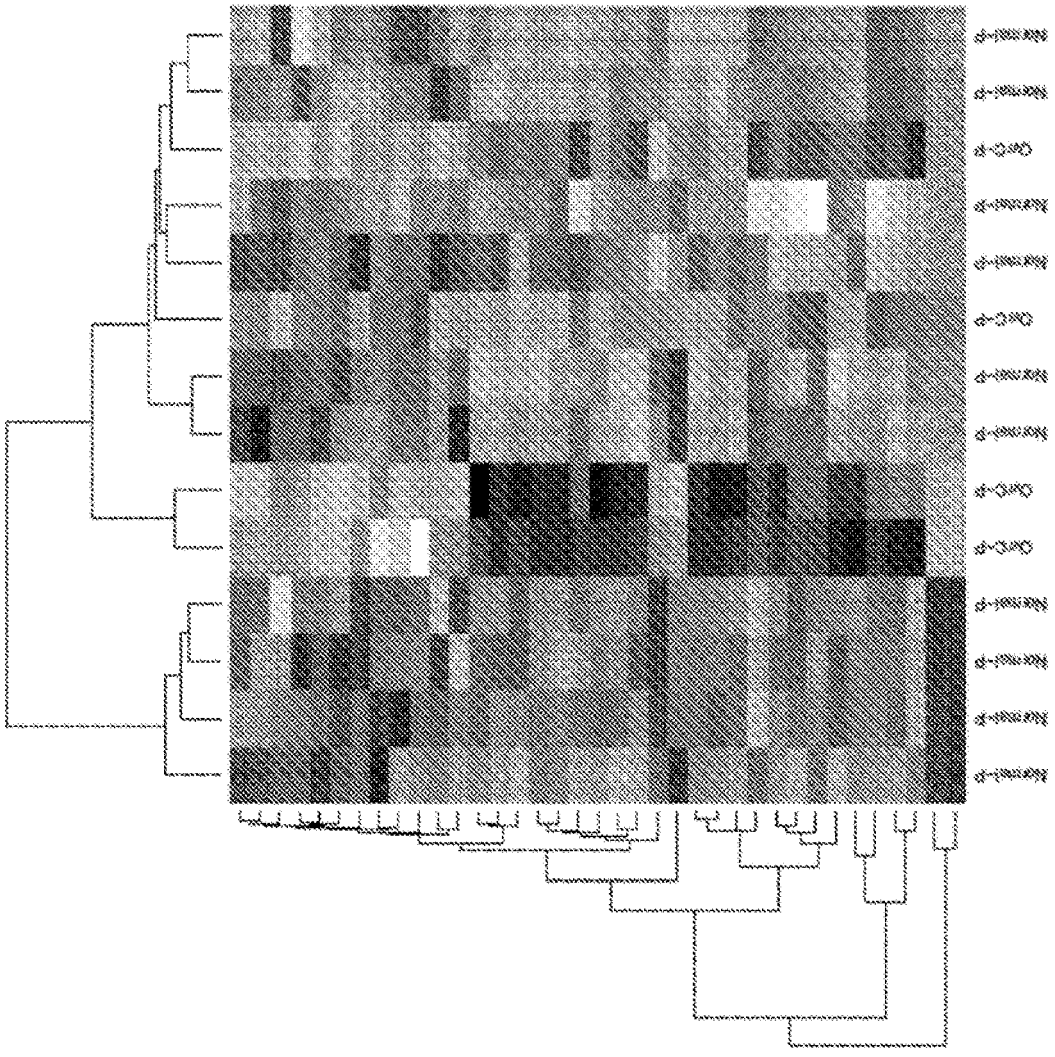


FIG. 15Y

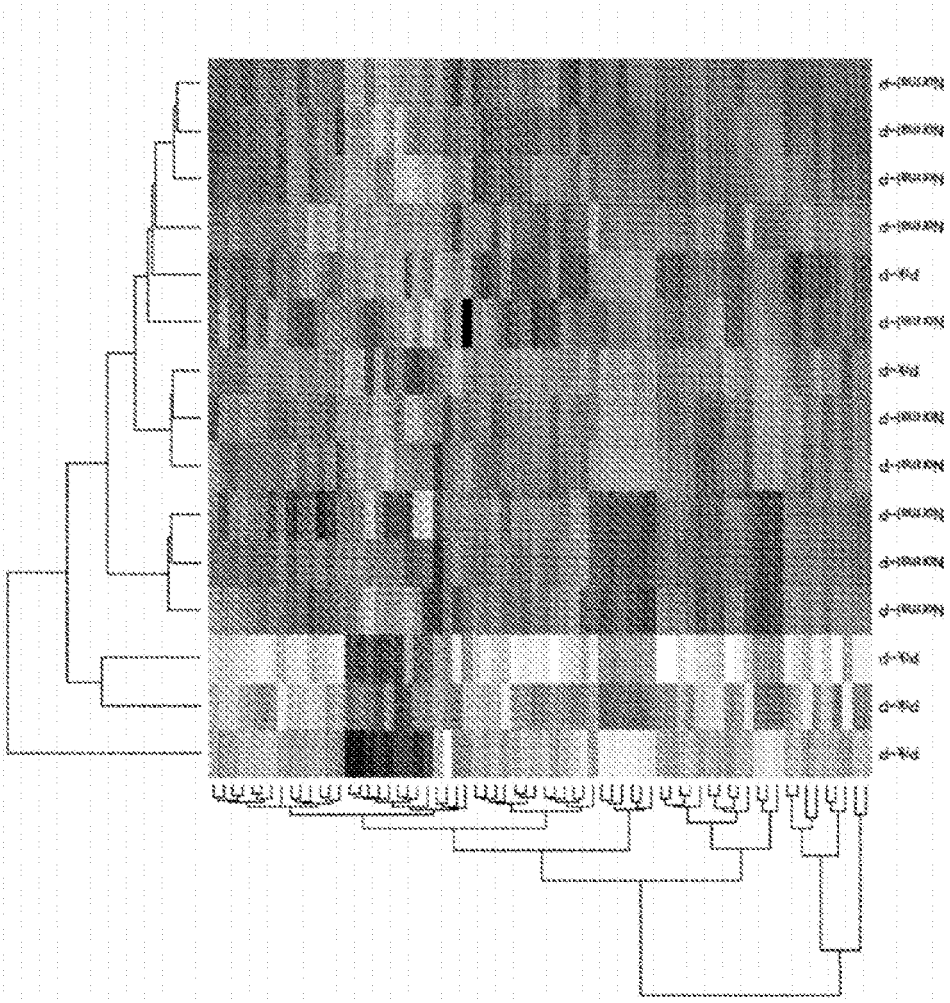


FIG. 15Z

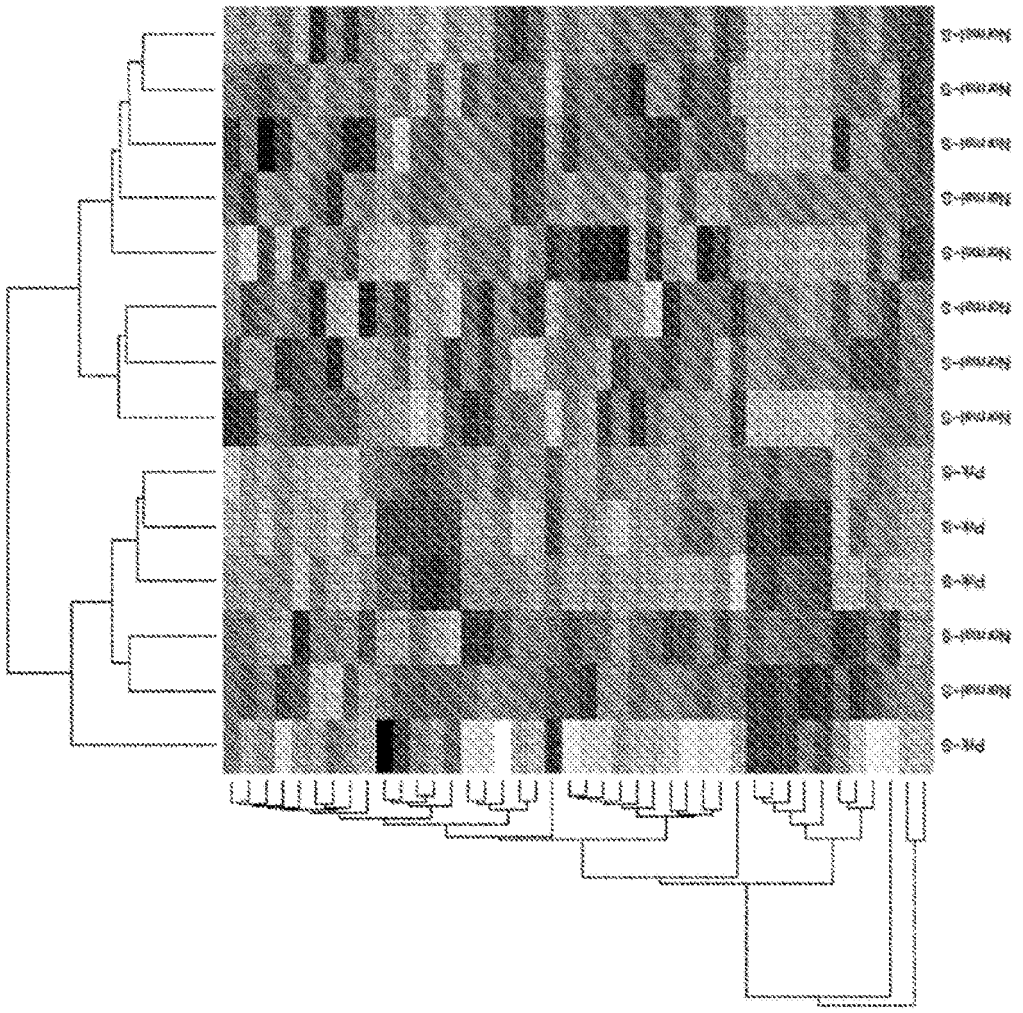


FIG. 15AA

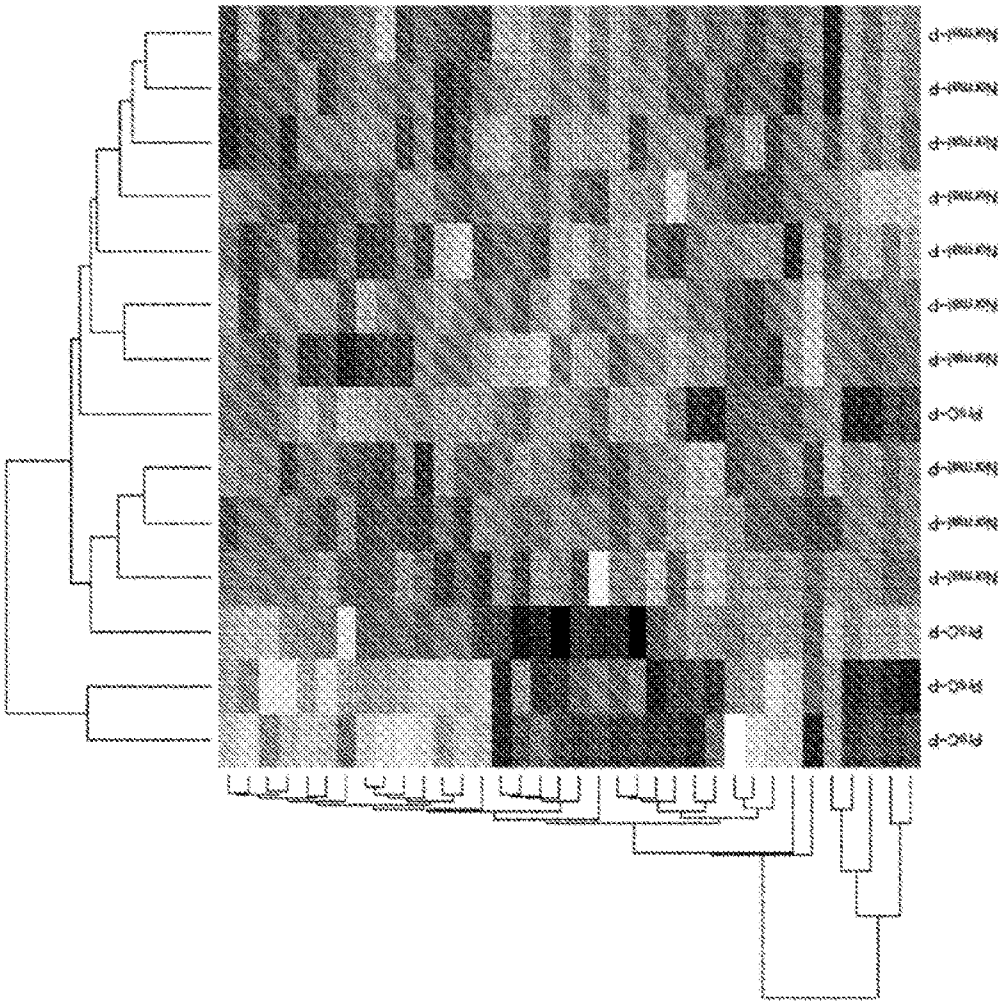


FIG. 15AB

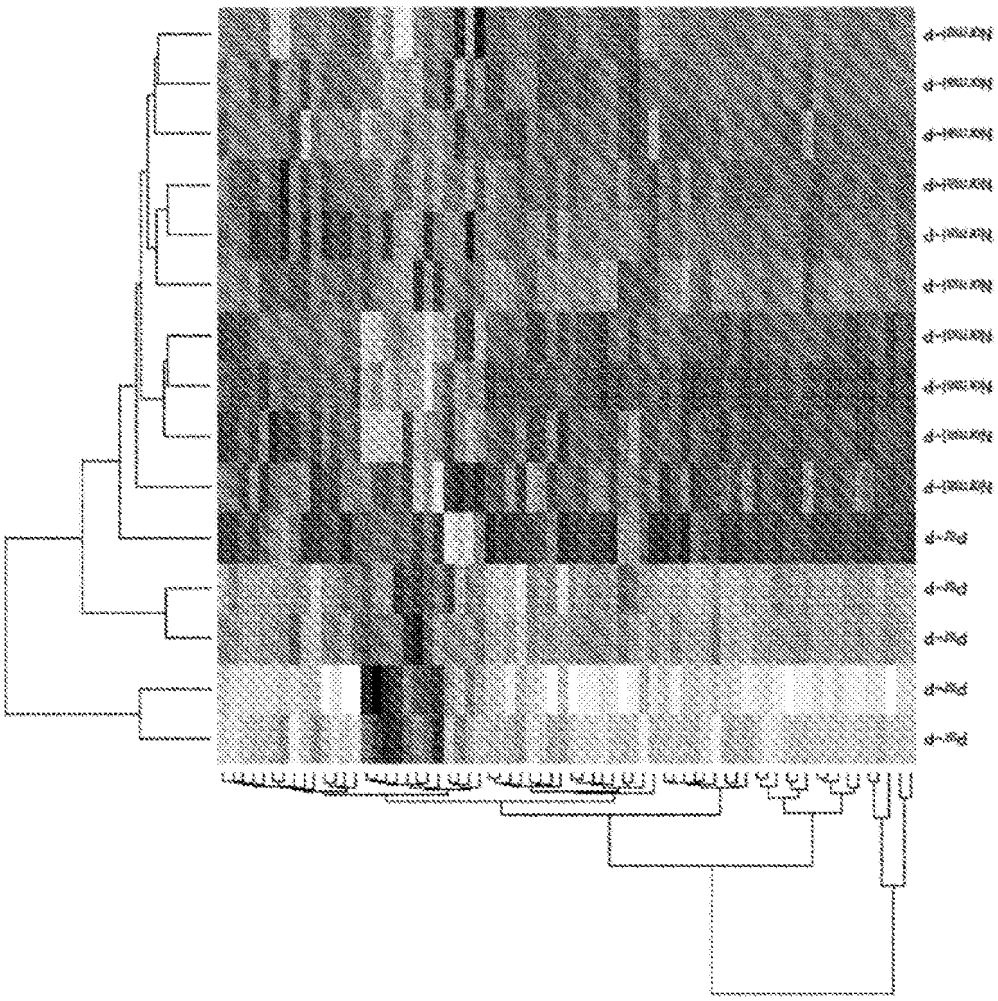


FIG. 15AC

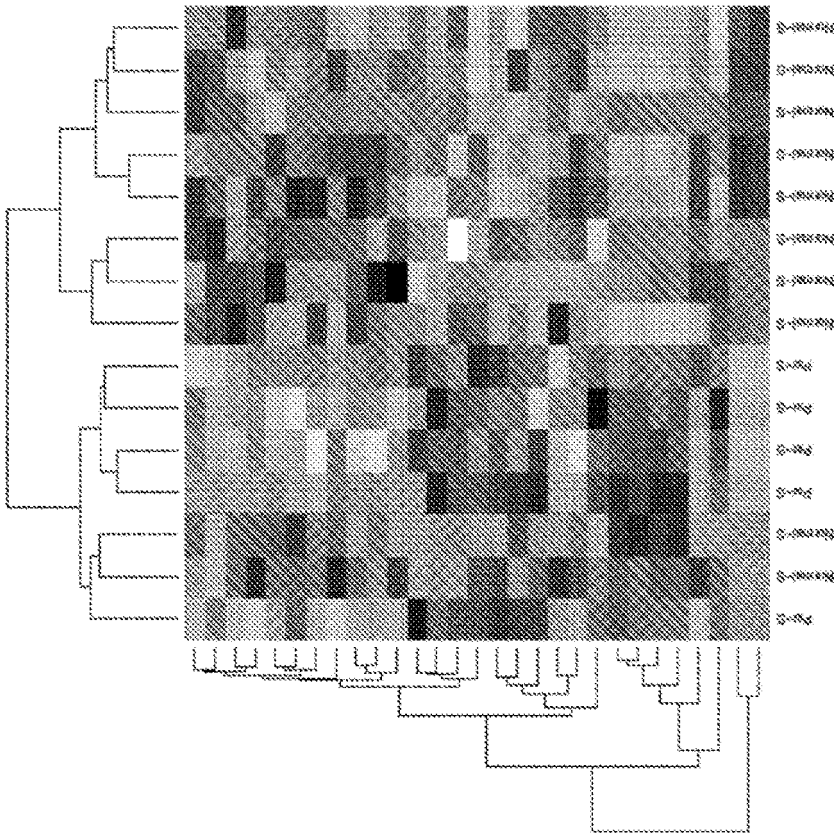


FIG. 15AD

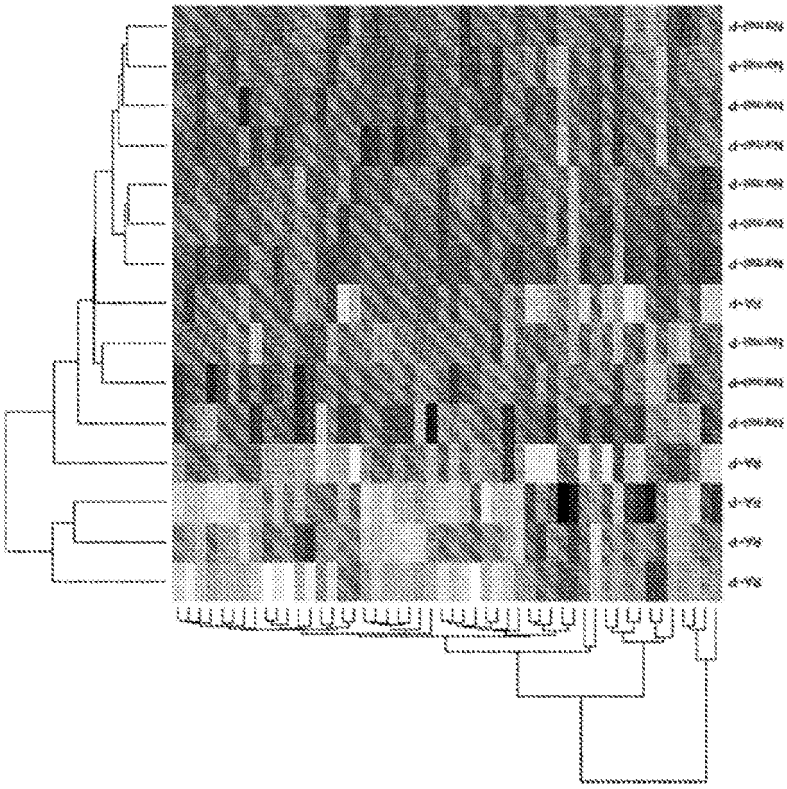


FIG. 15AE

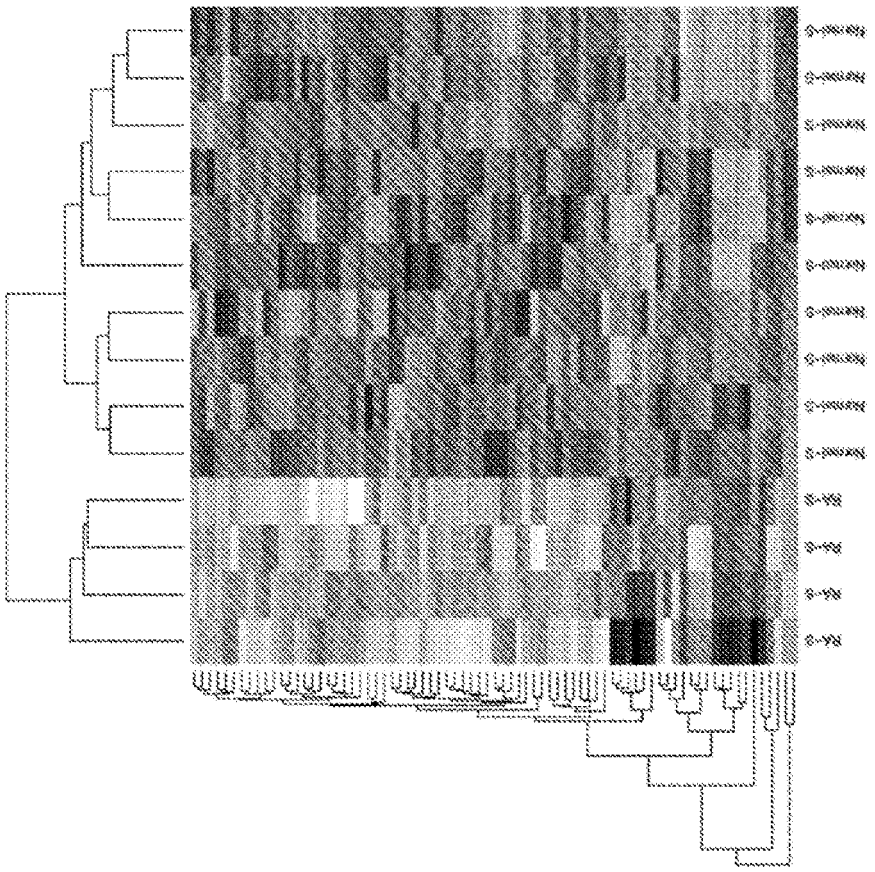


FIG. 15AF

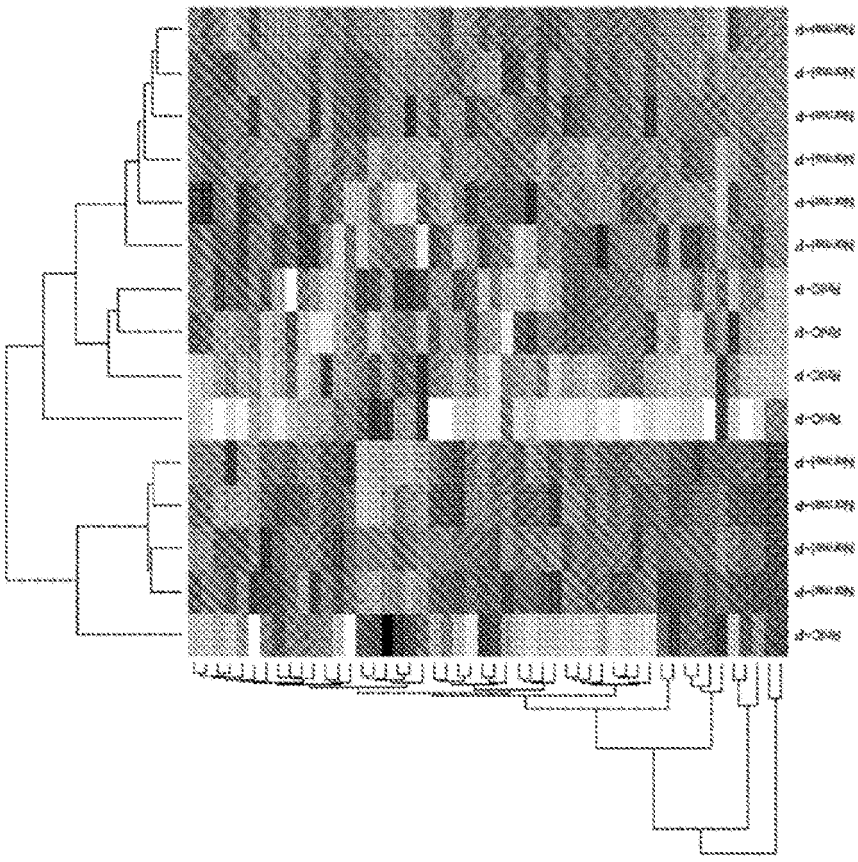


FIG. 15AG

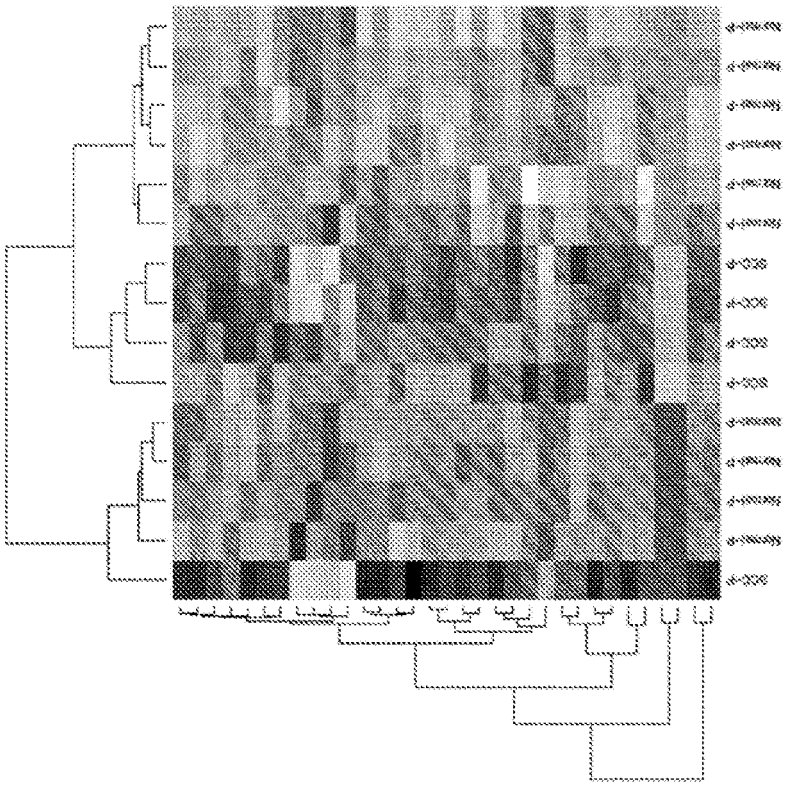


FIG. 15AH

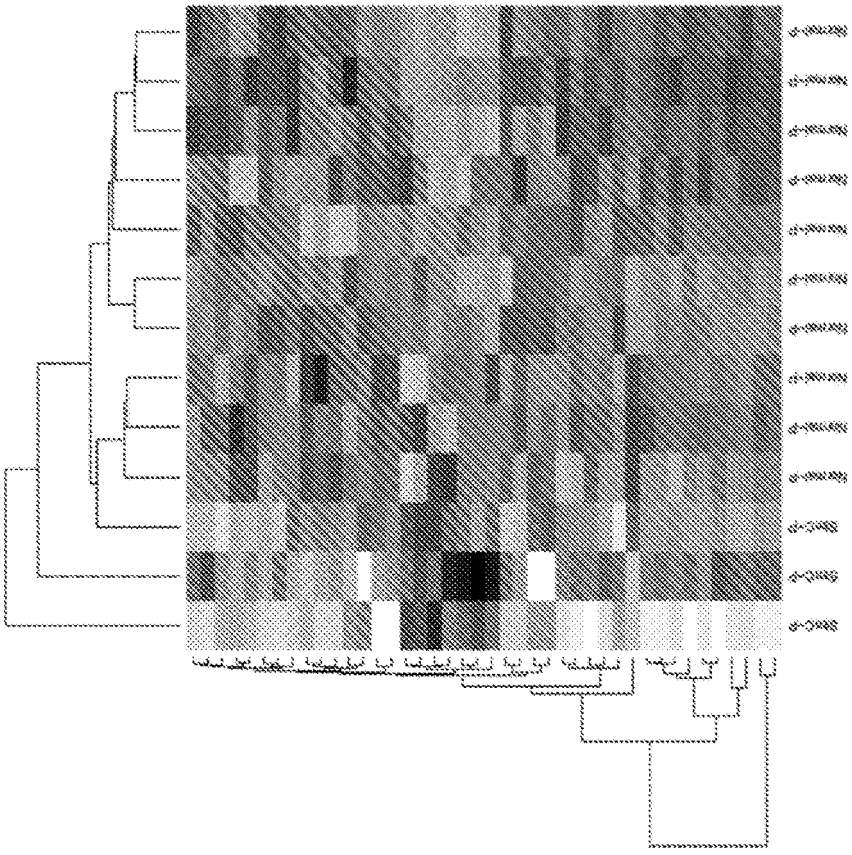


FIG. 15AI

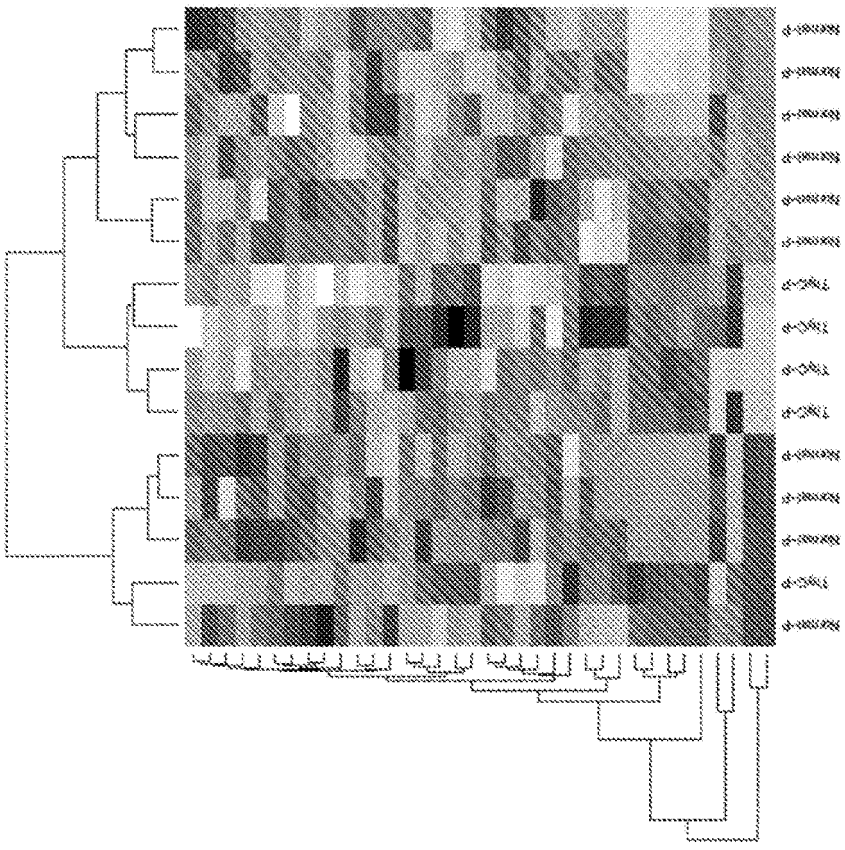


FIG. 15AJ

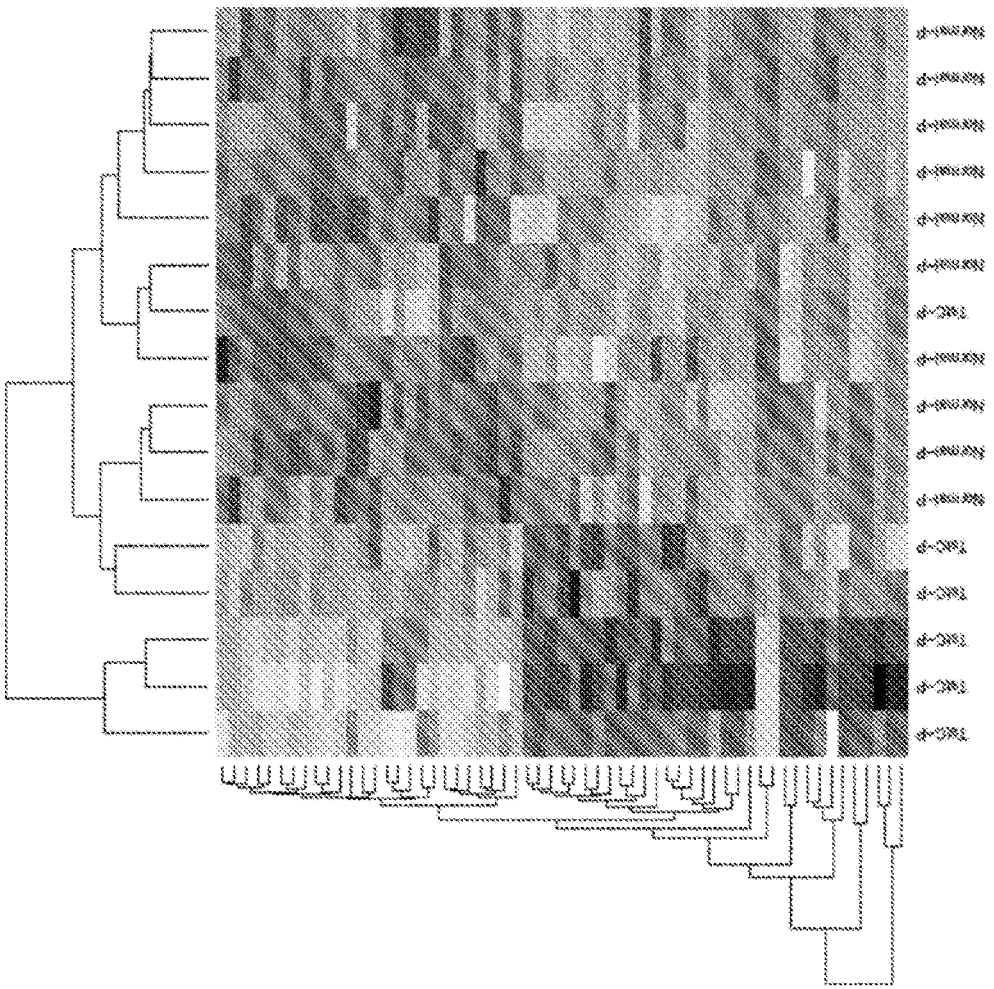


FIG. 15AK

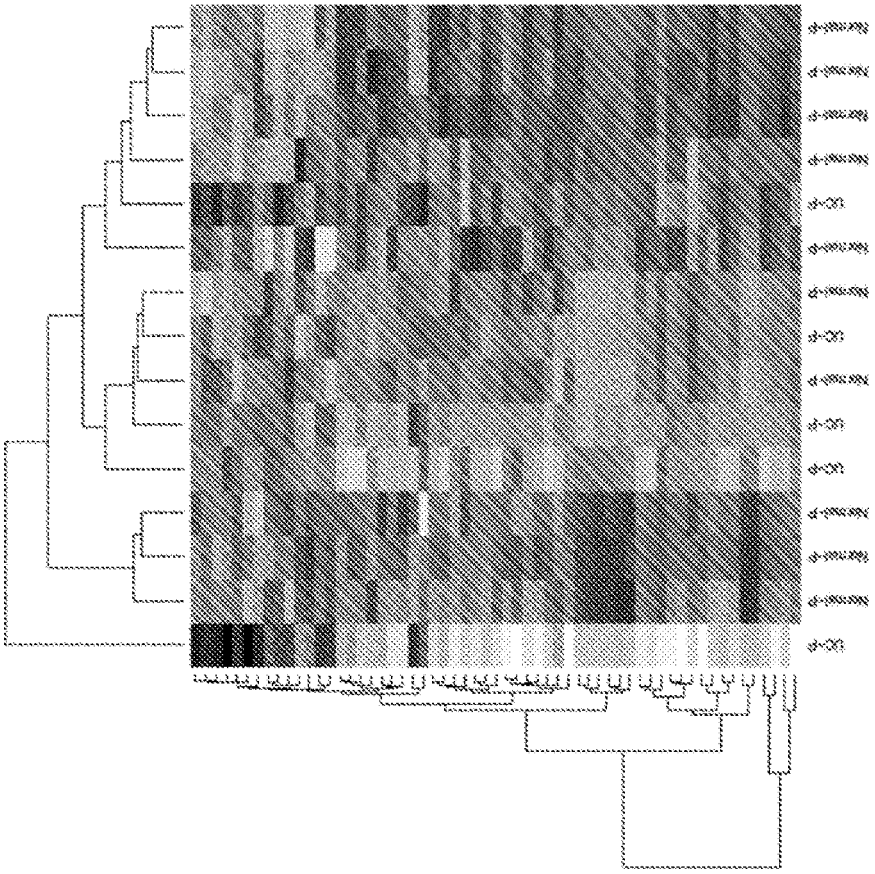


FIG. 15AL

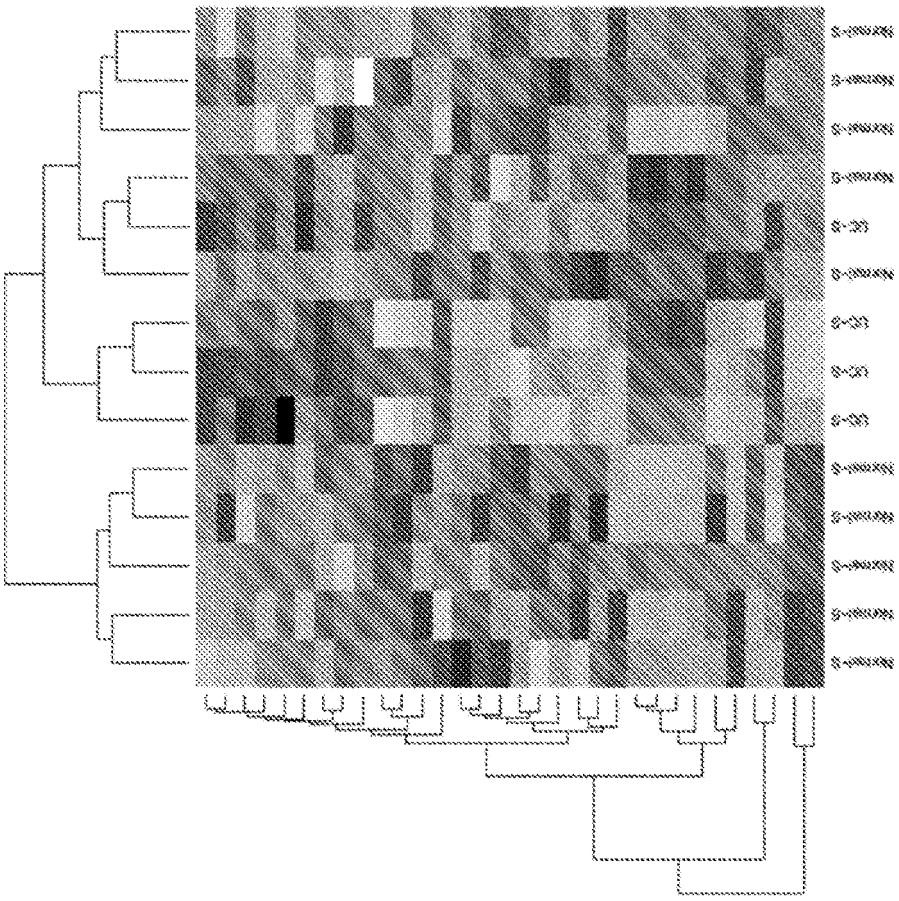


FIG. 15AM

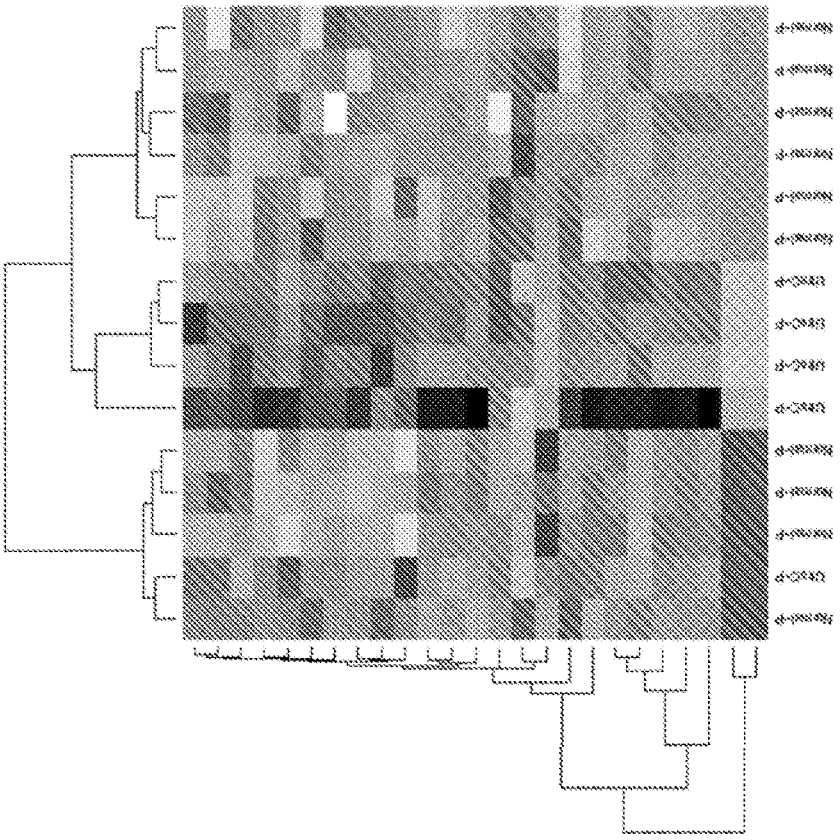


FIG. 15AN

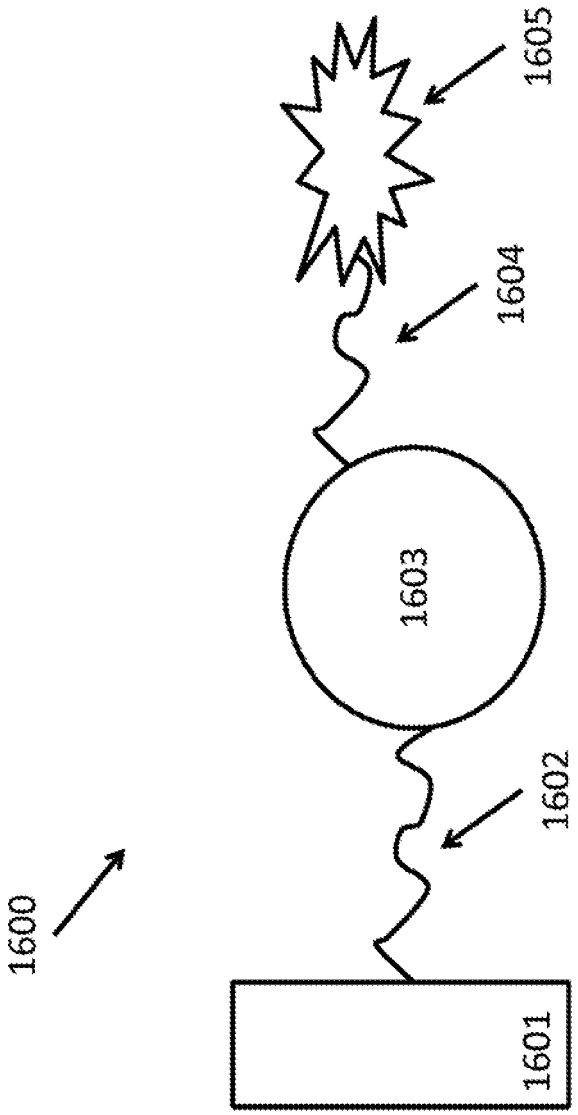


FIG. 16A

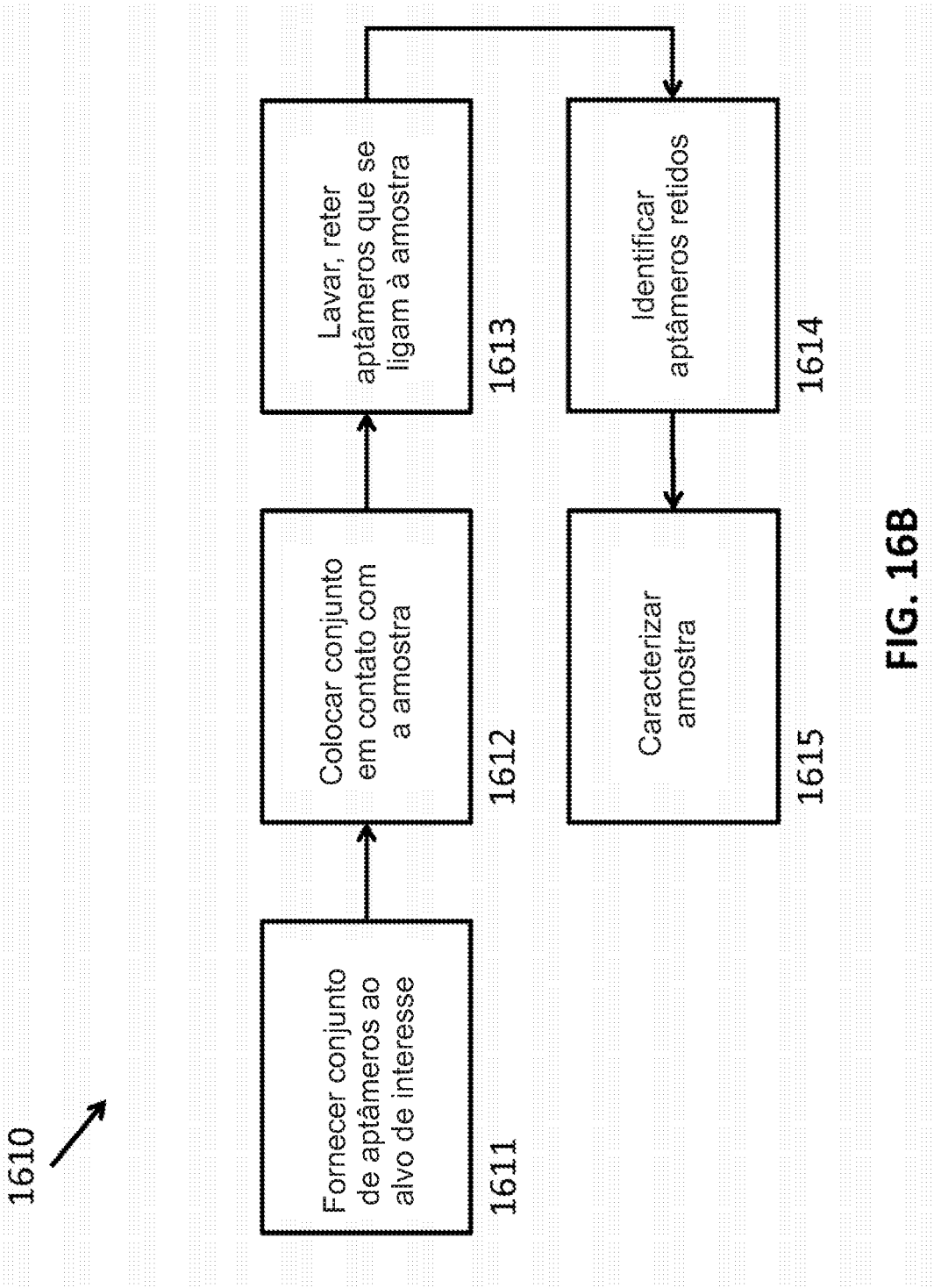

1610
Fornecer conjunto de aptâmeros ao alvo de interesse
1611
Colocar conjunto em contato com a amostra
1612
Lavar, reter aptâmeros que se ligam à amostra
1613
Identificar aptâmeros retidos
1614
Caracterizar amostra
1615

FIG. 16B

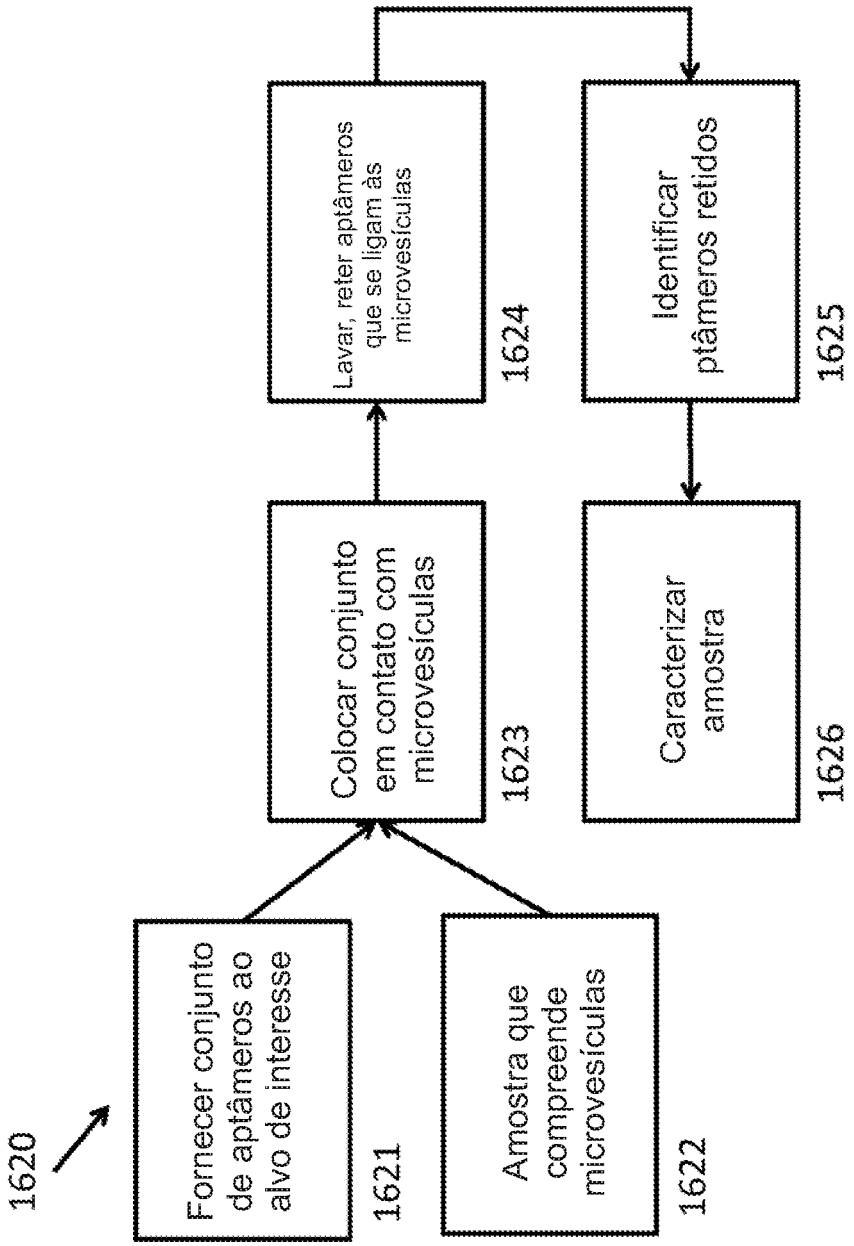

1620
Fornecer conjunto de aptâmeros ao alvo de interesse
1621
Amostra que compreende microvesículas
1622
Colocar conjunto em contato com microvesículas
1623
Lavar, reter aptâmeros que se ligam às microvesículas
1624
Caracterizar amostra
1626
Identificar ptâmeros retidos
1625

FIG. 16C

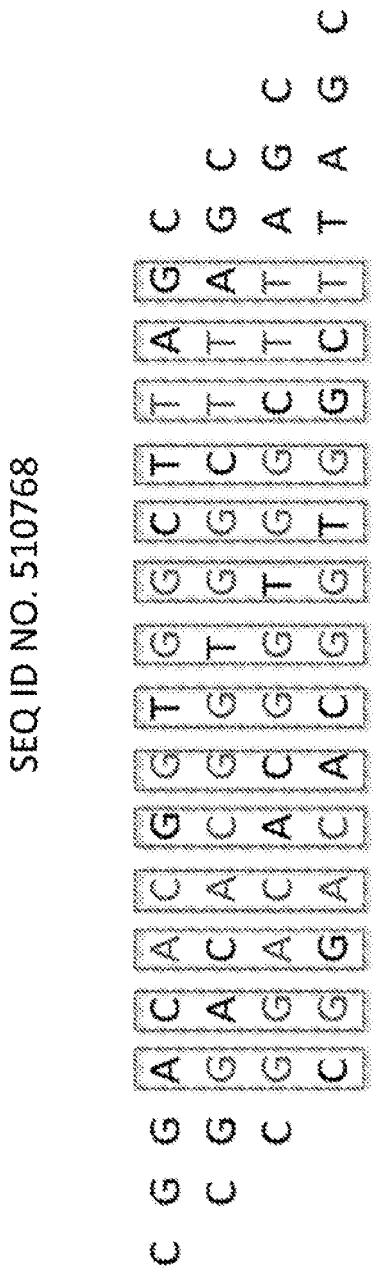


FIG. 17A

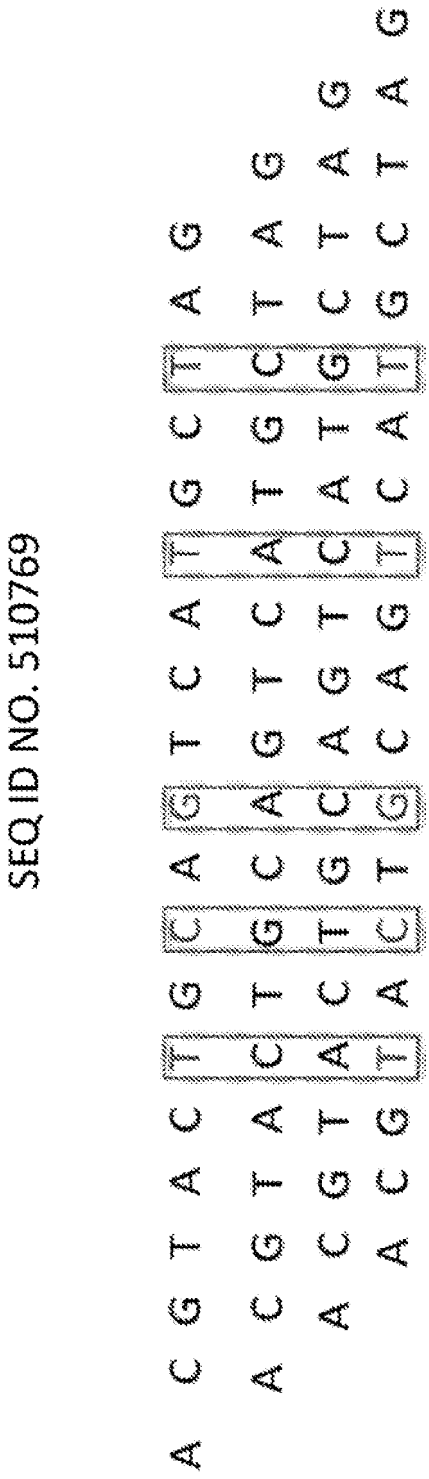


FIG. 17B

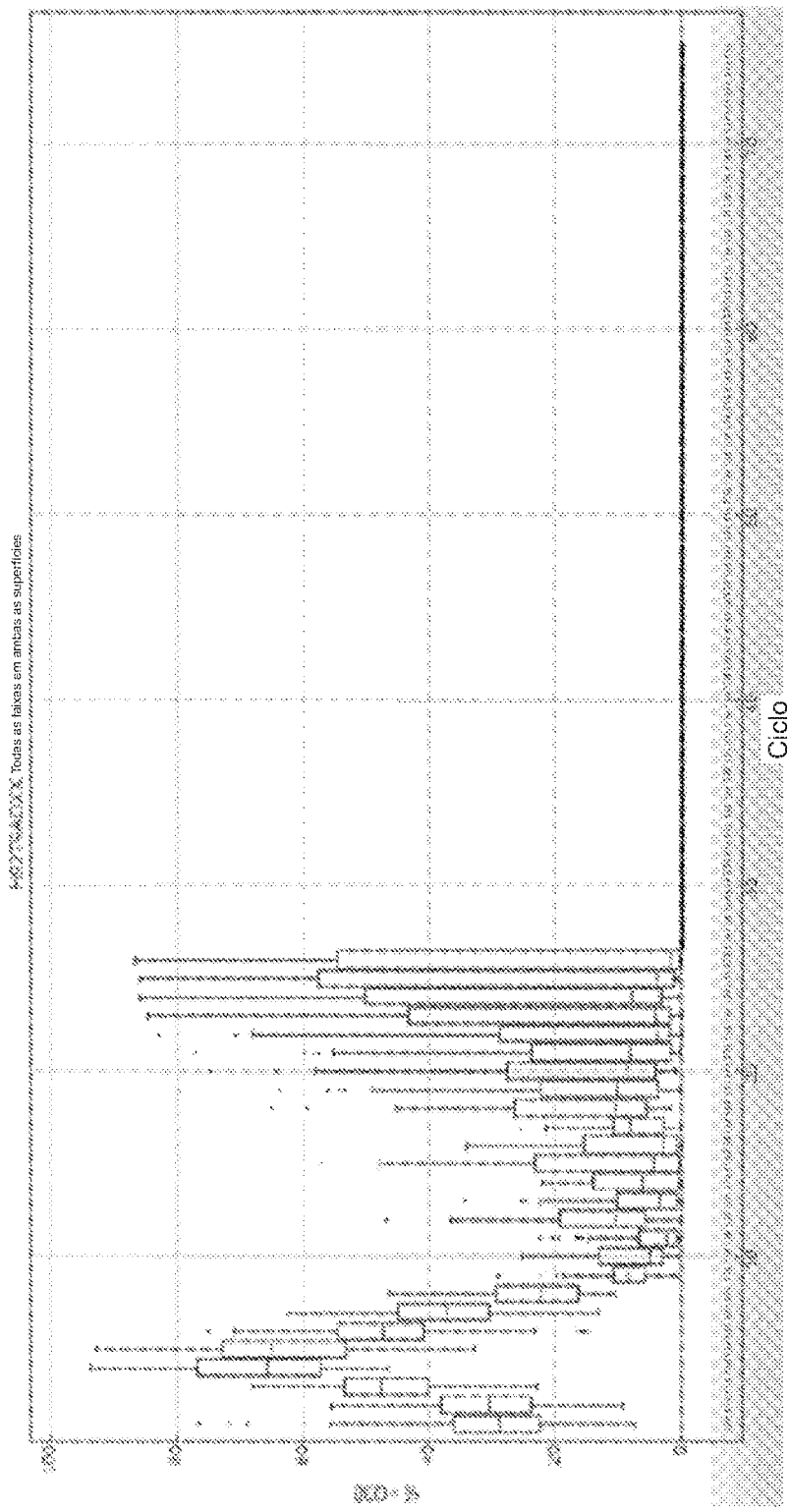


FIG. 17C

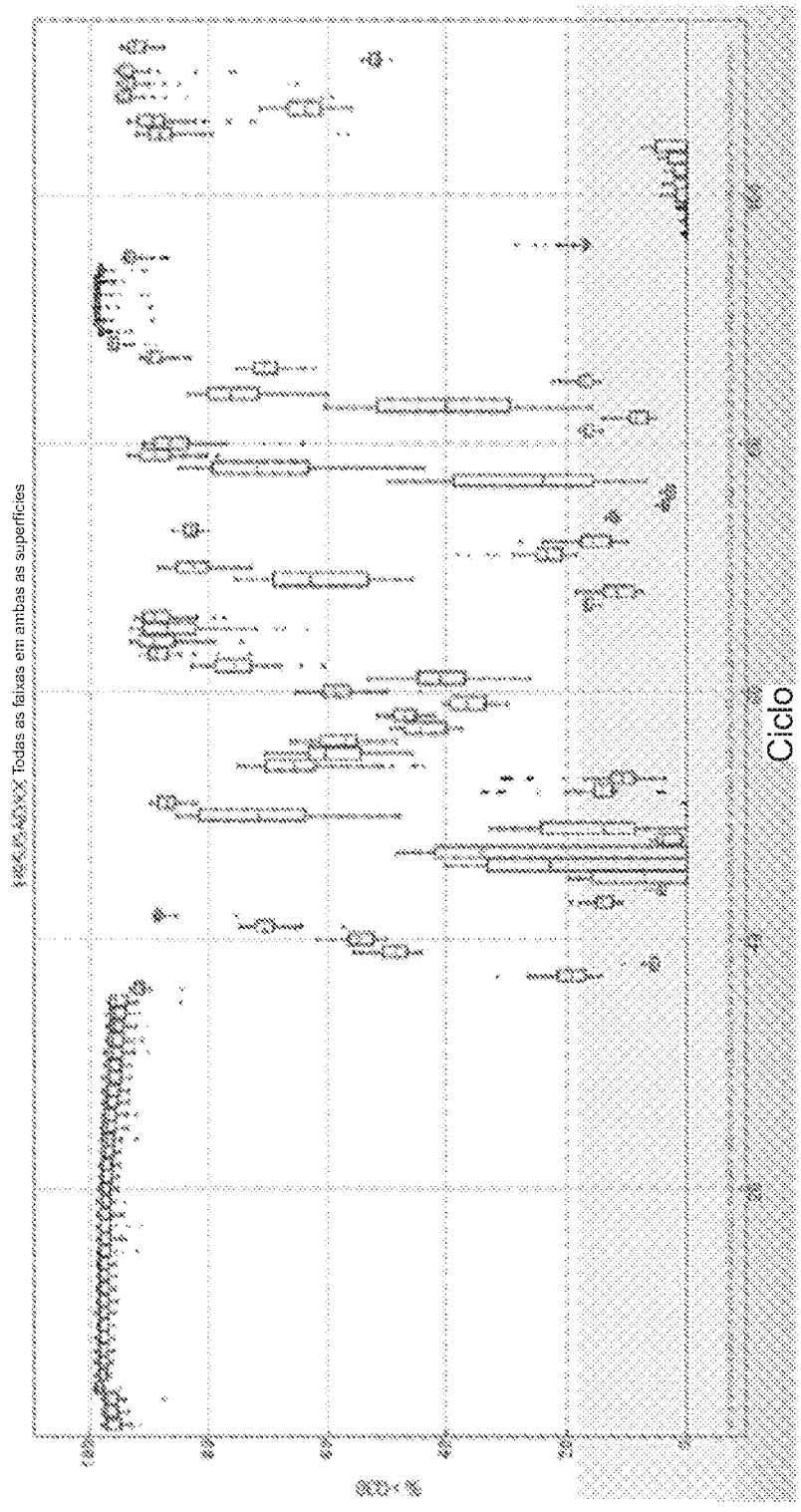


FIG. 17D



FIG. 17E

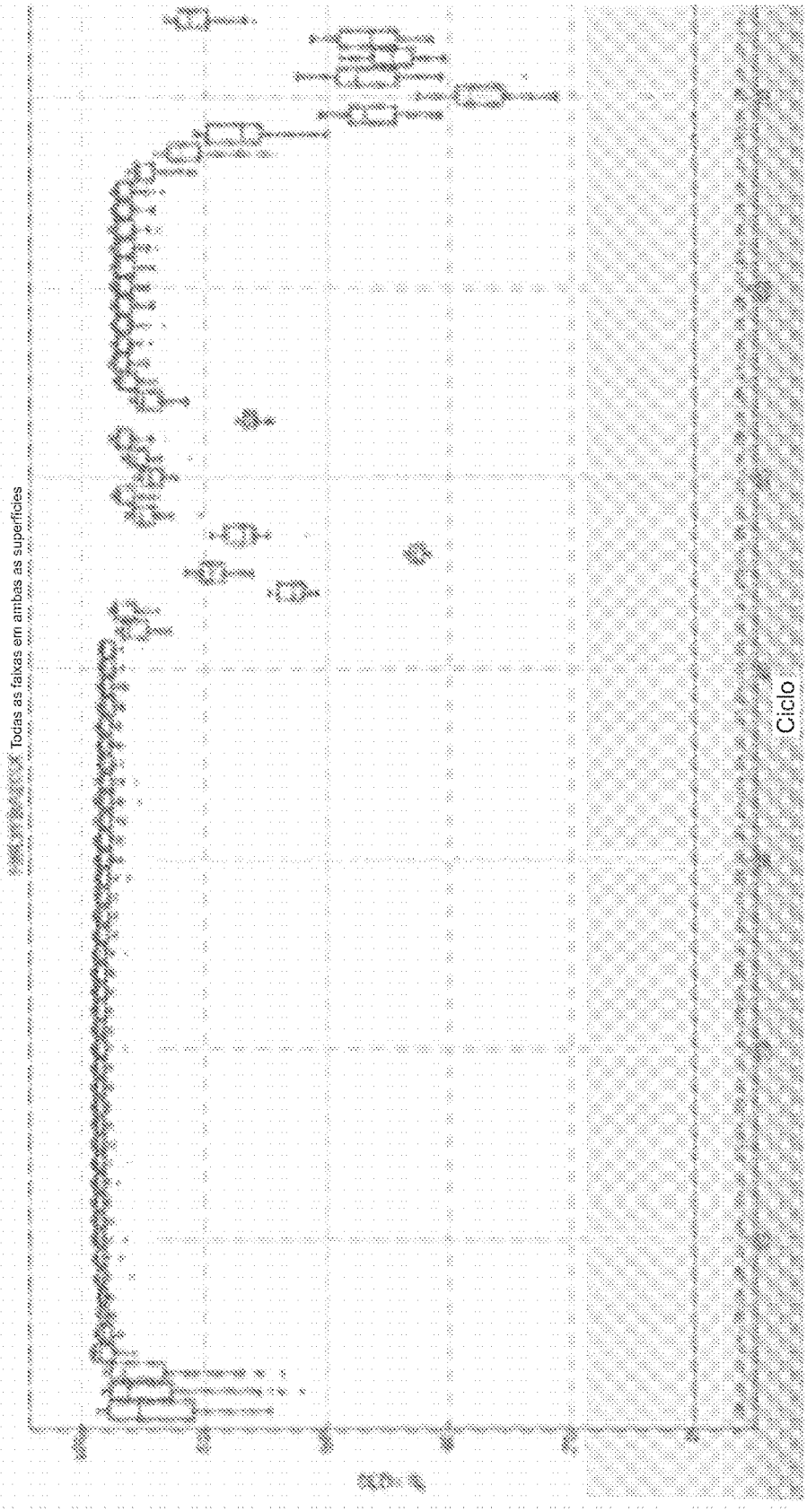


FIG. 17F

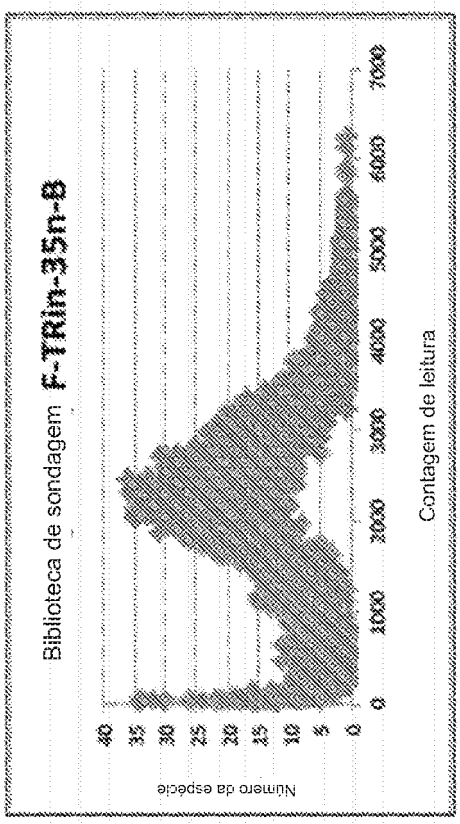


FIG. 17H

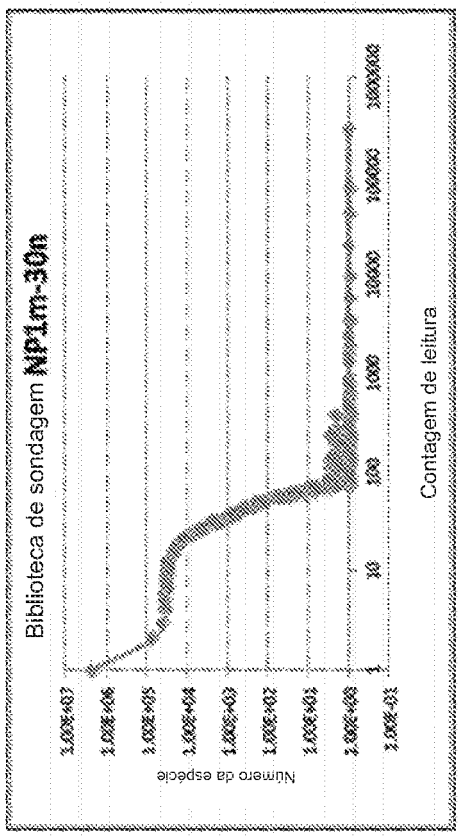


FIG. 17G

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA CARACTERIZAR UMA DOENÇA OU DISTÚRBIO, KIT, COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA GERAR UMA BIBLIOTECA DE ENTRADA, OLIGONUCLEOTÍDEO, PLURALIDADE DE OLIGONUCLEOTÍDEOS E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM APTÂMERO".**

A presente invenção refere-se a métodos e composições para oligonucleotídeos que ligam biomarcadores-alvo e permite a caracterização de um fenótipo. Os biomarcadores-alvo podem incluir antígenos de microvesícula, incluindo microvesículas derivadas de várias doenças. A caracterização pode compreender detecção, diagnóstico, prognóstico, teragnóstico ou outra caracterização de uma doença ou distúrbio.