



(51) МПК
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/6886 (2022.02); *C12Q 1/6827* (2022.02); *C07K 16/30* (2022.02); *G01N 33/54306* (2022.02); *C12Q 2600/156* (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2020102084, 21.06.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.06.2018

Дата регистрации:
18.04.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.06.2017 EP 17177190.0

(43) Дата публикации заявки: 21.07.2021 Бюл. № 21

(45) Опубликовано: 18.04.2022 Бюл. № 11

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 21.01.2020

(86) Заявка РСТ:
EP 2018/066604 (21.06.2018)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2018/234463 (27.12.2018)

Адрес для переписки:
101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 5, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

**КБЕЗИ, Антонио (ИТ),
 ЗАРОВНИ, Наташа (ИТ),
 ЦОККО, Давиде (ИТ)**

(73) Патентообладатель(и):
ЭКЗОСОМИКС С.П.А. (ИТ)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: TAYLOR D. D. et al. Exosome
isolation for proteomic analyses and RNA
profiling, Serum/plasma proteomics. - Humana
Press, 2011, p. 235-246. LAM J. S. et al. G250: a
carbonic anhydrase IX monoclonal antibody,
Current oncology reports, 2005, V. 7, N. 2, p.109-
115. GIATROMANOLAKI A. et al. Expression
of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates
(см. прод.)

(54) СПОСОБЫ И НАБОРЫ, ИМЕЮЩИЕ ОТНОШЕНИЕ К ЗАХВАТУ СА-IX-ПОЗИТИВНЫХ
ЭКЗОСОМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к способу *in vitro* выделения из биологической жидкости экзосом, происходящих из опухоли, путем их захвата с помощью анти-СА-IX антител. Способ позволяет осуществлять определение *in vitro* наличие

опухоли у субъекта, а также количественное определение *in vitro* связанной с опухолью последовательности нуклеиновой кислоты в биологической жидкости. 6 н. и 12 з.п. ф-лы, 36 ил., 36 пр.

(56) (продолжение):

to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer, Cancer research, 2001, V. 61, N. 21, p.7992-7998. ГУСАЧЕНКО О. Н. и др. Нуклеиновые кислоты экзосом: маркеры заболеваний и молекулы межклеточной коммуникации, Биохимия, 2013, V. 78, N. 1, с.5-13.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12Q 1/6886 (2022.02); *C12Q 1/6827* (2022.02); *C07K 16/30* (2022.02); *G01N 33/54306* (2022.02); *C12Q 2600/156* (2022.02)

(21)(22) Application: **2020102084, 21.06.2018**

(24) Effective date for property rights:
21.06.2018

Registration date:
18.04.2022

Priority:

(30) Convention priority:
21.06.2017 EP 17177190.0

(43) Application published: **21.07.2021 Bull. № 21**

(45) Date of publication: **18.04.2022 Bull. № 11**

(85) Commencement of national phase: **21.01.2020**

(86) PCT application:
EP 2018/066604 (21.06.2018)

(87) PCT publication:
WO 2018/234463 (27.12.2018)

Mail address:
**101000, Moskva, ul. Myasnitskaya, 13, str. 5, OOO
"Soyuzpatent"**

(72) Inventor(s):

**CHIESI, Antonio (IT),
ZAROVNI, Natasa (IT),
ZOCCO, Davide (IT)**

(73) Proprietor(s):

EXOSOMICS S.P.A. (IT)

(54) **METHODS AND SETS RELATED TO CAPTURE OF CA-IX-POSITIVE EXOSOMES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, specifically to a method for in vitro isolation of exosomes originating from the tumor from biological fluid by capturing them with anti-CA-IX antibodies.

EFFECT: method allows for in vitro determination of the tumor presence in a subject, as well as for quantitative in vitro determination of a nucleic acid sequence related to the tumor in biological fluid.

18 cl, 36 dwg, 36 ex

**C 2
2 7 7 0 5 9 2
R U**

**R U
2 7 7 0 5 9 2
C 2**

Настоящее изобретение имеет отношение к способам выделения экзосом, происходящих из опухоли, путем захвата при помощи анти СА-IX антитела, к способам определения количества связанных с опухолью последовательностей нуклеиновых кислот из таких выделенных экзосом и к способам определения *in vitro* наличия опухоли у субъекта. Изобретение также имеет отношение к наборам, предназначенным для использования в этих способах.

Уровень техники

Экзосомы представляют собой мембранные частицы диаметром 30-100 нм эндоцитозного происхождения. Они являются естественными липидными внеклеточными нановезикулами, которые продуцируются и выделяются практически всеми типами клеток тонко ругулируемым и функционально значимым образом, поэтому состав белков и последовательностей нуклеиновых кислот отражает тип и состояние родительской клетки. Эти везикулы обладают собственной стабильностью и способностью преодолевать биологические барьеры, благодаря чему экзосомы, происходящие из разных тканей, могут быть обнаружены в легкодоступных биологических жидкостях, таких как кровь. Принимая во внимание их биологические роли и свойства, экзосомы считаются ранним индикатором изменений в гомеостазе и метаболизме клетки и ткани и являются вызывающим интерес средством идентификации новых биомаркеров, имеющих отношение к определенной болезни, а также демонстрации известных биологических маркеров в подходе жидкостной биопсии. В этом заключается главная предпосылка и перспектива использования нацеленных на экзосомы анализов при диагностике сложных заболеваний, таких как рак. Основное препятствие заключается в связи ассоциированных с экзосомами маркеров с конкретной тканью в конкретных условиях и оптимизации надежных, доступных, неинвазивных решений и анализов, нацеленных на экзосомы, которые могли бы реально осуществляться в клинических исследованиях и на практике.

Необходимо разрабатывать способы и соответствующие наборы, с помощью которых можно выделять происходящие из опухоли экзосомы из биологических образцов, а также эффективно обнаруживать и определять количество связанных с опухолью последовательностей нуклеиновых кислот, таких как точечные мутации BRAFV600E, BRAFV600K, BRAFV600R, BRAFV600M и BRAFV600D гена BRAF, амплификация гена BRAF дикого типа (WT) (4,5), точечные мутации гена KRAS, такие как KRAS G12C, KRAS G12S, KRAS G12V, KRAS G12A, KRAS G12D, KRAS G13D и амплификация гена KRAS WT (6), точечные мутации гена NRAS, такие как NRAS G12C и NRAS G12D, NRAS Q61K, NRAS Q61R (7,8), точечные мутации гена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), такие как EGFR T790M, EGFR L858R, EGFR EXON 19 делеция, EGFR EXON 20 делеция (9,10), амплификация и сверхэкспрессия гена *c-Myc* (11,12), РНК-транскрипты ретротранспозонов, такие как короткие и длинные диспергированные ядерные повторы (SINE, LINE) и человеческие эндогенные ретровирусные повторы (HERV) (12), точечные мутации гена андрогенового рецептора (AR), такие как AR L702H, AR W742C, AR H875Y, AR F877L, AR T878A, сплайсинг-вариант AR-V7 и амплификация гена AR WT (13-15).

Предшествующий уровень техники

Карбоангидраза IX (CA-IX) является известным опухолевым биомаркером, имеющим диагностическое и прогностическое значение, а также потенциальной целью для разработки противоопухолевых лекарственных средств (1-2). Растворимая форма CA-IX может быть обнаружена в сыворотке раковых пациентов (3).

WO2012115885 приводит CA-IX в качестве биомаркера, который может измеряться по экзосомам. Dorai (16) описывает, как клетки рака почки, когда они принуждены

сверхэкспрессировать СА-IX, увеличивают отделение экзосом.

Анти-СА-IX антитела, как моноклональные, так и поликлональные, направленные против различных видов, таких как человек, крыса или мышь, являются коммерчески доступными, например, от компании ThermoFisher Scientific Inc.

5 Краткое описание чертежей

Фиг. 1 показывает измеренные уровни BRAF и BRAFV600E в экзосомах, выделенных из плазмы пациента, положительного по V600E, путем стандартной преципитации или путем захвата с помощью различных антител, включая СА-IX.

10 Фиг. 2А и В показывают уровни гена BRAF, измеренные в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов, пациентов с колоректальным раком или меланомой или при помощи захвата анти-СА-IX антитела или путем стандартного осаждения.

Фиг. 2С показывает частоту аллеля AR T878, измеренную в экзосомах, выделенных из плазмы пациентов с раком предстательной железы путем захвата при помощи анти-СА-IX антитела или путем стандартным осаждением внеклеточных везикул (EV).

15 Фиг. 3 показывает уровни гена BRAF, измеренные в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с колоректальным раком или путем захвата при помощи анти-СА-IX антител или захвата при помощи анти-EPCAM антител.

20 Фиг. 4 показывает Z-оценку измеренных уровней BRAF в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с колоректальным раком путем захвата при помощи анти-СА-IX антитела.

Фиг. 5 показывает Z-оценку измеренных уровней BRAF в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком предстательной железы путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

25 Фиг. 6 показывает Z-оценку измеренных уровней BRAF в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком желудка путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 7 показывает Z-оценку измеренных уровней BRAF в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком яичника путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

30 Фиг. 8 показывает Z-оценку измеренных уровней KRAS в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов, пациентов с колоректальным раком, пациентов с доброкачественной гиперплазией простаты или пациентов с раком предстательной железы путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

35 Фиг. 9 показывает оценку измеренных уровней EGFR в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком легких путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 10 показывает оценку измеренных уровней HERV-W в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком легких путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

40 Фиг. 11 показывает оценку измеренных уровней LINE в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком легких путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

45 Фиг. 12 показывает оценку измеренных уровней с-Мус в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком легких путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 13 показывает оценку измеренных уровней HERV-W в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком молочной железы путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 14 показывает оценку измеренных уровней LINE в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком молочной железы путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

5 Фиг. 15 показывает оценку измеренных уровней AR-WT в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком предстательной железы путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 16 показывает оценку измеренных уровней AR-T878A в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком предстательной железы путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

10 Фиг. 17 показывает оценку измеренных уровней HERV-W в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с колоректальным раком путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

15 Фиг. 18 показывает оценку измеренных уровней LINE в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с колоректальным раком путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 19 показывает оценку измеренных уровней HERV-W в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком желудка путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

20 Фиг. 20 показывает оценку измеренных уровней LINE в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком желудка путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 21 показывает оценку измеренных уровней с-Мус в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком яичника путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

25 Фиг. 22 показывает оценку измеренных уровней HERV-W в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком легкого patients путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

30 Фиг. 23 показывает оценку измеренных уровней с-Мус в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком легкого путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 24 показывает оценку измеренных уровней LINE в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком легкого путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

35 Фиг. 25 показывает оценку измеренных уровней LINE в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с колоректальным раком путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 26 показывает оценку измеренных уровней EGFR в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с колоректальным раком путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

40 Фиг. 27 показывает оценку измеренных уровней HERV-W в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с колоректальным раком путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

45 Фиг. 28 показывает оценку измеренных уровней LINE в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком молочной железы путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 29 показывает оценку измеренных уровней HERV-W в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с меланомой путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 30 показывает оценку измеренных уровней HERV-W в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком яичника путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

5 Фиг. 31 показывает оценку измеренных уровней AR-WT в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком предстательной железы путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 32 показывает оценку измеренных уровней AR-V7 в экзосомах, выделенных из плазмы здоровых пациентов или пациентов с раком предстательной железы путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

10 Фиг. 33 показывает оценку измеренных уровней LINE в экзосомах, выделенных из мочи здоровых пациентов или пациентов с раком мочевого пузыря путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 34 показывает оценку измеренных уровней HERV-W в экзосомах, выделенных из мочи здоровых пациентов или пациентов с раком мочевого пузыря путем захвата 15 при помощи анти-СА-IX антител.

Фиг. 35 показывает оценку измеренных уровней с-Мус в экзосомах, выделенных из мочи здоровых пациентов или пациентов с раком мочевого пузыря путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

20 Фиг. 36 показывает оценку измеренных уровней LINE в экзосомах, выделенных из мочи здоровых пациентов или пациентов с раком мочевого пузыря путем захвата при помощи анти-СА-IX антител.

Подробное описание изобретения

Мы неожиданно обнаружили, что в том случае, когда анти-СА-IX антитело используется для захвата экзосом из биологической жидкости, обеспечивается 25 возможность выделения экзосом, происходящих из опухоли.

Соответственно, в первом аспекте этого изобретения предоставляется способ *in vitro* выделения из биологической жидкости экзосом, происходящих из опухоли, такой способ включает захват экзосом из образца этой биологической жидкости с помощью анти-СА-IX антитела.

30 Мы также неожиданно обнаружили, что, в том случае когда, анти-СА-IX антитело используется для захвата экзосом из биологической жидкости, создается возможность полноценного обнаружения и количественного определения последовательностей нуклеиновых кислот, происходящих из опухоли, а также проведения разграничения между пациентами с опухолью и пациентами без опухоли.

35 Соответственно, во втором аспекте этого изобретения предоставляется способ количественного определения *in vitro* последовательности нуклеиновой кислоты, происходящей из опухоли, в биологической жидкости, причем такой способ включает

- а) захват экзосом из образца такой биологической жидкости при помощи анти-СА-IX антитела, и
- 40 б) определение уровня происходящей из опухоли последовательности нуклеиновой кислоты, присутствующей в экзосомах на стадии а).

В третьем аспекте этого изобретения предоставляется способ определения *in vitro* наличия опухоли у субъекта, включающий

- а) захват экзосом из образца биологической жидкости, полученного от этого субъекта, 45 при помощи анти-СА-IX антитела
- б) определение уровня происходящей из опухоли последовательности нуклеиновой кислоты, присутствующей в экзосомах на стадии а), и
- с) сравнение уровня происходящей из опухоли последовательности нуклеиновой

кислоты, определенного на стадии b), с одним или более эталонными значениями.

В четвертом аспекте этого изобретения предоставляется набор, предназначенный для использования при выделении происходящих из опухоли экзосом из биологической жидкости, причем такой набор содержит анти-СА-IX антитело.

5 В пятом аспекте этого изобретения предоставляется набор, предназначенный для использования в количественном анализе происходящей из опухоли последовательности нуклеиновой кислоты в экзосомах из биологической жидкости, причем такой набор содержит анти-СА-IX антитело.

10 В шестом аспекте этого изобретения предоставляется набор, предназначенный для использования при определении *in vitro* наличия опухоли у субъекта по экзосомам, выделенным из биологической жидкости, причем такой набор содержит анти-СА-IX антитело.

15 В особом варианте осуществления в пятом и шестом аспектах этого изобретения набор дополнительно содержит набор праймеров, направленных на последовательность нуклеиновой кислоты, связанную с опухолью.

В одном варианте осуществления в любом аспекте опухоль выбирают из числа рака легких, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака почки, рака предстательной железы, колоректального рака, рака желудка и меланомы.

20 В одном варианте осуществления в любом аспекте этого изобретения биологическую жидкость выбирают из крови, плазмы, сыворотки, мочи и слюны.

В одном варианте осуществления в любом аспекте этого изобретения происходящую из опухоли последовательность нуклеиновой кислоты выбирают из двухцепочечной последовательности ДНК, одноцепочечной последовательности ДНК и последовательности РНК.

25 В одном варианте осуществления двухцепочечн DNA tumour-related нуклеиновокислотная последовательность является последовательностью дикого типа из гена-мишени, выбранного из группы, состоящей из гена BRAF, гена KRAS, гена NRAS, гена EGFR и гена AR.

30 В другом варианте осуществления последовательность двухцепочечной ДНК нуклеиновой кислоты, происходящая из опухоли, является мутированной последовательностью из гена-мишени, выбранного из группы, состоящей из гена BRAF, гена KRAS, гена NRAS, гена EGFR и гена AR. В особом варианте осуществления мутированную последовательность выбирают из амплификации, точечной мутации, делеции и вставки.

35 В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты двухцепочечной ДНК, происходящей из опухоли, выбирают из амплификации гена BRAF WT, точечной мутации гена BRAF, амплификации гена KRAS WT, точечной мутации гена KRAS, амплификации гена NRAS WT, точечной мутации гена NRAS, амплификации гена cMyc WT, амплификации гена EGFR WT, точечной мутации гена EGFR, делеции гена EGFR, вставки гена EGFR, гена AR WT, точечной мутации гена AR.

40 В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты одноцепочечной ДНК, происходящей из опухоли, выбирают из амплификации гена cMyc WT, ретротранспозона длинного диспергированного ядерного повтора (LINE), ретротранспозона короткого диспергированного ядерного повтора (SINE) и ретротранспозона эндогенного ретровируса человека (HERV).

В одном варианте осуществления ретротранспозон HERV выбирают из HERV-H, HERV-K, HERV-C и HERV-W.

В одном варианте осуществления последовательность РНК выбирают из мРНК cMyc

WT, мПНК LINE, мПНК SINE, мПНК HERV, мПНК рецептора андрогена (AR) WT и сплайсинг-варианта мПНК гена AR.

В одном варианте осуществления последовательность мПНК HERV выбирают из мПНК HERV-Н мПНК, HERV-К мПНК, HERV-С мПНК и HERV-W.

5 В одном варианте осуществления точечная мутация гена BRAF является BRAF V600 мутацией.

В отдельном варианте осуществления мутацию BRAFV600 выбирают из BRAFV600E, BRAFV600K, BRAFV600R, BRAFV600M и BRAFV600D.

10 В одном варианте осуществления точечная мутация гена KRAS представляет собой мутацию KRAS G12.

В конкретном варианте осуществления мутацию KRAS G12 выбирают из KRAS G12C, KRAS G12S, KRAS G12V, KRAS G12A и KRAS G12D.

В одном варианте осуществления точечная мутация гена KRAS представляет собой мутацию KRAS G13.

15 В отдельном варианте осуществления мутация KRAS G13 является KRAS G13D.

В одном варианте осуществления точечная мутация гена NRAS представляет собой мутацию NRAS G12.

В отдельном варианте осуществления мутацию NRAS G12 выбирают из NRAS G12C и NRAS G12D.

20 В одном варианте осуществления точечная мутация гена NRAS представляет собой мутацию Q61.

В отдельном варианте осуществления мутацию NRAS Q61 выбирают из NRAS Q61K и NRAS Q61R.

25 В одном варианте осуществления точечная мутация гена EGFR представляет собой мутацию EGFR T790.

В отдельном варианте осуществления мутация EGFR T790 представляет собой EGFR T790M.

В одном варианте осуществления точечная мутация гена EGFR представляет собой мутацию EGFR L858.

30 В отдельном варианте осуществления мутация EGFR L858 представляет собой EGFR L858R.

В одном варианте осуществления делеция гена EGFR представляет собой делецию EGFR EXON 19.

35 В одном варианте осуществления вставка гена EGFR представляет собой вставку EGFR EXON 20.

В одном варианте осуществления точечную мутацию гена AR выбирают из мутации AR L702, мутации AR W742, и мутации AR H875, мутации AR F877 и мутации AR T878.

В отдельном варианте осуществления мутация AR L702 представляет собой AR L702H.

40 В отдельном варианте осуществления мутация AR W742 представляет собой AR W742C.

В отдельном варианте осуществления мутация AR H875 представляет собой AR H875Y.

В отдельном варианте осуществления мутация AR F877 представляет собой AR F877L.

45 В отдельном варианте осуществления мутация AR T878 представляет собой AR T878A.

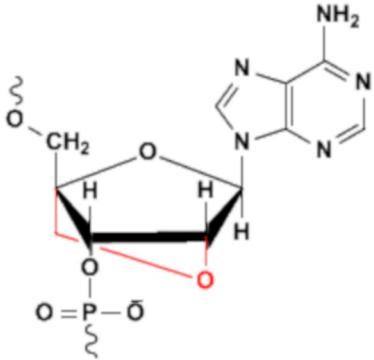
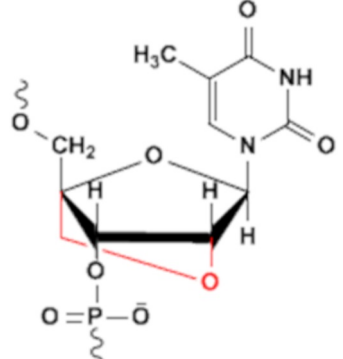
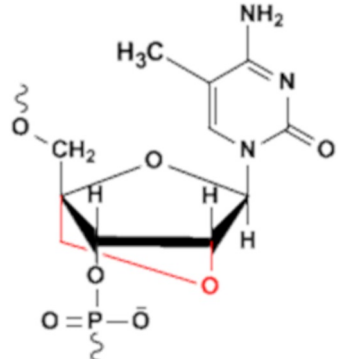
В одном варианте осуществления вариант сплайсинга гена AR представляет собой AR-V7.

Все варианты осуществления могут комбинироваться.

Примеры

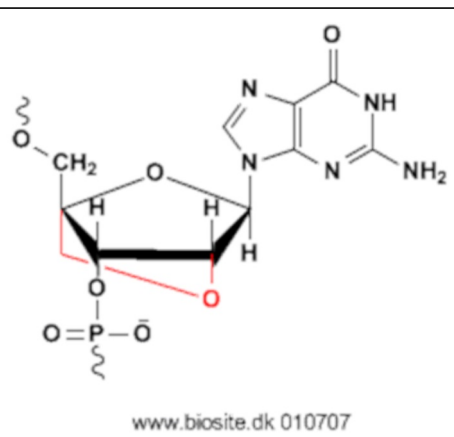
Далее изобретение описывается при помощи неограничивающих примеров.

Некоторые из нуклеотидных последовательностей, цитированных в примерах, содержат
 5 один или более нуклеозидов LNA, которые обозначаются символом "+", а затем соответствующей буквой (A, C, G или T/U). Структурные формулы LNA-модифицированных нуклеозидов приведены в описании ниже:

LNA-единица	Формула
LNA-аденозин	 <p style="text-align: center;">www.biosite.dk 010707</p>
LNA-тимидин	 <p style="text-align: center;">www.biosite.dk 010707</p>
LNA 5-метилцитидин	 <p style="text-align: center;">www.biosite.dk 010707</p>

5

LNA гуанозин



10

Материалы и методы

А) Сбор и фракционирование крови

15

Все пациенты голодали начиная с полуночи и до взятия образцов крови утром. Кровь собирали в K2-EDTA пробирки для взятия образцов плазмы (VACUTAINER® Becton Dickinson, пурпурная крышка, REF 367864, 6,0 мл) или соответствующие пробирки для сыворотки (VACUTAINER® Becton Dickinson, красная крышка, REF 366881, 5,0 мл). Потом пробирки переворачивали 5 или 6 раз, держали в вертикальном положении и хранили при комнатной температуре (20-25°C). Дальнейшую обработку проводили в пределах одного часа после сбора путем центрифугирования при 1500g в течение 15 минут при 20-25°C. Плазму собирали пастеровской пипеткой для одноразового использования (Steroglass, REF: LPMW032653; 5мл), останавливаясь на 3-4 мм выше лейкоцитарной пленки, чтобы не допустить ресуспендирования. Образцы визуально проверяли на следы липидов, желчи (Itterum) или гемолиза. Плазму собирали в пробирки Falcon 15 мл, осторожно переворачивали и делили на аликвоты в меченые криопробирки (REF: n BSM 535, Biosigma) и хранили при -80°C.

20

25

В) Приготовление плазмы и реагентов

30

Образцы плазмы центрифугировали при 1200g в течение 20 минут при комнатной температуре (RT), чтобы удалить эритроциты и клеточный дебрис. Затем супернатант собирали и центрифугировали еще раз при 10000g в течение 30 минут при RT, чтобы устранить более крупные везикулы и дебрис. Полученный в результате супернатант собрали и развели в объемном соотношении 1:1 фосфатным буфером (PBS). Один микролитр смеси ингибиторов протеаз (1000X; Sigma кат. номер P-834) добавили к каждому образцу, чтобы сохранить биомаркеры белков. Реагенты для очистки ДНК, включая промывочные буферы, готовили в соответствии с инструкциями производителей (HansaBioMed OU, Эстония). Праймеры и зонды повторно растворяли в воде Milli-Q или TE-буфере, делили на аликвоты и хранили при -20°C до использования.

35

С) Выделение экзосом из плазмы

40

Анти-CAIX- и анти-CA XII антитела, использованные для захвата происходящих из опухоли экзосом, были любезно предоставлены доктором Reinhard Zeidler (Helmoltz Zentrum Munchen, Германия). Анти-cMET (кат. номер PA5-27235; Thermo Fisher), анти-CD73 (кат. номер ab91086; Abcam), анти-CAV (кат. номер 611338; BD Biosciences), анти-TM9SF4 (кат. номер: LS-A9852; Lifespan Biosciences, Inc) и анти-Анти-EPCAM (кат. номер PA5-29634; Thermo Fisher) антитела были куплены у коммерческих поставщиков. Латексные гранулы были куплены у коммерческого поставщика (HansaBioMed OU, Эстония) и покрыты с использованием 1 мкг антител на образец. Для выделения популяции экзосом, использовали пептид Vn96 согласно инструкциям производителя (ME-kit, New England Peptide, США).

45

Десять микролитров покрытых антителами гранул или 50 мкг пептида Vn96 добавили к образцу предварительно очищенной разбавленной плазмы для выделения экзосом. Образцы смешивали путем пипетирования вверх-вниз и инкубировали в течение двух часов при RT при вращении. После инкубации образцы центрифугировали при 5000g в течение 10 минут при RT. Затем полученный супернатант осторожно отбрасывали, не нарушая осадок. Осадок промывали PBS и центрифугировали при 5000g в течение 10 минут. Затем стадию промывки повторяли еще раз и конечный осадок ресуспендировали в 200 мкл PBS 1X.

D) Выделение экзосом из мочи

До проведения процедуры выделения мочу концентрировали 10X при использовании фильтров EMD Millipore Amicon Ultra-15 с границей пропускания 100kDa (кат. номер UFC910024, Millipore).

Затем десять микролитров гранул, покрытых анти-CAIX, вливали в 1 мл концентрированной мочи. После 2-часовой выделенной гранулы осаждали центрифугированием и промывали, как описано ранее, до экстракции РНК.

E) Очистка и концентрирование ДНК

Связанную с экзосомами ДНК (EV-ДНК) экстрагировали и концентрировали при помощи коммерчески доступного набора для экстракции циркулирующей ДНК (EXO-DNAc-PS; HansaBioMed OU, Эстония). Коротко, связанные с гранулами экзосомы лизировали с помощью подходящего лизирующего буфера и обрабатывали протеиназой K для высвобождения ДНК из белковых комплексов. Затем в образцы добавляли этанол, загружали на спин-колонку с кремнеземной мембраной и центрифугировали при 10000g в течение 1 минуты. После центрифугирования проточную фракцию отбрасывали. Согласно инструкциям производителей осуществляли две стадии промывки, чтобы избавиться от загрязняющих растворителей и происходящих из плазмы ингибиторов до элюирования. В элюированную ДНК добавляли связывающий буфер и этанол и загружали на новую спин-колонку с кремнеземной мембраной еще раз для дальнейшей очистки и концентрирования. Еще две стадии промывки были осуществлены перед элюированием очищенной EV-ДНК в конечный объем 15 мкл элюирующего буфера, предоставленного в наборе.

F) Очистка РНК

РНК экстрагировали непосредственно из осажденных гранул с использованием коммерчески доступного набора для экстракции экзосомальной РНК (sortEVTM; Exosomics Siena Spa). Коротко, связанные с гранулами экзосомы лизировали с помощью буфера на основе фенола и перемешивали на вортексе в течение 30 секунд. Затем в образец добавляли хлороформ и центрифугировали при 12000g в течение 10 минут для того, чтобы отделить водную фазу от органической. После центрифугирования водную фазу собирали, добавляли этанол и загружали на спин-колонку с кремнеземной мембраной. Нагруженную колонку центрифугировали при 14000g в течение 30 секунд и отбрасывали проточную фракцию. Проводили две стадии промывки согласно инструкциям производителя, чтобы избавиться от загрязняющих растворителей и происходящих из плазмы ингибиторов перед элюированием. Очищенную EV-РНК элюировали в конечный объем 15 мкл элюирующего буфера, предоставленного с набором.

G) ПЦР-амплификация генов BRAF, KRAS, EGFR, сMyc из EV-ДНК

ПЦР-амплификация EV-ДНК представляет собой сложную задачу вследствие низкого количества копий и высокой фрагментации матрицы. Поэтому в протокол количественной ПЦР в реальном времени (кРНК) была включена стадия

предварительной амплификации с целью улучшения обнаружения генов-мишеней BRAF и KRAS.

Праймеры и зонды

BRAF предварительные праймеры:

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

KRAS предварительные праймеры:

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

BRAF qPCR праймеры и зонды:

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

KRAS qPCR праймеры и зонды:

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

EGFR qPCR праймеры и зонды

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

cMyc qPCR праймеры и зонды

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

Пре-амплификация генов-мишеней из EV-ДНК

Все реагенты размораживали при RT в течение по меньшей мере одного часа и быстро смешивали без встряхивания, чтобы не допустить инактивации фермента. Каждая реакция предварительной амплификации включала 7 мкл элюированной ДНК, 1X буфер Bioron High Fidelity, 3мМ MgCl₂; 200мкМ dNTPs, 1,25 единиц SNase полимеразы (Bioron GmbH, Германия) и 0,4 мкл праймеров (10 мкМ) в общем объеме 20мкл. Каждую реакцию проводили в ПЦР-совместимом микрофлаконе, загруженном в температурный ПЦР-циклер, выполняющий следующую ПЦР-программу: 98°C в течение 30", 98°C в течение 10" и 72°C в течение 5', стабилизация при 4°C. Пре-амплифицированную ДНК разводили в 80 мкл стерильной воды и немедленно использовали для кПЦР-анализа или хранили при -20°C до трех месяцев.

Амплификация генов-мишеней с помощью qPCR

Для амплификации генов-мишеней из EV-ДНК, каждая кПЦР-реакция включала 7 мкл пре-амплифицированной ДНК, 1X SsoAdvanced Мастер-микс универсальных зондов (Biorad; США), 0,625 мкл праймеров (10 мкМ) и 0,3125 мкл флуоресцентного зонда (10 мкМ) в общем объеме 25 мкл. После осторожного смешивания каждую реакцию загружали в двух экземплярах на 96-луночный ПЦР-планшет и запускали следующую кПЦР программу: 95°C в течение 3', 40 циклов при 95°C в течение 5" и 60°C в течение

30", с последующей стадией стабилизации при 4°C.

Для амплификации генов-мишеней из EV-РНК один микролитр EV-РНК непосредственно загружали в 20-мкл одностадийную RT-кПЦР реакцию и амплифицировали в соответствии с инструкциями производителя (iTaq Universal OneStep qPCR; Biorad).

Амплификация элементов ретротранспозона с помощью кПЦР

Один микролитр EV-ДНК или EV-РНК непосредственно загружали в кПЦР смесь и амплифицировали, как было описано ранее. Использовали следующие праймеры и зонды:

10 LINE qPCR праймеры и зонды

a) FW: 5'-ТСААСАГААГАГСТААСТАТСС-3' (SEQ ID NO:21);

b) RW: 5'-ТТГТАГГТКАСТКАГГАСТТГС-3' (SEQ ID NO:22);

с) зонд (5,6-ТАМРА)-ТГСАССААТАСАГГАГСАССАГАТТСА-ВНҚ2 (SEQ ID NO: 23);

15 HERV-W qPCR праймеры и зонды

a) FW: 5'-СТТССАГААТТГААГСТГТАААГС-3' (SEQ ID NO:24);

b) RW: 5'-GGGTTGTGCAGTTGAGATTTCC-3' (SEQ ID NO:25);

с) зонд FAM-5' -ТТСТТСААТГГАГССССАГАТГСАГ-3' –ТАМРА (SEQ ID NO:26);

Анализ данных кПЦР и интерпретация результатов

20 Количественное определение генов-мишеней BRAF и KRAS WT выразалось в виде значений порогового цикла (Ct) и наносилось на перевернутую Y ось. Альтернативно, значение Z-оценки было использовано для определения порога, предназначенного для проведения различия между образцами от здоровых субъектов и больных пациентов, как было опубликовано ранее (15). Коротко, образцы с положительным значением Z-оценки рассматривались как отрицательные в отношении заболевания, в то время как образцы с отрицательным значением Z-оценки классифицировались как положительные по раку. В некоторых отдельных случаях наблюдался также противоположная закономерность как результат понижающей регуляции уровней ретротранспозонных элементов.

30 Амплификация генов-мишеней с помощью цифровой ПЦР

Для определения мутаций использовали платформу цифровой ПЦР (dPCR) на основе чипа (QuantStudio 3D Digital PCR System Platform, Thermo Fisher Scientific, Карлсбад, СА, США). Обнаружение мутаций посредством dPCR выполнялось на основе зонда TaqMan-MGB, конъюгированного с FAM, нацеленным на мутацию Т878А АR, зонда TaqMan-MGB, конъюгированного с VIC, нацеленным на соответствующий ген дикого типа (SNP Genotyping Assay C_175239649_10; Fisher Scientific). Сплайс-варианты АR-WT и АR-V7 были изготовлены по заказу с использованием следующих праймеров и зондов:

a) АR-WT FW: 5'-САГССАТТГСАГАГАГАГСТГ-3' (SEQ ID NO:27);

b) АR-WT RW: 5'-ГАААГГАТСТТГГГАСТТГС-3' (SEQ ID NO:28);

40 c) зонд

d) АR-WT: MGB 5'- АГТТКАСТТТТГАССТГС -3' (SEQ ID NO:29);

e) АR-V7 FW: 5'-ССАТСТТГТСАГТСТТСАГАААТГТТА-3' (SEQ ID NO:30);

f) АR-V7 RW: 5'-ТТТГААТГАГГААГТСАГССТТТСТ-3' (SEQ ID NO:31);

g) зонд АR-V7: MGB 5'- ААГСАГГАТГАСТСТГ-3' (SEQ ID NO:32).

45 Было приготовлено шестнадцать микролитров реакционной смеси, содержащей 8 мкл смеси 2X QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix (Life Technologies), 0,4 мкл 40X зонда TaqMan-MGB-FAM, 1,1 мкл разбавленной ДНК (50нг/мкл) и 6,5 мкл воды, лишенной нуклеазной активности (Qiagen). Реакционная смесь отрицательных контролей содержала

8 мкл смеси 2X QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix, 0,4 мкл зонда 40X TaqMan-MGB-FAM и 7,6 мкл воды, лишенной нуклеазной активности.

Чтобы количественно определить копии генов AR T878A, AR-V7 и гена wt, 15 мкл реакционной смеси «загружали» на чип QuantStudio 3D Digital PCR 20K Chip с использованием автоматического устройства для загрузки чипа согласно инструкциям производителя (Life Technologies). При «загрузке» реакция разделяется на 20.000 микро-реакций с конечным объемом 865 пл, что соответствует 20.000 микролункам на поверхности чипа. Каждый загруженный чип подвергается следующим условиям при выполнении цикла с помощью системы ProFlex PCR: 95°C в течение 8', 40 циклов при 95°C в течение 15" и 60°C в течение 1', с последующей стадией конечной элонгации при 60°C в течение 2'. После термоциклирования чипы визуализировали на приборе QuantStudio 3D, который вычисляет приблизительную концентрацию последовательности нуклеиновой кислоты, на которую был нацелен зонд. Анализ полученных данных был проведен с использованием программного обеспечения QuantStudio 3D Analysis Suite Cloud Software после настройки вручную аналитического порога и исключения aberrantных эмиссий. Все сигналы отрицательных контролей получали при значении 5000 относительных единиц флуоресценции (RFU) для FAM, поэтому этот порог являлся фиксированным для установления позитивной и негативной эмиссии для AR T878A, тогда как 2100 RFU для VIC использовали как пороговую величину эмиссии AR wt. Мы также считали негативными образцы с 2 или меньше копиями мутантов на мл.

Пример 1: Захватывание экзосом с помощью анти-CA-IX антитела обеспечивает возможность обогащения по экзосомам, происходящим из опухоли

Фиг.1 показывает результаты количественного анализа дикого типа (WT) BRAF и V600E мутированного гена BRAF V600E с помощью количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР) на ДНК, экстрагированной из плазмы пациентов с меланомой, положительной по BRAF V600E, после иммуновыделения экзосом с помощью гранул, покрытых антителами против карбоангидразы IX (CAIX), против карбоангидразы XII (CA XII), против cMET, против CD73, против кавеолина (CAV) и против TM9SF4, или с помощью обычного осаждения внеклеточных везикул (EV). Антитела были отобраны, исходя из их способности нацеливаться на известные опухолевые биомаркеры. Иммуновыделение с помощью анти-CAIX-антитела обеспечивало большее обогащение по экзосомам, происходящим из опухоли, чем все другие подходы с иммунозахватом и обычное осаждение EV, о чем свидетельствуют более высокие уровни гена BRAF V600E по сравнению с геном BRAF WT. Данные выражали в виде значений порогового цикла (Ct), которые наносили на перевернутую шкалу Y.

Пример 2: В отличие от обычного выделения экзосом ультрацентрифугированием, иммунозахват при помощи анти-CA-IX антитела дает возможность проведения различия между здоровыми пациентами и пациентами с раком

Фиг.2 и В показывают результаты количественного анализа гена BRAF WT при помощи кПЦР на ДНК, экстрагированной из плазмы здоровых доноров (HD) и А) пациентов с колоректальным раком (CRC) или В) пациентов с метастатической меланомой (MEL) после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами, или обычным осаждением внеклеточных везикул (EV). Было обнаружено, что уровни гена BRAF WT в происходящих из опухоли экзосомах являются значительно более высокими в плазме обоих когорт пациентов CRC и MEL по сравнению с образцами плазмы от здоровых доноров после захвата анти-CAIX-антитела, что говорит об выделении CAIX-позитивных экзосом, происходящих из опухоли. В противовес этому, не наблюдалось различия между когортами после обычного

осаждения EV вследствие одновременного выделения экзосом, не происходящих из опухоли, несущих копии гена BRAF WT. Результаты выражаются как значения порогового цикла (Ct) и наносятся на перевернутую шкалу Y. Аналогичным образом, фиг. 2C показывает результат количественного анализа AR T878 против частоты аллеля AR WT у двух пациентов с раком предстательной железы (РСа).

Пример 3: В отличие от выделения экзосом путем захвата при помощи анти-ЕРСАМ антитела, иммунозахват при помощи анти-СА-IX антитела дает возможность проводить различие между здоровыми пациентами и пациентами с раком

Фиг. 3 показывает результаты количественного анализа гена BRAF WT при помощи кПЦР на ДНК, экстрагированной из плазмы пациентов HD и пациентов CRC после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-САIX-антителами, или гранул, покрытых антителами к адгезивной молекуле эпителиальных клеток (ЕРСАМ). ЕРСАМ была выбрана в качестве эталонного маркера опухолевых экзосом. Экзосомы, выделенные при помощи гранул, покрытых анти-САIX-антителами, имели низкие уровни гена BRAF WT в обоих образцах плазмы HD и высокие уровни в обоих образцах CRC. Наоборот, экзосомы, выделенные при помощи гранул, покрытых анти-ЕРСАМ-антителами, имели высокие уровни гена BRAF WT в одном образце HD и в обоих CRC образцах, вероятно, вследствие более низкой способности анти-ЕРСАМ антитела эффективно выделять экзосомы, происходящие из CRC, по сравнению с анти-САIX-антителами. Результаты выражают как значения порогового цикла (Ct) и наносят на перевернутую шкалу Y.

Пример 4: Дигностирование колоректального рака при помощи BRAF

Фиг. 4 показывает результаты количественного анализа гена BRAF WT при помощи кПЦР на ДНК, экстрагированной из плазмы пациентов HD (n=13) и пациентов CRC (n=13) после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-САIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога. Образцы с положительной Z-оценкой рассматривали как отрицательные по опухоли, тогда как образцы с отрицательной Z-оценкой рассматривали как положительные по раку. В этом эксперименте 10 из 13 (80%) образцов HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку. Наоборот, 10 из 13 (80%) образцов CRC имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. Эти результаты определяют диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов CRC с помощью описанного теста.

Пример 5: Дигностирование рака предстательной железы с помощью BRAF

Фиг. 5 показывает результаты количественного анализа гена BRAF WT при помощи кПЦР на ДНК, экстрагированной из пациентов HD (n = 5), пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ВРН; n = 5) и пациентов с раком предстательной железы (РСа; n = 5) после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-САIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. В этом эксперименте 4 из 5 (80%) образцов плазмы HD или ВРН имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку. 4 из 5 (80%) РСа образцов имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. Эти результаты определяют диагностический порог для различения здоровых индивидуумов или пациентов ВРН от пациентов с РСа с помощью описанного теста.

Пример 6: Дигностирование рака желудка с помощью BRAF

Фиг. 6 показывает результаты количественного анализа гена BRAF WT при помощи кПЦР на ДНК, экстрагированной из пациентов HD (n = 5) и пациентов с раком желудка

(Gastric Ca; n = 6) после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-САIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. В этом эксперименте 5 из 5 (100%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку. 5 из 6 (83%) РСa образцов имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. Эти результаты определяют диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком желудка с помощью описанного теста.

Пример 7: Дигностирование рака яичника с помощью BRAF

Фиг. 7 показывает результаты количественного анализа гена BRAF дикого типа (WT) при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из пациентов HD (n = 5) и пациентов с раком яичника (Ovary; n = 6) после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-САIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. В этом эксперименте 4 из 5 (80%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. 4 из 6 (66%) РСa образцов имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. Эти результаты определяют диагностический порог для отличия здоровых индивидуумов от пациентов с раком яичника с помощью описанного теста.

Пример 8: Дигностирование колоректального рака или рака предстательной железы с помощью KRAS

Фиг. 8 показывает результаты количественного анализа гена KRAS дикого типа (WT) при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов пациентов с HD, ВРН и раком после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-САIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. А) 4 из 5 (80%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 5 (80%) CRC образцов плазмы имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В) 4 из 5 (80%) образцов плазмы HD и ВРН имели положительный Zscore и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 5 (80%) РСa образцов плазмы имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти результаты показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов или пациентов с доброкачественной болезнью от пациентов раком можно получить, используя ген KRAS WT вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 9: Дигностирование рака легкого с помощью EGFR

Фиг. 9 показывает результаты количественного анализа гена EGFR дикого типа (WT) при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов HD и пациентов с раком легкого после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-САIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 11 из 15 (77%) образцов плазмы HD имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 5 из 9 (60%) образцов плазмы от пациентов с раком легкого имели положительную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти результаты показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов или пациентов с раком легкого можно получить, используя EGFR WT ген вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 10: Дигностирование рака легкого с помощью HERV-W

Фиг. 10 показывает результаты количественного анализа элемента ретротранспозона HERV-W при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов HD и пациентов с раком легкого после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве
5 диагностического порога, как описано ранее. 8 из 10 (80%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 6 из 7 (85%) образцов плазмы с раком легкого имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти результаты показывают, что диагностический порог для отличия здоровых индивидуумов от пациентов с
10 раком легкого может быть получен с использованием элемент ретротранспозона HERV-W вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 11: Дигностирование рака легкого с помощью LINE

Фиг. 11 показывает результаты количественного анализа элемента ретротранспозона LINE при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов
15 HD и пациентов с раком легкого после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 9 из 10 (90%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 6 (67%) образцов плазмы от пациентов с раком легкого имели отрицательную Z-
20 оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти результаты показывают, что диагностический порог для отличия здоровых индивидуумов от пациентов с раком легкого может быть получен с использованием элемента ретротранспозона LINE вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 12: Дигностирование рака легкого с помощью гена с-Мус

Фиг. 12 показывает результаты количественного анализа гена с-Мус при помощи
25 ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов HD и пациентов с раком легкого после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 7 из 7 (100%) образцов плазмы HD имели нулевую или
30 положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 6 (67%) образцов плазмы от пациентов с раком легкого имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от
35 пациентов с раком легкого может быть получен с использованием гена с-Мус вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 13: Диагностирование рака молочной железы с помощью HERV-W

Фиг. 13 показывает результаты количественного анализа элемента ретротранспозона HERV-W при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов
40 HD и пациентов с раком молочной железы после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 7 из 9 (78%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 5 (80%) образцов плазмы от пациентов с раком молочной железы имели
45 отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком молочной железы может быть получен с использованием элемент ретротранспозона HERV-W вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 14: Диагностирование рака молочной железы с помощью LINE

Фиг. 14 показывает результаты количественного анализа элемента ретротранспозона LINE при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов HD и пациентов с раком молочной железы после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 9 из 10 (90%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 5 (80%) образцов плазмы от пациентов с раком молочной железы имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком молочной железы может быть получен с использованием элемент ретротранспозона LINE вместо гена BRAF WT в виде результатов.

Пример 15: Дигностирование рака предстательной железы с помощью AR-WT

Фиг. 15 показывает результаты количественного анализа AR WT гена при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов HD и образцов пациентов с раком предстательной железы после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 1 из 1 (100%) образцов плазмы HD имел положительную Z-оценку и рассматривался как рак-негативный, тогда как 15 из 16 (93%) образцов от пациентов с раком предстательной железы имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком предстательной железы может быть получен с использованием AR WT гена вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 16: Дигностирование рака предстательной железы с помощью AR-T878A

Фиг. 16 показывает результаты количественного анализа AR T878A гена при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов HD и образцов от пациентов с раком предстательной железы после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 1 из 1 (100%) образцов плазмы HD имел положительную Z-оценку и рассматривался как рак-негативный, тогда как 2 из 2 (100%) образцов от пациентов с раком предстательной железы имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком предстательной железы может быть получен с использованием AR T878A гена вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 17: Дигностирование колоректального рака с помощью HERV-W

Фиг. 17 показывает результаты количественного анализа HERV-W элемента ретротранспозона при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов HD и пациентов с колоректальным раком (CRC) после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 8 из 10 (80%) образцов плазмы HD имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 9 из 10 (90%) CRC образцов плазмы имели положительную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с CRC может быть получен с использованием HERV-W элемент ретротранспозона вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 18: Дигностирование колоректального рака с помощью LINE

Фиг. 18 показывает результаты количественного анализа LINE элемента ретротранспозона при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов HD и образцов от пациентов с колоректальным раком (CRC) после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами.

5 Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 7 из 9 (77%) образцов плазмы HD имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 8 из 10 (80%) CRC образцов плазмы имели положительную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения
10 здоровых индивидуумов от CRC пациентов может быть получен с использованием LINE элемент ретротранспозона вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 19: Дигностирование рака желудка с помощью HERV-W

Фиг. 19 показывает результаты количественного анализа HERV-W элемента ретротранспозона при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной
15 из образцов HD и образцов от пациентов с раком желудка после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 7 из 10 (70%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 5 (80%) образцов плазмы пациентов с раком
20 желудка имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком желудка может быть получен с использованием HERV-W элемент ретротранспозона вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

25 Пример 20: Дигностирование рака желудка с помощью LINE

Фиг. 20 показывает результаты количественного анализа элемента ретротранспозона LINE при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов
HD и образцов от пациентов с раком желудка после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали
30 в качестве диагностического порога, как описано ранее. 7 из 10 (70%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 5 (80%) образцов плазмы от пациентов с раком желудка имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти
35 данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком желудка может быть получен с использованием элемента ретротранспозона LINE вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 21: Дигностирование рака яичника с помощью с-Мус

Фиг. 21 показывает результаты количественного анализа гена с-Мус при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из образцов HD и образцов от
40 пациентов с раком яичника после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 2 из 3 (70%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 2 из 2 (100%) образцов от пациентов с раком яичника имели отрицательную Z-оценку и
45 рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком яичника может быть получен с использованием гена с-Мус вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 22: Дигностирование рака легких с помощью HERV-W

Фиг. 22 показывает результаты количественного анализа элемента ретротранспозона HERV-W при помощи ПЦР в реальном времени на РНК, экстрагированной из образцов HD и образцов пациентов с раком легкого после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 6 из 8 (77%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 5 (80%) образцов пациентов с раком легкого имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком легкого может быть получен с использованием элемента ретротранспозона HERV-W из РНК вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 23: Дигностирование рака легких with c-Myc

Фиг. 23 показывает результаты количественного анализа матричной РНК (мРНК) c-Myc при помощи ПЦР в реальном времени на РНК, экстрагированной из образцов HD и образцов пациентов с раком легкого после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 4 из 5 (80%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 5 из 6 (85%) образцов пациентов с раком легкого имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком легкого может быть получен с использованием мРНК c-Myc вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 24: Дигностирование рака легких с помощью LINE

Фиг. 24 показывает результаты количественного анализа элемента ретротранспозона LINE при помощи ПЦР в реальном времени на РНК, экстрагированной из образцов HD и образцов пациентов с раком легкого после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 12 из 15 (80%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 6 (67%) образцов пациентов с раком легкого имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком легкого может быть получен с использованием элемента ретротранспозона LINE из РНК вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 25: Дигностирование колоректального рака с помощью LINE

Фиг. 25 показывает результаты количественного анализа LINE элемента ретротранспозона при помощи ПЦР в реальном времени на РНК, экстрагированной из образцов HD и образцов пациентов с колоректальным раком (CRC) после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 7 из 9 (77%) образцов плазмы HD имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 5 (80%) CRC образцов плазмы имели положительную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от CRC пациентов может быть получен с использованием LINE элемента ретротранспозона из РНК вместо гена BRAF WT в виде результатов

ПЦР.

Пример 26: Дигностирование колоректального рака с помощью EGFR

Фиг. 26 показывает результаты количественного анализа EGFR WT матричной РНК (мРНК) при помощи ПЦР в реальном времени на РНК, экстрагированной из образцов HD и образцов пациентов с колоректальным раком (CRC) после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 5 из 5 (100%) образцов плазмы HD имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 3 из 5 (60%) образцов плазмы CRC имели положительную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов CRC может быть получен с использованием mRNA EGFR WT вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 27: Дигностирование колоректального рака с помощью HERV-W

Фиг. 27 показывает результаты количественного анализа элемента ретротранспозона HERV-W при помощи ПЦР в реальном времени на РНК, экстрагированной из образцов HD и образцов пациентов с колоректальным раком (CRC) после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 6 из 8 (75%) образцов плазмы HD имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 5 (80%) CRC образцов плазмы имели положительную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов CRC может быть получен с использованием элемента ретротранспозона HERV-W из РНК вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 28: Дигностирование рака молочной железы с помощью LINE

Фиг. 28 показывает результаты количественного анализа LINE элемента ретротранспозона при помощи ПЦР в реальном времени на РНК, экстрагированной из образцов HD и образцов пациентов с раком молочной железы после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 12 из 15 (80%) образцов плазмы HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 5 из 8 (62%) образцов пациентов с раком молочной железы имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком молочной железы может быть получен с использованием элемента ретротранспозона LINE из РНК вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 29: Дигностирование меланомы с помощью HERV-W

Фиг. 29 показывает результаты количественного анализа элемента ретротранспозона HERV-W при помощи ПЦР в реальном времени на РНК, экстрагированной из образцов HD и образцов пациентов с меланомой после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 2 из 3 (66%) образцов плазмы HD имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 4 из 4 (100%) образцов плазмы от пациентов с меланомой имели положительную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с

меланомой может быть получен с использованием элемента ретротранспозона HERV-W из РНК вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 30: Дигностирование рака яичника с помощью HERV-W

Фиг. 30 показывает результаты количественного анализа элемента ретротранспозона HERV-W при помощи ПЦР в реальном времени на РНК, экстрагированной из HD и образцов пациентов с раком яичника после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 2 из 3 (66%) образцов плазмы HD имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 2 из 2 (100%) образцов плазмы от пациентов с раком яичника имели положительную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком яичника может быть получен с использованием HERV-W элемента ретротранспозона от РНК вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 31: Дигностирование рака предстательной железы с помощью AR-WT

Фиг. 31 показывает результаты количественного анализа гена рецептора андрогена (AR)-WT при помощи ПЦР в реальном времени на РНК, экстрагированной из HD и образцов от пациентов с раком предстательной железы после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 1 из 1 (100%) HD образец плазмы имел положительную Z-оценку и рассматривался как рак-негативный, тогда как 12 из 15 (80%) образцов плазмы от пациентов с раком предстательной железы имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком предстательной железы может быть получен с использованием гена AR-WT из РНК вместо гена BRAF WT в виде результатов ПЦР.

Пример 32: Дигностирование рака предстательной железы с помощью AR-V7

Фиг. 32 показывает результаты количественного анализа сплайс-варианта 7 гена рецептора андрогенов (AR-V7) при помощи ПЦР в реальном времени на РНК, экстрагированной из образцов HD и образцов от пациентов с раком предстательной железы после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 1 из 1 (100%) HD образец плазмы имел положительную Z-оценку и рассматривался как рак-негативный. 4 из 6 (67%) образцов от пациентов с раком предстательной железы, отвечающих на AR-ингибиторы, имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как истинные респондеры, тогда как 5 из 10 (50%) образцов от пациентов с раком предстательной железы, не отвечающих на AR-ингибиторы, имели положительный Zscore и рассматривались как истинные пациенты с отсутствием ответа (нереспондеры). В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов и пациентов-респондеров с раком предстательной железы от пациентов-нереспондеров может быть получен с использованием AR-V7 гена из РНК.

Пример 33: Дигностирование рака мочевого пузыря с помощью LINE

Фиг. 33 показывает результаты количественного анализа LINE элемента ретротранспозона при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из HD и образцов от пациентов с раком мочевого пузыря после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0

использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 2 из 2 (100%) HD образцов мочи имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 3 из 4 (75%) образцов мочи от пациентов с раком мочевого пузыря имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком мочевого пузыря может быть получен с использованием элемента ретротранспозона LINE.

Пример 34: Диагностирование рака мочевого пузыря с помощью HERV-W

Фиг. 34 показывает результаты количественного анализа HERV-W элемента ретротранспозона при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из HD и образцов от пациентов с раком мочевого пузыря после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 2 из 2 (100%) HD образцов мочи имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 3 из 4 (75%) образцов от пациентов с раком мочевого пузыря имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти данные показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком мочевого пузыря может быть получен с использованием элемента ретротранспозона HERV-W.

Пример 35: Диагностирование рака мочевого пузыря с помощью с-Мус

Фиг. 35 показывает результаты количественного анализа гена с-Мус при помощи ПЦР в реальном времени на ДНК, экстрагированной из HD и образцов от пациентов с раком мочевого пузыря после иммуновыделения экзосом при помощи гранул, покрытых анти-CAIX-антител. Значение Z-оценки 0 использовали в качестве диагностического порога, как описано ранее. 2 из 2 (100%) образца мочи HD имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 3 из 4 (75%) образцов мочи от пациентов с раком мочевого пузыря имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти результаты показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком мочевого пузыря может быть получен с использованием гена с-Мус.

Пример 36: Диагностирование рака мочевого пузыря при помощи LINE

Фиг. 36 показывает результаты количественного анализа элемента ретротранспозона LINE РНК с помощью ПЦР в реальном времени от HD пациентов и образцов от пациентов с раком мочевого пузыря после иммуновыделения экзосом с помощью гранул, покрытых анти-CAIX-антителами. Значение Z-оценки 0 было использовано в качестве диагностического порога, как описано ранее. 2 из 2 (100%) HD образцов мочи имели положительную Z-оценку и рассматривались как отрицательные по раку, тогда как 3 из 4 (75%) образцов мочи с раком мочевого пузыря имели отрицательную Z-оценку и рассматривались как положительные по раку. В общем, эти результаты показывают, что диагностический порог для различения здоровых индивидуумов от пациентов с раком мочевого пузыря может быть получен с использованием элемента ретротранспозона LINE.

Библиография

1) Chamie K, Klöpfer P, Bevan P, Störkel S, Said J, Fall B, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Carbonic anhydrase-IX score is a novel biomarker that predicts recurrence and survival for high-risk, nonmetastatic renal cell carcinoma: Data from the phase III ARISER clinical trial. Urol Oncol. 2015 May;33(5):204.

2) Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer

therapy: from biology to clinical use. *Semin Cancer Biol.* 2015 Apr;31:52-64.

3) Takacova M, Bartosova M, Skvarkova L, Zatovicova M, Vidlickova I, Csaderova L, Barathova M, Breza J Jr, Bujdak P, Pastorek J, Breza J Sr, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2013 Jan;5(1):191-197. Mutations of the BRAF gene in human cancer.

4) Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutation of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun 27; 417(6892):949-54.

5) Corcoran RB, Dias-Santagata D, Bergethon K, Iafrate AJ, Settleman J, Engelman JA BRAF gene амплификация can promote acquired resistance to MEK inhibitors in cancer cells harboring the BRAF V600E mutation. *Sci Signal.* 2010 Nov 23;3(149):ra84.

6) Perincheri S, Hui P. KRAS mutation testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015 Mar;15(3):375-84.

7) Cercek A, Braghiroli MI, Chou JF, Hechtman JF, Kemeny NE, Saltz L, Capanu M, Yaeger R Clinical features and outcomes of patients with colorectal cancers harboring NRAS mutations. *Clin Cancer Res.* 2017 Apr 26. 164.

8) Mandalà M, Merelli B, Massi D. Nras in melanoma: targeting the undruggable target. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014 Nov;92(2):107-22.

9) Passaro A, Guerini-Rocco E, Pochesci A, Vacirca D, Spitaleri G, Catania CM, Rappa A, Barberis M, de Marinis F. Targeting EGFR T790M mutation in NSCLC: From biology to evaluation and treatment *Pharmacol Res.* 2017 Mar;117:406-415.

10) Fang S, Wang Z. EGFR mutations as a prognostic and predictive marker in non-small-cell lung cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2014 Sep 26;8:1595-611.

11) Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Jun 2;4(6).

12) Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J. Tumour microvesicles contain ретротранспозон elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun.* 2011 Feb 1;2:180.

13) Romanel A, Gasi Tandefelt D, Conteduca V, Jayaram A, Casiraghi N, Wetterskog D, Salvi S, Amadori D, Zafeiriou Z, Rescigno P, Bianchini D, Gurioli G, Casadio V, Carreira S, Goodall J, Wingate A, Ferraldeschi R, Tunariu N, Flohr P, De Giorgi U, de Bono JS, Demichelis F, Attard G. Plasma AR and abiraterone-resistant prostate cancer. *Sci Transl Med.* 2015 Nov 4;7(312): 312re10.

14) Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, Chen Y, Mohammad TA, Chen Y, Fedor HL, Lotan TL, Zheng Q, De Marzo AM, Isaacs JT, Isaacs WB, Nadal R, Paller CJ, Denmeade SR, Carducci MA, Eisenberger MA, Luo J. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2014 Sep 11;371(11):1028-38.

15) Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. *J Mol Diagn.* 2003 May;5(2):73-81.

16) Dorai Y, *The Journal of Urology*, (2010), 183(4) supplement, e145, abstract 366.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ЭКЗОСОМИКС С.П.А.

<120> СПОСОБЫ И НАБОРЫ, ИМЕЮЩИЕ ОТНОШЕНИЕ К ЗАХВАТУ СА-IX-ПОЗИТИВНЫХ ЭКЗОСОМ

<130> PC1601EC
 <160> 32
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 5 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> BRAF preamp primer
 10 <400> 1
 taggtgattt tggcttagct acagt 25
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 15 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> BRAF preamp primer
 <400> 2
 ttaatcagtg gaaaaatagc ctca 24
 20 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 25 <223> BRAF preamp primer
 <400> 3
 taggtgattt tggcttagct acaga 25
 <210> 4
 <211> 24
 30 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> BRAF preamp primer
 <400> 4
 35 ttaatcagtg gaaaaatagc ctca 24
 <210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 40 <220>
 <223> KRAS preamp primer
 <400> 5
 ggtagttgga gctggtggc 19
 <210> 6
 45 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>

<223> KRAS preamp primer
 <400> 6
 tgattctgaa ttagctgtat cgtcaa 26
 <210> 7
 5 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> BRAF qPCR primer or probe
 10 <400> 7
 taggtgattt tggcttagct acagt 25
 <210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 15 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> BRAF qPCR primer or probe
 <400> 8
 ttaatcagtg gaaaaatagc ctca 24
 20 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 25 <223> BRAF qPCR primer or probe
 <400> 9
 taggtgattt tggcttagct acaga 25
 <210> 10
 <211> 24
 30 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> BRAF qPCR primer or probe
 <400> 10
 35 ttaatcagtg gaaaaatagc ctca 24
 <210> 11
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 40 <220>
 <223> BRAF qPCR primer or probe
 <400> 11
 ccgaagggga tccagacaac tgttcaaact gccttcgg 38
 <210> 12
 45 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>

<223> KRAS qPCR primer or probe
 <400> 12
 ggtagttgga gctggtggc 19
 <210> 13
 5 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> KRAS qPCR primer or probe
 10 <400> 13
 tgattctgaa ttagctgtat cgtcaa 26
 <210> 14
 <211> 15
 <212> DNA
 15 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> KRAS qPCR primer or probe
 <400> 14
 cactcttgcc tacgc 15
 20 <210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 25 <223> EGFR qPCR primer or probe
 <400> 15
 gcagcatgtc aagatcacag att 23
 <210> 16
 <211> 25
 30 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> EGFR qPCR primer or probe
 <400> 16
 35 cctccttctg catggtattc tttct 25
 <210> 17
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 40 <223> EGFR qPCR primer or probe
 <400> 17
 agtttgcca gcccaa 16
 <210> 18
 45 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>

<223> cMyc qPCR primer or probe
 <400> 18
 ccctccactc ggaaggacta tc 22
 <210> 19
 5 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> cMyc qPCR primer or probe
 10 <400> 19
 aggactctga cactgtccaa ct 22
 <210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 15 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> cMyc qPCR primer or probe
 <400> 20
 tgaccctctt ggcagcag 18
 20 <210> 21
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 25 <223> LINE qPCR primer or probe
 <400> 21
 tcaacaagaa gagctaacta tcc 23
 <210> 22
 <211> 22
 30 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> LINE qPCR primer or probe
 <400> 22
 35 ttgtaggtca ctcaggactt gc 22
 <210> 23
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 40 <220>
 <223> LINE qPCR primer or probe
 <400> 23
 tgcaccaat acaggagcac ccagattca 29
 <210> 24
 45 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>

<223> HERV-W qPCR primer or probe
 <400> 24
 cttccagaat tgaagctgta aagc 24
 <210> 25
 5 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> HERV-W qPCR primer or probe
 10 <400> 25
 gggttgtgca gttgagattt cc 22
 <210> 26
 <211> 26
 <212> DNA
 15 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> HERV-W qPCR primer or probe
 <400> 26
 ttcttcaaat ggagccccag atgcag 26
 20 <210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 25 <223> AR-WT FW primer
 <400> 27
 cagcctattg cgagagagct g 21
 <210> 28
 <211> 21
 30 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> AR-WT RW primer
 <400> 28
 35 gaaaggatct tgggcacttg c 21
 <210> 29
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 40 <220>
 <223> AR-WT probe
 <400> 29
 agttcacttt tgacctgc 18
 <210> 30
 45 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>

<223> AR-V7 FW primer
 <400> 30
 ccatcttgtc gtcttcggaa atgtta 26
 <210> 31
 5 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> AR-V7 RW primer
 10 <400> 31
 tttgaatgag gcaagtcagc ctttct 26
 <210> 32
 <211> 17
 <212> DNA
 15 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> AR-V7 probe
 <400> 32
 aagcagggat gactctg 17

20

(57) Формула изобретения

1. Способ *in vitro* выделения из биологической жидкости экзосом, происходящих из опухоли, причем способ включает захват экзосом из образца биологической жидкости с помощью анти-СА-IX антитела.

25

2. Способ количественного определения *in vitro* связанной с опухолью последовательности нуклеиновой кислоты в биологической жидкости, причем такой способ включает определение уровня связанной с опухолью последовательности нуклеиновой кислоты, где указанный способ отличается тем, что включает захват экзосом из образца биологической жидкости при помощи анти-СА-IX антитела, а

30

указанный уровень связанной с опухолью последовательности нуклеиновой кислоты определяют в этих захваченных экзосомах.

3. Способ определения *in vitro* наличия опухоли у субъекта, включающий определение уровня связанной с опухолью последовательности нуклеиновой кислоты в биологическом образце, полученном у субъекта, и сравнение этого определенного

35

уровня связанной с опухолью последовательности нуклеиновой кислоты с одним или более эталонными значениями, причем указанный способ отличается тем, что указанный уровень связанной с опухолью последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой уровень связанной с опухолью последовательности нуклеиновой кислоты, определенный в экзосомах, выделенных путем захвата указанных экзосом из указанного

40

образца биологической жидкости при помощи анти-СА-IX антитела.

4. Способ по пп. 1-3, согласно которому опухоль выбирают из рака легкого, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака почки, рака предстательной железы, колоректального рака, рака желудка, рака яичника и меланомы.

45

5. Способ по пп. 2, 3, согласно которому связанную с опухолью последовательность нуклеиновой кислоты выбирают из двухцепочечной ДНК-последовательности, одноцепочечной ДНК-последовательности и РНК-последовательности.

6. Способ по п. 5, согласно которому связанная с опухолью последовательность нуклеиновой кислоты двухцепочечной ДНК является последовательностью дикого

типа из целевого гена, выбранного из группы, состоящей из гена BRAF, гена KRAS, гена NRAS, гена EGFR, гена AR.

7. Способ по п. 5, согласно которому связанная с опухолью последовательность нуклеиновой кислоты двухцепочечной ДНК является мутированной последовательностью из целевого гена, выбранного из группы, состоящей из гена BRAF, гена KRAS, гена NRAS, гена EGFR, гена AR.

8. Способ по п. 7, согласно которому мутированную последовательность выбирают из амплификации, точечной мутации, делеции и вставки.

9. Способ по п. 5, согласно которому связанную с опухолью последовательность нуклеиновой кислоты двухцепочечной ДНК выбирают из амплификации гена BRAF WT, точечной мутации гена BRAF, амплификации гена KRAS WT, точечной мутации гена KRAS, амплификации гена NRAS WT, точечной мутации гена NRAS, амплификации гена cMyc WT, амплификации гена EGFR WT, точечной мутации гена EGFR, делеции гена EGFR, вставки гена EGFR, гена WT AR, точечной мутации гена AR.

10. Способ по п. 5, согласно которому связанную с опухолью последовательность нуклеиновой кислоты одноцепочечной ДНК выбирают из амплификации гена cMyc WT, ретротранспозона длинного диспергированного ядерного повтора (LINE), ретротранспозона короткого диспергированного ядерного повтора (SINE) и ретротранспозона эндогенного ретровируса человека (HERV).

11. Способ по п. 5, согласно которому РНК-последовательность выбирают из мРНК cMyc WT, мРНК LINE, мРНК SINE, мРНК HERV, мРНК рецептора андрогена (AR) WT и мРНК сплайс-варианта гена AR.

12. Способ по пп. 1-11, согласно которому биологическую жидкость выбирают из крови, плазмы, сыворотки, мочи и слюны.

13. Набор для применения при выделении происходящих из опухоли экзосом из биологической жидкости, отличающийся тем, что содержит анти-СА-IX антитело.

14. Набор для применения в количественном анализе связанной с опухолью последовательности нуклеиновой кислоты в экзосомах из биологической жидкости, отличающийся тем, что такой набор содержит анти-СА-IX антитело.

15. Набор для применения при определении *in vitro* наличия опухоли у субъекта по экзосомам, выделенным из биологической жидкости, отличающийся тем, что содержит анти-СА-IX антитело.

16. Набор по п. 14 или 15, дополнительно содержащий набор праймеров, направленных на связанную с опухолью последовательность нуклеиновой кислоты.

17. Набор по пп. 13-16, отличающийся тем, что опухоль выбирают из рака легкого, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака почки, рака предстательной железы, колоректального рака, рака желудка, рака яичника и меланомы.

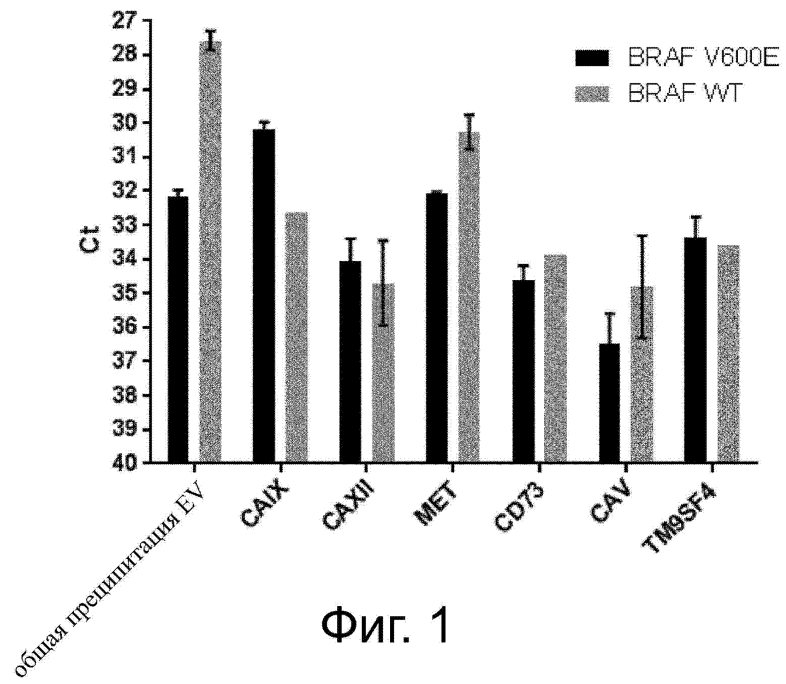
18. Набор по пп. 13-17, отличающийся тем, что биологическую жидкость выбирают из крови, плазмы, сыворотки, мочи и слюны.

40

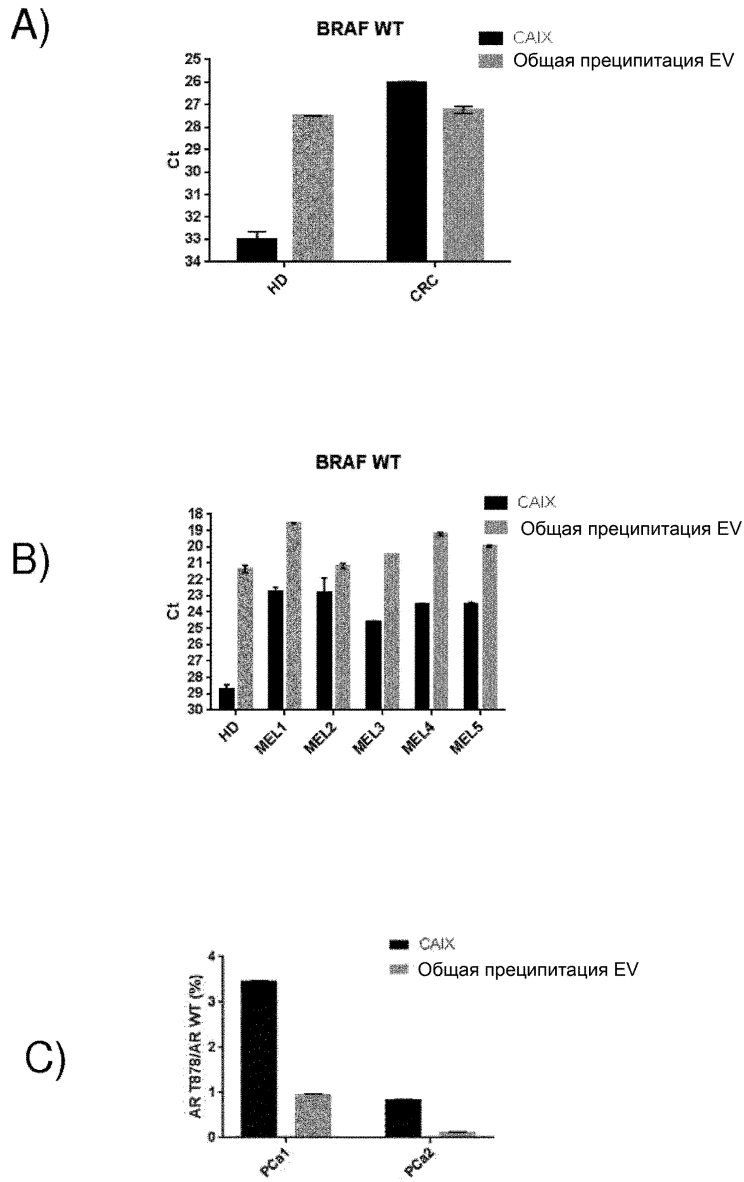
45

1

1/22

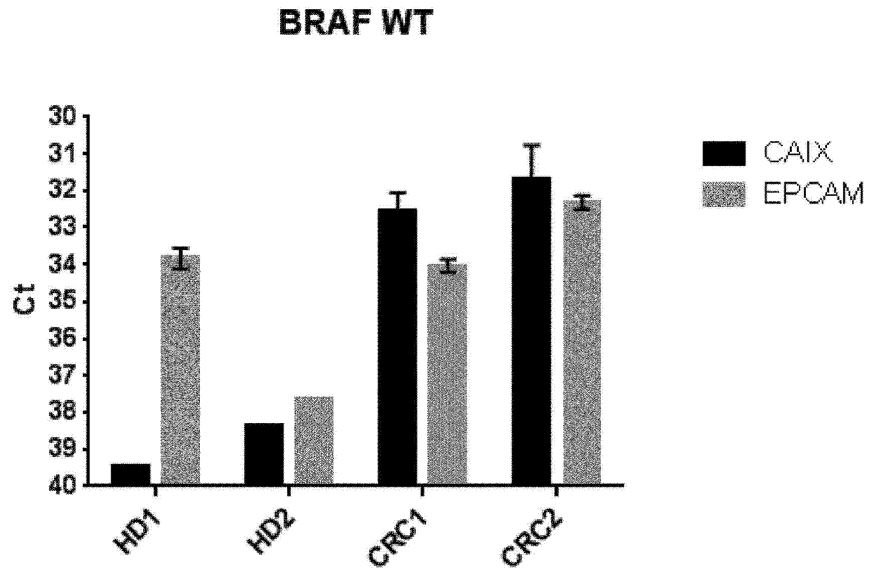


2

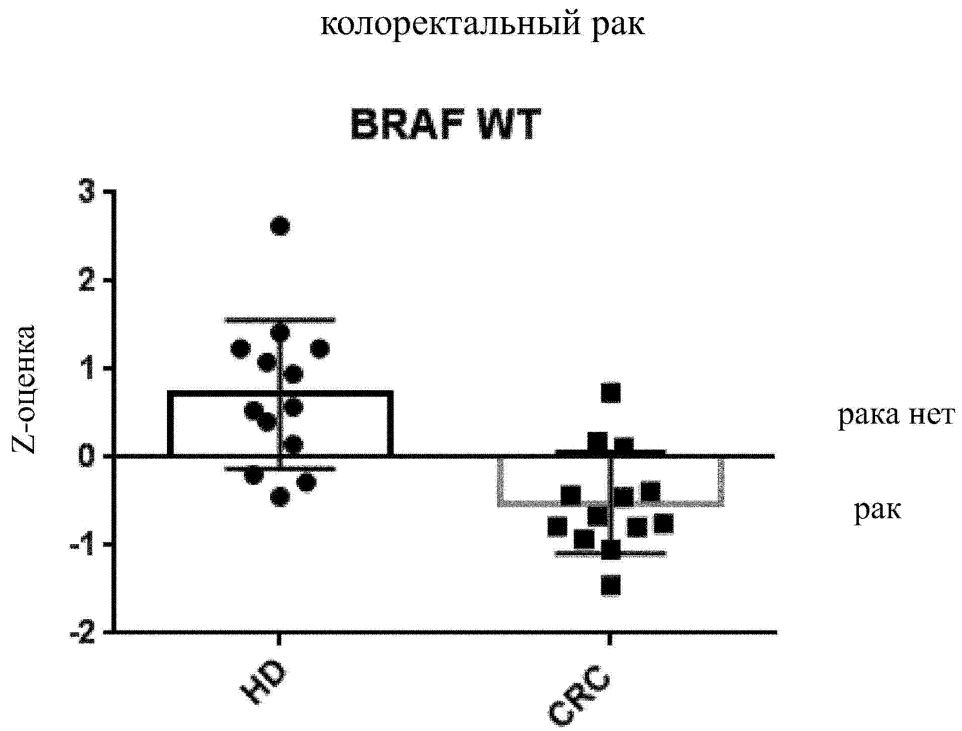


Фиг. 2

3/22



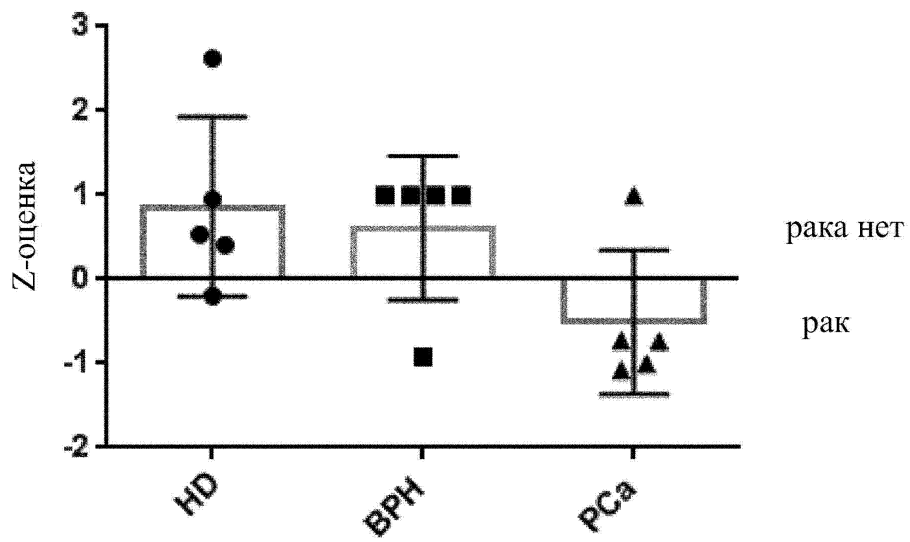
ФИГ. 3



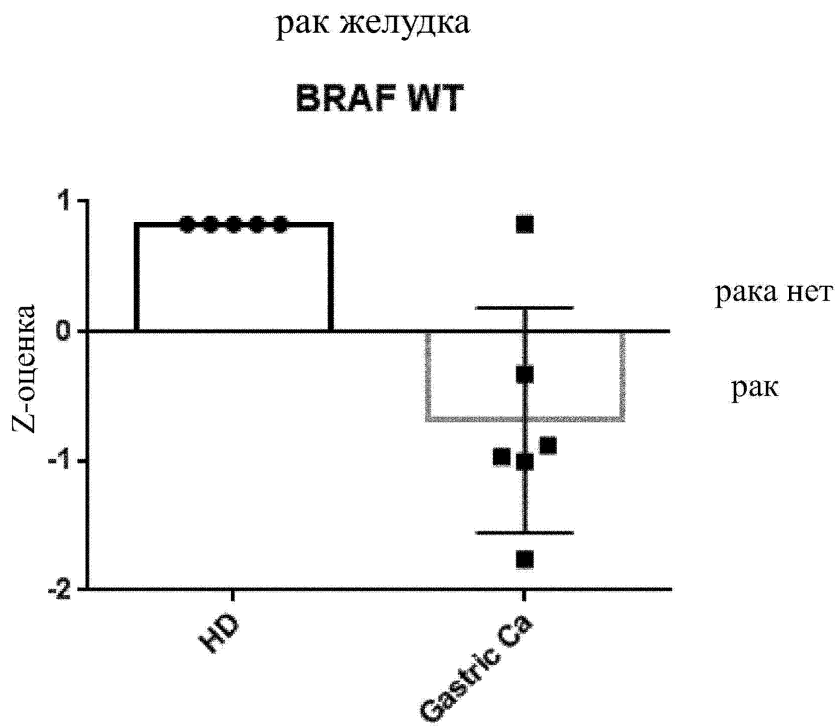
Фиг. 4

рак предстательной железы

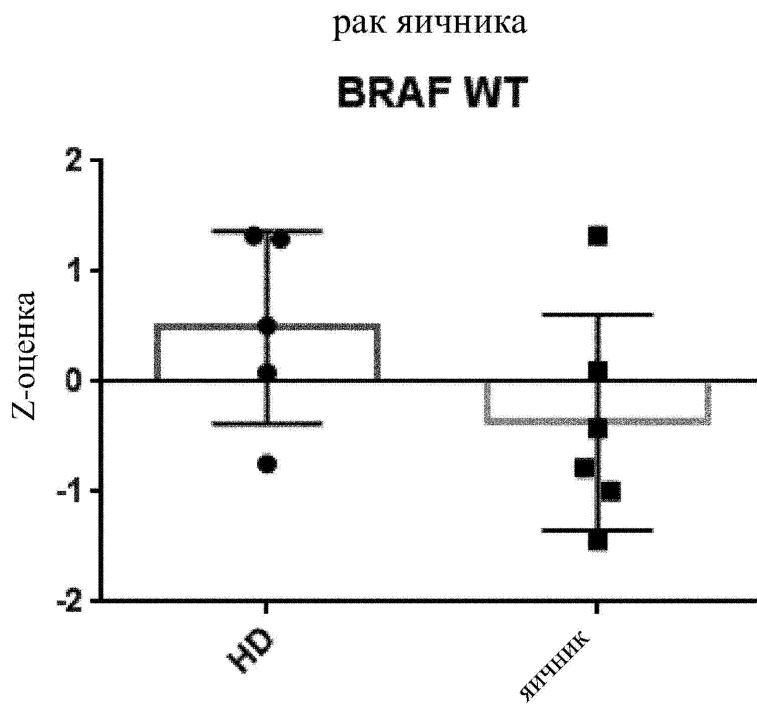
BRAF WT



Фиг. 5

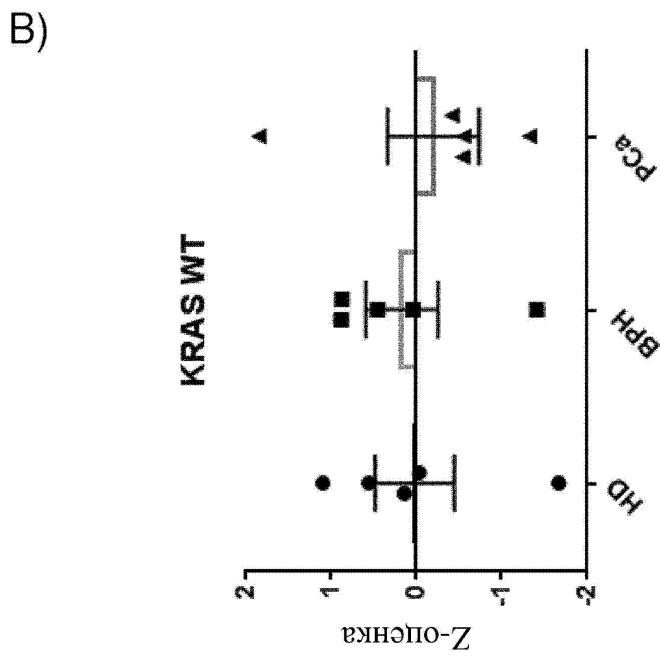
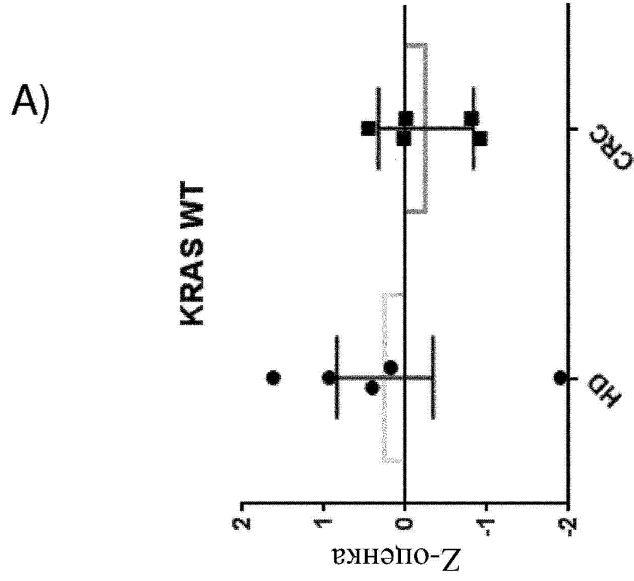


Фиг. 6



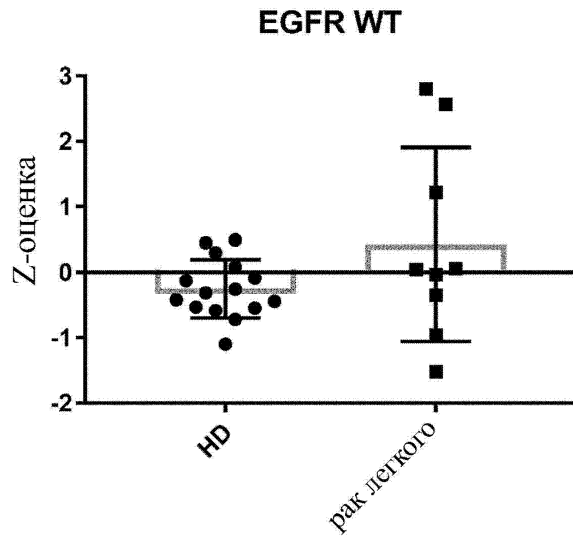
Фиг. 7

8/22

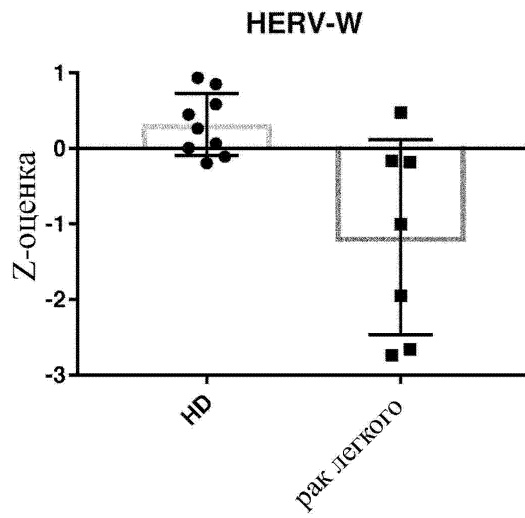


ФИГ. 8

Фиг. 9

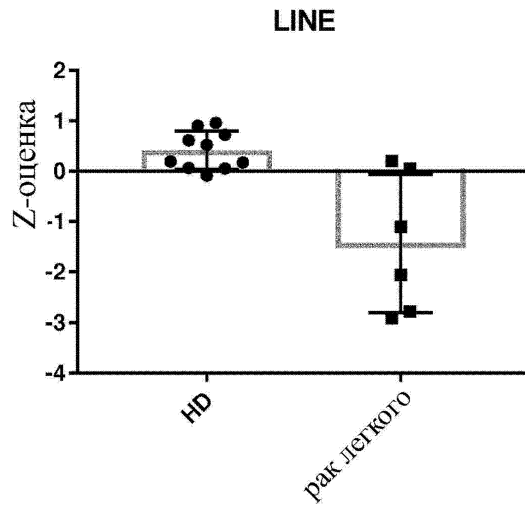


Фиг. 10

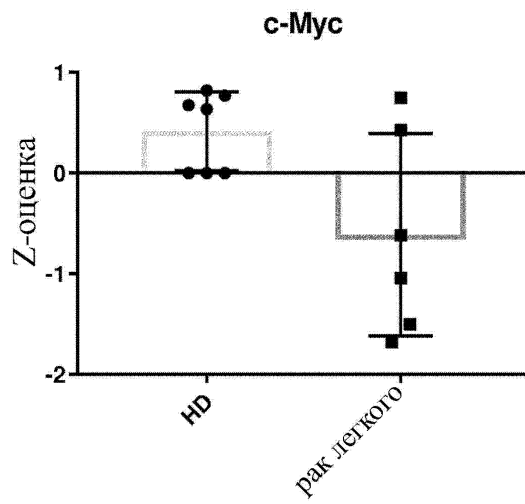


10/22

Фиг. 11



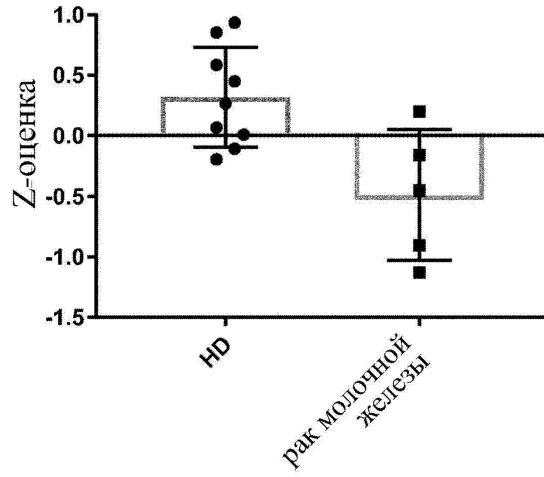
Фиг. 12



11/22

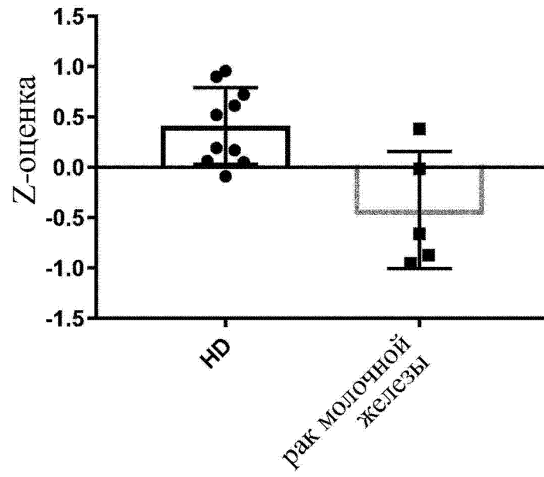
Фиг. 13

HERV-W



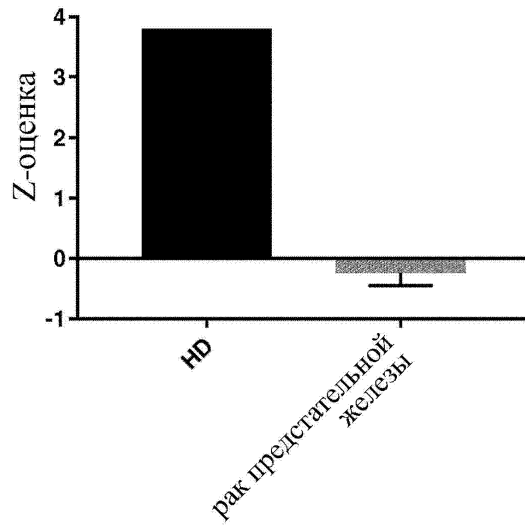
Фиг. 14

LINE



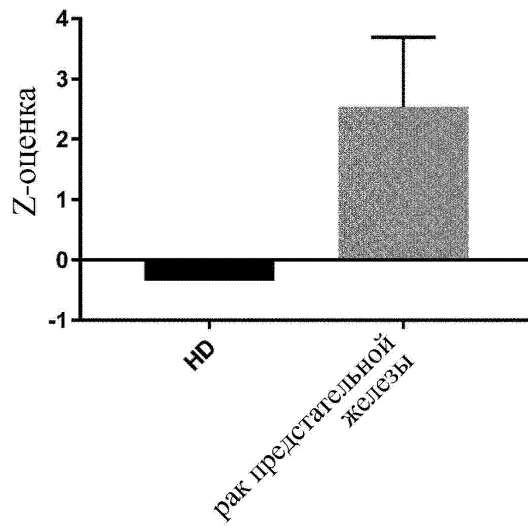
Фиг. 15

AR-WT

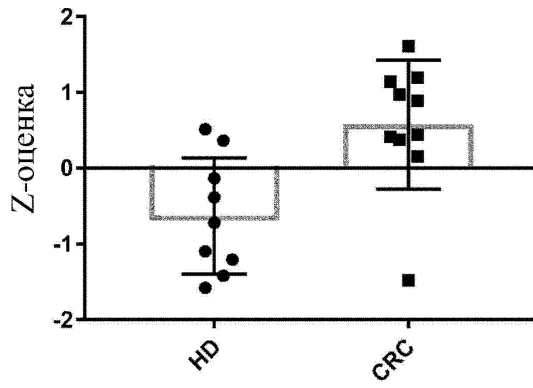


Фиг. 16

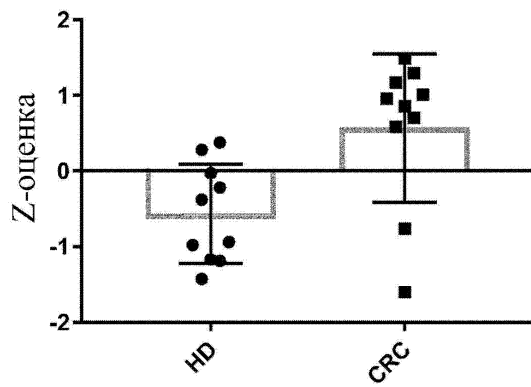
AR-T878A



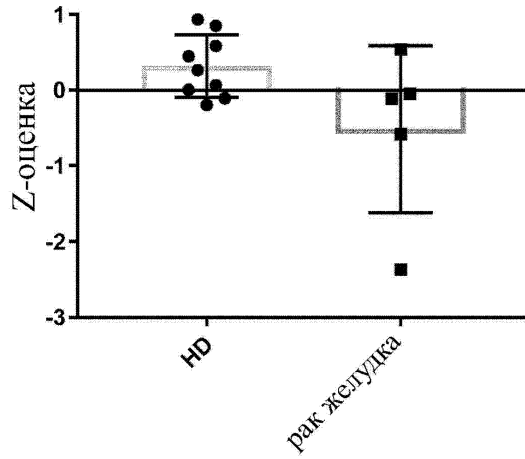
Фиг. 17
HERV-W



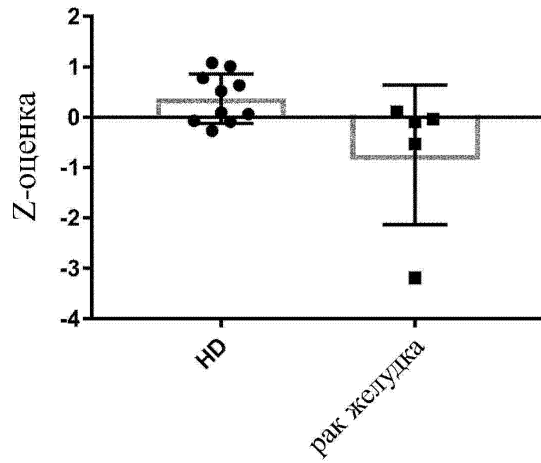
Фиг. 18
LINE



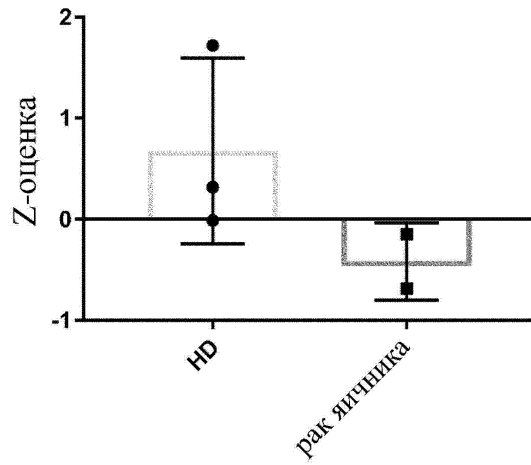
Фиг. 19
HERV-W



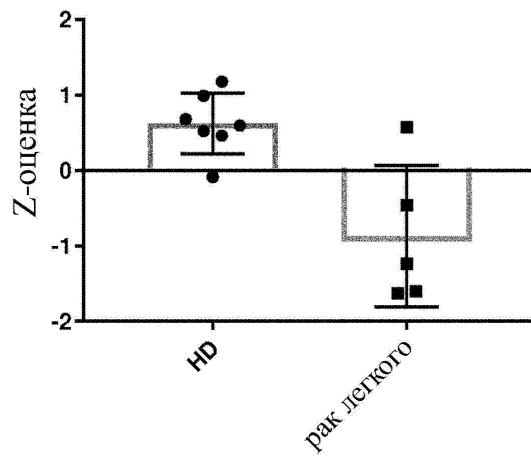
Фиг. 20
LINE



ФИГ. 21
с-тус

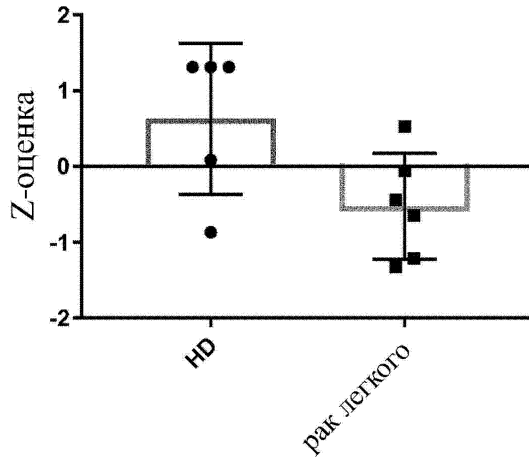


ФИГ. 22
HERV-W (PHK)



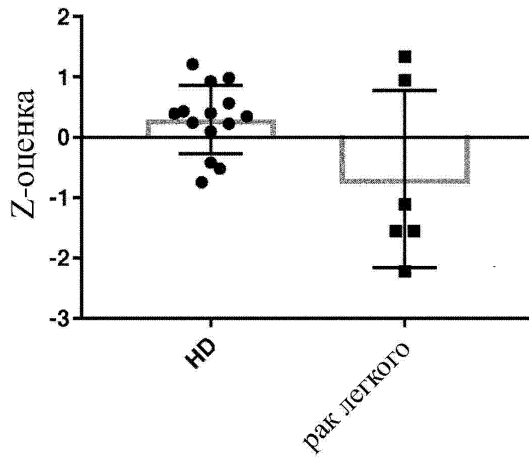
ФИГ. 23

c-тус (PHK)



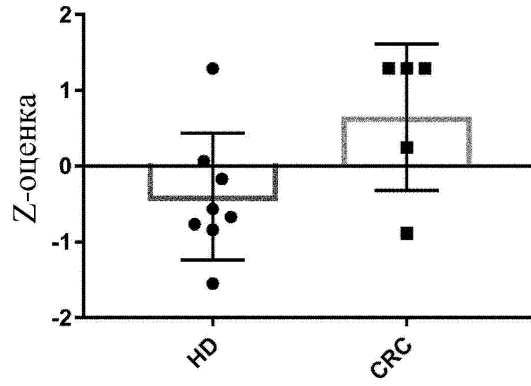
ФИГ. 24

LINE (PHK)



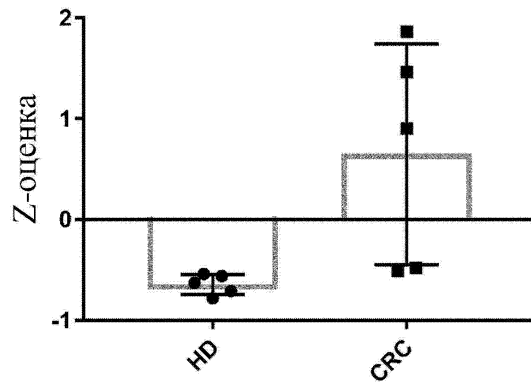
ФИГ. 25

LINE (PHK)



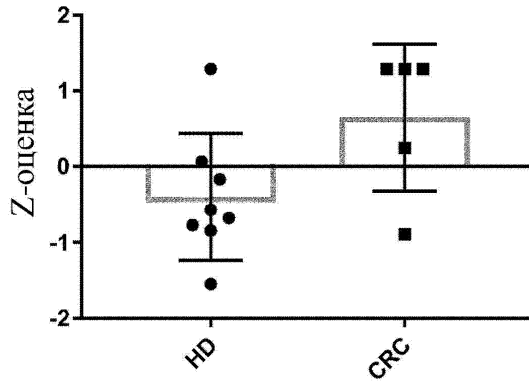
ФИГ. 26

EGFR WT (PHK)



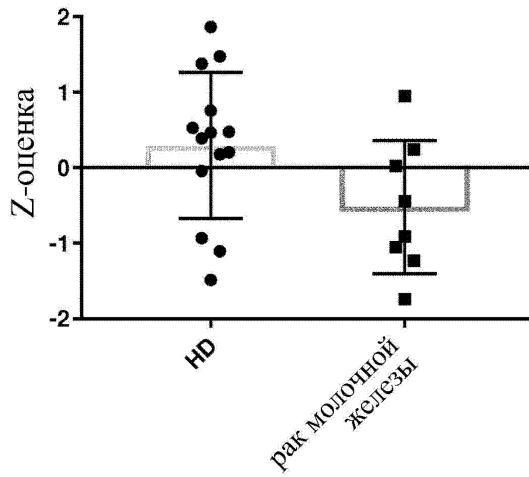
ФИГ. 27

HERV-W (PHK)



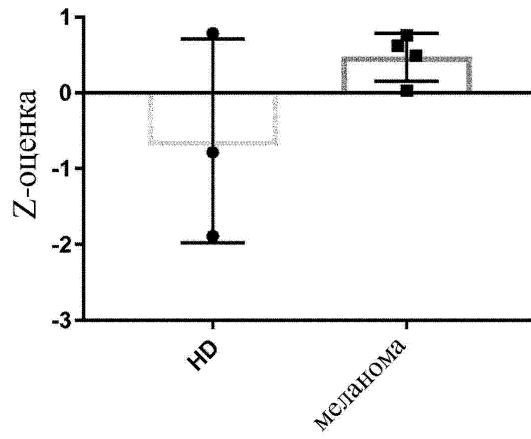
ФИГ. 28

LINE (PHK)



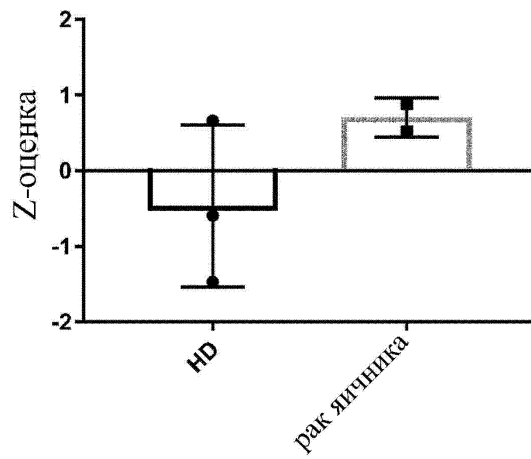
Фиг. 29

HERV-W (PHK)



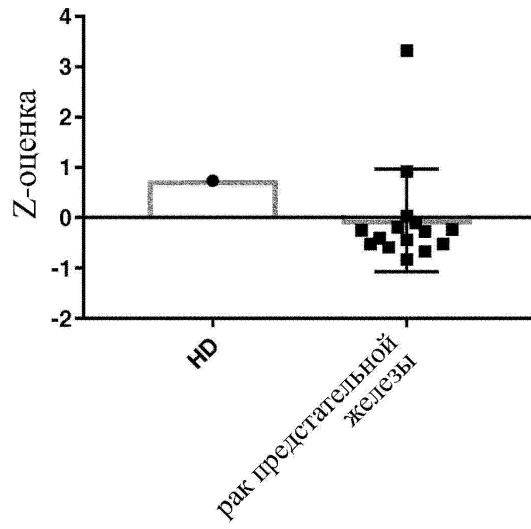
Фиг. 30

HERV-W (PHK)



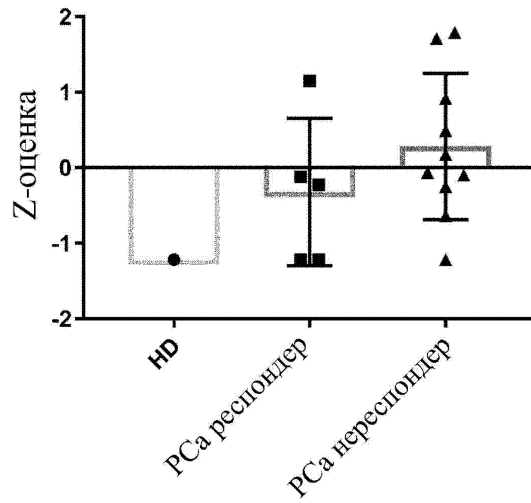
ФИГ. 31

AR-WT(РНК)



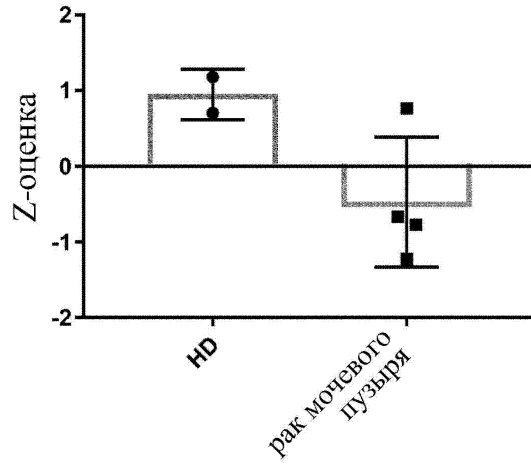
ФИГ. 32

AR-V7(РНК)



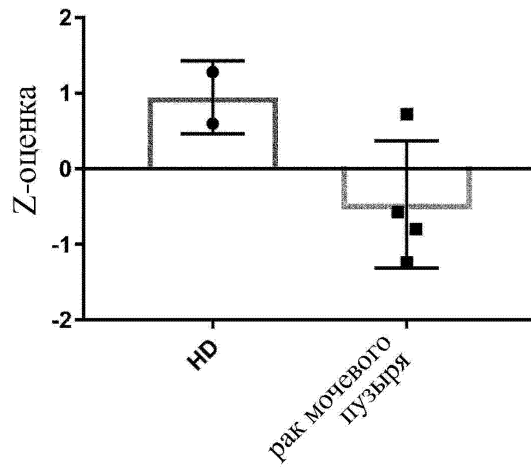
Фиг. 33

LINE



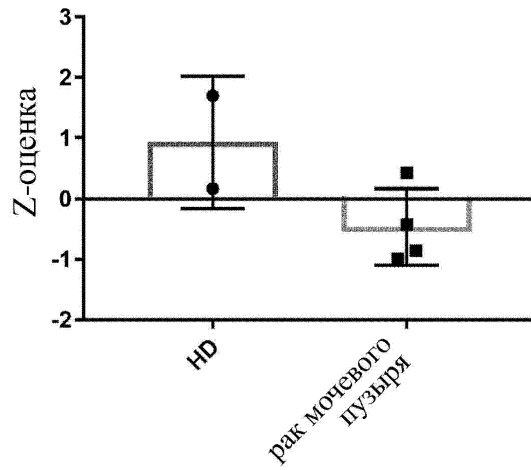
Фиг. 34

HERV-W



ФИГ. 35

с-тус



ФИГ. 36

LINE (PHK)

