

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 362 589**

21 Número de solicitud: 200931275

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**A61K 39/015** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **28.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.07.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**08.07.2011**

71 Solicitante/s: **Centre de Recerca en Salut  
Internacional de Barcelona  
c/ Villarroel, 170  
08036 Barcelona, ES  
Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats,  
Fundació Cellex y  
Hospital Clínic i Provincial de Barcelona**

72 Inventor/es: **Martín Jaular, Lorena y  
Portillo Obando, Hernando Antonio del**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

54 Título: **Exosomas derivados de reticulocitos infectados con *Plasmodium sp.*, método para su obtención y su uso.**

57 Resumen:

Exosomas derivados de reticulocitos infectados con *Plasmodium sp.*, método para su obtención y su uso.

La presente invención pertenece al campo de la vacunas para la prevención y profilaxis contra la malaria, más concretamente se refiere a un exosoma aislado a partir de reticulocitos infectados con *Plasmodium sp.*, al método para su obtención y a su uso para la prevención y profilaxis frente a la malaria.

ES 2 362 589 A1

## DESCRIPCIÓN

Exosomas derivados de reticulocitos infectados con *Plasmodium sp.*, método para su obtención y su uso.

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de las vacunas para la prevención y profilaxis contra la malaria, más concretamente se refiere a un exosoma aislado a partir de reticulocitos infectados con *Plasmodium sp.*, al método para su obtención y a su uso para la prevención y profilaxis frente a la malaria.

10

**Antecedentes de la invención**

*Plasmodium sp.*, es el agente etiológico causante de la malaria, también conocida como paludismo. Dentro del genero *Plasmodium* hay diferentes especies algunas de las cuales son inocuas. Otras especies, por el contrario, son altamente infecciosas y son la causa de la mayor parte de los casos de malaria humana a nivel mundial. Entre estas últimas, las especies más importantes son *P. falciparum*, y *P. vivax*.

15

Todas las especies humanas de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*) infectan en mayor o menor medida a eritrocitos y/o a los precursores de estos los reticulocitos que requieren un proceso de maduración y diferenciación para alcanzar su estadio funcional final como eritrocitos. De entre las diferentes especies de *Plasmodium* existen algunas que tienen mayor capacidad de infección de reticulocitos que otras como, por ejemplo, *Plasmodium vivax* que infecta predominantemente este tipo de células.

20

Dentro del proceso de maduración y diferenciación de reticulocitos a eritrocitos, algunas proteínas que no son necesarias para estos últimos son secuestradas en vesículas internas localizadas en cuerpos multivesiculares “multi-vesicular bodies” (MVBs) y posteriormente liberadas al medio extra-celular como pequeñas nano-vesículas conocidas como exosomas.

25

Recientemente, la investigación de exosomas ha sido estimulada tras el hallazgo que otras células, tales como las células presentadoras de antígenos, son capaces de secretar este tipo de nano-vesículas sugiriendo un papel más allá del originalmente descrito en la maduración y diferenciación de reticulocitos. De hecho, varios estudios con diferentes tipos de células han revelado que los exosomas juegan un papel en la regulación del sistema inmune al transferir información entre células durante la respuesta inmune, y, por lo tanto, representan un nuevo modo de comunicación inter-celular (Schorey and Bhatnagar, 2008). En esta línea, ha sido demostrada la capacidad protectora de exosomas en infecciones experimentales con *Toxoplasma gondii*, miembro del phylum Apicomplexa al que pertenece también *Plasmodium* (Bhatnagar *et al.*, 2007).

30

35

Además, se han descrito varias estrategias basadas en el uso de exosomas como agentes profilácticos o inmunoes-timuladores (Viaud *et al.* Exosomes for the treatment of human malignancies. Horm Metabl Res 2008, 40:82).

40

Entre otras, WO9705900 describe exosomas obtenidos a partir de células presentadoras de antígenos como células B, macrófagos o células dendríticas. Los exosomas descritos en este documento tienen la particularidad de que al ser obtenidos a partir de células presentadoras de antígeno, los antígenos son presentados en el contexto MHC-I y MHC-II.

45

Por su parte, el documento EP1523990 describe exosomas obtenidos a partir de células cancerígenas (identifi-cados como texosomas) o a partir de células dendríticas cargadas o no de antígenos (este documento los denomina dexosomas).

50

WO2004014954 utiliza una estrategia diferente ya que para obtener exosomas que muestren en su superficie un antígeno deseado, se transfectan células de la línea CT26 (cáncer de colon murino) y células de la línea TA3HA (carcinoma mamario de ratón) con virus recombinantes que comprenden en su genoma la secuencia que codifica el antígeno deseado (muc-1) que es así expresado en la superficie de los exosomas aislados a partir de este tipo de células.

55

WO0028001 describe exosomas obtenidos a partir de mastocitos esencialmente desprovistos de moléculas MHC endógenas. Los exosomas descritos en este documento si expresan en su superficie, sin embargo, MHC recombinantes.

Por último, WO2008092153 describe exosomas obtenidos a partir de células cancerosas y desprovistas de uno o más polipéptidos inmunosupresivos normalmente presentes en los exosomas.

60

Los autores de la presente invención han desarrollado ahora una nueva estrategia en la prevención y profilaxis de la malaria basada en el uso de exosomas aislados a partir de reticulocitos de sujetos o modelos murinos infectados con *Plasmodium*. Estos exosomas son obtenidos por aislamiento de la fracción de exosomas derivados de reticulocitos a partir de sangre infectada con *Plasmodium*.

65

## Breve descripción de las figuras

Figura 1: representa la caracterización de exosomas aislados a partir de plasma de ratones. (A) Análisis de tamaño por dispersión dinámica de luz. (B) Tinción negativa después de una fijación con paraformaldehído al 2%. La escala representa 100 nm.

Figura 2: representa la evolución en el tiempo de parasitemia y el análisis del tropismo celular de ratones inmunizados con exosomas. Las curvas de parasitemia fueron calculadas de la media de 2 ratones controles no infectados, 2 ratones controles infectados con exosomas aislados de animales normales, de 3 ratones infectados con exosomas obtenidos de animales infectados con la cepa no letal de *P. yoelli*, y de 3 ratones infectados con exosomas obtenidos de animales infectados con la cepa letal de *P. yoelli*. Tinción de Giemsa de extendidos de sangre periférica en el día antes de sacrificar de un animal representativo de cada grupo.

Figura 3: análisis por Western blot de la respuesta de anticuerpos IgG anti-*P. yoelli* en suero de animales inmunizados con exosomas. Las muestras fueron colectadas por punción maxilar en el día 20 después de la segunda inmunización. Cada panel corresponde a una mezcla de sueros de cada grupo de animales utilizados en estos experimentos. En el Western blot fue utilizado antígeno total obtenido de las cepas no-letal (AgNL) y letal (AgL), de *P. yoelli* y las respuestas de anticuerpos IgG fueron detectadas mediante el uso de suero de cabra conjugado a fosfatasa alcalina y producido contra la IgG de ratón.

Figura 4: representa un análisis por tinción intra-celular de células T, CD4+ y CD8+ en animales inmunizados con exosomas de la cepa no-letal de *P. yoelli*. Ratones Balb/c fueron inmunizados con 5 microgramos de exosomas PyNL en CpG-ODN. Dos semanas después de la primera inmunización, se realizó un refuerzo con 5 microgramos de exosomas sin CpG-ODN. (A) El porcentaje de linfocitos que son CD8+ IFN- $\gamma$ + fue calculado después de una re-estimulación *in vitro*, tinción intra-celular y análisis por citometría de flujo. El porcentaje de linfocitos CSFE+ que son CD4+ IFN- $\gamma$ + está representado en (B) y el de CD4+IFN- $\gamma$ + IL-2+ en (C). Los datos corresponden a un experimento y son expresados como la media  $\pm$  error estándar de 3 ratones no inmunizados y 3 ratones inmunizados con exosomas provenientes de ratones infectados con la cepa no letal exPyNL.

Figura 5: (A)-(D) espectro MS/MS resultante del análisis proteómico de los antígenos presentes en exosomas derivados de reticulocitos provenientes de ratones infectados con *P. yoelli* y de un paciente infectado con *P. vivax*. El análisis bioinformático del espectro confirma la presencia de antígenos tanto de *P. yoelli* como de *P. vivax* en las muestras de exosomas analizadas.

## Descripción detallada de la invención

El primer objeto de la presente invención viene representado por un exosoma aislado a partir de plasma que comprende al menos un antígeno de *Plasmodium sp.* en su interior o en su superficie (a partir de ahora exosomas de la invención).

Los exosomas de la invención han demostrado capacidad inmunogénica frente a la malaria por lo que resultan de gran potencial utilidad en la preparación de una vacuna para la prevención y profilaxis de esta enfermedad.

El antígeno o antígenos presentes en los exosomas de la presente invención pueden provenir de cualquier especie de *Plasmodium*. En una realización particular de la invención el antígeno o antígenos presentes en los exosomas provienen de *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. yoelli*, *P. achiotense*, *P. achromaticum*, *P. aegyptensis*, *P. aeminatum*, *P. agamae*, *P. anasum*, *P. atheruri*, *P. azurophilum*, *P. balli*, *P. bambusicolai*, *P. basilisci*, *P. berghei*, *P. bigueti*, *P. brasilianum*, *P. brygooi*, *P. booliati*, *P. bubalis*, *P. bucki*, *P. coatneyi*, *P. cathemerium*, *P. cephalophi*, *P. chabaudi*, *P. chiricahuae*, *P. circularis*, *P. cnemidophori*, *P. coatneyi*, *P. coggeshalli*, *P. colombiense*, *P. corradettii*, *P. coturnix*, *P. coulangesi*, *P. cuculus*, *P. popo*, *P. cyclopsi*, *P. cynomolgi*, *P. diminutivum*, *P. diploglossi*, *P. dissanaikai*, *P. dominicana*, *P. durae*, *P. egerniae*, *P. elongatum*, *P. eylesi*, *P. fabesia*, *P. fairchildi*, *P. fallax*, *P. fieldi*, *P. foley*, *P. forresteri*, *P. floridense*, *P. fragiue*, *P. garnhami*, *P. gallinaceum*, *P. giganteum*, *P. giovannolai*, *P. girardi*, *P. gonatodi*, *P. gonderi*, *P. georgesi*, *P. gracilis*, *P. griffithsi*, *P. guanggong*, *P. gundersi*, *P. guyannense*, *P. heischi*, *P. hegneri*, *P. hermani*, *P. heteronucleare*, *P. hexamerium*, *P. holaspi*, *P. huffi*, *P. hylobati*, *P. icipeensis*, *P. inopinatum*, *P. inui*, *P. jefferi*, *P. josephinae*, *P. juxtannucleare*, *P. kemp*, *P. knowlesi*, *P. kentropyxi*, *P. leanucteus*, *P. lemuris*, *P. lophurae*, *P. lepidoptiformis*, *P. lygosomae*, *P. mabuia*, *P. mackerrasae*, *P. maculilabre*, *P. maior*, *P. marginatum*, *P. matutinum*, *P. mexicanum*, *P. minasense*, *P. morulum*, *P. nucleophilum*, *P. octamerium*, *P. odocoilei*, *P. papernai*, *P. paranucleophilum*, *P. parvulum*, *P. pedioecetii*, *P. pelaezi*, *P. percygarnhami*, *P. petersi*, *P. pifanoi*, *P. pinotti*, *P. pinorrii*, *P. pitheci*, *P. pitmani*, *P. polare*, *P. praecox*, *P. reichenowi*, *P. relictum*, *P. rhadinurum*, *P. rhodaini*, *P. robinsoni*, *P. rouxi*, *P. sandoshami*, *P. sasaki*, *P. schweitz*, *P. silvaticum*, *P. simium*, *P. semiovale*, *P. shortii*, *P. smirnovi*, *P. supraecox*, *P. tenue*, *P. tejerai*, *P. tomodoni*, *P. torrealbai*, *P. traguli*, *P. tribolonoti*, *P. tropiduri*, *P. uilenbergi*, *P. watteni*, *P. wenyoni*, *P. vacuolatum*, *P. vastator*, *P. vaughani*, *P. vinckei*, *P. volans* y/o *P. youngi*.

En una realización preferida de la invención los exosomas comprenden antígenos que provienen de especies de *Plasmodium* que infectan al hombre, monos y/o roedores, es decir, en una realización preferida de la invención, dicho antígeno o antígenos presentes en el interior o en la superficie de los exosomas pertenecen a *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium yoelli*, *P. berghei*, *P. brasilianum*, *P. chabaudi*, *P. cynomolgi*, *P. fragile*, *P. knowlesi* y/o *P. reichenowi*.

## ES 2 362 589 A1

Los exosomas de la presente invención pueden ser aislados a partir de reticulocitos de cualquier mamífero infectado con *Plasmodium sp.* aunque preferiblemente se aíslan a partir de reticulocitos humanos, de monos y/o de ratones. Una realización preferida contempla el uso de reticulocitos humanos para en la medida de lo posible evitar reacciones indeseadas al ser administrados a pacientes humanos.

Otro objeto de la presente invención viene representado por un método para la obtención de los exosomas de la invención que comprende:

- a) obtener una muestra de sangre infectada con *Plasmodium sp.*,
- b) obtener la fracción de exosomas derivada de reticulocitos mediante ultracentrifugación secuencial de la muestra de sangre de a).

En una realización particular la muestra de sangre puede estar infectada con *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. yoelli*, *P. achiotense*, *P. achromaticum*, *P. aegyptensis*, *P. aeuminatum*, *P. agamae*, *P. anasum*, *P. atheruri*, *P. azurophilum*, *P. balli*, *P. bambusicolai*, *P. basilisci*, *P. berghei*, *P. bigueti*, *P. brasilianum*, *P. brygooi*, *P. booliati*, *P. bubalis*, *P. bucki*, *P. coatneyi*, *P. cathemerium*, *P. cephalophi*, *P. chabaudi*, *P. chiricahuae*, *P. circularis*, *P. cnemidophori*, *P. coatneyi*, *P. coggeshalli*, *P. colombiense*, *P. corradettii*, *P. coturnix*, *P. coulangesi*, *P. cuculus*, *P. popo*, *P. cyclopsi*, *P. cynomolgi*, *P. diminutivum*, *P. diploglossi*, *P. issanaikai*, *P. dominicana*, *P. durae*, *P. egerniae*, *P. elongatum*, *P. eylesi*, *P. fabesia*, *P. fairchildi*, *P. fallax*, *P. fieldi*, *P. foleyi*, *P. forresteri*, *P. floridense*, *P. fragile*, *P. garnhami*, *P. gallinaceum*, *P. giganteum*, *P. giovannolai*, *P. girardi*, *P. gonatodi*, *P. gonderi*, *P. georgesi*, *P. gracilis*, *P. griffithsi*, *P. guanggong*, *P. gundersi*, *P. guyannense*, *P. heischi*, *P. hegneri*, *P. hermani*, *P. heteronucleare*, *P. hexamerium*, *P. holaspi*, *P. huffi*, *P. hylobati*, *P. icipeensis*, *P. inopinatum*, *P. inui*, *P. jefferi*, *P. josephinae*, *P. juxtannucleare*, *P. kempfi*, *P. knowlesi*, *P. kentropyxi*, *P. leanucteus*, *P. lemuri*, *P. lophurae*, *P. lepidoptiformis*, *P. lygosomae*, *P. mabuiae*, *P. mackerrasae*, *P. maculilabre*, *P. maior*, *P. marginatum*, *P. matutinum*, *P. mexicanum*, *P. minasense*, *P. morulum*, *P. nucleophilum*, *P. octamerium*, *P. odocoilei*, *P. papernai*, *P. paranucleophilum*, *P. parvulum*, *P. pedioecetii*, *P. pelaezi*, *P. percygarnhami*, *P. petersi*, *P. pifanoi*, *P. pinotti*, *P. pinorrii*, *P. pitheci*, *P. pitmani*, *P. potare*, *P. praecox*, *P. reichenowi*, *P. relictum*, *P. rhadinurum*, *P. rhodaini*, *P. robinsoni*, *P. rouxi*, *P. sandoshami*, *P. sasai*, *P. schweitzii*, *P. silvaticum*, *P. simium*, *P. semiovale*, *P. shortii*, *P. smirnovi*, *P. supraecox*, *P. tenue*, *P. tejerai*, *P. tomodoni*, *P. torrealbai*, *P. traguli*, *P. tribolonoti*, *P. tropiduri*, *P. uilenbergi*, *P. watteni*, *P. wenyoni*, *P. vacuolatum*, *P. vastator*, *P. vaughani*, *P. vinckei*, *P. volans* y/o *P. youngi*.

En una realización preferida de la invención, sin embargo, la muestra de sangre se encuentra infectada con *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium yoelli*, *P. berghei*, *P. brasilianum*, *P. chabaudi*, *P. cynomolgi*, *P. fragile*, *P. knowlesi* y/o *P. reichenowi*.

A partir de la muestra de sangre infectada, el método de obtención de los exosomas de la invención comprende una serie de pasos de ultracentrifugación secuencial (etapa b del método). La secuencia de ultracentrifugación comprende preferiblemente:

- i) centrifugar entre 400-900 x g durante 25-35 minutos
- ii) centrifugar entre 10 000-14 000 x g durante 20-40 minutos
- iii) centrifugar entre 90 000-110 000 x g durante 1-3 horas.

Opcionalmente, después de esta primera secuencia de ultracentrifugación el pellet resultante se resuspende en una solución tampón, preferiblemente PBS, y se filtra a través de un filtro que discrimine por tamaño de partícula la fracción de exosomas (el filtro debe tener alrededor de 0,20  $\mu\text{m}$  de poro). Preferiblemente, después de esta operación se vuelve a centrifugar a 90 000-110 000 x g durante 1-3 horas.

La centrifugación secuencial debe llevarse preferiblemente a cabo a una temperatura baja de entre 0-7°C para preservar la integridad de las proteínas y las estructuras proteicas de los exosomas purificados.

Tras la etapa b) del método se obtiene una fracción exosómica mayoritariamente formada por exosomas derivados de reticulocitos. Sin embargo, esta fracción puede contener una mínima fracción de exosomas derivados de otros tipos celulares sanguíneos.

Aunque la fracción obtenida está suficientemente enriquecida en exosomas derivados de reticulocitos, opcionalmente, si se desea obtener una fracción aún más enriquecida se puede someter la fracción de exosomas obtenidos a un método de purificación por inmunoaislamiento. El inmunoaislamiento implica el uso de anticuerpos específicos frente a reticulocitos o frente a moléculas específicas de reticulocitos presentes en los exosomas. En una realización particular y preferida el inmunoaislamiento se realiza mediante el uso de anticuerpos específicos frente al receptor de la transferrina.

La realización preferida comprende el inmunoaislamiento de los exosomas derivados de reticulocitos mediante el uso de bolas magnéticas recubiertas de anticuerpos frente al receptor de la transferrina. Los exosomas derivados de reticulocitos, una vez unidos a las bolas magnéticas a través de los anticuerpos anti-receptor de la transferrina, son separados de estas por medio de un tratamiento ácido.

## ES 2 362 589 A1

Los exosomas de la invención han sido analizados por espectrometría de masa. Con esta información se ha desarrollado otro de los aspectos de la presente invención un exosoma artificial que comprende al menos un antígeno de *Plasmodium sp* en su interior o en su superficie.

5 Los exosomas se han desarrollado por métodos conocidos (de la Peña *et al.* 2009) a partir de los antígenos de *Plasmodium* identificados por espectrometría de masa. El uso de exosomas artificiales reduce el riesgo de que se produzca una respuesta autoinmune en el paciente inmunizado.

10 En una realización preferida de la invención los exosomas artificiales se encuentran acoplados principalmente por antígenos de Plasmodiums que infectan a monos ratones o humanos como por ejemplo *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium yoelli*, *P. berghei*, *P. brasilianum*, *P. chabaudi*, *P. cynomolgi*, *P. fragüe*, *P. knowlesi*, *P. reichenowi*. En una realización preferida, los exosomas artificiales comprenden antígenos de *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y/o *P. ovale*.

15 Otro objeto de la presente invención es composición farmacéutica que comprende los exosomas de la invención o los exosomas artificiales de la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 Los excipientes pueden seleccionarse entre portadores, excipientes, materiales de soporte, lubricantes, cargas, disolventes, diluyentes, colorantes, acondicionadores del sabor tales como azúcares, antioxidantes y/o aglutinantes. La selección de estos materiales auxiliares y/o excipientes y de las cantidades que han de utilizarse dependerá de la forma de aplicación de la composición farmacéutica.

25 La composición farmacéutica según la invención puede adaptarse a cualquier forma de administración, ya sea por vía oral o por vía parenteral, por ejemplo, por vía pulmonar, por vía nasal, por vía rectal y/o por vía intravenosa. Por tanto, la formulación según la invención puede adaptarse para la aplicación tópica o sistémica, particularmente para la aplicación dérmica, subcutánea, intramuscular, intraarticular, intraperitoneal, pulmonar, bucal, sublingual, nasal, percutánea, vaginal, oral o parenteral.

30 Un último objeto de la presente invención es una vacuna frente a la malaria que comprende exosomas de la invención o los exosomas artificiales de la invención.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención pero no pretenden ser limitativos del alcance de la misma.

### Ejemplos

#### 35 Ejemplo 1

##### *Purificación de exosomas*

40 Los exosomas fueron purificados de plasma obtenido de sangre de ratones colectado en EDTA. Fueron utilizados plasmas de ratones Balb/c no infectados e infectados con cepas *P. yoelli* 17X y 17XL al 10-30% de parasitemia. Para el aislamiento de los exosomas, los sueros fueron centrifugados secuencialmente a 500 x g por 30 min., a 12 000 x g por 35 min. y a 100 000 x g por 2 h a 4°C. El precipitado final fue resuspendido en PBS (usualmente 5x el volumen original de suero), filtrado a través de un filtro de 0.22- $\mu$ m y centrifugado a 100 000 x g por 2 h a 4°C. Los precipitados fueron resuspendidos en 1XPBS y la cantidad de proteínas recuperada fue determinada mediante un ensayo de Bradford. Aproximadamente 5 microgramos de exosomas son obtenidos de 1.5 ml de suero. El material obtenido se utiliza inmediatamente o se congela mediante enfriamiento rápido y se almacena a -80°C. Los exosomas han sido analizados mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica (EM) para confirmar su pureza y visualizar su morfología (Figura 1). Para las medidas de DLS, se analizaron 50  $\mu$ l de una suspensión 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l en PBS a 25°C utilizando un Zetasizer Nano S (Malvern Instruments). Los análisis de EM fueron hechos a partir de preparados frescos de exosomas fijados en 2% de paraformaldehído durante toda la noche a 4°C. Los exosomas fueron colocados en rejillas de formar durante 1 min. antes de ser lavados en agua destilada. Las rejillas fueron teñidas negativamente por 1 min. con una solución de 2% de acetato de uranilo en agua destilada. Después de ser secadas completamente, las rejillas fueron observadas en un microscopio de transmisión electrónica JEOL 1010. Ambas técnicas revelaron poblaciones homogéneas de nano-vesículas con un diámetro compatible con el tamaño previamente descrito para exosomas.

#### 60 Ejemplo 2

##### *Propiedades inmunogénicas de los exosomas*

Ratones Balb/c fueron inmunizados con exosomas derivados de la sangre de ratones no infectados (exC) y ratones infectados con exosomas de la cepa no letal (exPyNL) y letal (exPyL). Para las inmunizaciones, los ratones recibieron inyecciones intravenosas (i.v.) de 5  $\mu$ g de exosomas en 100  $\mu$ l de PBS después de haber sido anestesiados con una combinación de Ketamina (100 mg/Kg) y Midazolam (5 mg/Kg) inyectado intra-peritonealmente. Han sido realizados dos experimentos con grupos de 4-6 ratones Balb/c (9-11 semanas de edad) inmunizados i.v. a intervalos de 20 días con dos dosis de exosomas. Los ratones no inmunizados (NI) no fueron tratados. Veinte días después de

la segunda inmunización, todos los ratones fueron infectados con  $5.10^5$ - $10^6$  parásitos de la cepa letal (*P. yoelli* 17XL) y la parasitemia controlada diariamente. Notablemente, la mitad de los ratones inmunizados con exosomas de cada cepa mostró diferencias en las curvas de parasitemia con un tiempo mayor de supervivencia al compararlos con los ratones NI y exC (Figura 2A). Además, los ratones inmunizados con exosomas de animales infectados presentaron no solamente un aumento de reticulocitemia sino también un cambio de tropismo celular de la cepa letal de normocitos para reticulocitos (Tabla I).

TABLA I

Grupos de ratones Balb/c fueron inmunizados con exosomas de sangre de animales no infectados (exC, n=4) y ratones infectados con Py17XL (exPyL, n=4) y Py17XNL (exPyNL, n=6). Los ratones no inmunizados (NI) no fueron tratados. El porcentaje de reticulocitos infectados y la reticulocitemia fueron medidos el día antes de la muerte. Los resultados para los diferentes grupos se expresan con media  $\pm$  error estándar

	Días sobrevividos después de la muerte de animales no inmunizados	% de reticulocitos infectados	Reticulocitemia
NI		$0.65 \pm 0.92$	$0.6 \pm 0.85$
exC	$0.5 \pm 0.33$	$3.08 \pm 1.72$	$3.02 \pm 1.48$
exPyL	$2.5 \pm 1.37$	$49.15 \pm 21.46$	$30.98 \pm 16.11$
exPyNL	$3.5 \pm 1.29$	$35.57 \pm 18.66$	$23.68 \pm 12.83$

## Ejemplo 3

*Respuesta humoral y celular*

Después de demostrar la capacidad inmunogénica de los exosomas derivados de animales infectados con las cepas letal y no letal de *P. yoelli*, se iniciaron experimentos para evaluar si las respuestas protectoras estaban asociadas con respuesta inmune celular y/o humoral.

Para estudiar la producción de anticuerpos específicos, los sueros fueron recolectados en el día 20 después de la segunda inmunización y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Mezclas de sueros de los grupos de animales NI, exC, exPyNL y exPyL fueron utilizados para analizar los anticuerpos circulantes anti *P. yoelli* inducidos por la inmunización con exosomas. Western blots fueron realizados utilizando un lisado de antígeno total de *P. yoelli* obtenido por lisis de eritrocitos infectados con 1.5 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1 M  $\text{KHCO}_3$  y 0.01 M EDTA seguido de varios ciclos de congelación y descongelación. Ratones inmunizados con exosomas provenientes de infección no letal produjeron anticuerpos IgG específicos contra antígenos de *P. yoelli* de ambas cepas (Figura 3). Como era de esperarse, no se detectaron anticuerpos contra *P. yoelli* en los sueros de animales no inmunizados.

La producción de citoquinas de células individuales para evaluar la respuesta inmune celular, se realizó mediante tinción intra-celular. Veinte días después de la segunda inmunización, células del bazo (esplenocitos) de animales inmunizados fueron sembradas por triplicado en placas de cultivo de 96 pozos ( $5 \times 10^5$  células/pozo). Los esplenocitos fueron cultivados en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de ternero (FCS) inactivado por temperatura, HEPES (10 mM), L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM),  $2\beta$ -mercaptoetanol (50  $\mu\text{M}$ ), y penicilina-estreptomina (0.1 mM), y, en presencia o ausencia, de 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno de *P. yoelli* o 5  $\mu\text{g}$  de una preparación congelada de exosomas. Para analizar la proliferación, las células fueron teñidas con 5-6-carboxy-fluoresceína diacetatosuccinimidil éster (CFSE) utilizando el kit vibrant CFDASE "cell tracer" kit (Invitrogen) antes del cultivo. Las placas fueron incubadas por 72 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y con acetato de forbol miristato (50 ng/ml), ionomicina (500 ng/ml) y brefeldina A (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en las últimas 4 horas. Las células fueron colectadas, lavadas y teñidas para detectar diferentes marcadores de superficie por 20 min. utilizando anticuerpos conjugados a diferentes fluoróforos. Después de dos lavados con PBS/BSA, las células fueron fijadas por 20 min. a temperatura ambiente con cytofix/cytoperm (BD Biosciences) y luego lavadas y resuspendidas en una solución perm/wash la cual las permeabiliza. Después de la permeabilización, las células fueron teñidas por 30 min. con anticuerpos conjugados específicos para diferentes citoquinas. Las muestras fueron analizadas en un FACS Calibur. El examen visual del color y la cantidad de células en los pozos después de 72 h de cultivo reveló una respuesta proliferativa mayor en esplenocitos de exPyNL, solo en presencia de exosomas y de antígeno de *P. yoelli*. El número de esplenocitos  $\text{CD8}^+$  T que produjeron  $\text{IFN-}\gamma$  incrementó en animales inmunizados con exPyNL, y, después de la re-estimulación, con exosomas y antígeno total de *P. yoelli* (Figura 4A). Células T proliferativas  $\text{CD4}^+$  (CSFE low) que producen  $\text{IFN-}\gamma$ , solo o en combinación con IL-2, se detectaron en mayor número en el mismo grupo de animales después de la re-estimulación con antígeno total de *P. yoelli* y exosomas (Figura 4B, 4C).

## Ejemplo 4

*Análisis proteómico de los antígenos*

5 Además de generar datos sobre inmunogenicidad de exosomas en infecciones experimentales de malaria utilizando el modelo murino de Balb/c - *P. yoelli*, también han sido generado datos que demuestran que los exosomas obtenidos de ratones infectados con *P. yoelli* o exosomas obtenidos de un paciente con *P. vivax* contienen antígenos del parásito. Para ello, alícuotas de 5 microgramos de exosomas purificados de ratones no infectados, ratones infectados con la cepa letal y no letal de *P. yoelli*, de un voluntario humano saludable y de un paciente con malaria de *P. vivax*, fueron  
10 analizados por espectrometría de masa.

*Análisis por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida*

15 Las preparaciones de exosomas fueron resuspendidas en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0.4 M en urea 8M. Las muestras fueron reducidas con 5 mM DTT por 15 min a 50°C, alquilizadas con 10 mM iodoacetamida por 30 min. a temperatura ambiente y diluidas con agua grado HPLC hasta obtener una concentración de urea de 1 M. Después de digerir durante 16 h con tripsina con pureza de secuenciación 1/50 (relación enzima/proteína), la reacción fue terminada añadiendo ácido fórmico (FA) al 1% (Stone and Williams, 1996). Las muestras fueron desalineadas con POROS R2 ziptips (Jurado *et al.*, 2007) y secadas en una bomba de vacío. Posteriormente, las muestras fueron resuspendidas en 0.1% FA (sujetas a  
20 2D LC-MS system (LC - Eksigent 1 D-plus, MS - Thermo Fisher LTQ XL with ETD, ESI source - Triversa, Adivion). Las muestras fueron colocadas individualmente en una columna de intercambio catiónico fuerte (SCX) (5  $\mu\text{L}$ , Optimized Technologies), y eluidas automáticamente mediante la inyección de concentraciones crecientes de NaCl (0-500 mM NaCl en 5% acetonitrilo/0.5% FA). Los péptidos eluidos fueron atrapados y lavados en una columna casera C18 (1 cm, 75  $\mu\text{m}$ , Phenomenex Luna C18, 5  $\mu\text{m}$ ). La separación se consiguió mediante una columna capilar C18 (20 cm,  
25 75  $\mu\text{m}$ , Phenomenex Luna C18, 5  $\mu\text{m}$ ) en un gradiente lineal de ACN con 0.1% FA. Los espectros fueron recogidos en el modo "data-dependent acquisition mode" (Figura 5).

*Análisis bioinformático*

30 Los espectros MS/MS (figura 5) fueron convertidos a formato DTA y enviados a una búsqueda de bases de datos utilizando Sequest (Available in Bioworks 3.3.1, Thermo Fisher Scientific). Las bases de datos utilizadas de *P. vivax* y *P. yoelli* fueron las mas recientes liberadas en PLasmoDB (<http://plasmodb.org>), y las de secuencias contaminantes tales como queratina human, tripsina porcina, proteínas de medios de cultivo se buscaron en (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html> o <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein&itool=toolbar>). Todas las secuencias fueron concatenadas con la versión reversa para permitir el cálculo de falso-positivos (Elias and Gygi, 2007). Los datos obtenidos  
35 fueron filtrados para obtener aproximadamente una tasa de error de falso-positivos de 1-2%.

Notablemente, exosomas obtenidos de ratones infectados o del paciente con *P. vivax*, revelaron la presencia de proteínas de *Plasmodium* (Tabla II). Los datos de los espectros individuales validaron 100% que estos péptidos corresponden a proteínas de *Plasmodium*. Todos estos resultados demuestran inequívocamente que los exosomas contienen proteínas del parásito que causa malaria, incluyendo la malaria humana causada por *P. vivax*, y que estos son capaces de presentar antígeno, generar respuestas inmunes y protectoras en un modelo murino.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

**Tabla II**

*Plasmodium*  
*yoelii* XNL

Accession number/description	Total number of peptide spectra	Total number of xcorr sum	Peptide probability
tgr_PY00291 _organism_Plasmodium_yoelii_yoelii_str_17XNL _product_SERA_3 _location_MALPY00082_1581_5430_+_length_1205	22	87,127	8,75E-11
tgr_PY00292 _organism_Plasmodium_yoelii_yoelii_str_17XNL _product_Papain family cysteine protease _putative _location_MALPY00082_7268_10921_+_length_1133	18	70,545	3,75E-09
tgr_PY02883 _organism_Plasmodium_yoelii_yoelii_str_17XNL _product_merozoite surface protein_9 precursor _putative _location_MALPY00811_3609_5645_+_length_679	10	37,951	9,73E-05
tgr_PY05999 _organism_Plasmodium_yoelii_yoelii_str_17XNL _product_octapeptide_repeat antigen _location_MALPY01986_761_2980_+_length_740	9	31,953	5,02E-05
tgr_PY03885 _organism_Plasmodium_yoelii_yoelii_str_17XNL _product_lactate dehydrogenase _location_MALPY01158_507_1457_+_length_317	9	38,922	2,21E-10
tgr_PY05748 _organism_Plasmodium_yoelii_yoelii_str_17XNL _product_merozoite surface protein 1 precursor _location_MALPY01871_991_6309_+_length_1773	9	33,698	7,54E-07
tgr_PY00427 _organism_Plasmodium_yoelii_yoelii_str_17XNL _product_3_nucleotidase/nuclease _location_MALPY00119_10126_11112_+_length_329	7	27,502	8,52E-05
tgr_PY00293 _organism_Plasmodium_yoelii_yoelii_str_17XNL _product_Papain family cysteine protease _putative _location_MALPY00082_12343_16499_+_length_1224	7	25,306	0,000569
tgr_PY04614 _organism_Plasmodium_yoelii_yoelii_str_17XNL _product_heat shock protein 60 _location_MALPY01423_3332_5272_+_length_580	6	20,313	4,49E-06
tgr_PY02351 _organism_Plasmodium_yoelii_yoelii_str_17XNL _product_Y13180 multicatalytic endopeptidase _location_MALPY00643_11313_12796_+_length_279	5	19,382	3,76E-07
tgr_PY01759 _organism_Plasmodium_yoelii_yoelii_str_17XNL _product_hypothetical protein _location_MALPY00474_2572_10368_+_length_10368	3	8,462	1,93E-05





**Referencias**

- 5       - **Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F.J., and Schorey, J.S. (2007).** Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 110, 3234-3244.
- 10       - De La **Pena, H., Madrigal, J.A., Rusakiewicz, S., Bencsik, M., Cave, G.W., Selman, A., Rees, R.C., Travers, P.J., and Dodi, I.A. (2009).** Artificial exosomes as tools for basic and clinical immunology. *Journal of immunological methods* 344, 121-132.
- 15       - **Elias, J.E., and Gygi, S.P. (2007).** Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 4, 207-214.
- 20       - **Jurado, J.D., Rael, E.D., Lieb, C.S., Nakayasu, E., Hayes, W.K., Bush, S.P., and Ross, J.A. (2007).** Complement inactivating proteins and intraspecies venom variation in *Crotalus oreganus helleri*. *Toxicon* 49, 339-350.
- 25       - **Schorey, J.S., and Bhatnagar, S. (2008).** Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* (Copenhagen, Denmark) 9, 871-881.
- 30       - **Stone, K.L., and Williams, K.R. (1996).** Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrilamide gel. In *The protein protocol handbook*, J.M. Walker, ed. (Totowa, NJ, *Humana Press Inc.*).
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

## REIVINDICACIONES

1. Exosoma aislado a partir de reticulocitos que comprende al menos un antígeno de *Plasmodium sp* en su interior o en su superficie.

2. Exosoma de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicho antígeno o antígenos presentes en el exosoma pertenecen a *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium yoelli*, *P. achiotense*, *P. achromaticum*, *P. aegyptensis*, *P. aeuminatum*, *P. agamae*, *P. anasum*, *P. atheruri*, *P. azurophilum*, *P. balli*, *P. bambusicolai*, *P. basilisci*, *P. berghei*, *P. bigueti*, *P. brasilianum*, *P. brygooi*, *P. booliati*, *P. bubalis*, *P. bucki*, *P. coatneyi*, *P. cathemerium*, *P. cephalophi*, *P. chabaudi*, *P. chiricahuae*, *P. circularis*, *P. cnemidophori*, *P. coatneyi*, *P. coggeshalli*, *P. colombiense*, *P. corradettii*, *P. coturnix*, *P. coulagesi*, *P. cuculus*, *P. popo*, *P. cyclopsi*, *P. cynomolgi*, *P. diminutivum*, *P. diploglossi*, *P. dissanaikiei*, *P. dominicana*, *P. durae*, *P. egerinae*, *P. elongatum*, *P. eylesi*, *P. fabesia*, *P. fairchildi*, *P. fallax*, *P. fieldi*, *P. foleyi*, *P. forresteri*, *P. floridense*, *P. fragüe*, *P. garnhami*, *P. gallinaceum*, *P. giganteum*, *P. giovannolai*, *P. girardi*, *P. gonatodi*, *P. gonderi*, *P. georgesi*, *P. gracilis*, *P. griffithsi*, *P. guanggong*, *P. gundersi*, *P. guyannense*, *P. heischi*, *P. hegneri*, *P. hermani*, *P. heteronucleare*, *P. hexamerium*, *P. holaspi*, *P. huffi*, *P. hylobati*, *P. icipeensis*, *P. inopinatum*, *P. inui*, *P. jefferi*, *P. josephinae*, *P. juxtannucleare*, *P. kempi*, *P. knowlesi*, *P. kentropyxi*, *P. leanucteus*, *P. lemuris*, *P. lophurae*, *P. lepidoptiformis*, *P. lygosomae*, *P. mabuia*, *P. mackerrasae*, *P. maculilabre*, *P. maior*, *P. marginatum*, *P. matutinum*, *P. mexicanum*, *P. minasense*, *P. morulum*, *P. nucleophilum*, *P. octamerium*, *P. odocoilei*, *P. papernai*, *P. paranucleophilum*, *P. parvulum*, *P. pedioectii*, *P. pelaezi*, *P. percygarnhami*, *P. petersi*, *P. pifanoi*, *P. pinotti*, *P. pinorrii*, *P. pitheci*, *P. pitmani*, *P. polare*, *P. praecox*, *P. reichenowi*, *P. relictum*, *P. rhadinurum*, *P. rhodaini*, *P. robinsoni*, *P. rouxi*, *P. sandoshami*, *P. sasai*, *P. schweitz*, *P. silvaticum*, *P. simium*, *P. semiovale*, *P. shortii*, *P. smirnovi*, *P. subpraecox*, *P. tenue*, *P. tejerai*, *P. tomodoni*, *P. torrealbai*, *P. traguli*, *P. tribolonoti*, *P. tropiduri*, *P. uilenbergi*, *P. watteni*, *P. wenyoni*, *P. vacuolatum*, *P. vastator*, *P. vaughani*, *P. vinckei*, *P. volans* y/o *P. youngi*.

3. Exosoma de acuerdo con la reivindicación 2 donde dicho antígeno o antígenos presentes en el exosoma pertenecen a *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium yoelli*, *P. berghei*, *P. brasilianum*, *P. chabaudi*, *P. cynomolgi*, *P. fragüe*, *P. knowlesi* y/o *P. reichenowi*.

4. Exosoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde dicho exosoma ha sido aislado a partir de reticulocitos de mono, de ratón y/o humanos.

5. Uso de un exosoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en la elaboración de un medicamento para la prevención y profilaxis frente a la malaria.

6. Método para la obtención de los exosomas de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:

- a) obtener una muestra de sangre infectada con *Plasmodium sp.*,
- b) obtener la fracción de exosomas derivada de reticulocitos mediante ultracentrifugación secuencial de la muestra de sangre de a).

7. Método de acuerdo con la reivindicación 6 donde la muestra de sangre puede estar infectada con *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium yoelli*, *P. achiotense*, *P. achromaticum*, *P. aegyptensis*, *P. aeuminatum*, *P. agamae*, *P. anasum*, *P. atheruri*, *P. azurophilum*, *P. balli*, *P. bambusicolai*, *P. basilisci*, *P. berghei*, *P. bigueti*, *P. brasilianum*, *P. brygooi*, *P. booliati*, *P. bubalis*, *P. bucki*, *P. coatneyi*, *P. cathemerium*, *P. cephalophi*, *P. chabaudi*, *P. chiricahuae*, *P. circularis*, *P. cnemidophori*, *P. coatneyi*, *P. coggeshalli*, *P. colombiense*, *P. corradettii*, *P. coturnix*, *P. coulagesi*, *P. cuculus*, *P. popo*, *P. cyclopsi*, *P. cynomolgi*, *P. diminutivum*, *P. diploglossi*, *P. dissanaikiei*, *P. dominicana*, *P. durae*, *P. egerinae*, *P. elongatum*, *P. eylesi*, *P. fabesia*, *P. fairchildi*, *P. fallax*, *P. fieldi*, *P. foleyi*, *P. forresteri*, *P. floridense*, *P. fragile*, *P. garnhami*, *P. gallinaceum*, *P. giganteum*, *P. giovannolai*, *P. girardi*, *P. gonatodi*, *P. gonderi*, *P. georgesi*, *P. gracilis*, *P. griffithsi*, *P. guanggong*, *P. gundersi*, *P. guyannense*, *P. heischi*, *P. hegneri*, *P. hermani*, *P. heteronucleare*, *P. hexamerium*, *P. holaspi*, *P. huffi*, *P. hylobati*, *P. icipeensis*, *P. inopinatum*, *P. inui*, *P. jefferi*, *P. josephinae*, *P. juxtannucleare*, *P. kempi*, *P. knowlesi*, *P. kentropyxi*, *P. leanucteus*, *P. lemuris*, *P. lophurae*, *P. lepidoptiformis*, *P. lygosomae*, *P. mabuia*, *P. mackerrasae*, *P. maculilabre*, *P. maior*, *P. marginatum*, *P. matutinum*, *P. mexicanum*, *P. minasense*, *P. morulum*, *P. nucleophilum*, *P. octamerium*, *P. odocoilei*, *P. papernai*, *P. paranucleophilum*, *P. parvulum*, *P. pedioectii*, *P. pelaezi*, *P. percygarnhami*, *P. petersi*, *P. pifanoi*, *P. pinotti*, *P. pinorrii*, *P. pitheci*, *P. pitmani*, *P. polare*, *P. praecox*, *P. reichenowi*, *P. relictum*, *P. rhadinurum*, *P. rhodaini*, *P. robinsoni*, *P. rouxi*, *P. sandoshami*, *P. sasai*, *P. schweitz*, *P. silvaticum*, *P. simium*, *P. semiovale*, *P. shortii*, *P. smirnovi*, *P. subpraecox*, *P. tenue*, *P. tejerai*, *P. tomodoni*, *P. torrealbai*, *P. traguli*, *P. tribolonoti*, *P. tropiduri*, *P. uilenbergi*, *P. watteni*, *P. wenyoni*, *P. vacuolatum*, *P. vastator*, *P. vaughani*, *P. vinckei*, *P. volans* y/o *P. youngi*.

8. Método de acuerdo con la reivindicación 7 donde la muestra de sangre puede estar infectada con *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium yoelli*, *P. berghei*, *P. brasilianum*, *P. chabaudi*, *P. cynomolgi*, *P. fragile*, *P. knowlesi* y/o *P. reichenowi*.

## ES 2 362 589 A1

9. Método de acuerdo con la reivindicación 6 donde la ultracentrifugación secuencial de la etapa b) comprende:

- i) centrifugar entre 400-900 x g durante 25-35 minutos
- ii) centrifugar entre 10 000-14 000 x g durante 20-40 minutos
- iii) centrifugar entre 90 000-110 000 x g durante 1 -3 horas.

5

10. Composición farmacéutica que comprende exosomas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

11. Vacuna frente a la malaria que comprende exosomas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

15

20

25

30

35

40

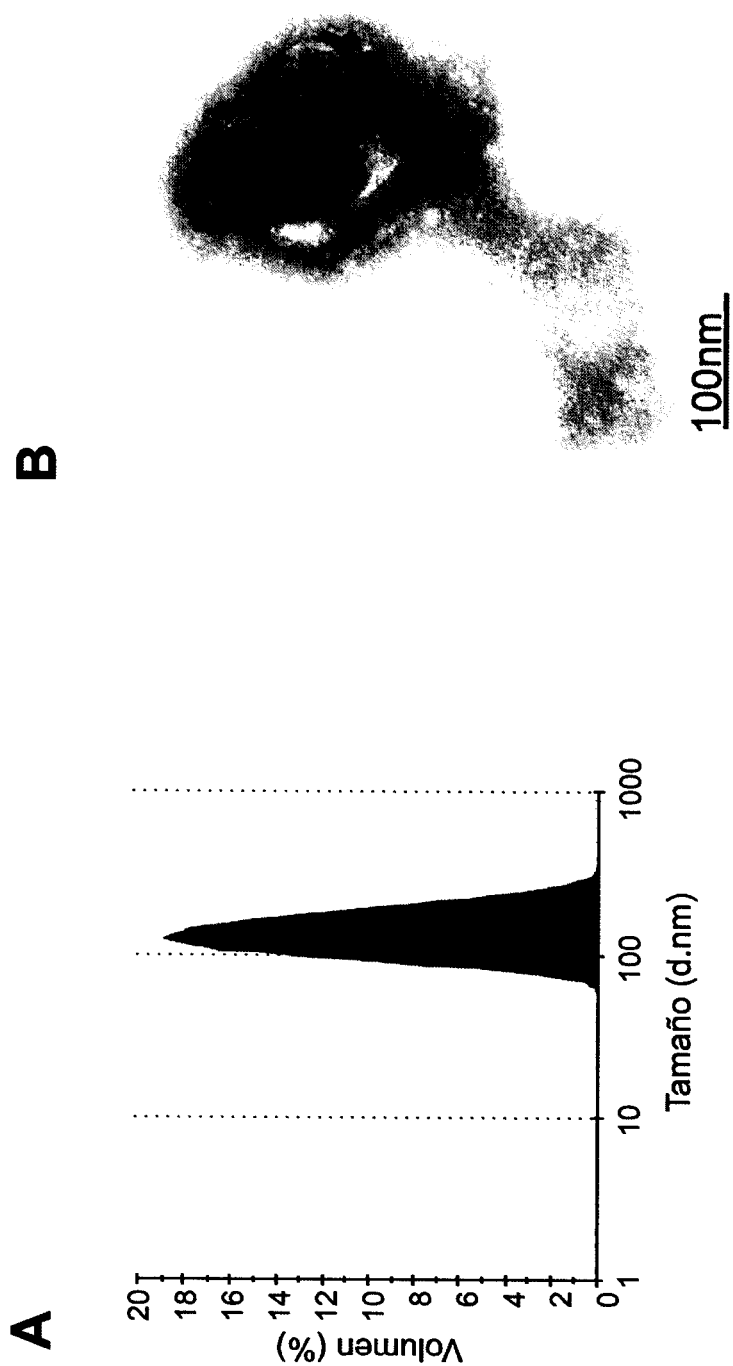
45

50

55

60

65



**FIG. 1**

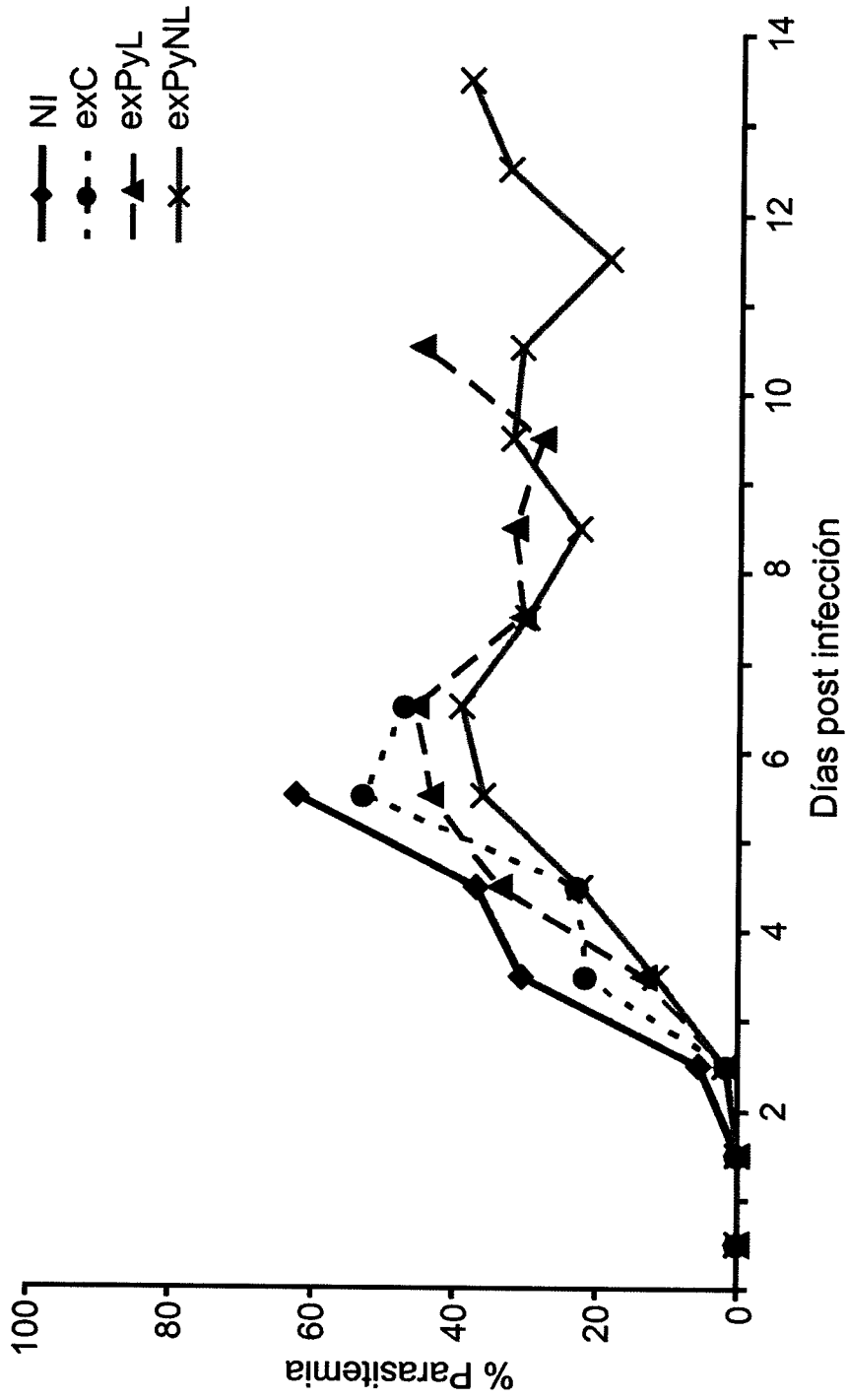
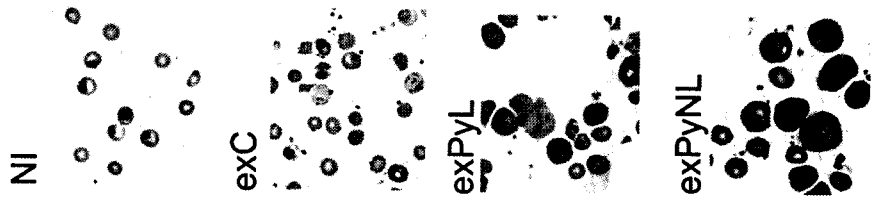
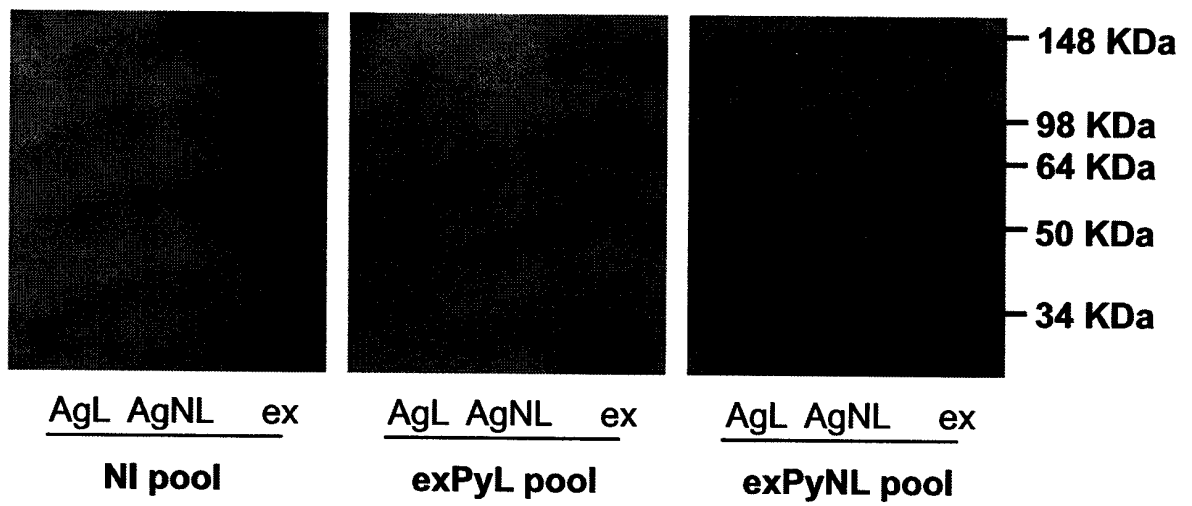
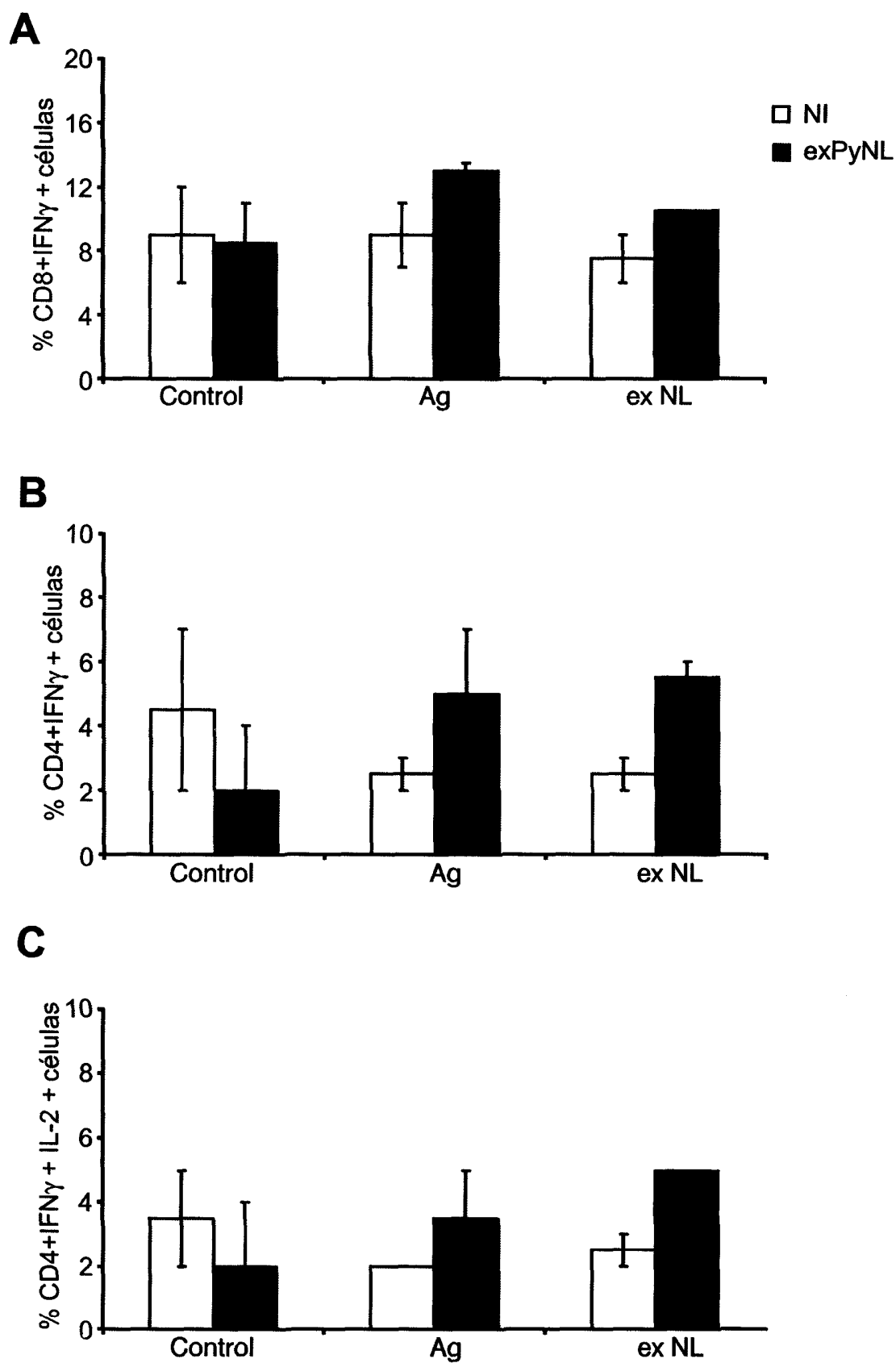


FIG. 2



**FIG. 3**



**FIG. 4**

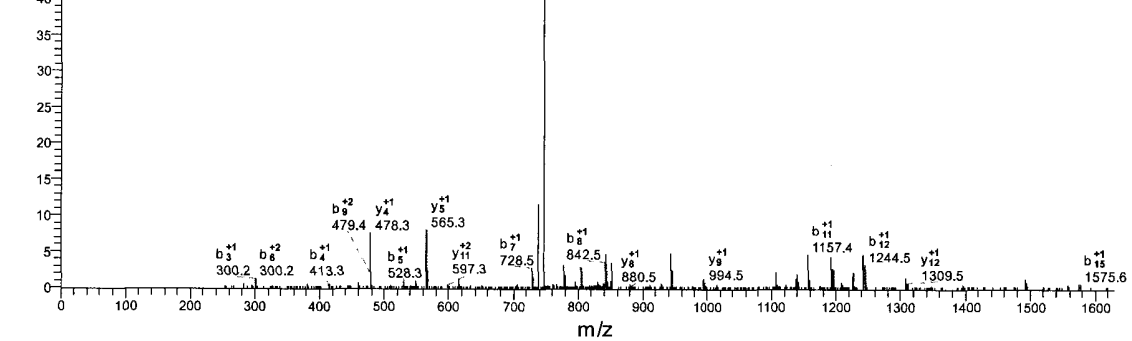


ES 2 362 589 A1

#7331-7331 NL: 1.64E4

gb|PVX\_116515 |  
 organism=Plasmodium\_vivax\_Sal-1 |  
 product=hypothetical protein,  
 conserved |  
 location=CM000453:1038825-  
 1043220(-) | length=1422  
 Peptide: NGKIDAENDSISM\*PSK  
 M+H=1722.85180342  
 DeltaM=-0.86811  
 Charges=2  
 Peptide prob.=0.0002043  
 Xcorr=3.27  
 DCn=0.43

	AA	B	Y	
1	N	115.05	-	16
2	G	172.07	1607.76	15
3	K	300.17	1550.74	14
4	I	413.25	1422.64	13
5	D	528.28	1309.56	12
6	A	599.31	1194.53	11
7	E	728.36	1123.49	10
8	N	842.40	994.45	9
9	D	957.43	880.41	8
10	S	1044.46	765.38	7
11	I	1157.54	678.35	6
12	S	1244.58	565.27	5
13	M	1391.61	478.23	4
14	P	1488.66	331.20	3
15	S	1575.70	234.14	2
16	K	-	147.11	1



#14555-14555 NL: 1.61E4

gb|PVX\_082575 |  
 organism=Plasmodium\_vivax  
 \_Sal-1 | product=isoleucyl-  
 tRNA synthetase, putative |  
 location=CM000453:827063-  
 830683(+) | length=1206  
 Peptide: WIFSSVQMLTK  
 M+H=1340.615722656  
 DeltaM=0.88237  
 Charges=2  
 Peptide prob.=0.0003790  
 Xcorr=2.50  
 DCn=0.26

	AA	B	Y	
1	W	187.09	-	11
2	I	300.17	1153.63	10
3	F	447.24	1040.54	9
4	S	534.27	893.48	8
5	S	621.30	806.44	7
6	V	720.37	719.41	6
7	Q	848.43	620.34	5
8	M	979.47	492.29	4
9	L	1092.55	361.24	3
10	T	1193.60	248.16	2
11	K	-	147.11	1

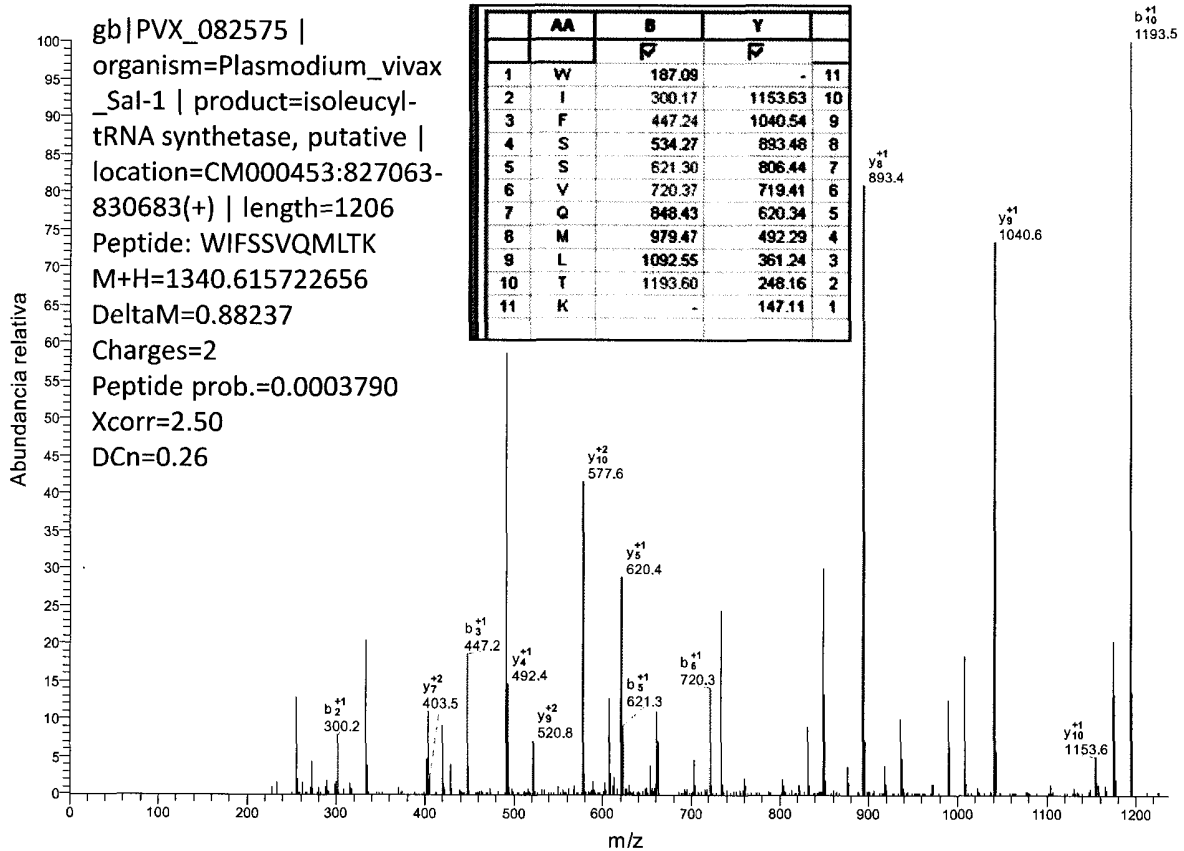
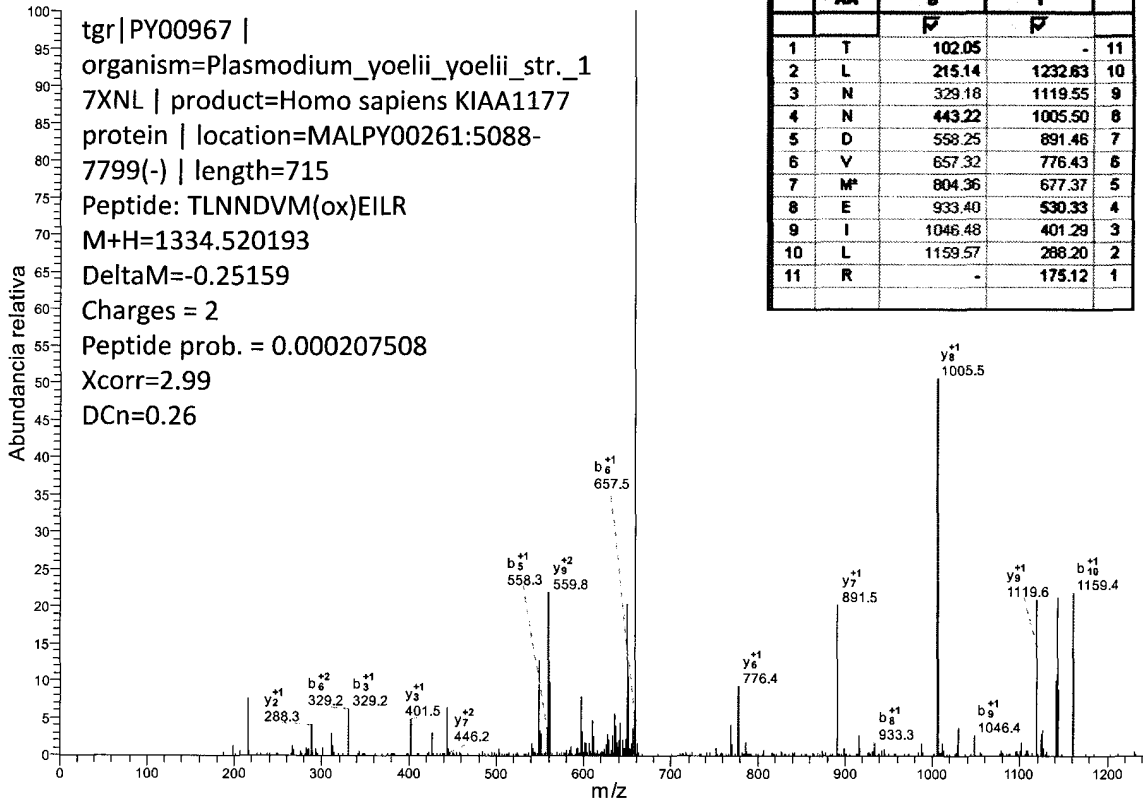


FIG. 5A

ES 2 362 589 A1

#8138-8138 NL: 1.95E3



#7332-7332 NL: 2.96E3

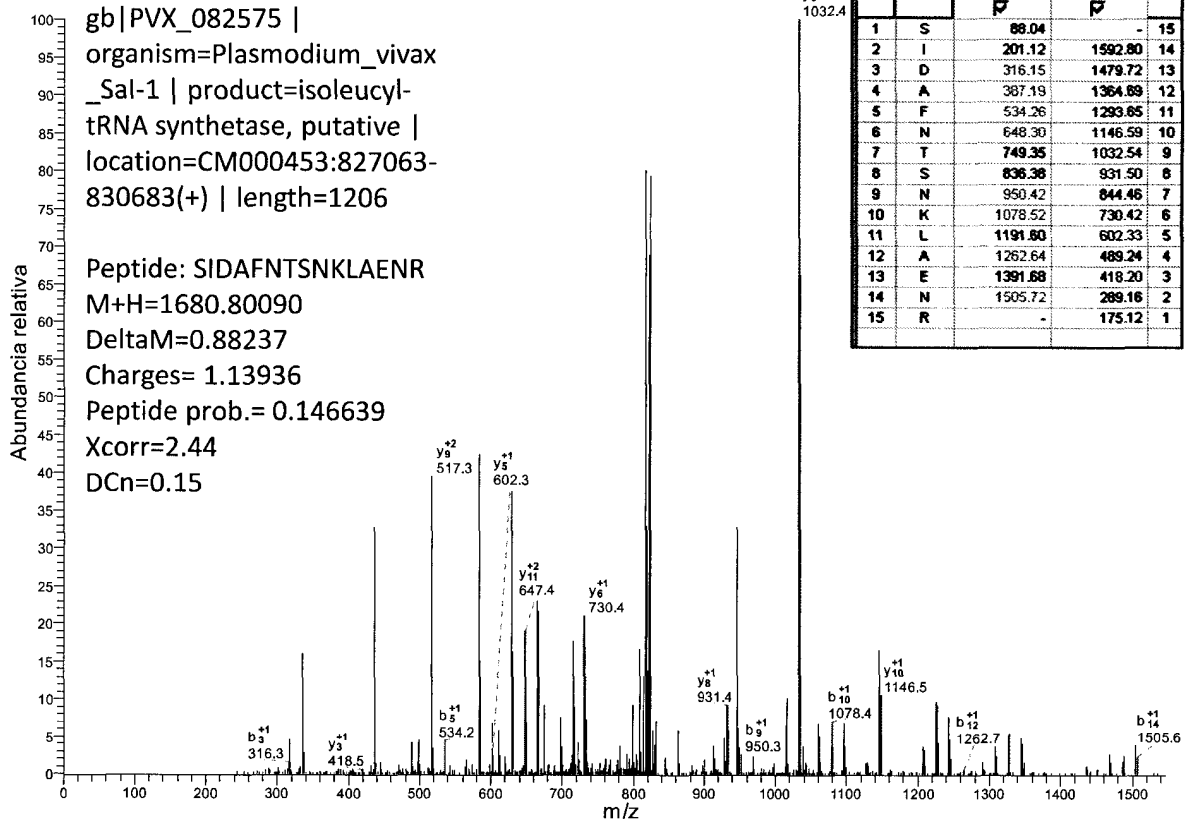
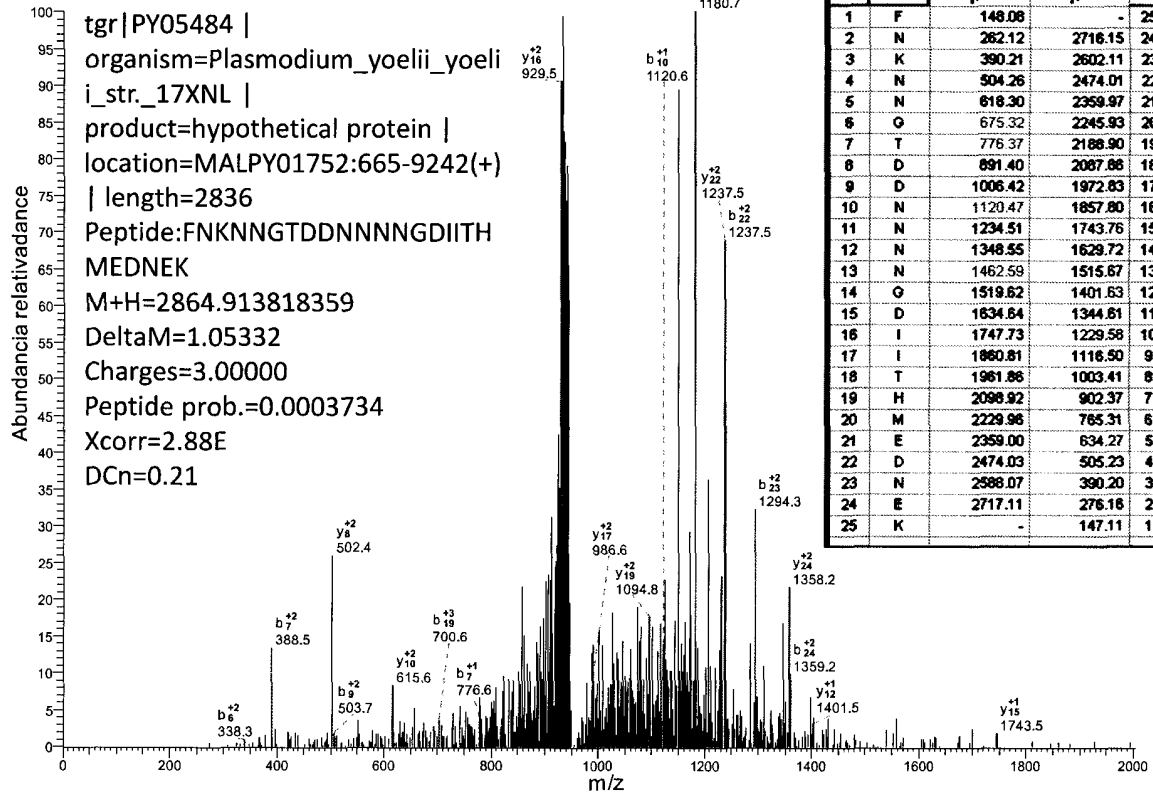


FIG. 5B

ES 2 362 589 A1

#14591-14591 NL: 1.23E2



#7134-7134 NL: 1.57E2

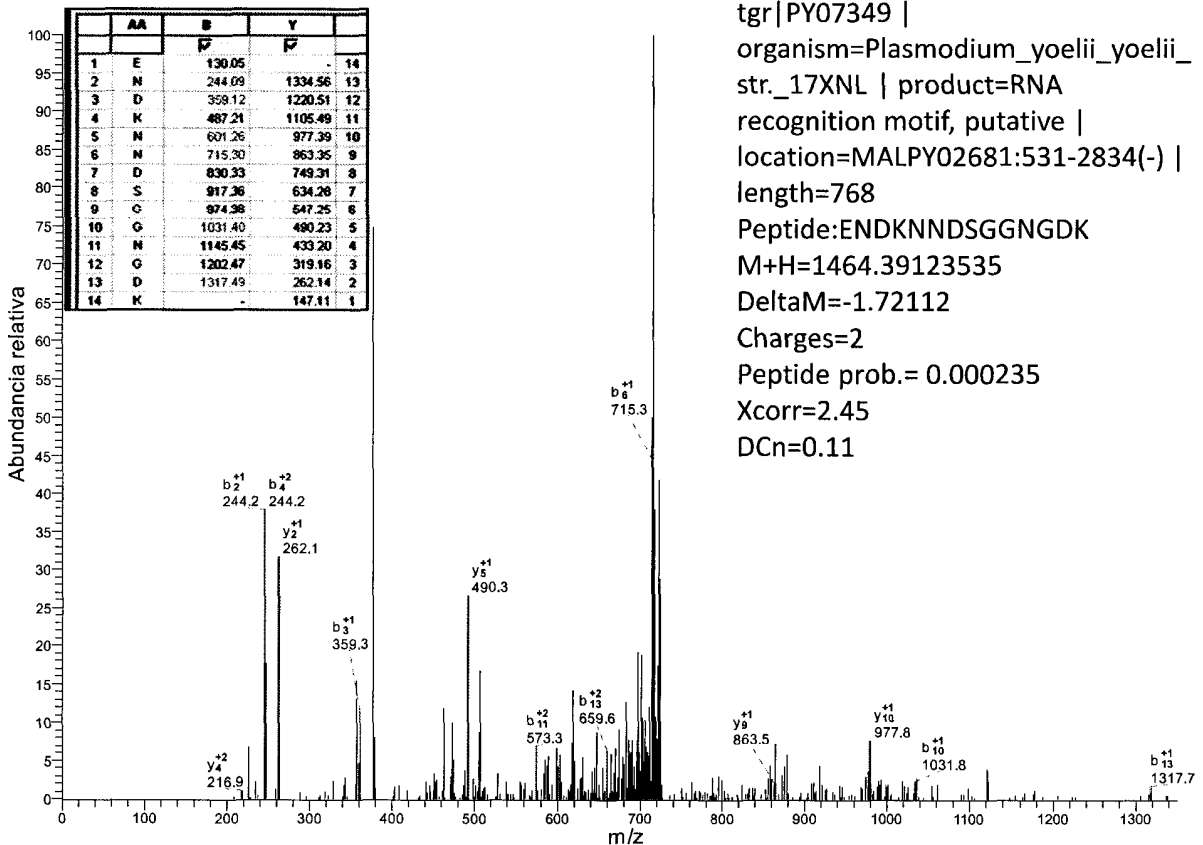


FIG. 5C

#8090-8090 NL: 1.35E3  
 tgr | PY00967 |  
 organism=Plasmodium\_yoelii\_yoelii\_s  
 tr\_17XNL | product=Homo sapiens  
 KIAA1177 protein |  
 location=MALPY00261:5088-7799(-) |  
 length=715  
 Peptide: TLNNDVM(ox)EILR  
 M+H=1334.520193  
 DeltaM=-0.25159  
 Charges = 2  
 Peptide prob. = 0.000207508  
 Xcorr=2.99  
 DCn=0.26

	AA	B	Y
1	T	102.05	-
2	L	215.14	1232.63
3	N	329.18	1119.55
4	N	443.22	1005.50
5	D	558.25	891.46
6	V	657.32	776.43
7	M*	804.36	677.37
8	E	933.40	530.33
9	I	1046.48	401.29
10	L	1159.57	288.20
11	R	-	175.12

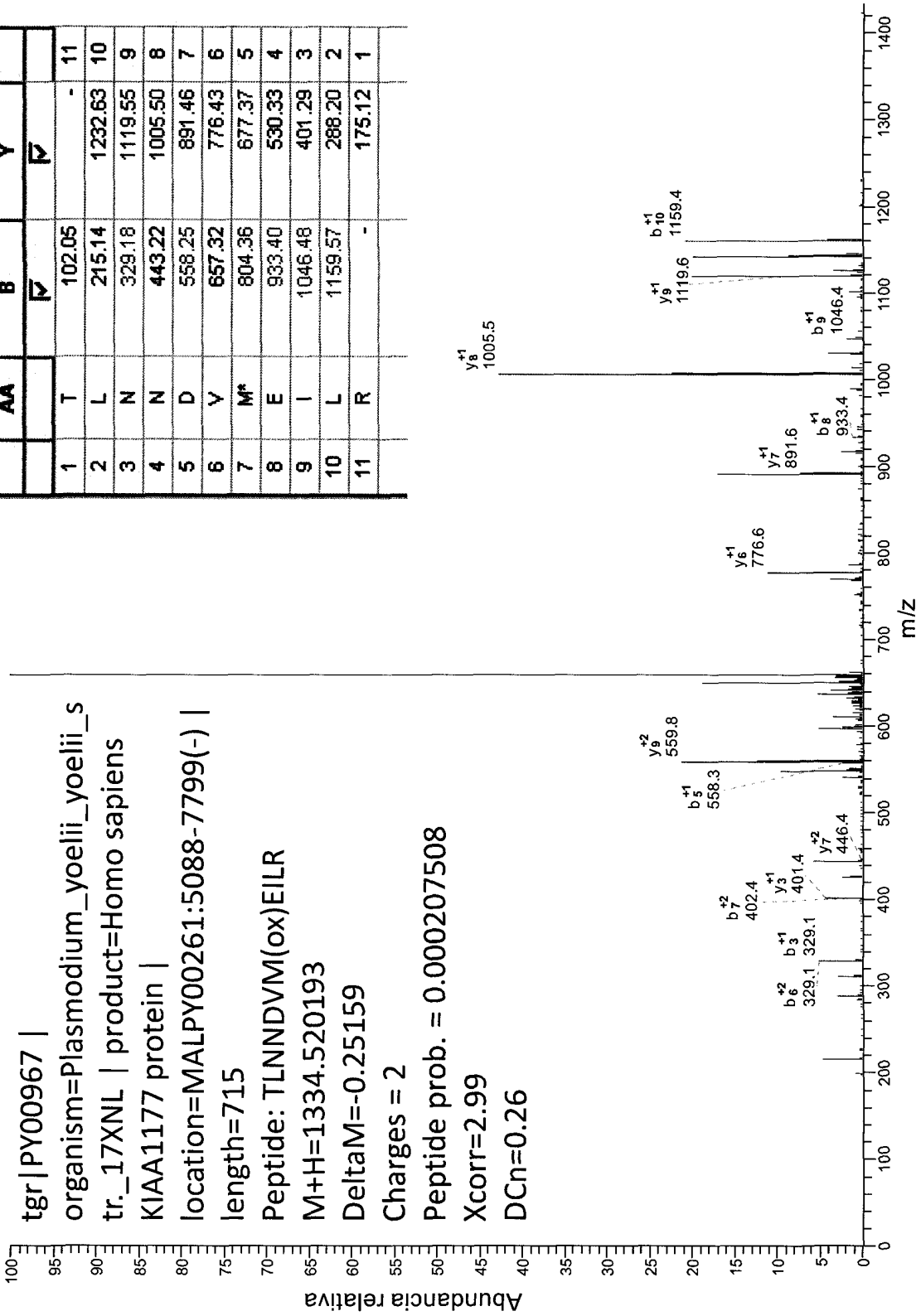


FIG. 5D



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931275

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BEAUVILLAIN C. et al. Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. Vaccine. Enero 2009. Volumen 27, páginas 1750-1757, todo el documento.	1-11
A	SCHOREY JS. & BHATNAGAR S. Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. Traffic. 2008. Volumen 9, páginas 871-881, página 871, resumen; página 877, columna 2 - página 878, columna 1.	1-11
A	VIAUD S. et al. Exosomes for the Treatment of Human Malignancies. Horm Metab Res. 2008. Volumen 40, páginas 82-88, página 82, resumen; página 86, columna 2 - página 87, columna 1.	1-11
A	WO 2008092153 A2 (UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH FOUNDATION) 31.07.2008, página 4, línea 25 – página 7, línea 11.	1-11
A	ENGWERDA ChR. et al. The importance of the spleen in malaria. TRENDS in Parasitology. 2005. Volumen 21 (2), páginas 75-80, página 77, columnas 1 y 2.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
22.03.2011

Examinador  
M. García Grávalos

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N33/569** (2006.01)

**A61K39/015** (2006.01)

**A61P31/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE PATENTES, USPTO PATENT DATABASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.03.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-11	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-11	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BEAUVILLAIN C. et al. Vaccine. Enero 2009. Volumen 27, páginas 1750-1757.	Enero-2009
D02	SCHOREY JS. & BHATNAGAR S. Traffic. 2008. Volumen 9, páginas 871-881.	2008
D03	VIAUD S. et al. Horm Metab Res. 2008. Volumen 40, páginas 82-88..	2008
D04	WO 2008092153 A2	31.07.2008
D05	ENGWERDA ChR. et al. TRENDS in Parasitology. 2005. Volumen 21 (2), páginas 75-80.	2005

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente invención divulga un exosoma, aislado de reticulocitos de mono, ratón y/o humanos, que contiene al menos un antígeno de *Plasmodium* sp. (reivindicaciones 1-4), al método para su obtención y a su uso para elaborar un medicamento, composición farmacéutica y/o vacuna para prevención y profilaxis de la malaria (reivindicaciones 5-11).

El documento D01 divulga el uso de exosomas en una vacuna frente a toxoplasmosis congénita en ratones, así como su posible uso en humanos como un nuevo tipo de vacuna que no contiene células sino exosomas que presentan antígenos y que transfieren material biológico entre células, constituyendo una diana inmunológica capaz de inducir una respuesta inmune efectiva (ver todo el documento).

El documento D02 se refiere a un estudio sobre los exosomas y sus funciones biológicas, entre ellas la de candidatos a posibles vacunas frente a enfermedades infecciosas, debido a que los exosomas aislados de células infectadas con patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* o *Toxoplasma gondii* contienen componentes microbianos y pueden promover la presentación de antígenos y la activación de macrófagos (ver página 871, resumen; página 877, columna 2 - página 878, columna 1).

El documento D03 se refiere al uso de exosomas para tratamiento de enfermedades humanas, especialmente en su potencial como vacunas libre de células para combatir el cáncer. También se refiere a su capacidad de presentar antígenos específicos que producen una respuesta inmune efectiva frente a infecciones como las provocadas por *Toxoplasma gondii* lo que hace que se las considere como potenciales vacunas frente a este y otros microorganismos patógenos (ver página 82, resumen; página 86, columna 2 - página 87, columna 1).

El documento D04 divulga un exosoma aislado de una célula, que comprende uno o más antígenos, incluso antígenos exógenos, y que es deficiente en uno o más de los polipéptidos inmunosupresores que normalmente se encuentran en estas moléculas. También se refiere a métodos de obtención de dichos exosomas y a su uso para tratamiento de cancer (ver página 4, línea 25 - página 7, línea 11).

El documento D05 se refiere a la importante función del bazo en el desarrollo de la malaria. Este órgano, es un lugar clave para renovación de los glóbulos rojos parasitados durante la malaria, donde se genera inmunidad y producción de nuevos glóbulos rojos. Este estudio sugiere que cuando el antígeno es capturado por las células dendríticas, presentadoras de antígeno, para generar la respuesta inmune, la transferencia del antígeno puede realizarse por exosomas o por fagocitosis de macrófagos. (ver página 77, columnas 1 y 2).

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**

El objeto técnico de la presente solicitud es un exosoma, que contiene al menos un antígeno de *Plasmodium* sp., un método para su obtención y su uso para elaborar un medicamento y/o vacuna para prevención y profilaxis de la malaria

**1.1. REIVINDICACIONES 1-11**

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica ya que anticipa el uso de exosomas en una vacuna frente a toxoplasmosis congénita en ratones y su posible uso en humanos.



Los documentos D02 y D03 también anticipan el uso de exosomas, aislados de células infectadas con patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* o *Toxoplasma gondii*, contienen componentes microbianos y pueden promover la presentación de antígenos como posibles vacunas libres de células.

Aunque el uso de los exosomas para elaboración de vacunas y es conocido en el estado de la técnica, sin embargo, la presente invención difiere de los documentos anteriormente citados en que reivindica un exosoma que contiene al menos un antígeno de *Plasmodium* sp., que puede ser de diferentes especies de *Plasmodium*, que se obtiene de sangre infectada con este organismo y su uso para elaborar un medicamento para prevención y profilaxis de la malaria, enfermedad difícil de combatir y de encontrar una vacuna específica para ella. Por tanto, se considera que invención divulgada en la presente solicitud resulta inventiva ya que supone una mejora considerablemente respecto a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01-D03, las reivindicaciones 1-11 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D04 y D05 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.