

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 670**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2009 PCT/EE2009/000002**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2009 WO2009092386**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2009 E 09704302 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2245458**

54 Título: **Un nuevo método para medir y caracterizar microvesículas en los fluidos corporales humanos**

30 Prioridad:

25.01.2008 US 62528 P
21.01.2009 US 321412

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2017

73 Titular/es:

EXOSOMICS SIENA S.P.A. (100.0%)
Via Fiorentina 1
53100 Siena, IT

72 Inventor/es:

FAIS, STEFANO y
LOGOZZI, MARIANTONIA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 613 670 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un nuevo método para medir y caracterizar microvesículas en los fluidos corporales humanos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere en general al campo de diagnóstico de cáncer. Más específicamente, la invención se refiere a un método para cuantificar y calificar exosomas en los fluidos corporales humanos.

10 **Técnica antecedente**

Los exosomas son microvesículas de un tamaño que oscila entre 30-120 nm, secretados activamente a través de una ruta de exocitosis usada normalmente para la descarga de receptores y comunicación intercelular. Los exosomas pueden detectarse en sobrenadantes de cultivos celulares y algunos fluidos corporales, tras una ultracentrifugación de múltiples etapas. Además de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH I, CMH II) y proteínas implicadas en la presentación de antígeno, los exosomas pueden transportar proteínas citosólicas y de membrana implicadas en muchas funciones celulares. Los exosomas se secretan en condiciones fisiológicas específicas a partir de diferentes tipos de células tales como células dendríticas (CD), linfocitos, mastocitos y células epiteliales. Este proceso conduce a la formación de depósitos celulares de tipo cesta que contienen estas microvesículas derivadas de multifusión, también denominadas cuerpos multivesiculares (CMV). Se ha resuelto este proceso a través de observaciones de la ultraestructura, particularmente en células normales. Sin embargo, a través de microscopía inmunoelectrónica y análisis de inmunotransferencia de tipo Western de preparaciones de exosomas se ha mostrado que estas microvesículas coexpresan marcadores de diferentes vacuolas intracelulares, tales como endosomas tempranos (por ejemplo Rab5), lisosomas (por ejemplo CD63, CD81, LAMP-1) y fagosomas tardíos (Rab7), pero también algunas otras proteínas más específicas de células (por ejemplo antígenos de CMH de clase III).

La liberación de exosomas a partir de células tumorales es drásticamente mayor que a partir de células normales, y está asociada a menudo con efectos inmunosupresores. Los exosomas derivados de tumores son en muchos aspectos comparables a los exosomas de células normales, excepto por la expresión de algunos marcadores tumorales, tales como CEA para carcinoma colónico, MART-1 o gp-100 para melanoma. Además, el origen de los exosomas tumorales parece ser en muchos aspectos distinto al de los exosomas normales. Esto es probablemente porque las células malignas tienen un tráfico vesicular más dinámico desde el citoplasma hasta el espacio extracelular y viceversa.

El papel de los exosomas tumorales en la progresión del cáncer es un área de investigación que acaba de surgir. Los datos iniciales sugieren que estos orgánulos actúan como portadores de material antigénico tumoral para la sensibilización cruzada de células T mediada por CD. Tales resultados apoyan los intentos clínicos de usar exosomas tumorales como vacunas contra el cáncer. Pruebas crecientes con respecto a un vasto conjunto de efectos supresores ejercidos por estas microvesículas sobre diferentes componentes del sistema inmunitario apoyan claramente la participación de los exosomas tumorales en la progresión de la enfermedad. En particular, se ha mostrado recientemente que los exosomas secretados por células tumorales humanas de diversos orígenes pueden inducir la apoptosis en células T activadas, a través de la expresión de ligandos de muerte (por ejemplo FasL, TRAIL), inhibir las funciones NK y promover la generación de células supresoras de origen mielóide a partir de monocitos normales. Estos datos, junto con la prueba reproducible de que los exosomas de probable origen tumoral pueden encontrarse abundantemente en el plasma y derrames neoplásicos de pacientes con cáncer, apoyan un papel de los exosomas tumorales en el moldeo del microentorno del huésped para permitir progresiones y crecimiento de células tumorales.

Dado el entendimiento creciente del papel de los exosomas en la progresión del cáncer y el hecho de que existe la necesidad creciente de encontrar nuevas curas, mejorar diagnósticos y seguir la malignidad y el crecimiento de los tumores, existe por consiguiente la necesidad de métodos y herramientas para detectar y medir exosomas en fluidos humanos. Sin embargo, el hecho es que los métodos que se usan actualmente para detectar exosomas son o bien no cuantitativos (MET) o bien sólo escasamente cuantitativos (WB). Aunque se ha usado citometría de flujo para cuantificar exosomas, este método no permite la medición precisa que necesitan los investigadores. De hecho, mientras que el análisis de FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*, clasificación celular activada por fluorescencia) es un método adecuado para cuantificar células, incluso de pequeño tamaño, no es adecuado para cuantificar la cantidad de tales vesículas pequeñas (es decir 50-100 nm). Además, la medición aproximada de la fluorescencia media total no permite una cuantificación precisa de cuántas microvesículas están presentes en la muestra proporcionada. Además, el análisis de FACS no permite el análisis simultáneo de diferentes muestras. Por tanto, existe la necesidad de un método para detectar y cuantificar exosomas a partir de pequeñas cantidades de fluidos corporales. Además, dado el hecho de que el diagnóstico temprano del cáncer es esencial para el tratamiento de la enfermedad, existe la necesidad de posibles marcadores tumorales y factores de pronóstico.

65 **Sumario de la invención**

Un problema central en la obtención de datos *in vivo* útiles sobre exosomas es el bajo nivel de eficacia de los métodos actualmente disponibles para obtener exosomas con el fin de cuantificar y caracterizarlos a partir de fluidos corporales humanos, particularmente a partir de plasma. Los fluidos corporales pueden ser también líquido ascítico, fluidos cerebrales, médula ósea, orina, heces o lavado broncoalveolar. Para proporcionar una solución a estos problemas afrontados actualmente, esta divulgación proporciona un método fiable y simple para detectar y cuantificar exosomas a partir de los fluidos corporales, especialmente a partir de plasma humano.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención es un método para detectar y cuantificar exosomas en muestras derivadas de células humanas o en fluido corporal, tal como se define en la reivindicación 1 adjunta. Otro aspecto de la invención es un método no invasivo para monitorizar el crecimiento tumoral, tal como se define en la reivindicación 6 adjunta. Un aspecto adicional de la invención es un kit de prueba para cuantificar y calificar exosomas en muestras derivadas de células humanas o en fluido corporal, tal como se define en la reivindicación 12 adjunta.

Según esta divulgación una prueba basada en ELISA (denominada ExoTest) permite la cuantificación y caracterización de exosomas a partir de plasma humano de tanto donantes sanos como pacientes con tumores. A través de esta prueba es posible la caracterización de microvesículas de tipo exosoma a partir de plasma tanto de ratones SCID con injerto de células de carcinoma de colon o melanoma humano como de pacientes con tumores. Esta divulgación muestra que los niveles plasmáticos de exosomas están directamente relacionados con el tamaño del tumor y que la caveolina-1 puede detectarse exclusivamente a partir de los exosomas purificados del plasma de pacientes con tumores.

Según esta divulgación la detección de exosomas tumorales en plasma de pacientes humanos es útil en el diagnóstico y seguimiento de tumores malignos humanos.

La tecnología dada a conocer en el presente documento permite una prueba no invasiva útil en la práctica clínica para el diagnóstico, el seguimiento y la detección de tumores. La tecnología según esta divulgación puede usarse también en la investigación clínica de tumores. Además, esta invención proporciona herramientas para mejorar las pruebas clínicas existentes basadas en proteínas que se expresan en exosomas (por ejemplo marcadores tumorales).

El razonamiento de esta invención se basa en dos puntos clave:

1. No hay técnica anterior sobre un método que permita la cuantificación y caracterización de exosomas, particularmente en volúmenes pequeños, a menudo disponibles en muestras de plasma humano.

2. Existe la necesidad no satisfecha de una prueba de pronóstico y/o diagnóstico no invasiva en muchos estados patológicos humanos, particularmente en cánceres.

Por consiguiente, un objeto de esta invención es proporcionar un método para cuantificar y caracterizar exosomas, particularmente en pequeños volúmenes.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un método para cuantificar y caracterizar exosomas en muestras de plasma.

Aún otro objeto de esta invención es proporcionar un método para medir los niveles de exosomas en menos de 2 ml de fluidos corporales, junto con una caracterización principalmente completa de la composición proteica de los exosomas. Además, un objeto de esta invención es proporcionar un método para cuantificar simultáneamente exosomas en varias muestras.

Además, la prueba según esta divulgación muestra que la cantidad de exosomas plasmáticos está relacionada con el tamaño del tumor. Por consiguiente otro objeto de la invención es proporcionar un método para seguir y proporcionar un pronóstico de pacientes con cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Detección de exosomas purificados a partir de sobrenadantes de cultivos celulares de melanoma humano.

A. Representación esquemática de ExoTest (ELISA) configurado para la detección y cuantificación de exosomas.

B. Análisis aumento de la dosis de exosomas CD63+ purificados mediante ExoTest. La concentración inicial se correspondía con 5 μ g de exosomas y se añadieron exosomas en diluciones de dos veces.

C. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la expresión de CD63, Rab5b y Lamp-1 en cantidades diferentes de exosomas purificados a partir de sobrenadantes de cultivo de células de melanoma humano (Me501).

D. Análisis de FACS de la expresión de Rab5b y CD63 en exosomas derivados de melanoma purificados a partir de

las células Me501 del sobrenadante y recubiertas sobre perlas de látex.

Figura 2. Detección de exosomas plasmáticos de ratones SCID con injerto de melanoma humano.

- 5 A. Análisis de aumento de la dosis de exosomas tumorales purificados a partir de plasma de ratones SCID con injerto de células de melanoma humano mediante ExoTest.
- B. Análisis de FACS de la expresión de Rab-5b y CD63 en exosomas purificados a partir de plasma de ratones SCID con injerto de células de melanoma humano (Me501).
- 10 C. Correlación del tamaño del tumor y los niveles de exosomas plasmáticos en ratones SCID con injerto de Me501 analizada a diferentes tiempos durante el crecimiento tumoral. Se representaron grupos de ratones mediante 5 animales para cada punto de tiempo. Los niveles de exosomas se expresan como DO450 x 1000.

15 Figura 3. Caracterización de la expresión de caveolina-1 (Cav-1) en exosomas.

- A. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de Cav-1 en extractos celulares y exosomas de células de melanoma humano y macrófagos.
- 20 B. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de CD64, Rab-5b y Cav-1 en exosomas purificados de células Me501, plasma de ratones SCID con injerto de Me501 y ratones SCID negativos para tumor.
- C. Análisis de FACS de la expresión de Cav-1 en exosomas purificados a partir de plasma de ratones SCID con injerto de Me501.
- 25 D. Niveles en plasma de exosomas CD63+ y Cav1+ de ratones SCID que llevan melanoma sacrificados 5 semanas tras el injerto.

Figura 4. Cuantificación de exosomas plasmáticos de pacientes con melanoma.

- 30 Los exosomas purificados a partir de plasma de donantes sanos y pacientes con melanoma se cuantificaron mediante ExoTest usando CD63 (A) o caveolina-1 (B) como antígenos de detección. Los datos se expresan como representación de diagrama de cajas: las líneas verticales y horizontales en cada caja representan la mediana y los percentiles 25º y 75º, respectivamente. Los puntos negros representan valores de resultados atípicos. Los niveles de exosomas se expresan como DO450 x 10000. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney.
- 35

Figura 5. ExoTest (Elisa) sobre muestras sin fraccionar.

- 40 A. La cantidad de exosomas detectables se midió en exosomas purificados (5 O µg de proteínas) en comparación con sobrenadantes de cultivo sin fraccionar (50 ml) a partir de macrófagos humanos, células de melanoma y plasma de pacientes con melanoma. Los datos se expresan como medias +/-DE.
- B. Análisis de regresión de los niveles en plasma de exosomas CD63+ medidos en muestras de plasma sin fraccionar o purificadas tanto de pacientes (n=9, rombos negros) como de donantes sanos (n=4, rombos blancos). Los niveles de exosomas se expresan como DO450 x 1000.
- 45

Figura 6. Cuantificación de exosomas plasmáticos de pacientes con melanoma.

- 50 Los exosomas purificados a partir de plasma de pacientes con melanoma (MEL) y donantes sanos (DS) se cuantificaron mediante Exotest usando como antígenos de detección CD63 o proteínas de melanoma típicas tales como gp100 y MART-I. Los datos se expresan como medias ± DE. Los niveles de exosomas se expresan como DO450 x 1000.

55 Descripción detallada de las invenciones

- Los exosomas son microvesículas de un tamaño que oscila entre 30-120 nm, secretados activamente en el entorno extracelular por células tumorales así como normales. Dado el entendimiento creciente del papel de los exosomas en la progresión del cáncer y el hecho de que existe la necesidad creciente de encontrar nuevas curas, mejorar diagnósticos y seguir la malignidad y el crecimiento de los tumores, existe por consiguiente la necesidad de métodos y herramientas para detectar y medir exosomas en fluidos humanos. Debido a la posible participación de los exosomas en la promoción de la progresión de la enfermedad a través de una serie de efectos perjudiciales sobre el microentorno tumoral, la posibilidad de cuantificar exosomas en plasma humano o suero a través de un ensayo viable, específico y sensible está convirtiéndose en un asunto crucial. Si un ensayo de este tipo estuviera disponible, podría convertirse en una herramienta fundamental para evaluar el posible papel de estas microvesículas en el pronóstico del cáncer y como factor de pronóstico novedoso o marcador para detectar o monitorizar la enfermedad
- 60
- 65

neoplásica. Sin embargo, los métodos usados actualmente, por ejemplo MET y WB, no son cuantitativos o son sólo escasamente cuantitativos, por lo cual existe la clara necesidad de un método para detectar y medir exosomas cuantitativamente en fluidos humanos. Por tanto el objetivo de esta divulgación es proporcionar una nueva herramienta para los oncólogos clínicos para diagnosticar y seguir los estudios de pacientes con cáncer. Además, un objetivo de esta divulgación es proporcionar un método novedoso que va a usarse para diagnosticar otras enfermedades humanas, tales como enfermedades víricas o priónicas, en las que las partículas se transmiten en microvesículas.

La prueba cuantitativa novedosa que se da a conocer en el presente documento se basa en la detección mediada por ELISA de exosomas y es la primera prueba fiable, sensible y fácil para cuantificar exosomas. Las proteínas que se detectan mediante este método no son específicas de exosomas sino que se comparten exclusivamente con orgánulos citoplásmicos tales como endosomas y lisosomas, cuyas membranas no se reciclan como para estructuras de membrana plasmática. Esta característica excluye la posibilidad de detectar estas proteínas en residuos derivados de células tumorales necróticas, o en su forma soluble. El ensayo de esta divulgación incluye preferiblemente un marcador tumoral universal (caveolina-1) que permite la detección preferente de exosomas secretados por tumores. Una serie de estudios exhaustivos realizados mediante diferentes métodos comparativos (inmunotransferencia de tipo Western y citometría de flujo) y diferentes condiciones experimentales descritos a continuación en los ejemplos demuestran la fiabilidad de la prueba novedosa de esta divulgación.

Koga *et al.* (Anticancer Res. 25, 3703-3727, 2005) dan a conocer un método para capturar exosomas a partir de muestras purificadas con perlas recubiertas frente a Her2/Neu. Admyre *et al.* (J Allegrly Clim Imuunol 120, 1418-1423,200) dan a conocer un ensayo Elisa por el cual se inmovilizan los exosomas con un anticuerpo anti-MHUC-II y se detectan por medio de un conjugado de peroxidasa del rábano. El documento CA 2453198 da a conocer un ensayo ELISA basado en la captura de exosomas con anticuerpo anti-CMH-I y la detección con un anticuerpo anti-FAsL.

El método novedoso de esta divulgación se basa en una prueba ELISA de tipo sándwich que se denomina ExoTest, para capturar y cuantificar exosomas plasmáticos basándose en la expresión de proteínas de mantenimiento (CD63 y Rab-5) y el marcador caveolina-1 asociado a tumores. ExoTest usa un anticuerpo anti-Rab5 para capturar los exosomas presentes en preparaciones de exosomas purificadas. Como anticuerpo de detección, ExoTest usa un anticuerpo que reconoce o bien un antígeno de exosoma (CD63) o bien antígenos expresados por la fuente celular de exosomas como caveolina-1, una proteína asociada al comportamiento metastásico de tumores. En un primer conjunto de experimentos, se usó una preparación de exosomas a partir de medios de cultivo de líneas celulares tumorales humanas, comparando los resultados de ExoTest con los obtenidos mediante inmunotransferencia de tipo western y FACS. Los resultados mostraron que los antígenos de exosoma típicos eran detectables en preparaciones de exosomas usando los tres métodos. Sin embargo, ExoTest permitió un análisis cuantitativo de exosomas y un panel más amplio de proteínas en la misma preparación con cantidades más pequeñas de material de partida en comparación con el análisis de FACS o WB. Esta característica técnica es de importancia fundamental cuando el análisis se realiza en muestras de plasma. De hecho, el análisis de grupos de plasma de ratones SCID con injerto de células de carcinoma de colon o melanoma humano a menudo no era reproducible o al menos muy difícil cuando se usó WB mientras que ExoTest permitió un análisis cuantitativo de los niveles de exosomas en el plasma de ratones SCID con tumor humano. Un hallazgo importante y novedoso es que basándose en los resultados de ExoTest, los niveles de exosomas en el plasma se correlacionan significativamente con el tamaño del tumor y aumentaron con el tiempo tras el injerto. Además, los exosomas circulantes, junto con las proteínas típicas, presentaron marcadores tumorales expresados por los tumores humanos que crecen en los ratones (no mostrado). Por tanto, ExoTest, usando el CD63 como antígeno de detección pudo cuantificar exosomas en plasma de pacientes con melanoma y de sujetos sanos. Puesto que las células tumorales secretan una gran cantidad de exosomas, sorprendentemente no se encontró realmente una diferencia entre los niveles de exosomas positivos para CD63 en plasma de pacientes con melanoma y personas de control sanas. Con el objetivo de identificar posibles exosomas específicos de tumores, se realizó ExoTest usando caveolina-1 como antígeno de detección. Publicaciones recientes han notificado que los niveles en plasma de caveolina-1 circulante se correlacionan significativamente con adenocarcinoma de próstata metastásico. De manera interesante, la caveolina-1 se ha implicado en la patogénesis de la transformación celular oncogénica, tumorigénesis y metástasis. En primer lugar, se demostró mediante FACS y WB que la caveolina-1 está presente en exosomas derivados de tumores humanos, purificados a partir de plasma de ratones SCID con injerto de tumores y pacientes con tumores. Luego, usando ExoTest pudo observarse un aumento significativo en los niveles en plasma de exosomas positivos para caveolina-1 en pacientes con tumores en comparación con el plasma de individuos sanos, lo que sugiere que la caveolina-1 puede representar un marcador tumoral específico y que ExoTest es una prueba satisfactoria para cuantificar tal aumento.

Conjuntamente, los resultados muestran que un ExoTest que detecta exosomas funciona y es útil para la detección y cuantificación de exosomas circulantes en humanos. Además, la prueba ofrece una posibilidad de detectar diferentes proteínas en preparaciones de exosomas plasmáticos, con una posible aplicación para tipos específicos de pacientes con tumores. Esta divulgación también proporciona una herramienta de pronóstico/diagnóstico novedosa para pacientes con tumores que se basa en la cuantificación y caracterización de exosomas plasmáticos. Esto es particularmente relevante para pacientes con melanoma, porque los marcadores séricos fiables y sensibles son todavía limitados y los niveles de LDH (lactato deshidrogenasa) siguen siendo el único factor sérico de

pronóstico para la evaluación del transcurso de la enfermedad y el pronóstico.

La invención se describe en detalle a continuación. Los ejemplos y detalles experimentales se dan a conocer para proporcionar un entendimiento mejorado y una guía para los expertos en la técnica. El alcance de la invención se determina mediante las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo

EJEMPLO 1

1. Fuentes de exosomas

A. Sobrenadantes de cultivo celular

Se usaron dos tipos de líneas celulares tumorales humanas, es decir melanoma y carcinoma de colon. Mel 501 y Mel BS son dos líneas celulares de melanoma metastásicas obtenidas de lesiones de melanoma de pacientes, extirpados quirúrgicamente (Istituto Nazionale dei Tumori, Milán, Italia). Se usaron también dos líneas celulares de carcinoma colorrectal Colo206 (generadas a partir de metástasis de hígado de un paciente con cáncer colorrectal) y 1869 col (proporcionada por el Dr. Maccalli, Istituto Superiore di Sanita'). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 ug/ml (Gibco), glutamina 1 2 mM (Gibco) y suero de ternero fetal al 10% (FCS) (Invitrogen, Milán, Italia). Los macrófagos derivados de monocitos humanos (MDM) se obtuvieron a partir de las capas leucocitarias de la sangre de donantes sanos usando perlas magnéticas CD 14 (Milteny Biotec, Alemania) y GM-CSF (500 U/ml) durante 5 días en cultivo.

B. Plasma de ratón SCID con tumor humano

Se usaron ratones hembra CB.17 SCID/SCID (Harlan, S. Pietro al Natisone, Italia) de 4-5 semanas de edad y se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo según las directrices UKCCR. Los ratones SCID se alojaron en jaulas microaislantes y todo el alimento, agua y lechos se esterilizaron en autoclave antes de su uso. Se les inyectaron a los ratones por vía subcutánea en el costado derecho $2,5 \times 10^6$ células/ratón de células de melanoma humano o carcinoma de colon. Se midió el crecimiento tumoral mediante un calibre y se estimó el peso del tumor con la fórmula: peso del tumor (mg) = longitud (mm) x anchura² (mm)/2, tal como se describió previamente (Luciani L *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 2004). Se permitió que los tumores injertados crecieran hasta un peso de 500 mg y se recogieron 500 µl de plasma de ratones con injerto de tumor de diferentes animales sacrificados a diferentes puntos de tiempo durante el crecimiento tumoral.

C. Donantes humanos y plasma de pacientes con tumores

Se recogieron muestras de plasma humano de sangre completa tratada con EDTA de pacientes con melanoma metastásico o primario y de donantes sanos de sexo y edad coincidente. Se almacenaron las muestras a -70°C hasta su análisis.

2. Preparaciones *in vitro* e *in vivo* de exosomas

Se recogieron sobrenadantes de líneas celulares de carcinoma de colon y melanoma humano a partir de cultivos celulares confluentes de 72 h en frascos T-175 y se aislaron las microvesículas tal como se describió previamente (Andreola *et al.*, J. Exp. Med. 2002) con modificaciones menores. Brevemente, tras la centrifugación a 300 x g durante 10 minutos para sedimentar las células, se centrifugó el sobrenadante a 1.200 x g durante 20 minutos seguido de 10.000 x g durante 30 minutos. Se filtró el sobrenadante usando un filtro de 0,22 µm (Stericup™, Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, EE.UU.) y se centrifugaron luego a 100.000 g durante 1 h en una ultracentrifugadora Beckman (Beckman Coulter) con el fin de sedimentar los exosomas. Tras un lavado en un gran volumen de solución salina tamponada con fosfato (PBS), se suspendieron los exosomas en un pequeño volumen de PBS o en el tampón de lisis apropiado, y se almacenaron a -80°C para su análisis experimental adicional. Con el fin de obtener exosomas a partir de muestras de plasma, se centrifugó sangre heparinizada de ratones SCID con injerto de tumores humanos o de pacientes con tumores y donantes sanos a 400 x g durante 20 minutos. Se recogió entonces el plasma, se repartió en alícuotas y se almacenó a -70°C hasta su análisis. Se sometieron muestras de plasma al mismo procedimiento centrífugo descrito anteriormente para aislar exosomas usando un instrumento Beckman TL100 para ultracentrifugación de pequeños volúmenes.

3. Análisis por citometría de flujo de exosomas

La determinación de la expresión de antígeno en los exosomas se realizó mediante análisis por citometría de flujo en exosomas purificados unidos sobre perlas de látex. Se incubaron preparaciones de exosoma (5-10 µg) con 5 µl de perlas de látex de sulfato/aldehído de 4 µm de diámetro (Interfacial Dynamics, Portland, OR) y se resuspendieron en 400 µl de PBS que contenía FCS al 2%. Se incubaron las perlas recubiertas con exosomas (20 µl) con los siguientes

anticuerpos: anti-Rab5 (Santa Cruz), anti-CD63-FITC (Pharmigen), anti-CD81-PE (Pharmingen), anti-caveolina-1 (clon N-20, Santa Cruz) durante 30 minutos a 4°C, seguido, cuando sea necesario, de incubación con anticuerpo secundario conjugado con FITC o con PE y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences).

5 4. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de exosomas

10 Se lisaron los exosomas purificados en tampón de lisis que contenía Triton X-100 al 1%, SDS al 0,1%, Tris-HCl 0,1 M (pH 7) e inhibidores de proteasa (aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM) (Sigma). Se determinó la concentración de proteínas de exosomas mediante el método de microensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se resuspendieron un total de 50 µg de proteínas en tampón de muestra de SDS, se sometieron a ebullición durante 5 min, se separaron en gel de SDS-PAGE al 10% y se sometieron a electroinmunotransferencia en nitrocelulosa (Protran BA85, Schleicher y Schuell). Se sometieron las membranas a inmunotransferencia con anticuerpos frente a CD63 (diluido 1:50) y Rab-5b (diluido 1:50), se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con HRP apropiados (Amersham Pharmacia) y se visualizaron mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL, Pierce).

15 5. Desarrollo de una prueba ELISA para exosomas (ExoTest)

20 La prueba de ELISA novedosa (ExoTest) según esta divulgación se basa en la presencia de proteínas específicas en los exosomas. Estas proteínas se comparten con orgánulos citoplásmicos tales como endosomas y lisosomas (Rab-5 y CD63, respectivamente), cuyas membranas no se desprenden o reciclan como para estructuras de membrana plasmática, excluyendo por tanto la posible presencia de estructuras que se derivan de rotura de la membrana.

25 Se recubrieron placas de noventa y seis pocillos (Nunc, Milán, Italia) con anticuerpo policlonal anti-Rab-5b (clon A-20 Santa Cruz) en un volumen de 100 µl/pocillo de tampón carbonato a pH 9,6 a la concentración final de 4 µg/ml y se incubaron durante la noche a 4°C. Tras 3 lavados con PBS, se añadieron 100 µl/pocillo de disolución de bloqueo (PBS que contenía BSA al 0,5%) y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras los tres lavados en PBS, se añadieron 50 µg de exosomas purificados (en un volumen final de 100 µl/pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C. Tras tres lavados con PBS, se diluyó el anticuerpo de detección apropiado (AcM anti-CD63 (clon H5C6 Pharmingen) o AcM anti-caveolina-1 (clon 2297, Pharmingen)) a 4 µg/ml en disolución de bloqueo y se incubaron 30 100 µl/pocillo durante 1 hora a 37°C. Tras tres lavados con PBS, se incubó la placa con 10QJ1 de anticuerpo secundario anti-peroxidasa de ratón conjugado con HRP (Pierce, Milán, Italia) diluido 1:50.000 en disolución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras los tres lavados finales con PBS, se reveló la reacción con 35 POD (Roche Applied Science, Milán, Italia), se bloqueó con H₂SO₄ 1 N y se registraron las densidades ópticas con un lector de ELISA usando un filtro de 450 nm (Biorad).

EJEMPLO 2

40 ExoTest proporciona una cuantificación de exosomas presentes en preparaciones de cultivos celulares y tiene una sensibilidad mayor para la detección de proteínas de exosomas que el análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

45 Se procesaron los sobrenadantes de cultivos de líneas celulares de melanoma y carcinoma de colon siguiendo el procedimiento convencional para obtener exosomas purificados tal como se describió anteriormente. Se realizó el ELISA tipo sándwich configurado para detectar exosomas (ExoTest, véase la figura 1A) en preparaciones de exosomas obtenidas a partir de sobrenadantes de cultivos celulares mediante centrifugación diferencial. ExoTest fue capaz de proporcionar una cuantificación de los exosomas presentes en los sobrenadantes de cultivos celulares, siendo los exosomas CD63+ detectables en una manera dependiente de la dosis (figura 1B). Los controles 50 negativos, representados por fracciones derivadas del sedimento obtenido tras la centrifugación a 10000 g, exosomas purificados a partir de medio de cultivo celular solo y por anticuerpos secundarios sólo dieron como resultado una densidad óptica apenas medible (DO= 0,07 +/- 0,01). Se calculó la variabilidad dentro y entre la prueba en seis réplicas de la misma preparación ejecutadas en tres placas diferentes y fueron del 30% y del 35%, respectivamente.

55 La inmunotransferencia de tipo western y el análisis de FACS de las mismas preparaciones de exosomas purificadas confirmaron los datos cualitativos obtenidos mediante ExoTest. De hecho, las proteínas Rab-5b, Lamp-1 y en una menor medida CD63 fueron detectables en las diversas preparaciones de exosomas ambas mediante WB en los lisados de exosoma (figura 1C) y tanto Rab-5b como CD63 se detectaron mediante FACS en exosomas unidos a 60 perlas de látex (figura 1D). Sin embargo, la detección y cuantificación de exosomas mediante ExoTest mostraron una sensibilidad mayor para la detección de proteína CD63 con respecto al análisis de WB (figura 1C). De hecho, mientras que se necesitaban al menos 12,5 µg de proteínas de exosomas para detectar apropiadamente o bien CD63 o bien Rab-5b mediante WB, ExoTest pudo detectar claramente los exosomas partiendo de una cantidad 65 mínima de 3 µg de preparaciones purificadas de exosomas.

EJEMPLO 3

Comparación de los resultados de calificación y cuantificación de una preparación *in vivo* de exosomas de ratones SCID con injerto de tumores humanos mediante FACS, WB y ExoTest.

5 Con el fin de verificar la posibilidad de detectar exosomas derivados de tumores humanos *in vivo* usando ExoTest, se realizaron en primer lugar experimentos en los que se inyectaron líneas celulares de carcinoma de colon y melanoma humano (Me501) por vía subcutánea en ratones SCID. En los primeros experimentos, se sometieron muestras de plasma obtenidas al sacrificar ratones SCID que llevaban tumores injertados (100-500 mg) al procedimiento de purificación de exosomas. En cuanto a los exosomas purificados a partir de sobrenadantes de cultivos celulares, los exosomas purificados a partir de plasma de ratones fueron también clara y específicamente detectables mediante ExoTest (figura 2A) y FACS (figura 2B). Las preparaciones de exosomas obtenidas a partir de plasma de ratones SCID de control (sin injerto de tumores humanos) dieron como resultado densidades ópticas de fondo comparables a las muestras de blanco ($DO = 0,08 \pm 0,03$), sugiriendo por tanto la ausencia de exosomas en los animales inmunodeprimidos o que los exosomas murinos no reaccionan de forma cruzada con CD63 y Rab-5b humanas. De nuevo ExoTest necesitó una cantidad significativamente más pequeña de preparaciones de exosomas para obtener resultados comparables a aquellos usando análisis de WB.

20 Tras demostrar que los exosomas humanos pueden recuperarse y detectarse mediante ExoTest, se realizaron experimentos de evolución temporal con el objetivo de evaluar si la cantidad de exosomas plasmáticos en ratones SCID con tumores humanos se correlacionaba con la carga tumoral. En estos experimentos, se dejó que los tumores de melanoma crecieran hasta cinco semanas tras el injerto temprano, y se purificaron los exosomas y se cuantificaron a partir de plasma de animales individuales empezando en el día 14 tras el injerto y durante las siguientes tres semanas. Los resultados mostraron que la cantidad de exosomas humanos detectados por ExoTest aumentaba con el tiempo en paralelo al aumento del tamaño del tumor (figura 2C); sugiriendo que la cuantificación de exosomas plasmáticos representa un método valioso para monitorizar el crecimiento tumoral. Se obtuvieron resultados similares con células MeBS (no mostrado).

EJEMPLO 4

30 Exosomas tumorales expresan caveolina-1

Puesto que se conoce que los exosomas representan una ruta específica e importante de comunicación intercelular, se razona que los exosomas derivados de tumores pueden diferir de los exosomas circulantes en condiciones fisiológicas normales. Recientemente, se ha notificado que los prostasomas (vesículas de membrana secretadas por células de cáncer de próstata) aislados de la línea celular PC-3 de carcinoma de próstata contienen la proteína caveolina-1, el componente principal de las caveolas. También se conoce que los niveles en suero de caveolina-1 son elevados en pacientes con cáncer de próstata en comparación con sujetos sanos (Tahir, 2003 #21). Sin embargo, no hay técnica anterior que sugiera la asociación de esta proteína con vesículas de membrana en la sangre. Por tanto, se evaluó la presencia de caveolina-1 en exosomas obtenidos a partir de plasma de ratones SCID con injerto de tumores de melanoma. Tal como se evidencia por los resultados de la figura 3A, la Cav1 se expresa fuertemente en exosomas secretados por células de melanoma humano *in vitro*, mientras que es indetectable tanto en extractos celulares como en exosomas de células humanas normales tales como por ejemplo macrófagos derivados de monocitos primarios (MDM). Estos resultados sugieren que Cav1 secretada en una forma incrustada en exosomas puede ser una característica específica de células de melanoma, representando por tanto un posible marcador para el análisis *ex vivo* de exosomas derivados de tumores. Se investigó por tanto la presencia de Cav1 en exosomas obtenidos a partir de plasma de ratones SCID con injerto de tumores de melanoma. Se detectó Cav 1 en preparaciones de exosomas derivados a partir de plasma de ratones SCID con injerto de tumores de melanoma mediante inmunotransferencia de tipo western (figura 3B), citometría de flujo (figura 3C) y ExoTest (figura 3D), mientras que Cav1 fue indetectable en exosomas derivados de plasma de animales de control (figuras 3B, 3D). De acuerdo con los resultados de pacientes con carcinoma colorrectal (CRC) y melanoma podrían usarse otros marcadores tumorales, tales como MelanA/Mart-1 para melanoma y CEA para CRC, para detectar la liberación *in vivo* de exosomas tumorales en ratones SCID que llevan tumores mediante ExoTest, con resultados comparables con aquellos obtenidos con Cav1. Sin embargo, puesto que el melanoma puede expresar una cantidad baja o heterogénea de MelanA/MART-1, especialmente a niveles metastásicos, y CEA está presente principalmente en forma soluble en el suero de pacientes con CRC, Cav1 es un marcador tumoral más fiable y reproducible. Por tanto, se desarrolla ExoTest con inclusión adicional de anticuerpos específicos anti-Cav1.

EJEMPLO 5

60 Cuantificación de una preparación de exosomas *in vivo* de plasma de pacientes con tumores mediante ExoTest: cantidad de exosomas en plasma como herramienta de pronóstico.

65 Los datos obtenidos en el modelo de ratón SCID con tumores humanos impulsaron a investigar si ExoTest permitía también la detección y caracterización de exosomas purificados a partir de plasma humano. Si la calificación era posible, se aspiraba a verificar si los pacientes con tumores pueden tener exosomas plasmáticos circulantes que

difieren en cantidad y/o calidad de aquellos presentes en plasma de donantes sanos. Se purificaron los exosomas a partir de plasma de pacientes con tumores (n=62) y donantes sanos (n= 37) y se sometieron luego a ExoTest y análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar la presencia de Rab5 y CD63. La cuantificación de exosomas basada en la expresión de CD63 y Cav1 mediante ExoTest se muestra en la tabla 1.

5 Tabla 1. Exosomas plasmáticos y niveles de LDH en la población de estudio. CD63+ y Cav1+ exo son exosomas plasmáticos expresados como DO450 x 1000. Los valores de LDH plasmática se expresan como IVfL. Los datos se muestran como media (IC del 95%)

	CD63+	Cav1+ exo	LDH
Pacientes con melanoma (n=62)	478 (de 390 a 566)	524 (de 458 a 590)	438 (de 321 a 555)
Donantes sanos (n= 37)	236 (de 188 a 285)	213 (de 180 a 246)	360 (de 240 a 480)

10 La prueba ExoTest permitió la detección de proteínas de exosomas en exosomas purificados en plasma tanto de pacientes con melanoma como de donantes sanos (figura 4A), con hasta 4 veces los niveles de exosomas en plasma de pacientes con melanoma en comparación con donantes sanos ($p < 0,001$). Con el fin de determinar la sensibilidad y especificidad de ExoTest basándose en la detección de los dos marcadores de proteínas de exosoma, se calculó el punto de corte (media +/- 2DE en muestras de donantes sanos) para exosomas plasmáticos que expresan tanto CD63 como Cav1, que fue de 526 y 411 (DO450 x 1000), respectivamente. ExoTest que detecta exosomas CD63+ mostró una baja sensibilidad (36%) y buena especificidad (97,3%) mientras que el ExoTest para exosomas Cav1+ tenía una mayor sensibilidad (62%) y similar especificidad (97,3%). En consonancia con esta observación, los niveles en plasma de exosomas Cav1 + fueron significativamente mayores que los niveles de exosomas CD63+ en pacientes con melanoma ($P=0,04$). Estos resultados sugieren que:

20 i) Cav1 circulante puede estar asociada a exosomas en pacientes con melanoma, y ii) la cuantificación de exosomas plasmáticos que llevan Cal puede considerarse un marcador tumoral útil.

25 Además, se encontró que la LDH plasmática no se correlacionaba con los exosomas plasmáticos CD63+ ni Cav1+ mientras que se observó una correlación significativa entre los exosomas plasmáticos CD63+ y Cav1+ (coeficiente de Spearman 0,25, $P=0,04$) (figura 4C). Además, ExoTest reveló la presencia de antígenos tumorales, tales como MART-1 o CEA en el plasma de pacientes con melanoma o carcinoma (figura 6).

30 La mayoría de los pacientes incluidos en el análisis (57/62) estaban afectados por enfermedad avanzada (estadios III-IV). Se detectó una amplia distribución de los niveles de exosomas plasmáticos mediante ExoTest en todos los estadios de la enfermedad, lo que sugiere que la variabilidad en la cantidad de exosomas presentes en la circulación periférica de diferentes pacientes pueden reflejar diversos niveles de agresividad tumoral y pueden por tanto convertirse en un factor de pronóstico independiente y novedoso para melanoma. Otros factores de pronóstico indicados por el American Joint Committee on Cancer (AJCC), incluyendo el grosor del melanoma primario y la ulceración, el número de ganglios linfáticos metastásicos, y los sitios y el número de metástasis distantes, también pueden correlacionarse con el contenido en suero de exosomas, tal como se sugiere por los resultados de esta divulgación.

40 EJEMPLO 6

Puede usarse plasma completo para la cuantificación de exosomas.

45 La posible aplicación de ExoTest para fines clínicos impulsó a verificar si podría usarse ExoTest para la detección de exosomas en fluidos biológicos sin fraccionar, lo que permitiría un análisis reproducible y fácil evitando las etapas de ultracentrifugación. Por tanto, se comparó la detección y cuantificación de exosomas CD63+ a partir de muestras sin fraccionar (sobrenadantes de cultivos celulares de macrófagos humanos y células de melanoma, y plasma humano) y exosomas purificados de las mismas muestras. Con el fin de aumentar la sensibilidad de la prueba, para estos experimentos específicos se incubó AcM conjugado con HRP durante 30 minutos en vez de 15 minutos. Tal como se muestra en la figura 5A, la presencia de exosomas a partir de macrófagos sin fraccionar y sobrenadantes de cultivo de melanoma y plasma de nueve pacientes con melanoma fue detectable mediante ExoTest. Además, se realizó el mismo análisis de plasma a partir de 4 donantes sanos y el análisis de regresión sobre el número total de muestras analizadas (9 pacientes + 4 donantes sanos) mostró una correlación significativa entre los dos tipos de medidas (figura 5B). Estos resultados sugieren la posible aplicación de ExoTest en entornos clínicos usando plasma completo y evitando los procedimientos de purificación de exosomas complejos y que consumen mucho tiempo.

55 **Referencias**

Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat Rev Immunol. Agosto de 2002; 2(8):569-79.

60 Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. Traffic. Mayo de

2002; 3(5):321-30.

Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao JY, Patel S, Hsu DH, Ruegg C, Le Pecq JB. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods*. Diciembre de 2002; 270(2):211-26.

5 Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem*. 28 de marzo de 2003; 278(13):10963-72.

10 Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, Hivroz C. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol*. 1 de abril de 2002; 168(7):3235-41.

15 Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell*. Diciembre de 1997; 8(12): 2631-45. van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*. Agosto de 2001; 121(2): 337-49. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing micro vesicles. *J Exp Med*. 2002; 195(10): 1303-1316.

20 Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M, Arancia G, Gentile M, Seregini E, Valenti R, Ballabio G, Belli F, Leo E, Parmiani G, Rivoltini L. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*. Junio de 2005; 128(7): 1796-804.

25 Chaput N, Scharz NE, Andre F, Zitvogel L. Exosomes for immunotherapy of cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 532:215-21. Taylor DD, Taylor CG, Jiang CG, Black PH. Characterization of plasma membrane shedding from murine melanoma cells. *Int J Cancer*. 15 de abril de 1988; 41(4): 629-35.

30 Taylor DD, Lyons KS, Gercel-Taylor C. Shed membrane fragment-associated markers for endometrial and ovarian cancers. *Gynecol Oncol*. Marzo de 2002; 84(3):443-8.

35 Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, Cassara D, Nagase H, Vittorelli ML. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res*. Septiembre-octubre de 1998; 18(5A): 3433-7.

40 Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, Gripenback S, Tornling G, Eklund A, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J*. Octubre de 2003; 22(4):578-83. Andre F, Scharz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, Pomel C, Lhomme C, Escudier B, Le Chevalier T, Tursz T, Amigorena S, Raposo G, Angevin E, Zitvogel L. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*. 27 de julio de 2002; 360(9329):295-305.

45 Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, Luidert TM, Willemsen R, Severijnen LA, van Meerbeeck JP, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Julio de 2004; 31(1):114-21.

Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*. Julio de 2005; 17(7):879-87.

50 Hegmans JP, Bard MP, Hemmes A, Luidert TM, Kleijmeer MJ, Prins JB, Zitvogel L, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am J Pathol*. Mayo de 2004; 164(5):1807-15.

55 Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux JF, Kobayashi T, Salles JP, Perret B, Bonnerot C, Record M. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J*. 15 de mayo de 2004; 380(Pt 1): 161-71. Clayton A, Turkes A, Dewitt S, Steadman R, Mason MD, Hallett MB. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J*. 2004 Apr de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*. 15 de diciembre de 2003; 102(13):4336-44. Mobius W, van Donselaar E, Ohno-Iwashita Y, Shimada Y, Heijnen HF, Slot JW, Geuze HJ. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic*. Abril de 2003; 4(4):222-31.

65 Scharz NE, Chaput N, Andre F, Zitvogel L. From the antigen-presenting cell to the antigen-presenting vesicle: the exosomes. *Curr Opin Mol Ther*. Agosto de 2002; 4(4):372-81. Chaput N, Taieb J, Scharz NE, Andre F, Angevin E, Zitvogel L. Exosome-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. Marzo de 2004; 53(3):234-9.

- Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JE. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem.* 26 de diciembre de 2003; 278(52):52347-54. *Blood.* 15 de diciembre de 2003; 102(13):4336-44. Flanagan J, Middeldorp J, Sculley T. Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *J Gen Virol.* Julio de 2003; 84(Pt 7):1871-9.
- 5 Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1 de marzo de 1996; 183(3):1161-72.
- Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med.* Mayo de 1998; 4(5):594-600.
- 10 Smith TJ, Weis JH. Mucosal T cells and mast cells share common adhesion receptors. *Immunol Today.* Febrero de 1996; 17(2):60-3. Revisión.
- 15 Lozupone F, Luciani F, Venditti M, Rivoltini L, Pupa S, Parmiani G, et al. Murine granulocytes control human tumor growth in SCID mice. *Int J Cancer.* 2000; 87:569-573.
- Lozupone F, Pende D, Burgio VL, Castelli C, Spada M, Venditti M, et al. Adoptive transfer of an anti-MART-127-35-specific CD8+ T cell clone leads to immunoselection of human melanoma antigen-loss variants in SCID mice. *Eur J. Immunol.* 2003; 33:556-566.
- 20 Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL, Satoh T, Li 20.L, Goltsov A, Ittmann M, Morrisett JD, Thompson TC. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res.* 15 de mayo de 2001; 61(10):3882-5.
- 25 Mouraviev V, Li L, Tahir SA, Yang G, Timme TM, Goltsov A, Ren C, Satoh T, Wheeler TM, Ittmann MM, Miles BJ, Amato RJ, Kadmon D, Thompson TC. The role of caveolin-1 in androgen insensitive prostate cancer. *J Urol.* Octubre de 2002; 168(4 Pt 1):1589-96.
- 30 D D Taylor and C Geijel-Taylor Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects *British Journal of Cancer* (2005) 92, 305311

REIVINDICACIONES

1. Método para cuantificar y calificar exosomas en muestras derivadas de células humanas o en fluidos corporales, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 a) capturar exosomas de la muestra derivada de células humanas o de fluidos corporales con un anticuerpo primario anti-Rab 5b;
- b) detectar los exosomas unidos con un anticuerpo de detección, uniéndose dicho anticuerpo de detección a un antígeno de exosoma;
- 10 c) permitir que un anticuerpo secundario unido a una enzima reaccione con el anticuerpo de detección;
- d) añadir sustrato; y
- 15 e) detectar la reacción.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de detección es anti-CD63 o anti-caveolina-1.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el método incluye una etapa de purificar una preparación de exosomas a partir de la muestra derivada de células humanas o fluido corporal, y la etapa a) se realiza con exosomas purificados.
4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el fluido corporal es una muestra de plasma humano, líquido ascítico, fluidos cerebrales, médula ósea, orina, heces o lavado broncoalveolar.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, en el que el volumen del fluido corporal usado es menor de 2 ml.
6. Método no invasivo para monitorizar el crecimiento del tumor, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 30 a) analizar periódicamente una muestra de fluido corporal de un paciente;
- b) capturar exosomas de la muestra de fluido corporal con un anticuerpo primario, siendo dicho anticuerpo primario anti-Rab-5b;
- 35 c) detectar los exosomas unidos con un anticuerpo de detección, siendo dicho anticuerpo de detección anti-CD63 o anti-caveolina-1;
- d) permitir que un anticuerpo secundario unido a una enzima reaccione con el anticuerpo de detección;
- 40 e) añadir sustrato;
- f) detectar la reacción; y
- 45 g) establecer una correlación entre la cantidad de exosomas detectados y el tamaño del tumor.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el método incluye la purificación de una preparación de exosomas a partir de la muestra de fluido corporal y la etapa c) se realiza con la preparación de exosomas purificada.
- 50 8. Método según la reivindicación 6, en el que la muestra de fluido corporal es una muestra de plasma.
9. Método según la reivindicación 6, en el que el tumor es un tumor de melanoma.
10. Método para diagnosticar un tumor, mediante la detección de exosomas que llevan caveolina-1 usando el método según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de detección es anti-caveolina-1.
- 55 11. Método según la reivindicación 10, en el que el tumor es un tumor de melanoma.
12. Kit de prueba para cuantificar y calificar exosomas en muestras derivadas de células humanas o en fluidos corporales, comprendiendo dicho kit:
- 60 a) una preparación de anticuerpo primario para capturar exosomas de las muestras derivadas de células, o el fluido corporal, siendo dicho anticuerpo primario anti-Rab 5b;
- 65 b) una preparación de anticuerpo de detección para detectar los exosomas unidos, siendo dicho anticuerpo de detección anti-CD63 o anti-caveolina-1;

- c) una preparación de anticuerpo secundario unido a una enzima para la reacción con el anticuerpo de detección; y
- d) un sustrato para la enzima.

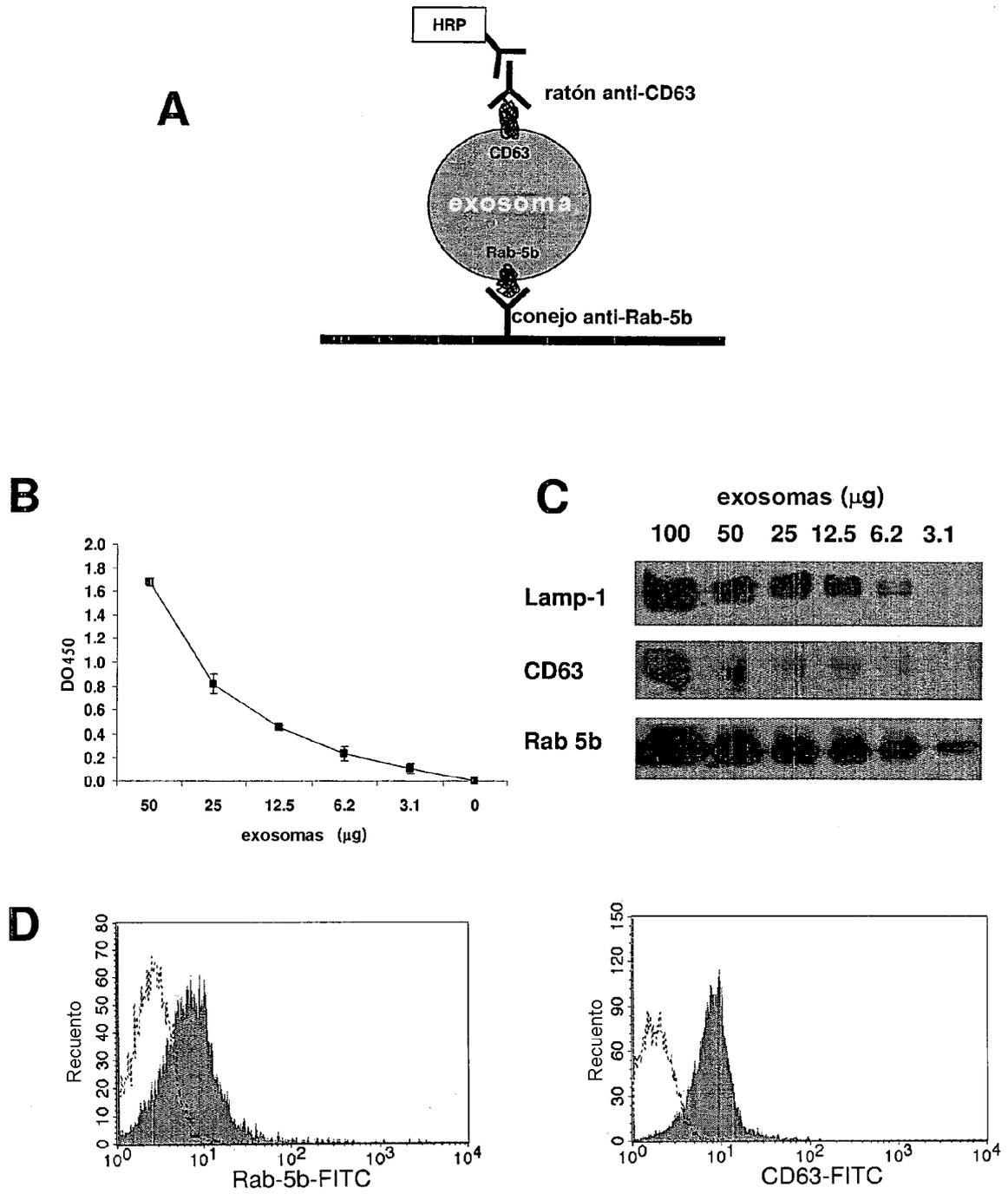


Fig 1

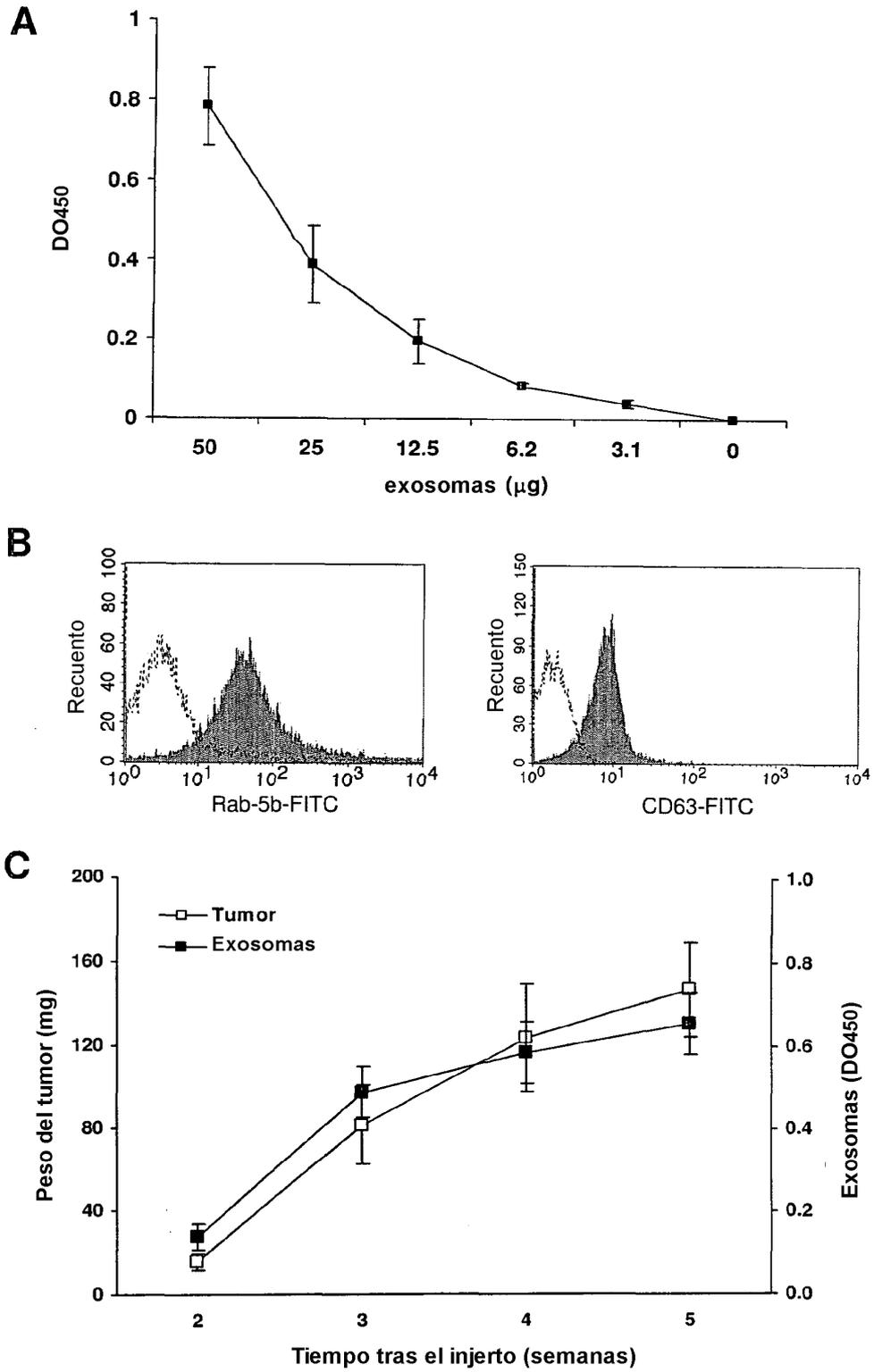


Fig 2

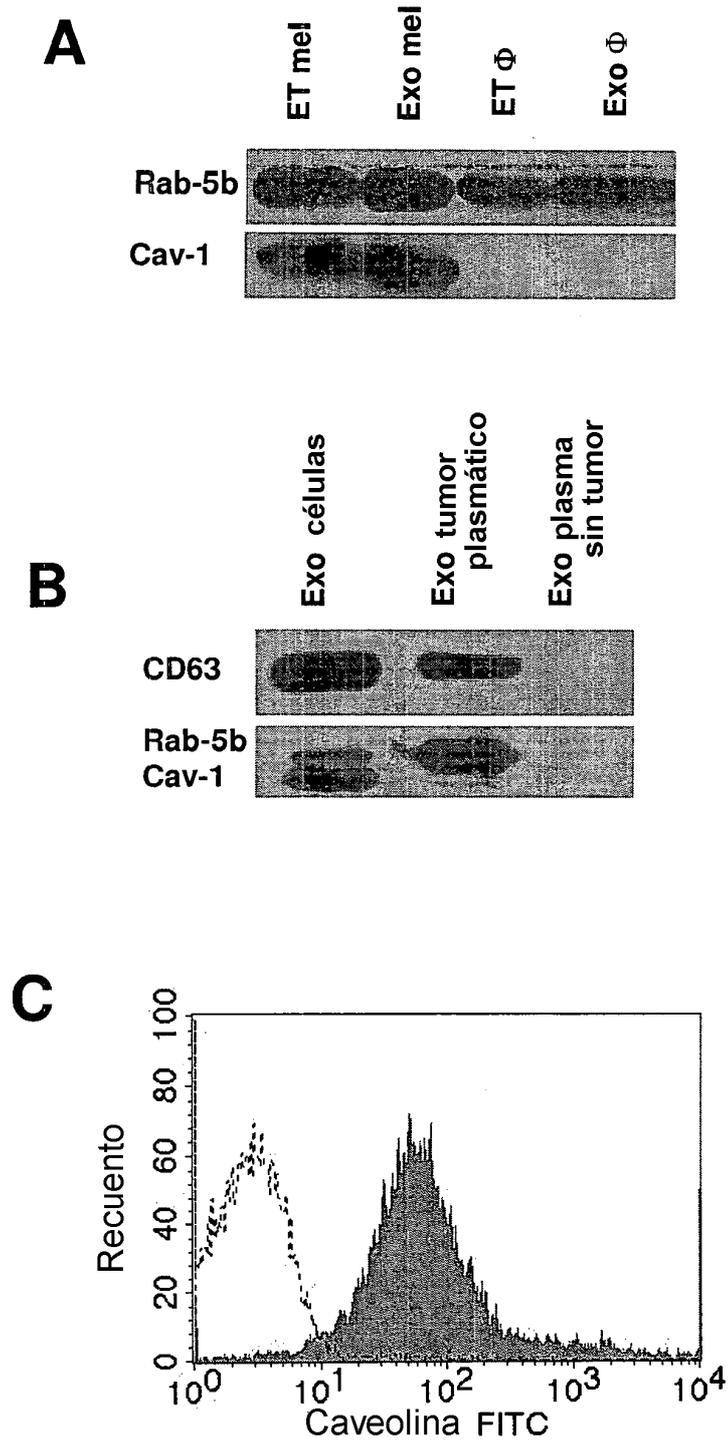


Fig 3

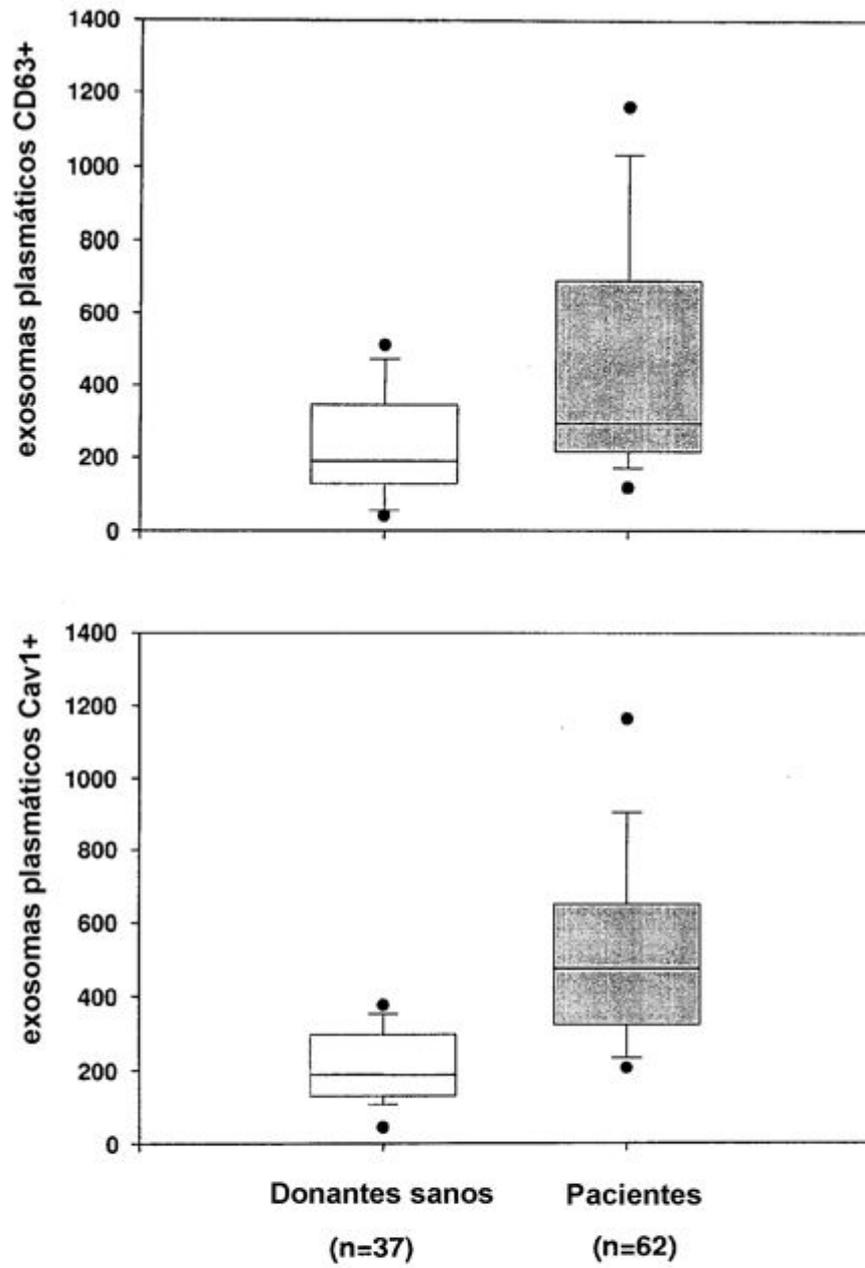
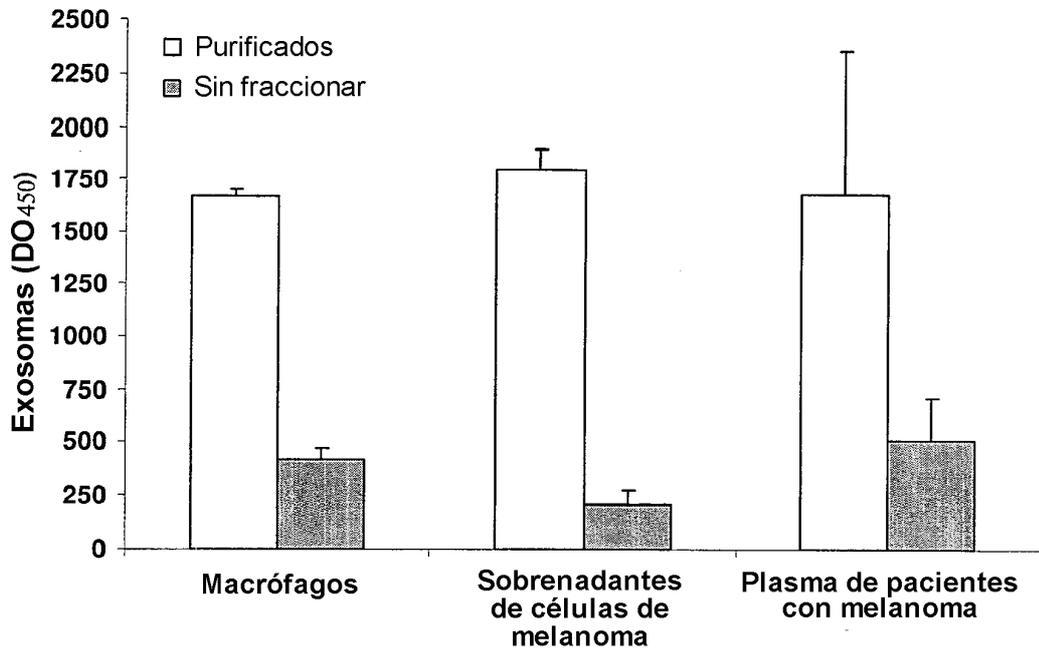


Fig 4

A



B

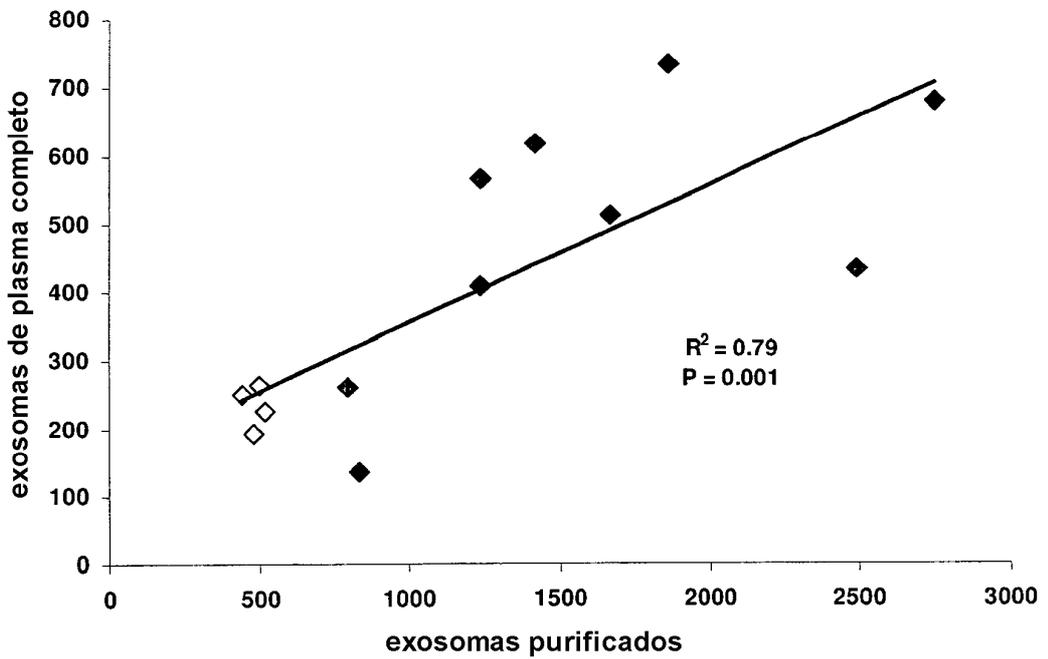


Fig 5

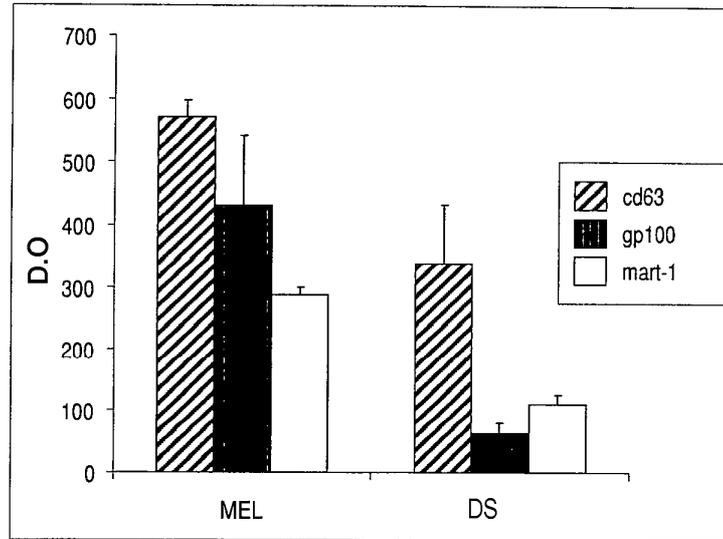


Fig 6