

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 284**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12Q 1/06** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2011 PCT/US2011/043265**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12006476**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2011 E 11804372 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2591359**

54 Título: **Métodos para cuantificar exosomas**

30 Prioridad:

**07.07.2010 US 362129 P**

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

**13.07.2017**

73 Titular/es:

**AETHLON MEDICAL INC (100.0%)  
9635 Granite Ridge Drive, Suite 100  
San Diego, CA 92123 , US**

72 Inventor/es:

**TULLIS, RICHARD, H. y  
DUFFIN, PAUL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 624 284 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

Métodos para cuantificar exosomas

5 Solicitudes relacionadas

Campo de la invención

10 Las realizaciones de la presente invención se refieren a métodos para cuantificar exosomas.

En particular, se proporcionan métodos que utilizan lectinas para cuantificar exosomas.

Antecedentes de la invención

15 Los exosomas incluyen pequeñas vesículas liberadas por células de mamífero para una serie de fines entre los que se incluye la inmunomodulación. Dependiendo de las afecciones, los exosomas pueden ser inmunoestimulantes o inmunosupresores. Durante el embarazo, los exosomas inhiben la producción de ciertas células T protegiendo de este modo el feto (Taylor, D.D., et al., Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. J Immunol, 2006. 176(3): 1534-42). En el caso de ciertas infecciones bacterianas, los exosomas derivados de células infectadas expresan fragmentos antigénicos de la bacteria para estimular el sistema inmunitario contra el patógeno (Bhatnagar, S., et al., Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. Blood, 2007. 110(9): 3234-44). Se ha postulado que los cánceres utilizan las propiedades inmunomoduladoras de los exosomas para eludir el sistema inmunitario (Taylor D.D. et al., (2005) Tumor-derived exosomes and their role in cancer associated T-cell signaling defects. Brit. J. of Cancer 92:305-311).

Mientras que cada vez existen más pruebas de la importancia de los exosomas en la progresión y el pronóstico de cánceres y enfermedades infecciosas tanto como medio de tratamiento como de diagnóstico, no existe actualmente ningún ensayo que detecte con precisión exosomas de varios tipos de células. Los exosomas se caracterizan y purifican actualmente mediante métodos tales como cromatografía de tamaño y ensayo de proteínas general. Los exosomas también pueden purificarse usando anticuerpos específicos para epítopos de exosomas particulares (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 20090220944). No obstante, los métodos que usan tales anticuerpos se limitan a los exosomas que muestran antígenos particulares únicamente. En vista de la creciente importancia de los exosomas en el diagnóstico y pronóstico de ciertas enfermedades, existe la necesidad de métodos simples y eficientes para cuantificar exosomas que sean aplicables de forma general a exosomas de una serie de tipos de células. El documento WO2010056337 desvela un método para determinar la característica bio-distintiva de los exosomas en una muestra, en la que la determinación de la característica bio-distintiva puede ser la cuantificación de exosomas aislados. El método comprende capturar exosomas usando un agente aglutinante, tal como una lectina.

40 Sumario de la invención

En su sentido más amplio la invención se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas que abarcan los siguientes aspectos:

- 45
1. Un método para cuantificar exosomas en una muestra que comprende: poner en contacto la muestra con lectina inmovilizada en un sustrato; poner en contacto exosomas unidos a la lectina con un agente de unión a exosomas detectable; y medir una señal del agente de unión a exosomas detectable unido, cuantificando de este modo los exosomas unidos; en los que se selecciona la lectina a partir del grupo que consiste en lectina de *Galanthus nivalis* (GNA), lectina de *Narcissus pseudonarcissus* (NPA), lectina de *Allium sativum* (ASA), lectina de *Lens culinaris* (LCH), lectina de *Sambucus nigra* (SNA), lectina de *Maackia amurensis* (MAL) y concanavalina A.
  2. El método de 1, que comprende adicionalmente comparar la señal del agente de unión detectable unido con una señal en una curva patrón.
  3. El método de uno cualquiera de 1-2, en el que los exosomas se derivan de una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula de cáncer de ovarios, una célula de melanoma, una célula de cáncer de colon y una célula infectada de tuberculosis.
  4. El método de uno cualquiera de 1-3, en el que el método proporciona una sensibilidad de detección de exosomas en la muestra que es de al menos  $1 \times 10^9$  exosomas/ml, preferentemente de al menos  $1 \times 10^8$  exosomas/ml o más preferentemente de al menos  $1 \times 10^7$  exosomas/ml.
  5. El método de uno cualquiera de 1-4, en el que la muestra comprende un exosoma que tiene un diámetro de 10 nm a 800 nm, o preferentemente un diámetro de 30 nm a 200 nm.
  6. El método de uno cualquiera de 1-5, en el que la muestra comprende exosomas aislados de un fluido mediante un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía de exclusión por tamaño, centrifugación de gradiente de densidad, centrifugación diferencial, ultrafiltración de nanomembranas, captura inmunoabsorbente, purificación de afinidad, separación de microfluidos y una combinación de los mismos.
  7. El método de uno cualquiera de 1-6, en el que al menos una de la lectina inmovilizada en el sustrato y el
- 65

agente de unión detectable son capaces de unirse a exosomas derivados de una pluralidad de tipos de células.

8. El método de uno cualquiera de 1-7, en el que el agente de unión a exosomas detectable se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una lectina seleccionada del grupo que consiste en lectina de *Galanthus nivalis* (GNA), lectina de *Narcissus pseudonarcissus* (NPA), lectina de *Allium sativum* (ASA), lectina de *Lens culinaris* (LCH), lectina de *Sambucus nigra* (SNA), lectina de *Maackia amurensis* (MAL) y concanavalina A; y opcionalmente en el que el agente de unión a exosomas detectable comprende un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una enzima, un agente quimioluminiscente, un agente fluorescente y un isótopo.

9. El método de uno cualquiera de 1-8, en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, suero, plasma, ascitis, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), esputo, saliva, médula ósea, líquido sinovial, humor acuoso, líquido amniótico, cerumen, leche materna, líquido de lavado broncoalveolar, semen, líquido prostático, líquido de Cowper o líquido preeyaculador, eyaculación femenina, sudor, materia fecal, pelo, lágrimas, líquido de quiste, líquido pleural o líquido peritoneal, líquido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bilis, líquido intersticial, menstruación, pus, sebo, vómito, secreciones vaginales, secreción mucosa, agua de heces, jugo pancreático, líquidos de lavado de cavidades nasales, aspirados broncopulmonares, líquido de cavidad de blastocisto, sangre de cordón umbilical y líquido ascítico.

10. El método de uno cualquiera de 1-9, en el que el sustrato comprende una placa multipocillo que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en sefarosa, látex, vidrio, poliestireno, polivinilo, nitrocelulosa y silicio.

#### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una representación de absorbancia a 450 nm frente a la concentración de manano medida mediante una realización de un ensayo de la presente invención.

La FIG. 2 es una representación de absorbancia a 450 nm frente a la concentración de perlas de látex recubiertas con manano medidas mediante una realización de un ensayo de la presente invención.

La FIG. 3 ilustra una curva patrón de manano y una preparación purificada de exosomas medida mediante una realización de un ensayo de la presente invención.

La FIG. 4 ilustra una dilución de una muestra de exosoma medida mediante una realización de un ensayo de la presente invención. Las FIG. 5A y 5B ilustran un experimento de optimización de manano (FIG. 5A) y una perla de látex recubierta con manano (FIG. 5B) en el que se incubaron cantidades conocidas de manano y perlas de manano en pocillos de placa de 96 pocillos que se recubrieron con diferentes cantidades de GNA (10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml y 1,25 µg/ml).

La FIG. 6 ilustra una curva patrón de perla de manano medida mediante una realización de un ensayo de la presente invención. La FIG. 7 ilustra un gráfico de cantidades de exosomas presentes en una muestra purificada de gradiente de sacarosa o una muestra purificada de una columna de GNA, relativa a una curva patrón de manano medida mediante una realización de un ensayo de la presente invención.

La FIG. 8 ilustra un gráfico de exosomas de cáncer de ovarios detectado usando un anticuerpo anti-PLAP en una realización de un ensayo de la presente invención.

#### Descripción detallada

Las realizaciones de la presente invención se refieren a métodos que utilizan lectinas para cuantificar exosomas. Lectinas tales como la concanavalina A y la lectina de *Galanthus Nivalis* (GNA) se unen específicamente a células cancerosas indicando que estas células contienen restos de azúcar poco habituales en células sanas. Exosomas específicos de cáncer secretados a partir de estas células tienen los mismos restos y son, por tanto, capaces de ser capturados por la lectina y detectados.

Ensayos tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) son una herramienta poderosa que se ha usado durante las últimas 4 décadas para detectar proteínas en muestras homogéneas y heterogéneas, generalmente mediante la adsorción de un anticuerpo específico de antígeno a una superficie sólida tal como una placa de plástico de 96 pocillos, incubando el antígeno con el anticuerpo adsorbido y detectando el antígeno con un anticuerpo secundario marcado con diversos compuestos químicos que reaccionan para proporcionar color, fluorescencia u otros medios de detección.

No obstante, el uso de ELISA para la detección de exosomas requiere un anticuerpo que sea específico para un antígeno de superficie en el exosoma que no está presente en células normales. El desarrollo de anticuerpos para su uso con un ensayo de ELISA puede ser difícil y laborioso. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos y composiciones que capturen y/o detecten exosomas de forma específica y precisa, preferentemente de una forma cuantitativa.

Más allá de los potenciales beneficios terapéuticos de eliminar exosomas inmunosupresores de la circulación, los investigadores reconocen que los exosomas representan un diagnóstico de interés importante para determinar la progresión y pronóstico de tanto cánceres como afecciones de enfermedades infecciosas. No obstante, la disponibilidad de ensayos funcionales que detecten específicamente exosomas es limitada. Actualmente, los exosomas se caracterizan y purifican generalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño y ensayo de

proteínas general, no mediante estructuras químicas específicas para el exosoma. Entre algunas de las realizaciones de la presente tecnología se incluyen los ensayos de lectina específica ligada a enzimas (ELLSA) diseñados para unirse específicamente a estructuras de carbohidratos comunes a exosomas, pero no a componentes celulares humanos sanos. En algunas de tales realizaciones, cada placa ELLSA permite hasta 96 pruebas de detección de exosomas. Es posible realizar análisis adicionales de los exosomas capturados a través de la detección de moléculas tales como anticuerpos unidos a un biomarcador específico en el exosoma.

El Hemopurifier® es un dispositivo médico que dirige de forma selectiva la retirada de virus infecciosos y proteínas inmunosupresoras de todo el sistema circulatorio (véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 7226429). Se ha descubierto que dispositivos tales como el Hemopurifier® capturan exosomas secretados por tumores que suprimen el sistema inmunitario de aquellos que padecen cáncer (véase, *por ejemplo*, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 20090304677). Anterior a este descubrimiento, no existía en los tratamientos oncológicos una estrategia terapéutica para inhibir directamente o revertir la destrucción de inmunosupresores causada por exosomas. Al eliminar este mecanismo, el Hemopurifier® puede suplir una necesidad clínica insatisfecha y proporcionar los beneficios de una terapia basada en la inmunidad sin añadir toxicidad farmacológica o riesgos de interacción con estrategias de tratamiento establecidas o que estén surgiendo.

En algunas realizaciones, el Hemopurifier® es un dispositivo de filtración selectivo que contiene agentes de afinidad que se unen fuertemente a estructuras altas en manosa únicas a la superficie de exosomas producidos por cáncer y glucoproteínas que residen en la envuelta de virus. Los agentes pueden incluir algunos biomarcadores (véase, *por ejemplo*, la Publicación de Patente Internacional n.º WO 2010/065765). Estos agentes se inmovilizan sobre aproximadamente 2800 fibras huecas porosas que abarcan la longitud interna del dispositivo. El diseño resultante aumenta la capacidad de separar tanto los exosomas como los objetivos virales de las células sanguíneas de forma que pueden retirarse de forma selectiva y permanente del sistema circulatorio. En algunas aplicaciones, la circulación sanguínea se establece en el Hemopurifier® a través de un catéter u otro dispositivo para acceder a la sangre. Una vez se ha establecido el flujo sanguíneo, el beneficio del tratamiento es inmediato ya que todo el sistema circulatorio puede pasar a través del Hemopurifier®, en algunas realizaciones, en tan solo 15 minutos. No obstante, persiste la necesidad de medir la concentración de exosomas en muestras de pacientes para calibrar la efectividad del tratamiento con el Hemopurifier®. Las realizaciones de la presente invención satisfacen esta necesidad proporcionando métodos para cuantificar un amplio espectro de exosomas en muestras.

#### Muestras biológicas

Algunas realizaciones de los métodos y composiciones que se proporcionan en el presente documento incluyen una muestra biológica. Las muestras biológicas incluyen, *por ejemplo*, medio de cultivo celular y muestras obtenidas de un voluntario. Tal como se usa en el presente documento, el término "voluntario" incluye un animal, un mamífero y un ser humano. Una muestra obtenida de un voluntario puede incluir cualquier tejido o fluido del voluntario que pueda contener exosomas. Entre los ejemplos de muestra biológicas obtenidas de un voluntario que pueden contener exosomas se incluye sangre periférica, sueros, plasma, ascitis, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), esputo, saliva, médula ósea, líquido sinovial, humor acuoso, líquido amniótico, cerumen, leche materna, líquido de lavado broncoalveolar, semen (incluyendo líquido prostático), líquido de Cowper o líquido preeyaculador, eyaculación femenina, sudor, materia fecal, pelo, lágrimas, líquido de quiste, líquido pleural o líquido peritoneal, líquido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bilis, líquido intersticial, menstruación, pus, sebo, vómito, secreciones vaginales, secreción mucosa, agua de heces, jugo pancreático, líquidos de lavado de cavidades nasales, aspirados broncopulmonares u otros líquidos de lavado. Una muestra biológica también puede incluir la cavidad de blastocisto, sangre del cordón umbilical o circulación materna que puede ser de origen fetal o materno. La muestra biológica también puede ser una muestra de tejido o biopsia, de las que se pueden obtener exosomas. *Por ejemplo*, si la muestra es una muestra sólida, pueden cultivarse las células de la muestra e inducirse el producto de exosoma. En algunas realizaciones, la muestra es líquido ascítico de un voluntario, *por ejemplo*, Líquido ascítico de un voluntario humano con cáncer de ovarios; medio de cultivo celular sobrenadante de una línea celular de melanoma primario humano; medio de cultivo celular sobrenadante de una línea celular de cáncer de colon primario humano; o macrófago murino, *por ejemplo*, macrófago murino infectado con tuberculosis.

#### Exosomas

Algunas realizaciones de los métodos y composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen una muestra que comprende exosomas. En general, los exosomas son pequeñas vesículas que se liberan en el medio extracelular de una variedad de diferentes células, *por ejemplo*, células que se originan o derivan del ectodermo, endodermo o mesodermo incluyendo cualquiera de tales células que se hayan sometido a variaciones o alteraciones genéticas, ambientales y/o de otro tipo. Un exosoma se crea típicamente de forma intracelular cuando un segmento de la membrana celular invagina de forma espontánea y se exocita en última instancia (véase, *por ejemplo*, Keller et al. (2006), Immunol. Lett. 107: 102-8). En algunas realizaciones, los exosomas tienen un diámetro superior a aproximadamente 10 nm, 20 nm o 30 nm; un diámetro de, o aproximadamente de, 30 -1000 nm, 30 -800 nm, 30-200 o 30-100 nm. En algunas realizaciones, los exosomas tienen un diámetro inferior a, o inferior a aproximadamente, 10.000 nm, 1000 nm, 800 nm, 500 nm, 200 nm, 100 nm o 50 nm. Los exosomas también pueden denominarse microvesículas, nanovesículas, vesículas, dexosomas, ampolla, ampollita, prostasomas, micropartículas, vesículas

intraluminales, vesículas endosómicas o vesículas exocitadas. Los exosomas también pueden incluir cualquier partícula unida a membrana separada que viene derivada de la membrana plasmática o de una membrana interna. Los exosomas también pueden incluir estructuras derivadas de células unidas mediante una membrana de bicapa lipídica que surge de tanto la separación de evaginación herniada como del sellado de porciones de la membrana plasmática o de la exportación de cualquier estructura vesicular unida a membrana intracelular que contiene diversas proteínas asociadas con la membrana de origen tumoral, entre las que se incluyen moléculas unidas a la superficie derivadas de la circulación hospedadora que se unen de forma selectiva a las proteínas derivadas del tumor junto con moléculas contenidas en el lumen del exosoma que incluyen microARN derivados del tumor o proteínas intracelulares.

Los exosomas también pueden incluir fragmentos de membrana.

En algunas realizaciones, los exosomas son exosomas cancerígenos. Los exosomas cancerígenos incluyen exosomas de células cancerosas y/o células tumorales (primarias o cultivo celular) de cánceres tales como cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer de colon, pólipo hiperplásico, adenoma, cáncer colorrectal, displasia de grado alto, displasia de bajo grado, hiperplasia prostática, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer cerebral (tal como glioblastoma), malignidad hematológica, hepatocarcinoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), carcinoma de células renales (RCC) o cáncer gástrico. El cáncer colorrectal incluye CRC en estadio B de Dukes o en estadio C-D de Dukes. La malignidad hematológica incluye leucemia linfática crónica de células B, linfoma LDCBG de células B, linfoma LDCBG de células B centrogerminales, linfoma LDCBG de células B activadas y linfoma de Burkitt. Los exosomas cancerígenos también pueden derivar de una afección premaligna, por ejemplo, pero sin limitación, el esófago de Barrett. En algunas realizaciones, los exosomas cancerígenos incluyen exosomas de cáncer de ovarios, cáncer de colon y melanoma.

#### Aislamiento de exosomas

Algunas realizaciones de los métodos y composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen aislar exosomas a partir de una muestra. Tal como se usa en el presente documento, el término "aislamiento" se refiere a aumentar la concentración o densidad de exosomas en una muestra y, o, retirar sustancias no exosómicas (por ejemplo, proteínas, células) a partir de una muestra. Se conocen bien en la técnica métodos de aislamiento de exosomas. Los ejemplos de métodos útiles para aislar exosomas incluyen, pero sin limitación, cromatografía de exclusión por tamaño, centrifugación de gradiente de densidad, centrifugación diferencial, ultrafiltración de nanomembranas, captura inmunoabsorbente, purificación de afinidad, separación de microfluidos o combinaciones de los mismos. Puede usarse cromatografía de exclusión por tamaño, tal como columnas de permeación de gel, centrifugación o centrifugación de gradiente de densidad y métodos de filtración. Por ejemplo, pueden aislarse exosomas mediante centrifugación diferencial, intercambio aniónico y/o cromatografía por permeación en gel (por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n° 6.899.863 y n° 6.812.023), gradientes de densidad de sacarosa, electroforesis de orgánulos (por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.198.923), separación de células activadas por magnetismo (MACS), o con un concentrador de ultrafiltración de nanomembranas. Pueden usarse diversas combinaciones de métodos de aislamiento o concentración.

#### Sustratos

Algunas realizaciones de los métodos y composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen un sustrato. En algunas realizaciones el sustrato puede comprender una superficie. Los sustratos pueden incluir, pero sin limitación, por ejemplo, placas, perlas y fibras. En algunas realizaciones, un sustrato comprende una placa multipocillo, tal como una placa de 96 pocillos convencional. Un sustrato puede comprender cualquier material adecuado. Los ejemplos de materiales adecuados incluyen, pero sin limitación, seferosa, látex, vidrio, poliestireno, polivinilo, nitrocelulosa y silicio.

#### Agentes de unión a exosomas

Las lectinas usadas para esta invención se seleccionan del grupo que consiste en lectina de *Galanthus nivalis* (GNA), lectina de *Narcissus pseudonarcissus* (NPA), lectina de *Allium sativum* (ASA), lectina de *Lens culinaris* (LCH), lectina de *Sambucus nigra* (SNA), lectina de *Maackia amurensis* (MAL) y concanavalina A. En algunas realizaciones, la lectina es GNA, NPA, SNA o MAL. En realizaciones particulares, la lectina es GNA.

#### Restos detectables

Algunas realizaciones de los métodos y composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen un agente de unión a exosomas o un agente de unión secundario que comprende un resto detectable. Entre los ejemplos de restos detectables se incluyen, pero sin limitación enzimas, tal como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP),  $\beta$ -galactosidasa y ureasa. Puede usarse un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, por ejemplo, con el sustrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB), que da un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Otros sistemas enzimáticos convenientes incluyen,

por ejemplo, el sistema de detección de fosfatasa alcalina, que puede usarse con el sustrato cromogénico fosfato de p-nitrofenilo para dar un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. De forma análoga, puede usarse un sistema de detección de  $\beta$  - galactosidasa con el sustrato cromogénico orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ON-PG) para dar un producto soluble detectable a 410 nm o puede usarse un sistema de detección de ureasa con un sustrato tal como urea- púrpura de bromocresol (Sigma Immunochemicals, San Luis, Mo.).

Más ejemplos de restos detectables incluyen, pero sin limitación, marcadores quimioluminiscentes. Se conocen en la técnica métodos de detección de marcadores quimioluminiscentes. La detección fluorescente también puede ser útil en ciertos métodos que se proporcionan en el presente documento. Los ejemplos de fluorocromos incluyen, pero sin limitación, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y lisamina. Anticuerpos marcados con fluoresceína o rodamina, o anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína o rodamina pueden ser útiles con realizaciones que se proporcionan en el presente documento. Un ejemplo de anticuerpo secundario incluye un anticuerpo de anti-GNA. También pueden ser útiles isótopos en ciertos métodos proporcionados en el presente documento. Tales restos y ensayos se conocen bien en la técnica.

Puede analizarse una señal a partir de un resto detectable, por ejemplo, usando un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico; un contador de radiación para detectar la radiación, tal como un contador gamma para la detección de  $^{125}\text{I}$ ; o un fluorímetro para detectar la fluorescencia en presencia de luz de una cierta longitud de onda. Cuando se usa un ensayo enzimático, puede realizarse un análisis de la cantidad de un biomarcador utilizando un espectrofotómetro, tal como un Lector de Microplacas EMAX (Molecular Devices; Menlo Park, Calif.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si se desea, los ensayos de la invención pueden automatizarse o realizarse de manera robótica y la señal de múltiples muestras puede detectarse simultáneamente.

#### Métodos para cuantificar exosomas

Realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento incluyen cuantificar exosomas en una muestra biológica. Exosomas unidos a una lectina inmovilizada en un sustrato se detectan y/o cuantifican usando un agente de unión a exosomas detectable que incluye lectina, un anticuerpo de unión a exosoma, o fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el agente de unión a exosomas detectable se detecta usando un agente de unión secundario que se marca con un resto detectable. Por ejemplo, un anticuerpo secundario que reconoce el agente de unión a exosomas detectable.

Se pone en contacto una muestra biológica que comprende exosomas con un sustrato que tiene una superficie con lectina inmovilizada en la misma. La muestra biológica se incuba con la lectina inmovilizada, y los exosomas se unen a la lectina inmovilizada. La muestra biológica no unida se lava de la superficie. Los exosomas unidos se detectan y miden usando un agente de unión a exosomas, por ejemplo, un agente que comprende una lectina marcada, o un anticuerpo marcado o un fragmento marcado del mismo. Detectar y medir incluye poner en contacto los exosomas unidos con el agente de unión a exosomas detectable; incubar el agente con los exosomas unidos; y lavar el agente no unido de los exosomas unidos a la lectina inmovilizada en el sustrato. Puede medirse la señal del agente de unión a exosomas detectable unido (de forma opcional poniendo en contacto el agente de unión a exosomas con un agente de unión marcado secundario) y el nivel de la señal puede usarse para determinar la cantidad de exosomas unidos a la lectina inmovilizada en el sustrato. Métodos para determinar la cantidad de exosomas unidos usando una señal medida pueden incluir comparar el nivel de la señal con una referencia, tal como una curva patrón. Una curva patrón de ejemplo incluye una curva que se ha preparado usando un control con diversas cantidades de un compuesto de unión a lectina, tal como manano o perlas recubiertas con manano. En algunas realizaciones, el método incluye de forma opcional aislar exosomas en una muestra antes de poner en contacto la muestra con lectina inmovilizada a un sustrato. Métodos para aislar exosomas son bien conocidos en la técnica y también se proporcionan ejemplos en el presente documento.

Un agente de unión a exosomas unido a un exosoma puede detectarse y medirse mediante una diversidad de métodos. Preferentemente, el agente de unión a exosomas comprende un resto detectable. El resto detectable puede detectarse y medirse usando métodos bien conocidos en la técnica; ejemplos de tales métodos se proporcionan en el presente documento. En algunas realizaciones, la señal del resto detectable puede compararse con una señal de una referencia, por ejemplo, una curva patrón. Usando tales métodos bien conocidos, puede determinarse la cantidad relativa de resto detectable unido. Por consiguiente, puede determinarse la cantidad relativa de exosomas unidos mediante el resto de unión de exosomas que comprende el resto detectable.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la sensibilidad del método de detección de exosomas en una muestra es, es alrededor de, es al menos de, o es al menos alrededor de,  $1 \times 10^{10}$  exosomas/ml,  $1 \times 10^9$  exosomas/ml,  $1 \times 10^8$  exosomas/ml,  $1 \times 10^7$  exosomas/ml, o  $1 \times 10^6$  exosomas/ml, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los anteriores valores. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la sensibilidad de detección de exosomas es relativa a una referencia, por ejemplo, perlas recubiertas con manano. En dichas realizaciones, la sensibilidad de detección de exosomas en una muestra es equivalente a, es equivalente a alrededor de, es equivalente al menos a, o es equivalente al menos alrededor de,  $1 \times 10^{10}$  perlas/ml,  $1 \times 10^9$  perlas/ml,  $1 \times 10^8$  perlas/ml,  $1 \times 10^7$  perlas/ml, o  $1 \times 10^6$  perlas/ml, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los anteriores valores. En algunas realizaciones, la sensibilidad de

detección de exosomas en una muestra es, es alrededor de, es al menos de, o es al menos alrededor de, el equivalente de 1000 ng de manano/ml, 500 ng de manano/ml, 100 ng de manano/ml, 50 ng de manano/ml, 1000 pg de manano/ml, 500 pg de manano/ml, 100 pg de manano/ml, o 50 pg de manano/ml, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los anteriores valores.

5

## Ejemplos

### Ejemplo 1- Preparación de un sustrato recubierto con lectina

10 Una placa de 96 pocillos recubierta con lectina se preparó añadiendo 100 µl de lectina 10 µg/ml de *Galanthus nivalis* (GNA) a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de GNA se retiró de los pocillos. La lectina inmovilizada se bloqueó con 200 µl de BSA 1 % + Tween 20 0,1 % en una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (dPBS) 1 x durante 1 hora a temperatura ambiente.

### 15 Ejemplo 2- Cuantificación de unión de manano en un sustrato recubierto con lectina

Para generar una curva patrón de manano, se incubaron 100 µl por pocillo de una solución de manano en cada pocillo en una placa preparada como en el ejemplo 1 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se usaron soluciones que contenían 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25ng/ml, 3,125 ng/ml y 1,5625 ng/ml de manano en dPBS 1 X, y un blanco sin manano (dPBS solo), para crear la curva patrón. La solución de manano se lavó de la placa x1 con 300 µl de Tween 20 0,1 % en dPBS (solución de lavado) y se detectó manano unido mediante incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µl de GNA marcado (1 µg/ml) con peroxidasa de rábano picante (HRP). La placa se lavó x 4 con una solución de lavado y se detectó con 100 µl de tetrametilbencidina (TMB) (SIGMA-Aldrich). La TMB se incubó hasta 30 minutos o hasta que se vio color en el blanco. La reacción de HRP de TMB se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 1 M. El color amarillo resultante se midió en un lector de placa a 450 nm de longitud de onda. La curva patrón resultante se muestra en la FIG.1.

### 20 Ejemplo 3- Cuantificación de perlas de manano en un sustrato de lectina

30 Se prepararon perlas recubiertas con manano mediante la incubación de manano a 1 mg/ml con perlas de látex fluorescente 1e14 (100 nm de diámetro), que recubre las perlas de tal modo que pueden capturarse por un GNA. Para preparar una curva patrón, las perlas recubiertas con manano se incubaron en una placa que se preparó como en el ejemplo 1. 100 µl de las perlas de manano se incubaron en la placa durante 1 hora a temperatura ambiente a 1e10 perlas/ml, 5e09 perlas/ml, 2,5e09 perlas/ml, 1,25e09 perlas/ml, 6,25e08 perlas/ml, 3,125e08 perlas/ml, y 1,56e08 perlas/ml, 7,81e07 perlas/ml, 3,91e07 perlas/ml, 1,95e07 perlas/ml, 9,77e06 perlas/ml en 1X dPBS, y un blanco sin perlas de manano (dPBS solo), para crear una curva patrón, parte de esta curva patrón se muestra en la FIG. 2. La solución de perla de manano se lavó de la placa x 1 con 300 µl de Tween 20 0,1 % en dPBS (solución de lavado) y se detectaron perlas de manano unidas mediante incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µl de GNA marcado (1 µg/ml) con HRP. La placa se lavó x 4 con solución de lavado y se detectó con 100 µl de TMB. La TMB se incubó hasta 30 minutos o hasta que se vio color en el blanco. La reacción de HRP de TMB se detuvo con de ácido sulfúrico 1 M. El color amarillo resultante se midió en un lector de placa a 450 nm de longitud de onda.

### 40 Ejemplo 4- Cuantificación de exosomas celulares de cáncer de ovarios

45 Se obtuvo y trató una muestra de exosoma de células de cáncer de ovarios de acuerdo con los métodos de los ejemplos 2 y 3 usando placas preparadas como en el ejemplo 1. La señal generada a partir de los exosomas de cáncer de ovarios se correlacionó con las curvas patrón de manano y de perlas de manano de los ejemplos 2 y 3; las perlas recubiertas con manano tienen aproximadamente el mismo tamaño que los exosomas de cáncer de ovarios. Los resultados de tales experimentos se muestran en la FIG. 3 y FIG. 4.

### 50 Ejemplo 5- Cuantificación de exosomas de macrófago infectado con bacilo de tuberculosis (TB)

Se incubó una muestra de exosoma purificado a partir de un macrófago infectado con bacilo de tuberculosis (TB) mediante el mismo método y en la misma placa que las curvas de patrón de manano o de perla de látex de manano descritas en los ejemplos 1, 2 y 3. La señal generada a partir de los exosomas derivados del macrófago infectado con TB se correlaciona con una cantidad conocida de manano o un número de perlas recubiertas de manano que tienen aproximadamente el mismo tamaño que el exosoma derivado del macrófago infectado con TB.

### 60 Ejemplo 6- Optimización de perlas recubiertas de manano

La prueba ELLSA de lectina se optimizó con diferentes concentraciones de GNA recubierto. En un experimento, Se incubaron 100 µl de GNA en dPBS durante 1 hora a temperatura ambiente en los pocillos de una placa de 96 pocillos con las siguientes concentraciones: 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml y 1,25 µg/ml. La solución de recubrimiento de GNA se retiró de la placa a continuación y la placa se bloqueó con 300 µl de BSA 1%, Tween 20 0,1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Bien el manano o bien las perlas recubiertas de manano se incubaron en la placa

65

5 durante 1 hora a temperatura ambiente a 1000 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml y 1 ng/ml para el manano y 1e11 perlas/ml, 1e10 perlas/ml, 1e9 perlas/ml y 1e8 perlas/ml para perlas de látex de manano, incluyendo 2 pocillos blancos (dPBS solo) por concentración de recubrimiento de GNA para determinar la sensibilidad y antecedentes de la prueba. Se incubó manano o perlas de manano durante 1 hora a temperatura ambiente en las platas recubiertas de GNA. Los pocillos se lavaron x 1 con 300 µl de solución de lavado. Se incubaron 100 µl de GNA (1 µg/ml) marcado con HRP con manano unido o perlas de manano durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron x 4 con 300 µl de solución de lavado y se añadieron 100 µl de TMB a cada pocillo durante 30 minutos o hasta que se desarrolló color en los pocillos blancos. La reacción de HRP de TMB se detuvo con ácido sulfúrico 1 M y el color amarillo resultante se midió en un lector de placa a 450 nm de longitud de onda. Los resultados se muestran en las FIG. 5A y 5B. Los sustratos recubiertos con 10 µg/ml de GNA proporcionaron resultados óptimos en este experimento.

Ejemplo 7- Cuantificación de exosomas de cáncer de colon

15 Se preparó una placa de 96 pocillos de acuerdo con el ejemplo 1. Se obtuvieron diversas diluciones de sobrenadantes de medios de cultivo celular a partir de células de cáncer de colon primario.

20 Se añadió una muestra de 100 µl de un patrón de perla de manano o una muestra sobrenadante a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a TA. Las placas se lavaron X 1 con PBS + Tween-20 0,1 %. Se detectaron exosomas unidos o manano unido mediante la adición de 100 µl de GNA 1 µg/ml acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) e incubándolo durante 1 hora a TA, lavando la placa X 4 con PBS + Tween-20 0,1 %. Se detectó y midió HRP añadiendo 100 µl de tetrametilbencidina, permitiendo que el color se desarrolle 30 minutos a TA, deteniendo la reacción con 100 µl de ácido sulfúrico 1 M. La intensidad de color se midió a una absorbancia de 450 nm. La FIG 6 muestra la curva patrón de perla de manano. La tabla 1 resume la concentración de exosoma calculada relativa a la curva patrón de manano.

TABLA 1

Dilución sobrenadante	A <sub>450</sub>	Concentración de exosomas relativa a la curva patrón de perla de manano (perlas/ml)
1,00	1,019	3,28E+09
0,1	0,08	3,43E+07
0,01	0,039	9,47E+06
0,001	0,028	5,23E+06

Ejemplo 8- Cuantificación de exosomas de melanoma

30 Se prepararon sobrenadantes de cultivo celular de exosomas de melanoma mediante la siembra en placas de cinco líneas celulares de melanoma (líneas celulares de melanoma primario humano). Después de cinco días, se lavaron las células y a continuación se incubaron durante 48 horas en medios complementados. Se recogieron los sobrenadantes.

35 Se detectaron y midieron los exosomas como se describe en el ejemplo 7. La tabla 2 resume las mediciones de absorbancia a 450 nm de sobrenadantes diluidos y la concentración de los exosomas respecto a una curva patrón de manano.

TABLA 2

Línea celular	Dilución sobrenadante	A <sub>450</sub>	Concentración de exosomas respecto a la curva patrón de manano (ng/ml)	Concentración de exosomas relativa media (ng/ml)
CCS-1	No diluido	0,298	24	25
	1:2	0,211	26	
	1:4	0,152	25	
CCS-2	No diluido	0,531	51	45
	1:2	0,267	40	
	1:4	0,191	43	
CCS-3	No diluido	0,171	8	17



Línea celular	Dilución sobrenadante	A <sub>450</sub>	Concentración de exosomas respecto a la curva patrón de manano (ng/ml)	Concentración de exosomas relativa media (ng/ml)
	1:2	0,187	21	
	1:4	0,144	21	
CCS-4	No diluido	0,388	34	45
	1:2	0,313	51	
	1:4	0,203	49	
CCS-5	No diluido	0,263	19	20
	1:2	0,182	20	
	1:4	0,147	22	

Ejemplo 9- Cuantificación de exosomas de cáncer de ovarios

5 Se obtuvieron diversas diluciones de líquido ascítico humano a partir de un paciente con cáncer de ovarios. Los exosomas en el fluido se cuantificaron de acuerdo con un método similar al método descrito en el ejemplo 7. La tabla 3 resume las concentraciones calculadas de los exosomas de ovarios respecto al manano.

TABLA 3

Dilución sobrenadante	A <sub>450</sub>	Concentración de exosomas respecto a la curva patrón de manano (ng/ml)
1	0,404	55,6
0,5	0,259	35,4
0,25	0,163	22,1
0,125	0,115	15,4
0,0625	0,073	9,6
0	0	-0,5

10 Ejemplo 10- Cuantificación de exosomas derivados de macrófago infectado con tuberculosis

Se purificaron exosomas de macrófago murino infectado con tuberculosis mediante el uso de un gradiente de sacarosa, o usando una resina de GNA y eluyendo con metil alfa-manosidasa 1 M. Las concentraciones de exosomas se determinaron usando un método similar al método del ejemplo 7. La FIG. 7 resume los resultados.

15

Ejemplo 11- Cuantificación de exosomas de cáncer de ovarios con un anticuerpo de Anti-PLAP

20 Se ensayó la capacidad del anti fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) para detectar exosomas de cáncer de ovarios unidos a placas recubiertas de GNA. Las placas multipocillo recubiertas de GNA se prepararon como se describe en el ejemplo 1. Los exosomas celulares de cáncer de ovarios se incubaron en los pocillos. La presencia de exosomas se determinó usando un anticuerpo anti-PLAP marcado que detecta un marcador de células de ovarios. Los resultados se resumen en la FIG. 8.

20

25 La expresión "que comprende" tal como se usa en el presente documento es sinónimo de "que incluye", "que contiene", o "caracterizado por", y es inclusivo o indeterminado y no excluye elementos o etapas de método adicionales no mencionados.

25

## REIVINDICACIONES

1. Un método de cuantificación de exosomas en una muestra que comprende:
  - 5 poner en contacto la muestra con lectina inmovilizada en un sustrato;  
poner en contacto exosomas unidos a la lectina con un agente de unión a exosomas detectable; y  
medir una señal del agente de unión a exosomas detectable unido, cuantificando de este modo los exosomas unidos;
  - 10 en los que se selecciona la lectina a partir del grupo que consiste en lectina de *Galanthus nivalis* (GNA), lectina de *Narcissus pseudonarcissus* (NPA), lectina de *Allium sativum* (ASA), lectina de *Lens culinaris* (LCH), lectina de *Sambucus nigra* (SNA), lectina de *Maackia amurensis* (MAL) y concanavalina A.
  2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente comparar la señal del agente de unión detectable unido con una señal en una curva patrón.
  3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que los exosomas se derivan de una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula de cáncer de ovarios, una célula de melanoma, una célula de cáncer de colon y una célula infectada de tuberculosis.
  - 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el método proporciona una sensibilidad de detección de exosomas en la muestra que es de al menos  $1 \times 10^9$  exosomas/ml, preferentemente de al menos  $1 \times 10^8$  exosomas/ml o más preferentemente de al menos  $1 \times 10^7$  exosomas/ml.
  - 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la muestra comprende un exosoma que tiene un diámetro de 10 nm a 800 nm, o preferentemente un diámetro de 30 nm a 200 nm.
  6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la muestra comprende exosomas aislados de un fluido mediante un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía de exclusión por tamaño, centrifugación de gradiente de densidad, centrifugación diferencial, ultrafiltración de nanomembranas, captura inmunoabsorbente, purificación de afinidad, separación de microfluidos y una combinación de los mismos.
  - 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que al menos una de la lectina inmovilizada en el sustrato y el agente de unión detectable son capaces de unirse a exosomas derivados de una pluralidad de tipos de células.
  - 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el agente de unión a exosomas detectable se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y una lectina seleccionada del grupo que consiste en lectina de *Galanthus nivalis* (GNA), lectina de *Narcissus pseudonarcissus* (NPA), lectina de *Allium sativum* (ASA), lectina de *Lens culinaris* (LCH), lectina de *Sambucus nigra* (SNA), lectina de *Maackia amurensis* (MAL) y concanavalina A; y opcionalmente en el que el agente de unión a exosomas detectable comprende un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en una enzima, un agente quimioluminiscente, un agente fluorescente y un isótopo.
  - 40 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, suero, plasma, ascitis, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), esputo, saliva, médula ósea, líquido sinovial, humor acuoso, líquido amniótico, cerumen, leche materna, líquido de lavado broncoalveolar, semen, líquido prostático, líquido de Cowper o líquido preeyaculador, eyaculación femenina, sudor, materia fecal, pelo, lágrimas, líquido de quiste, líquido pleural o líquido peritoneal, líquido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bilis, líquido intersticial, menstruación, pus, sebo, vómito, secreciones vaginales, secreción mucosa, agua de heces, jugo pancreático, líquidos de lavado de cavidades nasales, aspirados broncopulmonares, líquido de cavidad de blastocisto, sangre de cordón umbilical y líquido ascítico.
  - 45 50 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el sustrato comprende una placa multipocillo que comprende un material seleccionado del grupo que consiste en sefarosa, látex, vidrio, poliestireno, polivinilo, nitrocelulosa y silicio.
  - 55

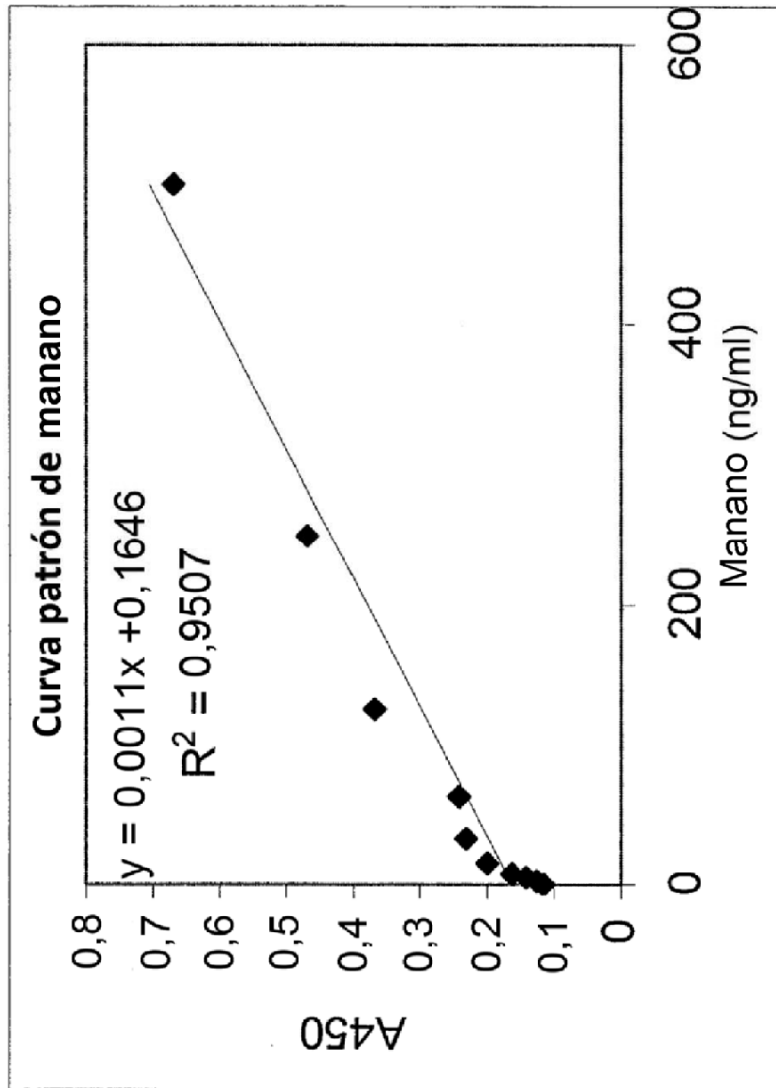


FIG. 1

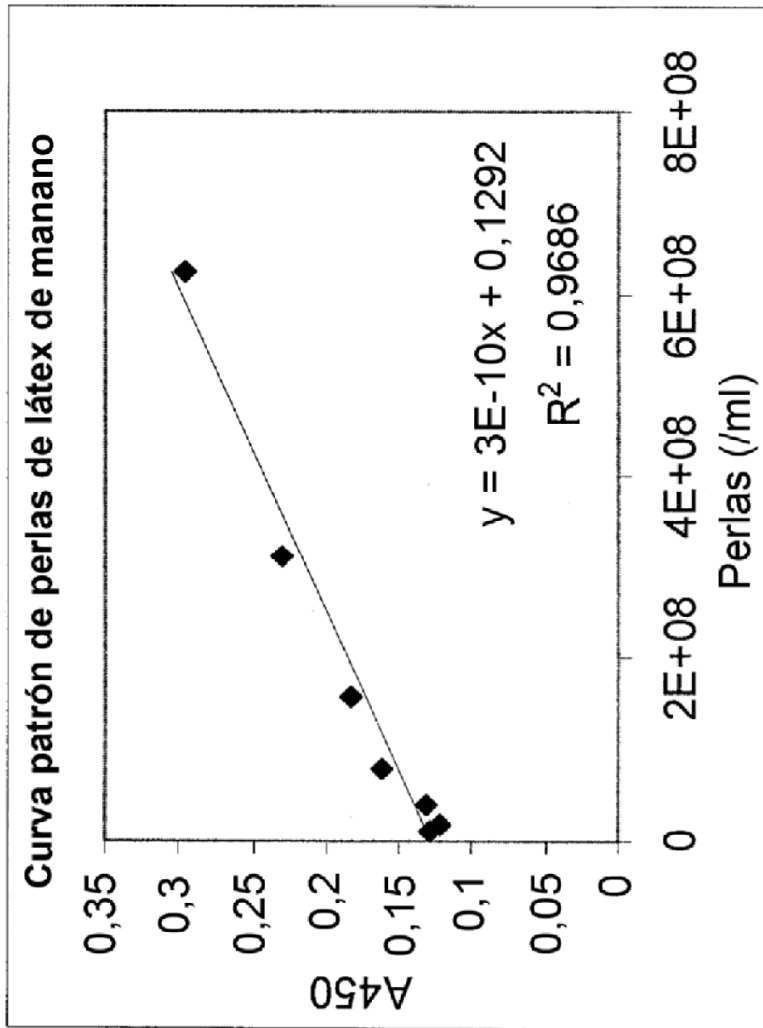


FIG. 2

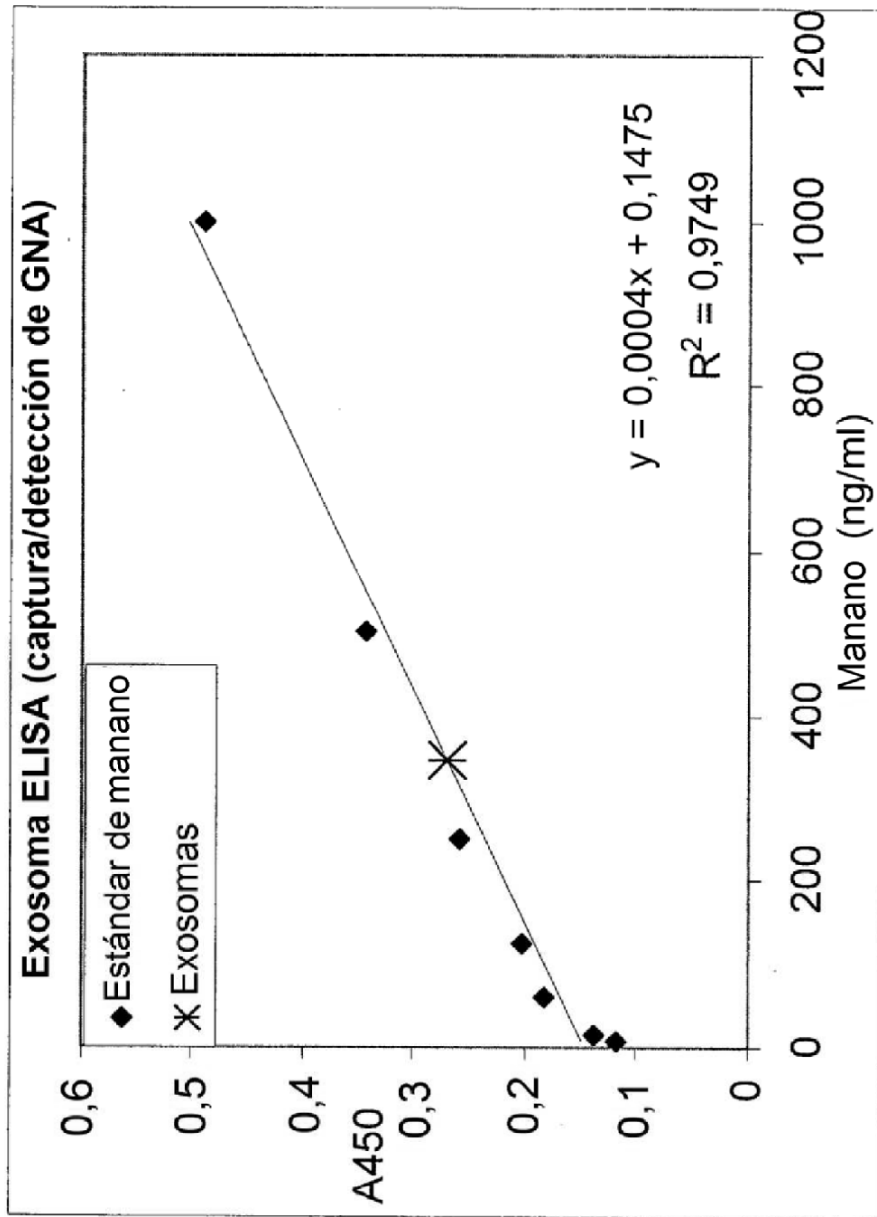


FIG. 3

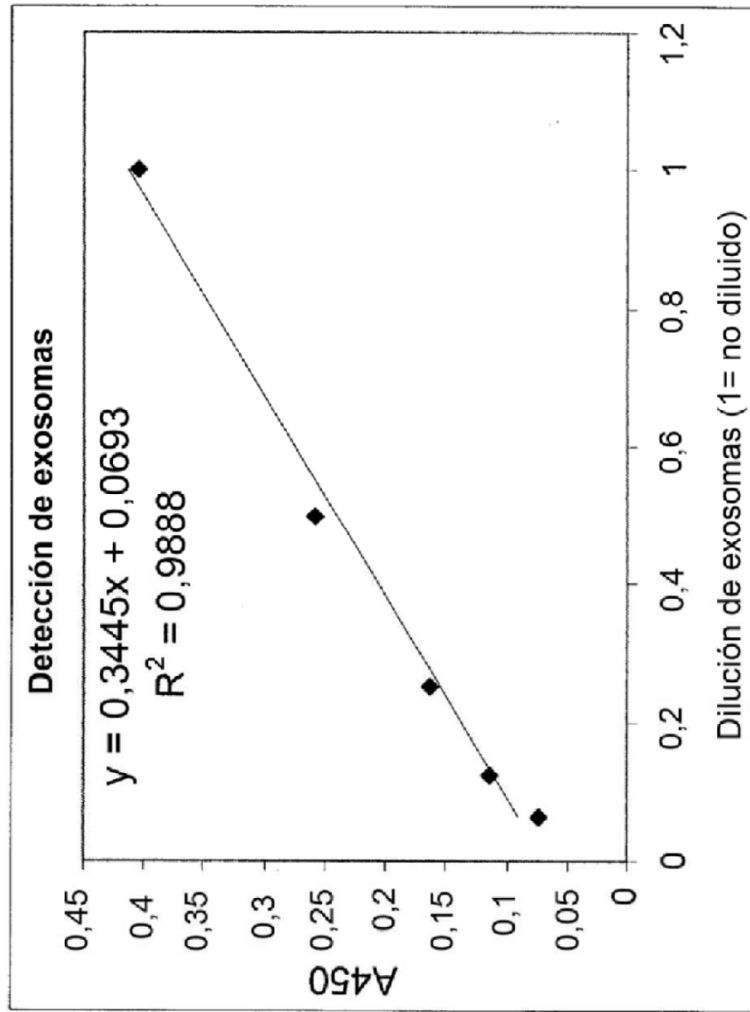


FIG. 4

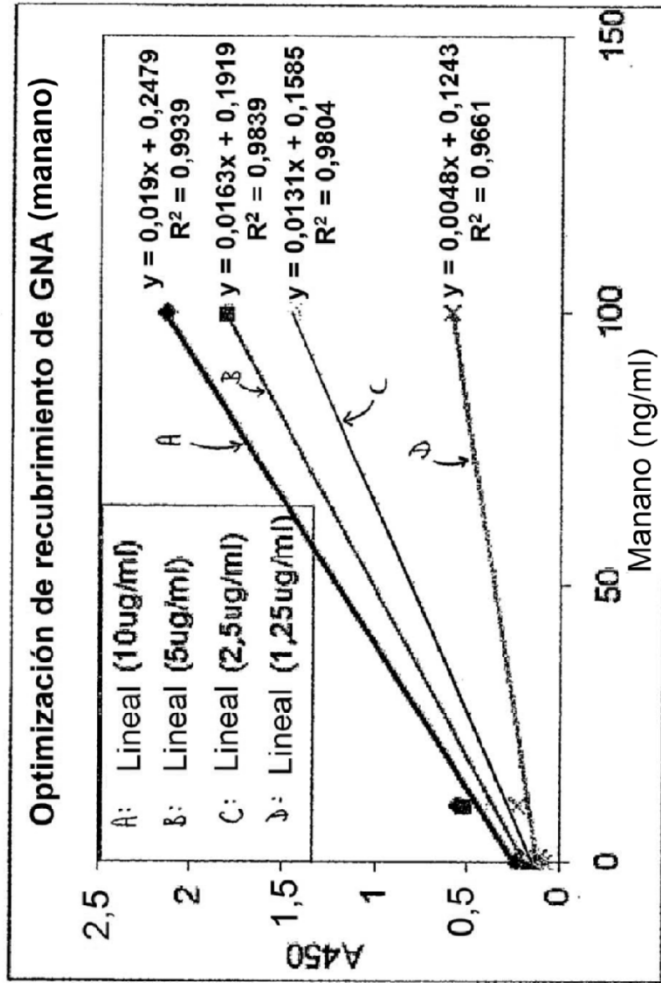


FIG. 5A

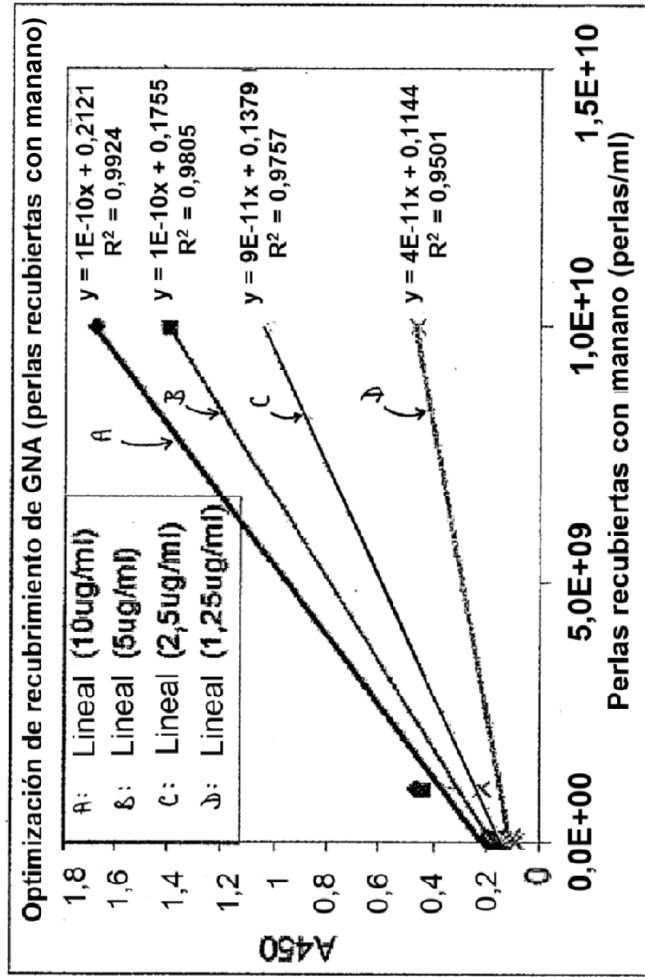


FIG. 5B



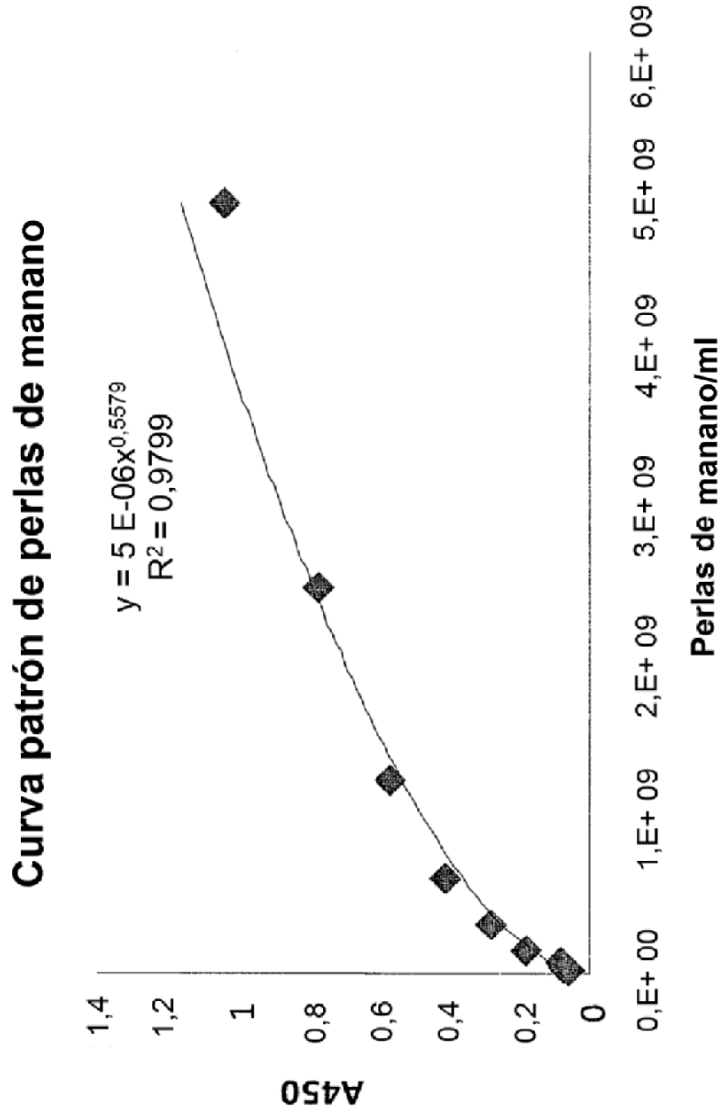


FIG. 6

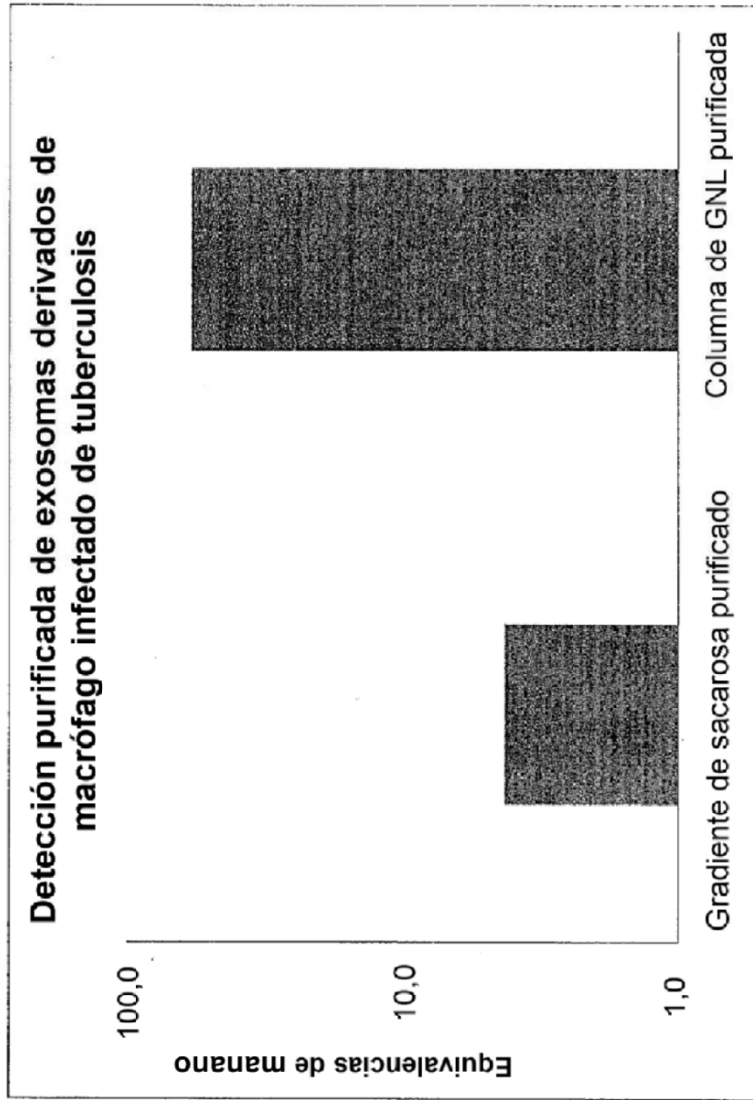


FIG. 7

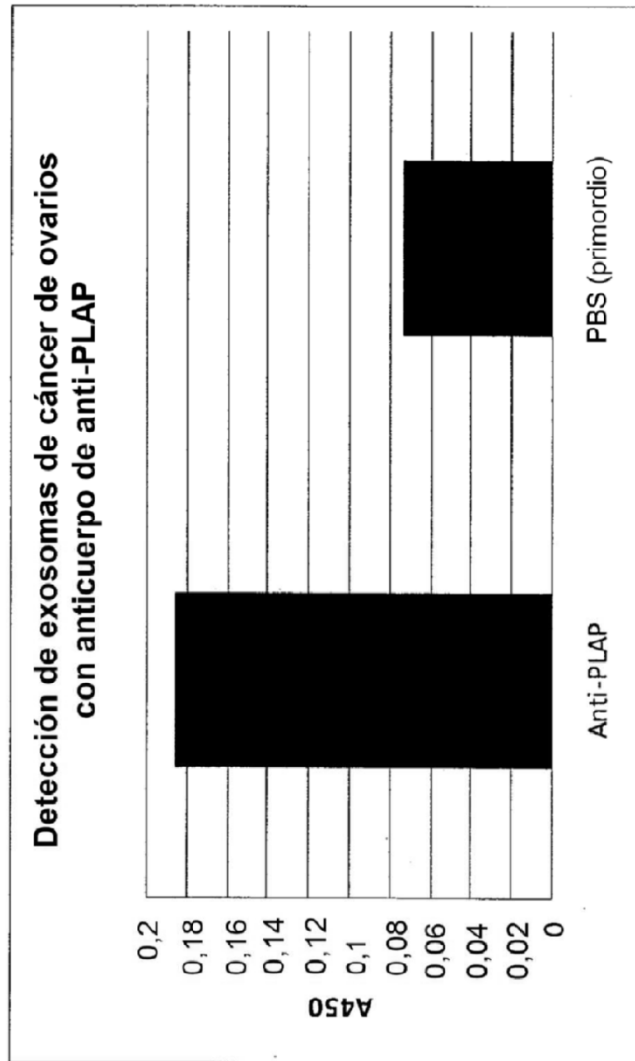


FIG. 8