

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 250**

51 Int. Cl.:

G01N 1/34 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2014 PCT/FR2014/053143**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015 WO15082839**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2014 E 14824058 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3077813**

54 Título: **Procedimiento de aislamiento de exosomas**

30 Prioridad:

03.12.2013 FR 1362021

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

21.02.2019

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (50.0%)
69280 Marcy l'Étoile, FR y
HOSPICES CIVILS DE LYON (50.0%)**

72 Inventor/es:

**OTT, CATHERINE;
MALLET, FRANÇOIS y
GENERENAZ, LAURENCE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 701 250 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

Procedimiento de aislamiento de exosomas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de aislamiento de exosomas a partir de una muestra biológica, y a la utilización de este procedimiento como herramienta en la caracterización de los exosomas presentes en dicha muestra, así como en el diagnóstico y pronóstico de una patología y/o de la fase clínica de una patología, pero también en el seguimiento de la evolución de una patología, tratada o no, en un ser humano o animal.

10 Los exosomas son unas vesículas membranas de 40-120 nm de diámetro, segregadas por diferentes tipos celulares *in vivo*. Debido a su origen y su biogénesis, los exosomas reflejan el contenido y el estado fisiológico normal o patológico de las células de las cuales procede. Se encuentran en numerosos líquidos biológicos, como la sangre, el plasma, el suero, la orina, la saliva, el líquido cefalorraquídeo (LCR), la linfa, la bilis, los lavados bronco-alveolares, el esperma, el líquido sinovial, el líquido amniótico, la leche materna, los líquidos de ascitis malignas, etc.

15 Su proceso de secreción es un proceso muy activo para células en proliferación tales como las células cancerosas. Contienen unos marcadores nucleicos y proteicos de células tumorales, a partir de los cuales se segregan y, por lo tanto, se consideran como reservas de nuevos biomarcadores potenciales del cáncer. Como tal, su estudio presenta un interés creciente para la comunidad científica.

20 La limitación principal para su estudio se basa en la obtención de preparaciones purificadas y suficientemente enriquecidas, a partir de los diferentes fluidos biológicos antes citados, con las técnicas actuales disponibles en el estado de la técnica. La bibliografía subraya en efecto la complejidad de la evaluación de los exosomas debido a preparaciones contaminadas, en particular por proteínas, de las fracciones microsomaes u orgánulos copurificados mediante técnicas tales como la ultracentrifugación o la nanofiltración, o a preparaciones demasiado poco concentradas en exosomas para ser analizadas, procedentes de técnicas inmunológicas de separación. En la actualidad, ni siquiera la combinación de estas técnicas ha dado total satisfacción.

25 La mayoría de los trabajos realizados con el objetivo de caracterizar los exosomas se llevan a cabo sobre cultivos de células malignas. Se someten a técnicas de purificación de los exosomas que las células segregan durante el desarrollo, y se determinan los perfiles proteómicos de exosomas aislados. Así, según el artículo S. Mathivanan *et al.*, Mol Cell Proteomics. Febrero de 2010;9(2):197-208, los autores han aislado exosomas a partir de una línea celular del carcinoma humano del colon, LIM1215. El medio de cultivo se ha sometido en primer lugar a una primera serie de ultracentrifugaciones para separar una población de partículas de un tamaño de 40-100 nm, que se introduce después en una inmunopurificación con un anticuerpo A33 humanizado, que reconoce específicamente las células epiteliales del colon. Se han identificado 394 proteínas, que pertenecen a diversas categorías de proteínas, siendo algunas comunes a las aisladas de cultivos de líneas celulares humanas de orina y de cultivo de líneas de mastocitos murinos, y que revela un papel multifuncional de los exosomas.

30 Dado que se ha establecido la importancia de los exosomas, es primordial disponer de técnicas de aislamiento eficaces y específicas que permitan al mismo tiempo ser fiables, utilizables en rutina y que no necesiten grandes volúmenes de muestras biológicas.

35 El documento WO 2013/022995A2 divulga un procedimiento de análisis de exosomas que comprende su aislamiento a partir de una muestra biológica mediante anticuerpos marcados, dirigidos contra diferentes marcadores de superficie.

40 La invención reside en un procedimiento de aislamiento de exosomas que comprende dos niveles sucesivos de separación que se basan en la técnica de separación por afinidad. Esta separación secuencial confiere al procedimiento de la invención una alta especificidad. Le permite además ser aplicable a cualquier muestra de un líquido o fluido biológico.

45 El procedimiento de la invención constituye una herramienta que se puede utilizar de forma rutinaria. Supera los obstáculos a los que el experto en la materia se había confrontado hasta ahora, abriendo una vía de acceso generalizada a la caracterización de los exosomas.

50 El procedimiento de la invención comprende por lo menos las dos etapas sucesivas siguientes:

- 60 a) una primera etapa de purificación por afinidad, aplicada a un líquido biológico, que utiliza por lo menos un anti-ligando específico de un ligando genérico portado por los exosomas, para obtener una población P de exosomas, separándose dichos exosomas de dicho anti-ligando, y
- 65 b) una segunda etapa de purificación por afinidad, aplicada a la población P de exosomas, que utiliza por lo menos un anti-ligando específico de un ligando característico de una sub-población SP de exosomas,

para obtener dicha sub-población SP de exosomas, separándose dichos exosomas de dicho anti-ligando o no.

5 Antes de exponer en detalle la invención, se definen a continuación algunos términos empleados en el presente texto para caracterizar la invención.

Los exosomas pertenecen a una fracción de nanovesículas segregadas por las células en los líquidos biológicos. Estructuralmente, son unas vesículas que poseen una bi-capa lipídica que comprende en superficie unas proteínas y unos azúcares. Se definen por su tamaño que varía de 30 a 200 nm, más particularmente por un tamaño de por lo menos 40 nm, incluso de por lo menos 50 nm, y de como máximo 150 nm, incluso de como máximo 120 nm e incluso de como máximo 100 nm.

15 Las expresiones líquido biológico y fluido biológico se emplean indiferentemente. Un líquido biológico es producido por un ser humano o animal, sano o enfermo, diagnosticado o no. Se extrae o se punciona en el ser humano o en el animal, directa o indirectamente. Por indirectamente, se entiende que se pueden extraer del ser humano o del animal unas células o un tejido celular que se pone en cultivo en un medio apropiado en el que dichas células excretarán exosomas y de los cuales todo o parte se extraerá para ser sometido al procedimiento de aislamiento de la invención. A título de ejemplos no limitativos, se pueden citar los sobrenadantes celulares, las muestras de heces o de médula ósea.

20 Mediante la técnica de purificación por afinidad, se comprende una técnica basada en una interacción o reconocimiento específico entre un ligando exosómico portado por el exosoma y un antiligando. Este reconocimiento puede ser de naturaleza inmunológica y conducir a un complejo inmune, como las interacciones antígeno/anticuerpo, epítipo/anticuerpo, epítipo/paratopo, antígeno/paratopo, etc., se habla entonces de inmunopurificación. Este reconocimiento puede ser de cualquier otra naturaleza, por ejemplo covalente. Esta técnica permite aislar de la muestra el exosoma unido todavía a dicho anti-ligando o el exosoma separado de dicho anti-ligando, después de la elución por ejemplo. Una forma de realización preferida de esta técnica según la invención consiste en fijar, directa o indirectamente, dicho antiligando sobre un soporte sólido, por ejemplo unas bolas magnéticas, membranas, matrices de cromatografías, microplacas, o también aparatos microfluídicos.

35 En el caso de una fijación indirecta, la fijación del anti-ligando al soporte sólido se puede llevar a cabo utilizando una bola magnética como intermediario entre el soporte sólido, por ejemplo una membrana, y el anti-ligando. Para ello, la activación de un imán detrás del soporte sólido permitirá fijar la bola magnética al soporte sólido, y la inactivación de dicho imán permitirá separar del soporte sólido los exosomas fijados al anti-ligando, fijado a su vez a la bola magnética.

40 Por célula normal, se comprende una célula que no posee marcadores detectables o un porcentaje detectable de marcadores característicos de un estado anormal de la célula. Se incluyen en esta definición las células cepas, en particular mesenquimatosas, neurales y hematopoyéticas, que segregan unos exosomas característicos de un estado no diferenciado. Por oposición, una célula se considera como anormal cuando posee uno o más marcadores detectables, o un porcentaje detectable de marcadores, características de un estado diferente del de una célula normal, y en particular un estado patológico de la célula o un estado susceptible de evolucionar hacia un estado patológico. Entran en particular en esta definición, las células cancerosas, adenomatosas, infecciosas, inflamatorias, estimuladas inmunitariamente, quemadas, y más generalmente atacadas por cualquier tipo de estímulos.

50 Como se ha indicado anteriormente, a pesar de su pequeño tamaño, los exosomas presentan la ventaja de acumular proteínas muy numerosas que constituyen su trazabilidad, y son la quintaesencia de las células que los excretan, en particular, la naturaleza del tejido celular, el estado normal o anormal de la célula, etc.

55 El procedimiento de la invención comprende una primera etapa de purificación por afinidad que permite aislar una población P de exosomas, que se basa en la existencia de marcadores específicos de los exosomas, susceptibles de estar presentes o expuestos en la superficie de estos, en una fase de su desarrollo. Estos marcadores, que se denominarán también ligandos genéricos, son antígenos, receptores, factores de crecimiento, así como cualquier otra partícula o molécula, y cualquier fracción de estos, capaces de ser reconocidos específicamente por un anti-ligando.

60 La primera etapa utiliza así por lo menos un anti-ligando que reconoce específicamente por lo menos uno de los marcadores o ligandos anteriores. Según la especificidad del ligando frente a exosomas, y para mejorar la eficacia de esta etapa, se pueden utilizar dos anti-ligandos o más, siendo cada uno de ellos específico de dos ligandos genéricos o más, respectivamente, siendo estos ligandos genéricos específicos de la población exosómica. Según una variante de la invención, la primera etapa comprende solamente una purificación, durante la cual se utiliza uno o varios anti-ligandos antes citados. Según otra variante de la invención, la primera etapa puede comprender dos sub-etapas consecutivas o más, utilizando cada una de ellas uno o varios anti-ligandos específicos de uno o varios ligandos genéricos, respectivamente.

5 Como se ilustra en los ejemplos, la primera etapa lleva a la obtención de una población P de exosomas que se separan del o de dichos anti-ligandos específicos de uno o varios ligandos genéricos de los exosomas. Esta separación se realiza preferentemente por elución, en condiciones que revelan unas competencias generales del experto en la materia.

Esta primera etapa a) se puede aplicar a cualquier líquido biológico tal como se ha definido anteriormente.

10 Previamente, este líquido puede haber sido tratado. Así, sin apartarse del ámbito de la invención, el líquido biológico puede ser pretratado mediante una etapa de separación física, por tamaño, que permite aislar una fracción del líquido biológico que no contiene moléculas o partículas de un tamaño superior a 800 nm, preferentemente a 500 nm, que será sometida después a la primera etapa a).

15 Esta etapa de separación física se puede realizar mediante cualquier técnica apropiada tal como las seleccionadas de entre las técnicas de centrifugación y/o filtración, como la filtración en serie, la ultrafiltración, la cromatografía de exclusión por tamaño, y las combinaciones de estas técnicas.

20 Esta etapa de separación física previamente a etapas sucesivas de purificación por afinidad tiene como ventaja que permite enriquecer la muestra antes de la realización de dichas etapas de purificación por afinidad, dando unos exosomas con una purificación aún más elevada.

Al final de la primera etapa a), se obtiene una población P de exosomas que entra entonces en la segunda etapa b) del procedimiento de la invención.

25 La segunda etapa de purificación por afinidad del procedimiento de la invención que permite aislar, desde la población P de exosomas, una subpoblación SP de exosomas, se basa en la existencia de marcadores específicos propios a, o característicos de algunos exosomas, siendo dichos marcadores susceptibles de estar presentes o expuestos en la superficie de estas, en una fase de su desarrollo. Estos marcadores, que se denominarán ligandos particulares, por oposición a los ligandos genéricos, son antígenos, receptores, factores de crecimiento, así como cualquier otra partícula o molécula, y cualquier fracción de estos, capaces de ser reconocidos específicamente por un anti-ligando.

35 La segunda etapa b) utiliza por lo menos un anti-ligando que reconoce específicamente por lo menos uno de los marcadores o ligandos particulares anteriores. Según la especificidad del ligando frente a los exosomas, y para mejorar la eficacia de esta etapa, se pueden utilizar dos anti-ligandos o más, siendo cada uno de ellos específicos de dos ligandos particulares o más, respectivamente.

40 Como se ilustra en los ejemplos, y en función de la tecnología en la que están implicados después los exosomas aislados según la invención, la segunda etapa conduce a la obtención de una sub-población SP de exosomas que se unen a dichos anti-ligandos específicos del o de dichos ligandos característicos de una sub-población SP de exosomas, o que se separan de dichos anti-ligandos. En este último caso, los exosomas obtenidos se liberan de cualquier soporte y son solubles. La separación de los exosomas de los anti-ligandos se realiza preferentemente por elución, en condiciones que entran dentro de las competencias generales del experto en la materia.

45 Según una variante de la invención, la segunda etapa b) comprende solamente una purificación, durante la cual se utiliza uno o varios anti-ligandos antes citados. La purificación de esta segunda etapa b) se puede realizar en varias sub-etapas que utilizan uno o varios anti-ligandos, contribuyendo al aislamiento de una misma sub-población SP de exosomas, que será por lo tanto cada vez más específica.

50 Según otra variante de la invención, el procedimiento de la invención comprende por lo menos una tercera etapa c) de purificación por afinidad, aplicándose esta etapa a dicha sub-población SP y utilizando por lo menos un anti-ligando específico de un ligando característico de una sub-población SP' de exosomas, incluyéndose la sub-población SP' en la sub-población SP, para obtener dicha sub-población SP'. A semejanza de la segunda etapa b), esta tercera etapa c) de purificación puede comprender unas sub-etapas que contribuyen al aislamiento de una misma sub-población SP' de exosomas.

60 Por supuesto, una o varias etapas consecutivas suplementarias de purificación por afinidad también pueden complementar el procedimiento de la invención. En este caso, los exosomas se separarán de dichos anti-ligandos durante las purificaciones por afinidad anteriores a la última etapa de purificación por afinidad, los exosomas pueden entonces separarse o no de dichos anti-ligandos durante la última etapa de purificación.

65 La sub-población SP y la sub-población SP' son unas poblaciones de exosomas particulares. En función de los anti-ligandos particulares utilizados, la sub-población SP o la sub-población SP' puede, a título de ejemplo, reunir unos exosomas que proceden de un mismo órgano, de un mismo tejido celular, o de un mismo tipo de células. El tejido o las células de origen pueden ser normales o anormales.

En la práctica y antes de una ilustración de la realización y de las ventajas de un procedimiento de la invención, en los ejemplos siguientes, la población P, procedente de la primera etapa a), puede ser sometida a la segunda etapa b) del procedimiento, en presencia de uno o varios anti-ligandos específicos de ligandos característicos de un órgano patológico, por ejemplo de un tumor de próstata, para aislar una sub-población SP de exosomas característicos de un tumor de próstata. En otra forma de realización, la población P puede ser sometida a la segunda etapa b), en presencia de uno o varios anti-ligandos específicos de ligandos característicos de un órgano, por ejemplo de la próstata, sin indicación del estado normal o patológico del órgano. Para afinar el procedimiento de aislamiento, esta sub-población SP puede ser sometida a una tercera etapa c) con unos anti-ligandos específicos de ligandos marcadores de células anormales, para permitir el aislamiento de una sub-población SP' de exosomas característicos de un tumor de próstata. Se puede considerar también que esta sub-población SP' se obtenga por tratamiento de una población P procedente de la primera etapa a), en una segunda etapa b) en presencia de anti-ligandos específicos de ligandos marcadores de células anormales para aislar una sub-población SP de exosomas característicos de células anormales; después, esta sub-población SP es sometida a una tercera etapa c) con unos anti-ligandos específicos de ligandos característicos de la próstata.

El o los ligandos genéricos y/o el o los ligandos característicos se pueden seleccionar de entre unos polipéptidos, unas proteínas, unos antígenos, unos receptores, unas enzimas, unos factores de crecimiento, unos glicolípidos, unos polisacáridos, y los anti-ligandos específicos de dichos ligandos son unos anticuerpos, unos fragmentos de anticuerpos como los fragmentos F(ab')₂, scFv, unos análogos de anticuerpos, las lectinas, los aptámeros, unos péptidos. Según la invención, el o por lo menos uno de los ligandos genéricos son diferentes del o del por lo menos uno de los ligandos característicos.

Por "análogos de anticuerpo" se entienden unos compuestos biológicos y/o químicos que poseen las mismas capacidades de unión que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o unas capacidades de unión similares. En particular, los análogos de anticuerpos incluyen pequeñas proteínas que, como los anticuerpos, son capaces de unirse a una diana biológica que permite así detectarla, capturarla o simplemente centrarla dentro de un organismo o de una muestra biológica. Los campos de aplicaciones de estos análogos de anticuerpos son prácticamente tan extensos como los de los anticuerpos. A título de ejemplo, se pueden citar los Nanofitines™, pequeñas proteínas comercializadas por la compañía AFFILOGIC.

Más particularmente, el ligando genérico se selecciona de entre las proteínas de la familia de las tetraspaninas, tales como las tetraspaninas CD63, CD9, CD81; las proteínas implicadas en la adhesión como la lactaderina (o MFGE-8), ICAM-1; unas proteínas implicadas en el transporte y la fusión membranaria de la familia de Rab-GTPasas, tales como Rab5 y Rab7 y las anexinas; y unas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tales como MHI, MHII.

El ligando característico de una sub-población se selecciona preferentemente de entre PSCA, anexina A3, PSMA, caveolina, B7H3, las proteínas de origen retroviral endógeno como las proteínas de cubierta.

La invención reside además en una utilización de un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente para caracterizar y/o cuantificar los exosomas. Como se ha indicado anteriormente, los exosomas aislados según la invención pueden separarse del o de los anti-ligandos implicados en la etapa b) de purificación por afinidad o en la última etapa de purificación por afinidad si se efectúan otras etapas de purificación por afinidad.

Los exosomas aislados según el procedimiento de la invención, separados de cualquier soporte y solubles, son particularmente útiles en las aplicaciones siguientes, dadas a título ilustrativo y no limitativo:

- nanotecnología/nanosistemas
- secuenciación del contenido exosómico/genotipado
- terapia: nanovector y suministro de dianas terapéuticas
- estudios *in vitro*: mensajeros celulares.

El procedimiento de la invención se puede aplicar también al diagnóstico y al pronóstico de una patología y/o de la fase clínica de una patología, pero también en el seguimiento de la evolución de una patología, tratada o no, en un ser humano o en un animal enfermo, o el seguimiento del efecto del tratamiento de esta patología, en un ser humano o en un animal enfermo.

La patología puede ser crónica o aguda, de origen infecciosa o no infecciosa. En una utilización del procedimiento, la patología es un adenoma, un cáncer, una inflamación, una septicemia, una enfermedad neurológica, como las enfermedades de Alzheimer, de Parkinson, la esclerosis en placas y las enfermedades de priones, o una patología del embarazo como la pre-eclampsia.

El tratamiento puede ser un tratamiento medicamentoso, una radioterapia o un injerto.

La invención se ilustra en los ejemplos siguientes en los que se aplica a diferentes líquidos biológicos de

pacientes sanos o enfermos, a saber afectados de cáncer de próstata, siendo los anti-ligandos utilizados en la segunda etapa característicos de la próstata. Estos ejemplos hacen referencia a las figuras siguientes:

- 5 La figura 1 representa la detección de exosomas en ng/μl por dosificación ExoTEST Rab5/CD63 en las sub-poblaciones inmunopurificadas por un procedimiento de la invención, con el marcador genérico CD63 y los marcadores específicos PSMA (antígeno membranario específico de la próstata) y caveolina, a partir de grupos de suero de sujetos sanos y enfermos.
- 10 La figura 2 representa la detección de exosomas en ng/μl por dosificación sándwich ExoTEST Rab5/CD63 en las sub-poblaciones inmunopurificadas por un procedimiento de la invención, con el marcador genérico CD63 y los marcadores AnxA3, PSCA (antígeno de célula cepa de la próstata), y G7H3 (marcador de células epiteliales tumorales y del cáncer de próstata) a partir de grupos de plasma Cap de sujetos enfermos.
- 15 La figura 3 es el resultado de una observación por MET de los exosomas sobre perlas de la sub-población CD63/PSMA aislada a partir de grupos de sueros.
- La figura 4 es el resultado de una observación por MET de los exosomas sobre perlas de la sub-población CD63/AnxA3 aislada a partir de grupos de sueros.
- 20 La figura 5 es el resultado de una observación por MET de los exosomas sobre perlas de la sub-población CD63/AnxA3 aislada a partir de grupos de sueros, después de la elución (o desorción).
- 25 La figura 6 representa la detección de exosomas en ng/μl por dosificación sándwich ExoTEST Rab5/CD63 en las sub-poblaciones inmunopurificadas por un procedimiento de la invención, con el marcador genérico CD63 y los marcadores PSMA, caveolina y AnxA3 para 2 sueros P1 y P2 de sujetos que padecen cáncer de próstata, ensayados individualmente.
- 30 La figura 7 representa la detección de exosomas en ng/μl por dosificación sándwich ExoTEST Rab5/CD63 en las sub-poblaciones inmunopurificadas por un procedimiento de la invención, con el marcador genérico CD63 y los marcadores CD9, PSMA, y AnxA3 para los grupos de plasma CaP y EFS.
- 35 La figura 8 representa una comparación entre la detección de los exosomas en una sub-población CD63/AnxA3 de origen plasmático (EFS y CaP) mediante la técnica Nanosight y aquella realizada por ExoTEST.
- La figura 9 representa una comparación entre la detección de los exosomas en una sub-población CD63/PSMA de origen plasmático (EFS y CaP) mediante la técnica Nanosight y aquella realizada por ExoTEST.
- 40 La figura 10 representa la detección de exosomas en ng/μl por dosificación sándwich ExoTEST Rab5/CD63 en las sub-poblaciones inmunopurificadas por un procedimiento de la invención, con el marcador genérico CD63 y el marcador específico PSCA para unos plasmas de sujetos que padecen cáncer de próstata (n=6) y de sujetos sanos (n=3).

45 **Ejemplo 1: aplicación del procedimiento de la invención a una muestra de sangre (suero o plasma) o de orina, para aislar unos exosomas características de células prostáticas tumorales**

50 1) Material

1.1) Muestras de líquidos biológicos

Muestras de sujetos enfermos

55 Grupo de sueros CaP:

El método de purificación se ha realizado mediante un grupo de sueros (V=2,5 ml) compuesto por 6 muestras de pacientes que padecen cáncer de próstata en diferentes fases de la enfermedad con unos resultados de Gleason que miden la agresividad de las células cancerosas, que va de 6 a 9 (en una escala de 2 a 10).

60 Sueros individuales CaP:

Se ha realizado un estudio que se refiere a 2 sueros individuales procedentes del grupo de muestras anterior, a partir de un volumen de suero reducido a V=1,2 ml, es decir una toma de ensayo 2 veces menos importante. Se trata de 2 sueros que provienen de pacientes (P1 y P2) que tienen un resultado de Gleason de 7 y 8, respectivamente.

Grupo de plasma CaP:

El método de purificación se ha aplicado sobre un grupo de plasmas (V=2,5 ml) constituido por 4 muestras de pacientes que padecen cáncer de próstata en fase metastásica.

Grupo de orinas CaP:

El método de purificación se ha aplicado sobre un grupo de orinas de pacientes que padecen cáncer de próstata que tienen un resultado de Gleason de 7, después del masaje examen post-digital rectal (post-DRE) (CaP) y de pacientes afectados de hiperplasia benigna de la próstata (HBP).

Muestras de sujetos sanos

Grupo de sueros EFS:

Unas muestras séricas que proceden de 6 donantes sanos del Etablissement Français du Sang (EFS) han permitido constituir un grupo de suero EFS (V=2,5 ml) como grupo control para el estudio.

Grupo de plasmas EFS:

Unas muestras plasmáticas que provienen de 6 donantes sanos del EFS han permitido constituir un grupo de plasma EFS (V=2,5 ml) como grupo control para el estudio.

1.2) Anticuerpos utilizados

Se listan en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1

anticuerpo	Clon	Tipo	Diana	Marcador
anti-CD63 ¹	MX-49, 129,5	Monoclonal de ratón	CD63	Genérico
anti-CD9 ²	MEM-61	Monoclonal de ratón	CD9	Genérico
anti-PSM ¹	K1H7	Monoclonal de ratón	PSMA	Cáncer de próstata
anti-PSCA ³	5C2	Monoclonal de ratón	PSCA	Cáncer de próstata
anti-AnxA3 ⁴	13A12G4	Monoclonal de ratón	Anexina A3	Cáncer de próstata
anti-B7H3 ¹	4396	Monoclonal de ratón	B7H3	Cáncer agresivo
anti-Caveolina ¹	N-20	Policlonal de conejo	Caveolina	Cáncer

1: proveedor Santa Cruz Technology

2: proveedor Novus Biological

3: proveedor Sigma Aldrich

4: producido por la compañía bioMérieux como se describe en el documento FR 2 968 767 A1

2) Preparación de los anti-ligandos

Los anticuerpos antes citados se acoplan a unas bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads® M-280 Streptavidin).

Se realiza una etapa de biotinylación de los anticuerpos previamente con el kit comercial One-step Antibody Biotinylation, comercializado por Miltenyi Biotec, según las recomendaciones del proveedor.

Un volumen de 150 µl de bolas MP-280 (es decir 10⁸ bolas) se extraen y después se lavan durante 5 minutos con 500 µl de un tampón + 0,5% Tween. El tubo se coloca sobre un soporte imantado con el fin de eliminar el sobrenadante. Se añaden 500 µl de los anticuerpos monoclonales anti-CD63 humano, anti-PSMA, anti-AnxA3, anti-caveolina o anti-CD9 diluidos a la concentración de 20 µg/ml en el tampón + Tween 0,05% y se incuban durante 30 minutos bajo agitación rotativa. Para el bloqueo de los sitios libres, se añade una solución de biotina a 10 mM y se incuba durante 30 minutos bajo agitación rotativa. Las bolas se lavan después 5 veces 5 minutos con 500 µl de tampón + 0,5% de Tween. El conjugado bolas de estreptavidina MP-280/anticuerpo biotinylado está listo para ser puesto en contacto con la muestra sanguínea.

3) Pretratamiento de la muestra

La muestra sérica o plasmática se somete a un tratamiento previo de ultracentrifugación que consiste en dos centrifugaciones diferenciales y una filtración de la siguiente manera.

La muestra (volumen de 2,5 ml) se centrifuga a 500 g durante 10 minutos a +4°C con el fin de eliminar las células sanguíneas y los restos celulares, después a 16500 g durante 20 minutos a +4°C para sustraer las micropartículas y los cuerpos apoptóticos del fluido. Se realiza una etapa de filtración sobre 0,45 µm para la eliminación de las vesículas extracelulares y de los agregados proteicos de tamaño superior a 450 nm.

La muestra de orina se somete también a un tratamiento previo de centrifugaciones diferenciales, después de filtración sobre 0,45 µm. La orina se concentra después 5X sobre Vivaspín 20 (cut off 10 kD, Vivasciences).

4) aplicación de la primera etapa a) de inmunopurificación del procedimiento de la invención para obtener una población P

Para esta etapa, se coge como diana un ligando genérico tetraspanina.

El anti-ligando utilizado es un anticuerpo anti-tetraspanina, más precisamente un anti-CD63.

La primera inmunopurificación por el anti-tetraspanina CD63 se realiza en 2 incubaciones de la muestra sanguínea pretratada. En un primer tiempo, se realiza un "lote" incubando un volumen de 1,25 ml de muestra con el conjugado de bolas de estreptavidina/Ac-antiCD63 biotinilado durante 3 horas a temperatura ambiente bajo agitación rotativa. El volumen restante de 1,25 ml de suero pretratado se incuba en "lote" con el bioconjugado durante una noche bajo agitación rotativa a temperatura ambiente. Se realizan 5 lavados de 5 minutos con 500 µl de tampón + 0,5% Tween. La etapa final de elución se realiza por adición de 100 µl de tampón de elución (0,2 M glicina, HCl, pH 2,2 + 1 mg/ml de BSA) después de 2 minutos de incubación con el bioconjugado realizando una agitación suave de algunos segundos. A un primer volumen de elución E1 de 100 µl se añaden 14 µl de tampón de neutralización (Tris 2M, pH 9,5). Se realiza una segunda elución + neutralización E2 idéntica. Los eluatos E1 y E2 se mezclan y se conserva un volumen de elución final de 228 µl a -80°C hasta el análisis.

En las mismas condiciones, esta etapa de inmunopurificación se ha realizado con el anticuerpo anti-tetraspanina, anti-CD81, sobre los grupos de sueros de pacientes enfermos (CaP).

Los grupos de orinas CaP y HBP se someten a esta primera etapa de inmunopurificación con la anti-tetraspanina CD63.

5) Aplicación de la segunda etapa b) de inmunopurificación del procedimiento de la invención para obtener una sub-población SP

Para esta etapa, los ligandos particulares son PSMA, caveolina y anexina A3.

Los anti-ligandos utilizados son los anticuerpos anti-PSMA, anti-caveolina, anti-anexina A3.

Esta segunda etapa de inmunopurificación específica se realiza a partir de las fracciones de elución P CD63 y P CD81, respectivamente, obtenidas en 4). Un volumen de 205 µl de elución P se ajusta a un volumen final de 1200 µl con un tampón y fraccionado en tres veces 400 µl antes de ser puesto en contacto con los bioconjugados bolas/Ac anti-PSMA biotinilado, bolas/Ac anti-caveolina biotinilada y bolas/Ac anti-anexina A3 biotinilada durante 3h a temperatura ambiente bajo agitación rotativa. Se realizan 5 lavados de 5 minutos con 500 µl de tampón + 0,5% de Tween. De la misma manera que para la población P, la elución se realiza en dos veces con un volumen de elución final obtenido de 228 µl conservado a -80°C hasta el análisis.

Se obtienen las sub-poblaciones SP siguientes: CD63/PSMA, CD63/caveolina, CD63/AnxA3, CD81/PSMA, CD81/PSCA, CD81/AnxA3.

Los grupos de orinas CaP y HBP se someten a la segunda etapa de inmunopurificación con el anticuerpo anti-PSMA.

Ejemplo 2: Técnicas de detección de los exosomas purificados por el procedimiento de la invención

1) Inmunodetección de los exosomas por ELISA, ExoTEST® (proveedor HansaBiomed)

Con el fin de detectar la presencia de exosomas en las fracciones purificadas por el procedimiento de la invención descrito anteriormente, se ha utilizado el ensayo ExoTEST comercializado por la compañía HansaBiomed. Se trata de un ensayo de dosificación por microplaca ELISA sándwich que utiliza en fase captura un Ac monoclonal dirigido contra la proteína Rab5 (familia de Rab GTPasas) y en detección un Ac monoclonal anti-CD63. El formato sándwich permite la captura específica de los exosomas reduciendo la detección de proteínas contaminantes. Además, el ensayo permite la cuantificación de los exosomas a partir de muestras biológicas y de preparaciones purificadas y enriquecidas en exosomas, gracias a la presencia de un estándar de calibración incluido en el kit. La dosificación de las muestras se ha realizado según las recomendaciones del proveedor.

2) Detección de los exosomas mediante el método físico, NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)

La compañía NanoSight comercializa un instrumento de análisis, el LM10-HS, que permite medir y caracterizar cualquier tipo de nanopartículas de tamaño comprendido entre 10 nm y 1 µm, dentro de una muestra polidispersa. Con la ayuda de un láser 405 nm, las nanopartículas se excitan y su movimiento browniano se sigue mediante un microscopio óptico y se filma mediante una videocámara. El programa proporcionado con el aparato (Nanosight 2.0) permite obtener un análisis del tamaño y de la concentración de las diferentes partículas presentes en la muestra.

Se ha determinado un umbral de detección a partir de las mediciones realizadas a partir de 6 inyecciones de tampón PBS1X previamente filtrado 2 veces sobre 0,22 µm. Este umbral corresponde a la media de los valores + 3 desviaciones estándar, es decir $0,42 \cdot 10^8$ partículas/ml.

Al principio de cada manipulación, se controla la calidad del tampón PBS1X, filtrado extemporáneamente sobre 0,1 µm) utilizado para la dilución de las muestras. El valor del blanco no debe superar el umbral de detección.

Las fracciones inmunopurificadas mediante el procedimiento según la invención se diluyen al 1/50 en PBS1X para el análisis. Las fracciones procedentes del pretratamiento por ultracentrifugación [véanse los ejemplos 1, 3]) se diluyen al 1/500 en PBS1X.

Para cada muestra, el coeficiente de variación (CV) se calcula sobre las mediciones de concentración y de tamaño (modo y "mean") obtenidas tras 5 a 6 inyecciones. Estas mediciones permiten evaluar la reproducibilidad del análisis NTA de las muestras.

3) Detección de los exosomas por microscopía electrónica de transmisión (MET)

La observación directa de los exosomas en suspensión después de la coloración negativa se realiza por microscopía electrónica de transmisión. Se observa a) los exosomas acoplados a las bolas y b) los exosomas solos, después de la elución.

Ejemplo 3: Aplicación a la detección de los exosomas inmunopurificados procedentes de un grupo de sueros según la invención

Las diferentes técnicas de detección expuestas en el Ejemplo 2 se aplican en el presente ejemplo a las subpoblaciones de exosomas CD63/AnxA3 y CD63/PSMA, procedentes del grupo de sueros, del Ejemplo 1 después de los tratamientos 4) y 5) del Ejemplo 1.

1) Detección con ExoTEST®

A partir de un grupo de sueros de pacientes que padecen cáncer de próstata CaP y de un grupo de donantes sanos (EFS), se realiza la detección de los exosomas circulantes por inmunoafinidad secuencial genérica y específica, mediante la dosificación ELISA sándwich ExoTEST Rab5/CD63. Una toma de ensayo que corresponde a ¼ del volumen de cada fracción de aislamiento exosómica obtenida se dosifica por ExoTEST®.

Las figuras 1 y 2 indican la concentración de exosomas en ng/µl obtenida para los diferentes marcadores ensayados de la segunda inmunopurificación.

La figura 1 pone en evidencia la detección de exosomas séricos en las fracciones siguientes:

- la población CD63/PSMA corresponde a una subpoblación de exosomas procedentes de un procedimiento de doble inmunopurificación según la invención, por aplicación de una etapa a) del procedimiento al grupo de sueros CaP (sujetos que padecen cáncer de próstata) y el grupo de sueros EFS (sujetos sanos), utilizando un anti-ligando dirigido contra el ligando genérico CD63, y después aplicación de una etapa b) a la población así aislada, utilizando un anti-ligando dirigido contra el marcador específico del cáncer de próstata PSMA;
- la población CD63/caveolina corresponde a una subpoblación de exosomas procedentes de un procedimiento de doble inmunopurificación según la invención, por aplicación de una etapa a) del procedimiento al grupo de suero CaP (sujetos que padecen cáncer de próstata), utilizando un anti-ligando dirigido contra el ligando genérico CD63, y después aplicación de una etapa b) a la población así aislada, utilizando un anti-ligando dirigido contra el marcador específico del cáncer de próstata caveolina.

Se detectan unas concentraciones superiores en exosomas para el grupo de sueros CaP del cáncer de próstata en comparación con el grupo de sueros que procede de donantes sanos.

La figura 2 pone en evidencia la detección de exosomas séricas en las fracciones siguientes:

5 Las subpoblaciones CD63/AnxA3, CD63/PSCA y CD63/B7H3 de exosomas se obtienen al final de un procedimiento de doble inmunopurificación según la invención, por aplicación de una etapa a) del procedimiento al grupo de sueros CaP (sujetos que padecen cáncer de próstata), utilizando un anti-ligando dirigido contra el ligando genérico CD63, y después aplicación de una etapa b) a la población así aislada, utilizando un anti-ligando dirigido contra los marcadores específicos AnxA3, PSCA y B7H3, respectivamente.

10 La especificidad del procedimiento de aislamiento de la invención se ha verificado por inmunodosificación sándwich Luminex AnxA3 de la subpoblación CD63/AnxA3. Esta dosificación es muy sensible, posee un límite de detección calculado de 1,1 pg/ml. Mediante esta dosificación, se ha medido una concentración en AnxA3 de 50 pg/ml en la subpoblación CD52/AnxA3.

15 La tabla 2 siguiente da los valores de concentración de los exosomas detectados por ExoTEST® sobre las subpoblaciones CD81/PSMA, CD81/PSCA, CD81/AnxA3:

Tabla 2

Subpoblación	CD81/PSMA	CD81/PSCA	CD81/AnxA3
Concentración en exosomas (ng/μl)	763,44	615,33	690,02

20 2) Detección por NTA

El análisis de las subpoblaciones SP CD63/AnxA3 y SP CD63/PSMA procedentes de grupo de sueros CaP, efectuada por NTA indica la concentración en exosomas así como el tamaño del pico principal y media en las muestras purificadas que aparecen en la tabla 3 siguiente.

25

Tabla 3

SP	Partículas X10 ⁹ /ml	CV%	Tamaño medio de los picos (nm)	CV%	Tamaño del pico máximo (nm)	CV%
CD63/AnxA3	16,4	24	125	1,7	92	4,5
CD63/PSMA	24,6	30	77	3	99	4

30 Se observa una buena reproducibilidad de los perfiles de distribución de tamaño con, para cada uno de los marcadores estudiados, unos tamaños de pico principal comprendido entre 90 y 100 nm y coherentes con el tamaño descrito para los exosomas.

3) Detección por MET

35 Se ha efectuado una caracterización morfológica de las vesículas aisladas por microscopía electrónica a transmisión.

a) Observación de los exosomas fijados sobre las bolas:

40 Se observan directamente las vesículas capturadas sobre las bolas (Dynabeads® M-280 estreptavidina) conjugadas con los anticuerpos anti-AnxA3 y anti-PSMA biotinilados. Así, después de una primera inmunopurificación de los exosomas séricos mediante el anti-CD63, el eluato se incubó con unas bolas recubiertas o bien con el anti-AnxA3, o bien con el anti-PSMA, lavadas y recogidas en PBS.

45 El resultado de esta observación se ilustra mediante los clichés siguientes objeto de la figura 3 (figuras 3A y 3B) para la SP CD63/PSMA y figura 4 (figuras 4A y 4B) para la SP CD63/ AnxA3, sobre los cuales se visualizan la captura de pequeñas vesículas en la superficie de las bolas magnéticas.

b) Observación de los exosomas solos después de la elución:

50

Se ha sometido un volumen de 7,5 ml de los grupos de sueros a una doble inmunopurificación según la invención utilizando los anticuerpos anti-CD63 para la primera etapa y anti-AnxA3 y anti-PSMA, respectivamente, para la segunda etapa. Cada una de las subpoblaciones SP, CD63/AnxA3 y CD63/PSMA se ha sometido a una elución por 2 x 60 μl de tampón glicina 0,2M, pH de 2,5, y después se ha neutralizado.

55

El resultado de esta observación se ilustra en la figura 5 (figuras 5A y 5B). La morfología en “cup-shaped” y el tamaño que varían de 50 a 120 nm de las vesículas observadas son típicos de los exosomas, lo cual demuestra la eficacia del procedimiento de la invención.

Ejemplo 4: Aplicación para la detección de los exosomas inmunopurificados procedentes de sueros individuales según la invención

La técnica de detección con ExoTEST® expuesta en el ejemplo 2 se aplica en el presente ejemplo a las subpoblaciones de exosomas CD63/AnxA3 y CD63/PSMA, procedentes de sueros individuales CaP (sujetos enfermos) 1.1) del ejemplo 1 después de los tratamientos 4) y 5) del ejemplo 1.

La figura 6 indica la concentración en exosomas obtenida para los sueros individuales P1 y P2 procedentes del grupo de sueros de pacientes que padecen cáncer de próstata. Las poblaciones PSMA, caveolina y AnxA3 de exosomas se obtienen al final de un procedimiento de doble inmunopurificación según la invención, por aplicación de una etapa a) del procedimiento a los sueros P1 y P2, utilizando un anti-ligando dirigido contra el ligando genérico CD63, y después aplicación de una etapa b) a la población así aislada, utilizando un anti-ligando dirigido contra los marcadores específicos PSMA, caveolina y AnxA3, respectivamente.

Ejemplo 5: Aplicación para la detección de los exosomas inmunopurificados procedentes de un grupo de plasmas según la invención

Las técnicas de detección con ExoTEST® y por NTA expuestas en el ejemplo 2 se aplican en el presente ejemplo en subpoblaciones de exosomas CD63/AnxA3 y CD63/PSMA, procedentes del grupo de plasmas CaP (sujetos enfermos) y del grupo de plasmas EFS /sujetos sanos), del ejemplo 1 después de los tratamientos 4) y 5) del ejemplo 1.

1) Detección con ExoTEST®

A partir de un grupo de plasmas de pacientes que padecen cáncer de próstata y de un grupo de donantes sanos (EFS), la detección de los exosomas circulantes aislados por el procedimiento de la invención se realiza mediante la dosificación ELISA sándwich ExoTEST Rab5/CD63. Las diferentes fracciones de aislamiento exosómico obtenidas se diluyen al ½ en PBS1X y dosificadas por ExoTEST.

La figura 7 indica la concentración de exosomas en ng/µl obtenida en las fracciones siguientes:

- la población CD63/PSMA corresponde a una subpoblación de exosomas procedentes de un procedimiento de doble inmunopurificación según la invención, por aplicación de una etapa a) del procedimiento al grupo de plasmas CaP (sujetos que padecen cáncer de próstata) y el grupo de plasmas EFS (sujetos sanos), utilizando un anti-ligando dirigido contra el ligando genérico CD63, y después la aplicación de una etapa b) a la población así aislada, utilizando un anti-ligando dirigido contra el marcador específico del cáncer de próstata PSMA;
- la población CD63/AnxA3 corresponde a una subpoblación de exosomas procedentes de un procedimiento de doble inmunopurificación según la invención, por aplicación de una etapa a) del procedimiento al grupo de plasmas CaP (sujetos que padecen cáncer de próstata) y el grupo de plasmas EFS (sujetos sanos), utilizando un anti-ligando dirigido contra el ligando genérico CD63, y después la aplicación de una etapa b) a la población así aislada, utilizando un anti-ligando dirigido contra el marcador específico del cáncer de próstata anexina A3;

Se observan unas concentraciones superiores en exosomas para el grupo de plasmas CaP en comparación con el grupo de plasmas de los donantes sanos para el marcador PSMA.

De manera interesante, se observa una diferencia de concentración en exosomas entre el grupo de plasmas de donantes sanos y el del grupo de plasmas CaP para el marcador AnxA3, siendo la primera superior a la segunda.

2) Detección por NTA

El análisis de SP CD63/AnxA3 y CD63/PSMA procedentes de grupo de plasmas CaP y de grupo de plasmas EFS, efectuado por NTA indica la concentración en exosomas así como el tamaño del pico principal y medio en las muestras purificadas que aparecen en la tabla 4 siguiente.

Tabla 4

SP	Partículas X10 ⁹ /ml	CV%	Tamaño medio de los picos (nm)	CV%	Tamaño del pico máximo (nm)	CV%
CD63/AnxA3 EFS	3,1	10,8	140	32,4	108	14,1
CD63/AnxA3 CaP	2,7	12,8	124	2,8	85	7,3
CD63/PSMA EFS	8,5	34,8	163	19,9	122	15,5
CD63/PSMA CaP	14,2	15,9	176	7,5	133	14,4

El tamaño de los picos mayoritarios es coherente con el tamaño descrito de los exosomas.

5 Las figuras 8 y 9 ilustran una comparación entre las dos técnicas ExoTEST y NTA, para respectivamente las subpoblaciones SP CD63/AnxA3 y SP CD63/PSMA. Se observa una adecuación entre estas dos técnicas de detección.

Ejemplo 6: Aplicación a la detección de los exosomas inmunopurificadas procedentes de plasmas según la invención

10 La técnica de detección con ExoTEST® expuesta en el Ejemplo 2 se aplica en el presente ejemplo a las subpoblaciones de exosomas CD63/PSMA, procedentes de plasmas de pacientes que padecen cáncer de próstata y de sujetos sanos, respectivamente.

15 La figura 10 indica la concentración media en exosomas de las subpoblaciones SP CD63/PSMA aisladas para los grupos de pacientes sanos (n=3) y para los grupos de pacientes que padecen cáncer de próstata (n=6), respectivamente. Se observa un nivel de exosomas plasmáticos más elevado en los pacientes enfermos que en los sujetos sanos.

Ejemplo 7: Aplicación a la detección de los exosomas inmunopurificados procedentes de un grupo de orinas según la invención

20 Las fracciones inmunopurificadas anteriores se dosifican por dosificación ELISA ExoTEST. Los resultados se presentan en la tabla 5 siguiente.

25 Tabla 5

	CD63/PSMA
IP2	ELISA ExoTest [exosomas] ng/ml
Grupo Orina HBP	513
Grupo Orina CaP	1366

30 Una concentración dos veces superior en exosomas se detecta para el grupo CaP frente al grupo HBP. Unos exosomas urinarios que presentan el marcador prostático de superficie PSMA son por lo tanto dos veces más numerosos en la orina de pacientes que padecen CaP.

Ejemplo 8: Dosificación específica del marcador antígeno específico de próstata total (tPSA)

35 Se ha dosificado el tPSA en los grupos de sueros CaP y EFS así como en las fracciones exosómicas purificadas con el fin de verificar la calidad de las fracciones exosómicas obtenidas después de la doble inmunopurificación.

40 Para ello, se ha realizado una adaptación de la dosificación sándwich tPSA VIDAS que utiliza en la captura el anticuerpo monoclonal 12C11C3 y en la detección el anticuerpo 11E5C6 biotinilado, en formato Luminex. La técnica permite, a partir de microesferas en suspensión, detectar y cuantificar varias biomoléculas en una misma muestra de bajo volumen con una sensibilidad elevada.

45 Unas bolas magnéticas de 5,6 µm de diámetro, que presentan una dirección espectral basada en su contenido rojo/infrarrojo han servido de soporte para la dosificación. Una cantidad de 9 µg de anticuerpo de captura 12C11C3 se ha injertado en la superficie de las bolas magnéticas (Bio-Rad, Bio-Plex Pro Magnetic COOH Beads Amine Coupling Kit) según las instrucciones del proveedor.

50 Para la dosificación de los grupos séricos y plasmáticos, las muestras se diluyen al 1/5° en tampón TBST. Para las fracciones exosómicas purificadas, la dosificación de tPSA se realiza con 1/8 del volumen de la fracción exosómica eluida.

55 Las muestras se incuban en placas de 96 pocillos (Bio-Rad, 171025001) en presencia de 5000 bolas acopladas al anticuerpo de captura durante 2 horas a 37°C, 650 rpm, y fuera de la luz. Entre cada etapa, los pocillos se lavan 3 veces en TBST 0,05%. La detección se realiza con 100 µl de anticuerpos secundarios 11E5C6 biotinilados a la concentración de 0,005 µg/ml durante 1 hora a 37°C bajo agitación. La revelación del complejo inmune tiene lugar por incubación de 100 µl de solución de estreptavidina acoplada a la ficoeritrina (RPE) a la concentración de 2 µg/ml (Dako) durante 30 minutos a 37°C bajo agitación. La etapa final consiste en resuspender los complejos inmunes en 100 µl de TBS para un análisis de fluorimetría de flujo efectuada por el autómata Bio-Plex 200 (Bio-Rad). Cada bola sufrirá una doble excitación por un láser rojo (633 nm) para su identificación y un láser verde (532 nm) para la cuantificación del analito por medición del conjugado fluorescente.

El límite de detección analítica de la dosificación tPSA desarrollada sobre Luminex alcanza una excelente sensibilidad de 1,1 pg/ml de tPSA.

Los resultados de la dosificación en el suero CaP se presentan en la tabla 6 siguiente.

5

Tabla 6

	[tPSA] en ng/ml		
	Grupo sueros	Fracción purificada IP2	
		PSMA	AnxA3
CaP	2,98	0	0

10 Los resultados de la dosificación Luminex tPSA muestran que el marcador tPSA sérico se detecta a la concentración de 2,98 ng/ml en el grupo de suero CaP. Después de la purificación del grupo sérico, el marcador tPSA no se detecta, se detecta muy poco, en las fracciones exosómicas purificadas. Este resultado indica la calidad de la fracción exosómica purificada obtenida por el procedimiento de la invención, con la eliminación del marcador proteico soluble tPSA de las preparaciones purificadas.

15 **Ejemplo 9: Repetitividad y reproducibilidad del procedimiento**

La repetitividad, es decir la variabilidad entre series, y la reproducibilidad, es decir la variabilidad entre series y entre días, del procedimiento de aislamiento de la invención se han estudiado durante 4 días.

20 El ensayo se realiza para el aislamiento de subpoblaciones CD63/AnxA3 y CD63/PSMA de exosomas a partir de un grupo de sueros de pacientes enfermos. La inmunodetección de los exosomas se efectúa por ExoTEST y los resultados aparecen en la tabla 7 siguiente.

Tabla 7

25

Ligando	Estadística	Repetitividad	Reproducibilidad
AnxA3	Desviación estándar	17,95	27,78
	CV (%)	4,87	7,54
PSMA	Desviación estándar	129,89	94,80
	CV (%)	24,63	18,62

Se observa para el ligando AnxA3 una muy buena repetitividad, con un CV del 4,87%. Para este marcador, la reproducibilidad entre días indica también un CV muy bueno del 7,5%.

30 Se observan variaciones un poco más importantes pero perfectamente aceptables para el marcador específico PSMA.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de aislamiento de exosomas a partir de un líquido biológico, caracterizado por que comprende por lo menos dos etapas sucesivas de purificación por afinidad siguientes:
- 10 a) una primera etapa que utiliza por lo menos un anti-ligando específico de un ligando genérico llevado por los exosomas, para obtener una población P de exosomas, separándose dichos exosomas de dicho anti-ligando y siendo dicho ligando llevado por dicha población P de exosomas, y
- 15 b) una segunda etapa, aplicada a la población P de exosomas, que utiliza por lo menos un anti-ligando específico de un ligando característico de una subpoblación SP de exosomas, para obtener dicha subpoblación SP de exosomas, separándose dichos exosomas de dicho anti-ligando o no.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la segunda etapa utiliza por lo menos dos anti-ligandos, siendo cada uno de ellos específico de un ligando respectivamente característico de una subpoblación SP1 y SP2.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la primera etapa utiliza por lo menos dos anti-ligandos, siendo cada uno de ellos específico de un ligando respectivamente genérico de los exosomas.
- 30 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende por lo menos una tercera etapa c) de purificación por afinidad, aplicándose esta etapa a dicha subpoblación SP y utilizando por lo menos un anti-ligando específico de un ligando característico de una subpoblación SP' de exosomas, incluyéndose la subpoblación SP' en la subpoblación SP, para obtener dicha subpoblación SP'.
- 35 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que la tercera etapa utiliza por lo menos dos anti-ligandos, siendo cada uno de ellos específico de un ligando respectivamente característico de una subpoblación SP'1 y SP'2.
- 40 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el ligando genérico de los exosomas y/o el o los ligandos característicos de una subpoblación SP o SP' de exosomas se seleccionan de entre los ligandos presentes en la superficie de los exosomas.
- 45 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la o las subpoblaciones de exosomas son unas subpoblaciones de exosomas que proceden de un mismo órgano.
- 50 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la o las subpoblaciones de exosomas son unas subpoblaciones de exosomas que proceden de un mismo tejido.
- 55 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la o las subpoblaciones de exosomas son unas subpoblaciones de exosomas que proceden de un mismo tipo de células.
- 60 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que la o las subpoblaciones de exosomas son unas subpoblaciones de exosomas que proceden de un tejido o de células sanas o de un tejido o de células anormales.
- 65 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que el tejido o las células anormales son tumorales.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que el ligando es característico de una subpoblación SP de exosomas que proceden de la próstata.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que, previamente a la primera etapa a), el líquido biológico es tratado mediante una etapa de separación física, por tamaño, que permite aislar una fracción del líquido biológico que no contiene moléculas o partículas de un tamaño superior a 800 nm, preferentemente a 500 nm, que será sometida a la primera etapa a).
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que, al final de la etapa a), los exosomas se separan del anti-ligando por elución.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que, al final de la etapa b), los exosomas se separan del anti-ligando por elución.
16. Utilización de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para caracterizar y/o cuantificar unos exosomas.

17. Utilización según la reivindicación 16, para el diagnóstico y el pronóstico de una patología y/o de la fase clínica de una patología, y para el seguimiento de la evolución de una patología, tratada o no, o para el seguimiento de la eficacia del tratamiento de una patología, en un ser humano o animal.

5 18. Utilización según la reivindicación 17, caracterizada por que la patología es crónica o aguda, de origen infeccioso o no infeccioso.

19. Utilización según la reivindicación 17 o 18, caracterizada por que el tratamiento es un tratamiento medicamentoso, una radioterapia o un injerto.

10

Figura 1

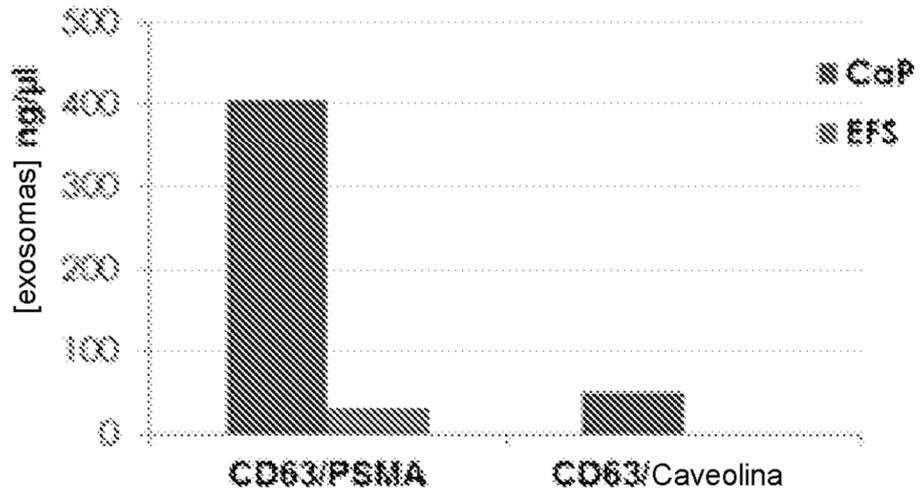


Figura 2

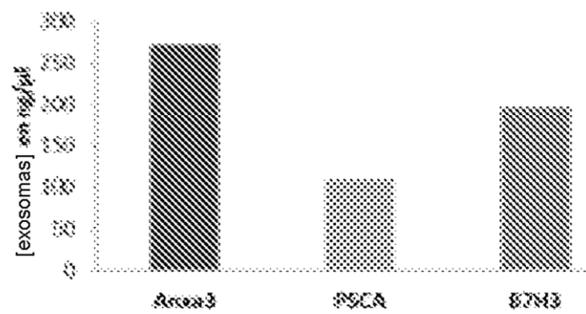


Figura 3

Figura 3A

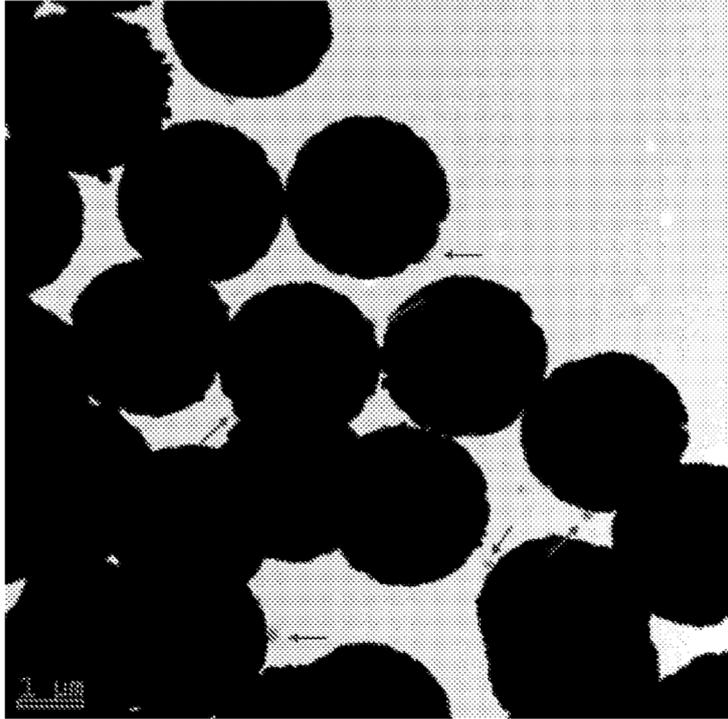


Figura 3B

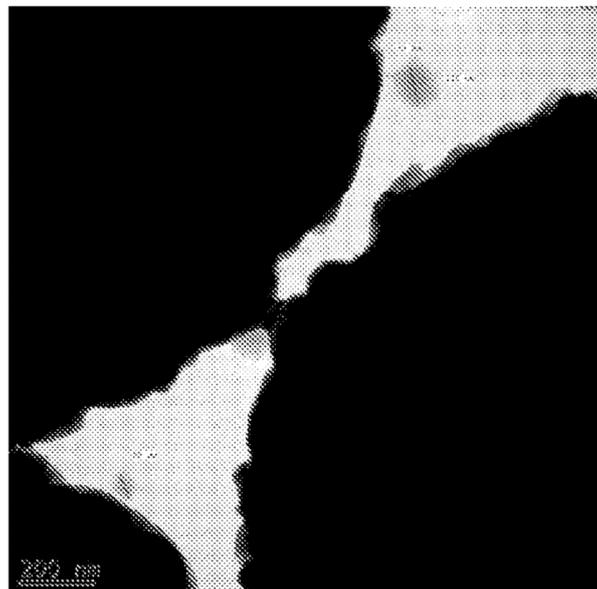


Figura 4

Figura 4A

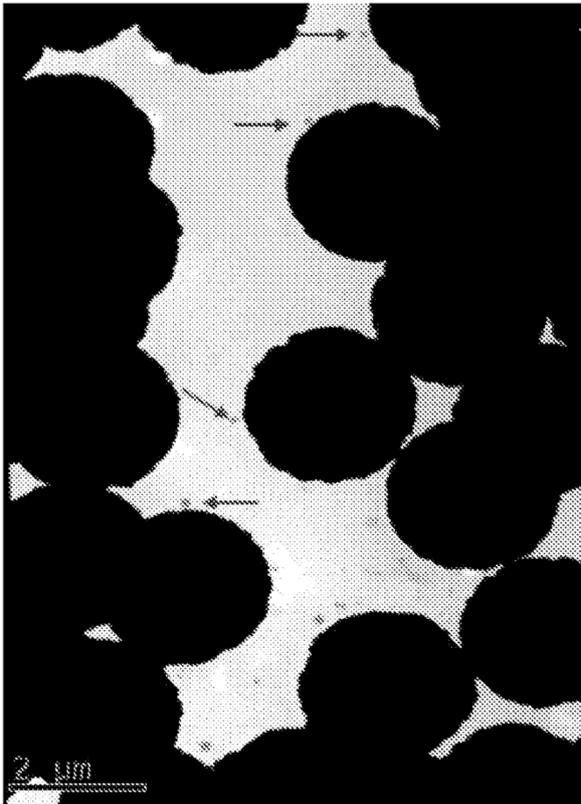


Figura 4B

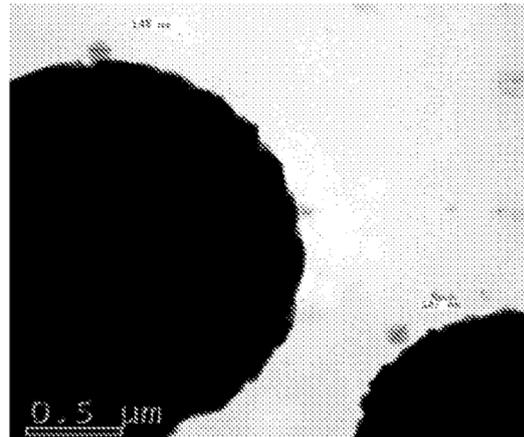


Figura 5

Figura 5A

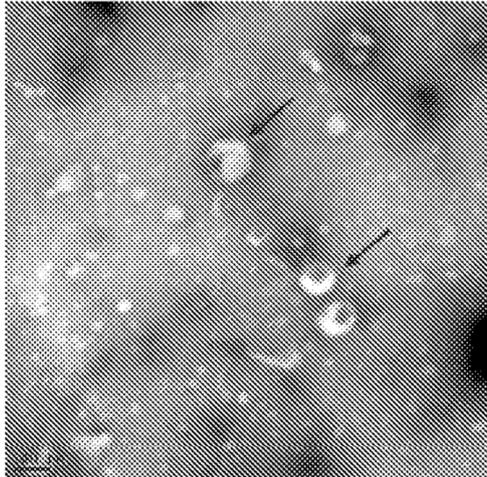


Figura 5B

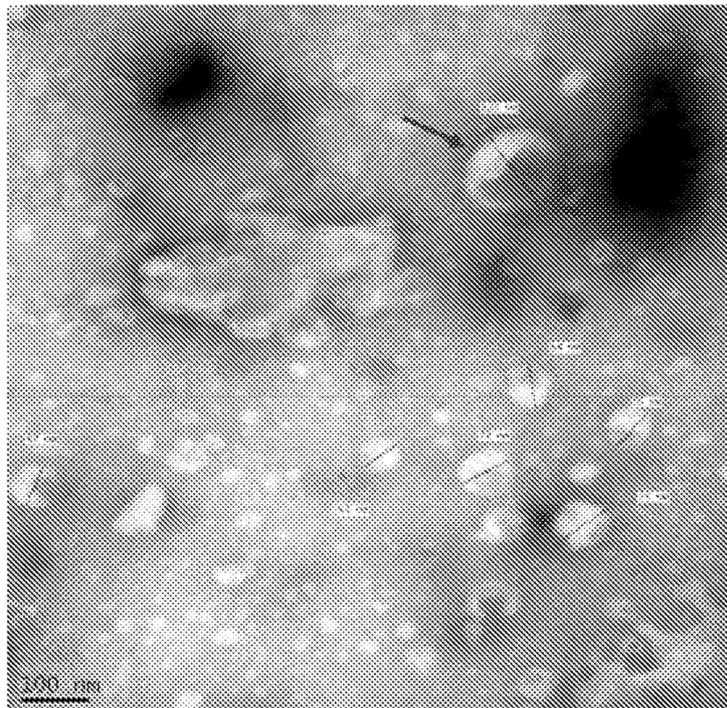


Figura 6

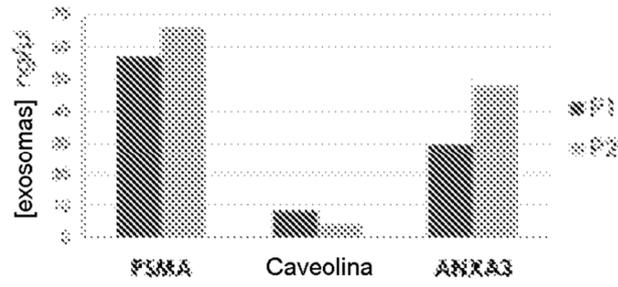


Figura 7

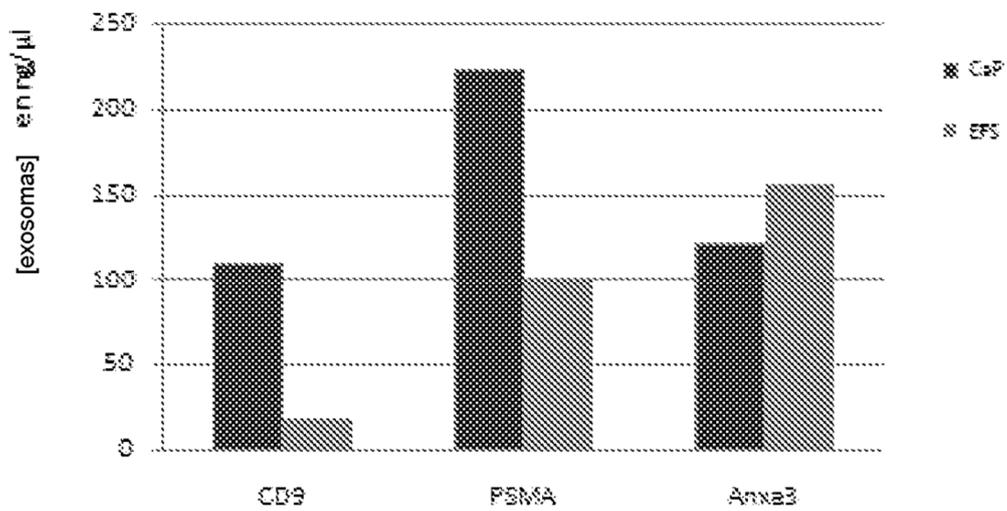


Figura 8

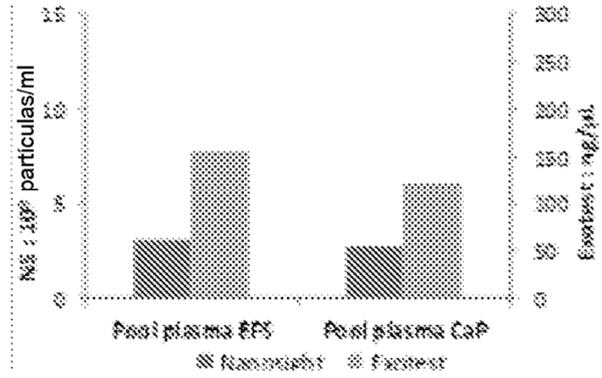


Figura 9

Detección de exomas

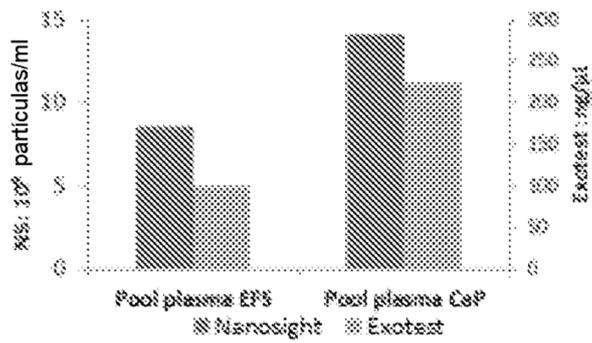


Figura 10

