

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 375**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2015 PCT/EP2015/064256**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15197692**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2015 E 15739526 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3161136**

54 Título: **Procedimiento para el enriquecimiento de microvesículas**

30 Prioridad:

**24.06.2014 DE 102014212126**

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

**15.11.2019**

73 Titular/es:

**AJ INNUSCREEN GMBH (100.0%)  
Robert-Roessle-Strasse 10  
13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**HILLEBRAND, TIMO**

74 Agente/Representante:

**ÁLVAREZ LÓPEZ, Sonia**

**ES 2 731 375 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 para el enriquecimiento de microvesículas

- 5 El objeto de la presente invención consiste en un procedimiento para el enriquecimiento de microvesículas (exosomas) desde una muestra, para un análisis subsiguiente de esas partículas, así como para la liberación y la extracción de los ácidos nucleicos incluidos en los exosomas, en particular del ARN.

Es conocido el hecho de que en los líquidos corporales libres de células se encuentran los así llamados ácidos nucleicos de circulación libre. En este caso se trata de ADN, así como de ARN, que puede aislarse desde esas muestras. Si el así llamado ADN libre de células, de circulación libre, realmente se trata de ADN libre, entonces debe partirse del hecho de que el ARN aislado no es ARN de circulación libre, ya que las ribonucleasas que se presentan en líquidos corporales provocarían muy rápido una degradación masiva del ARN libre. Por lo tanto, se parte del hecho de que el ARN se encuentra en los así llamados exosomas.

15 Los exosomas se tratan de vesículas que son liberadas desde una célula a su entorno. Su tamaño se ubica aproximadamente entre 30 y 90 nm.

Los exosomas se originan en un proceso de varias etapas y finalmente, después de un estrechamiento de la membrana celular, en un proceso de expulsión, son liberados hacia el entorno de la célula. Los exosomas contienen ácidos nucleicos, en particular ARN y proteínas, en una composición variable. Los mismos sirven como vehículos de transporte, para la expulsión de componentes celulares y, según conocimientos recientes, sirven ante todo para la comunicación celular. En este contexto, los exosomas cobran una importancia cada vez mayor para el estudio de distintas enfermedades (cáncer, infecciones virales, enfermedades autoinmunes, y muchas otras). Se considera especialmente relevante el estudio de micro-ARN, así como el ARN mensajero incluido en los exosomas, ya que esos ácidos nucleicos, mediante los exosomas, son transportados desde las células tumorales hacia las células receptoras, y parecen tener una importancia decisiva para el crecimiento del tumor. Como muestras iniciales importantes se consideran por ejemplo líquidos corporales, como el plasma sanguíneo o el suero, o también la orina. No obstante, para otros objetivos de estudio se utilizan también otras clases de muestras (por ejemplo, muestras de leche). Se considera un problema que la cantidad de los exosomas que se encuentran presentes en esas muestras en general es muy reducida, de manera que se consideraría deseable trabajar con volúmenes de muestras más grandes.

Actualmente sólo existen pocos procedimientos que permitan enriquecer exosomas desde una muestra o aislarlos, así como a continuación extraer los ácidos nucleicos contenidos en los exosomas. Se encuentra muy difundida la aplicación de técnicas de ultra-centrifugación. De este modo se produce la concentración de exosomas en el fondo del recipiente de reacción. Ese método está vinculado a una centrifugadora y, además, llevan mucho tiempo y no son adecuados para el diagnóstico de rutina. Se utiliza además la técnica de la ultrafiltración. También ese método implica mucho tiempo y es muy costoso. Procedimientos alternativos consisten en una inmunoprecipitación de los exosomas mediante una inmunoplatea o mediante inmuno-lechos. También esa forma de enriquecimiento de los exosomas lleva mucho tiempo y, debido a los reactivos que deben utilizarse, es propensa a errores, así como es costosa. Además, en el caso de esa tecnología pueden utilizarse solamente 200 - 500 ml de muestra.

Al estado de la técnica pertenece también la primera publicación de la solicitud WO 2009/135936 A1. El objeto de dicho documento consiste en un procedimiento simple para el enriquecimiento de biomoléculas (por ejemplo, proteínas o ácidos nucleicos) desde una muestra, para el aislamiento subsiguiente de las biomoléculas y eventualmente para la detección sensible. El procedimiento comprende los siguientes pasos:

- a) adición de una solución acuosa de una sal de un ácido poliurónico a la muestra
- b) adición de una sustancia que induce la formación de gel/la formación de gránulos
- 50 c) mezclado de la muestra e incubación
- d) centrifugación de la muestra y eliminación del líquido sobrenadante
- e) disolución de los gránulos o de los trozos de gel
- f) aislamiento de las biomoléculas, de manera conocida.

55 Como sal preferente se utiliza alginato.

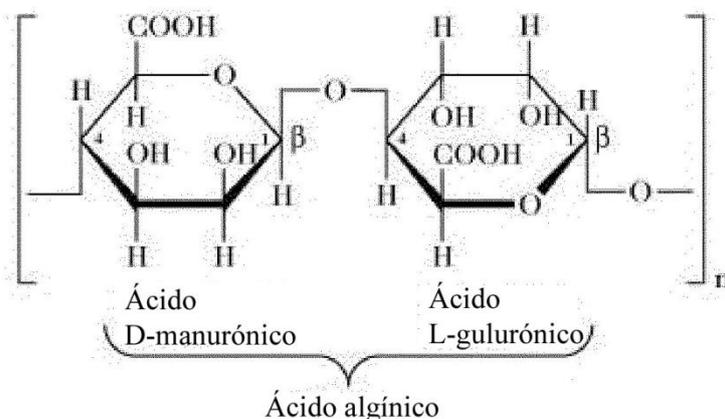
El aislamiento y el enriquecimiento de biomoléculas mediante una sal de un ácido poliurónico y formación de gel subsiguiente, por tanto, en principio es conocido. En cambio, no es conocido el hecho de que, de este modo, también exosomas puedan enriquecerse y aislarse.

60 Por lo tanto, el objeto de presente invención consiste en posibilitar un enriquecimiento de exosomas mediante un procedimiento rápido y simple, en particular también para poder trabajar con muestras de gran volumen. De este modo,

el procedimiento debe ser compatible con un método simple y rápido, subsiguiente, para el aislamiento de ARN, el cual se encuentra en los exosomas.

El objeto se soluciona según las características de las reivindicaciones. La invención representa una invención de selección, a saber, el enriquecimiento y el aislamiento de las biomoléculas especiales de los exosomas mediante un procedimiento que ya era conocido para el enriquecimiento y el aislamiento de otras biomoléculas. Sin embargo, esta invención es completamente llamativa y no está sugerida por el conocimiento del documento WO 2009/135936 A1 conocido. Si bien es conocido el hecho de aislar ácidos nucleicos, virus o proteínas del modo mencionado, fue completamente llamativo el hecho de que los exosomas también pueden aislarse según ese procedimiento.

De manera llamativa se constató que determinados derivados de polisacáridos pueden emplearse para el enriquecimiento de exosomas en muestras líquidas, donde ese paso de enriquecimiento es compatible con un procedimiento eficiente del aislamiento del ARN incluido en los exosomas. Los derivados de polisacáridos se tratan de sales de ácidos poliurónicos. Se consideran especialmente adecuados los así llamados alginatos de los ácidos alginicos. Los alginatos se tratan de elementos que proporcionan una estructura en las algas pardas. El alginato es un polisacárido que se constituye en base a ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) 1,4 unido y ácido  $\beta$ -D-manurónico (M).



Se forman áreas homopoliméricas en las que se encuentra presente como bloque ácido manurónico o ácido gulurónico.

Los alginatos se utilizan en la industria de los alimentos, así como en la industria farmacéutica y la industria cosmética, por ejemplo, como gelificantes en la industria de los alimentos, como agentes de estrechamiento para los productos textiles, para producir papeles fotográficos o en la práctica médica dental para producir moldeados de dientes y mandíbulas.

El alginato también es un biomaterial importante. A través del encapsulado de tejido celular humano con alginato es posible incorporar material ajeno al cuerpo, como por ejemplo células emisoras, sin que las mismas puedan ser detectadas por el sistema inmune y puedan ser eliminadas. Sin embargo, no hay evidencias de que los alginatos puedan ser utilizados como materiales para el enriquecimiento de exosomas para un aislamiento subsiguiente, y una depuración de ARN incluido.

En el procedimiento según la invención se aprovecha la capacidad conocida de los alginatos, de gelificarse en soluciones con contenido de calcio reducido y de formar los así llamados hidrogeles. La causa de la gelificación se funda en la incorporación de iones de calcio en la estructura en forma de zig-zag de los bloques G-G. Sobre esa zona se extiende entonces la estructura en forma de zig-zag de otra molécula de alginato. Debido a esto se conforman estructuras tridimensionales. La conformación de geles tiene lugar también en combinación con ácidos fuertes. Además, las estructuras de gel producidas pueden también desintegrarse nuevamente, de manera específica.

Mediante el aprovechamiento de la conformación de geles de alginato, el enriquecimiento de exosomas para un análisis de diagnóstico molecular subsiguiente, desde una muestra líquida, en particular desde las muestras problemáticas de gran volumen, puede realizarse de forma extremadamente sencilla y rápida, mediante el procedimiento según la invención. El procedimiento no es riesgoso en cuanto a la utilización de productos químicos y no se necesita un equipamiento especial.

El procedimiento según la invención para el enriquecimiento de exosomas desde una muestra, para un aislamiento

subsiguiente del ARN, puede desarrollarse del siguiente modo.

1. Adición de una solución de alginato acuosa a la muestra
  2. Adición de una solución acuosa que induce la formación de gel/la formación de gránulos (por ejemplo, la utilización de una solución de cloruro de calcio 1 M o de una solución de ácido clorhídrico al 1 %)
  3. Mezclado de la muestra e incubación a temperatura ambiente
  4. Centrifugación de la muestra y eliminación del líquido sobrenadante
  5. Disolución de los gránulos o trozos de gel y aislamiento subsiguiente del ARN, de manera conocida
- 10 Las concentraciones de alginato y de reactivo utilizadas para el procedimiento según la invención son extremadamente reducidas. De ello resulta el hecho de que el proceso de la gelificación no tiene lugar en absoluto de forma visible, tal como se conoce por la industria de los alimentos o como se describe lo mencionado para cualquier aplicación de los alginatos. Después de la centrifugación, el líquido sobrenadante se retira. En el fondo del recipiente de reacción puede observarse un trozo de gel pequeño o un gránulo; ese trozo de gel/gránulo contiene los exosomas concentrados a partir de la muestra. A continuación, ese trozo de gel/gránulo se disuelve nuevamente mediante la adición de una solución que desintegra la estructura del gel. En el último paso, por tanto, tiene lugar el aislamiento del ARN desde la muestra concentrada, con métodos conocidos. El procedimiento es extremadamente sencillo en cuanto a su ejecución. El periodo de incubación y la centrifugación subsiguiente pueden finalizarse dentro de 5 - 10 minutos. La disolución del trozo de gel tiene lugar sin problemas. No se necesita una ultracentrifugación, de manera que puede trabajarse con centrifugadoras de mesa estándar normales. El volumen de las muestras iniciales líquidas puede seleccionarse de cualquier modo deseado, lo cual permite un espectro de aplicación muy amplio. Por ejemplo, puede trabajarse con muestras de 500 µl, o sin embargo también de 10 ml. De este modo se proporciona un margen de aplicación extremadamente amplio.
- 25 A través del procedimiento según la invención, el volumen inicial de la muestra se reduce al trozo de gel/gránulo producido en el proceso según la invención, el cual sin problemas puede trabajarse posteriormente en el así llamado mini - formato de aislamiento de ARN.

30 Para el procedimiento según la invención, por ejemplo, se combinan una solución de alginato acuosa y una solución acuosa, que contiene sales de cationes divalentes, así como polivalentes (por ejemplo, cloruro de calcio o cloruro de aluminio). Del mismo modo pueden combinarse una solución de alginato acuosa y un ácido débil (ácido clorhídrico). La desintegración de la estructura de gel puede tener lugar mediante una solución tampón que contiene un agente quelante (EDTA) o sin embargo también mediante la adición de una solución en base a citrato de sodio dihidratado. Del mismo modo, el trozo de gel/gránulo puede disolverse en un tampón de sal hiposalina (por ejemplo 10 mM Tris-HCl), a un valor pH básico.

40 Una forma de realización especialmente eficiente aprovecha el efecto observado de que la disolución de los geles de alginato producidos es posible de modo excelente también con sustancias tampón que se utilizan para el aislamiento de ARN. De este modo, los así llamados tampones caotrópicos, por ejemplo, en base a sales de guanidinio, desintegran los geles de alginato de un modo general, independientemente de mediante qué procedimiento fue conformado el gel de alginato. Del mismo modo, un aislamiento de ARN conocido por el experto, mediante la utilización de una solución monofásica en base a isotiocianato de guanidina/fenol, puede utilizarse para un aislamiento de ARN posterior al enriquecimiento. Las publicaciones especializadas sobre los alginatos y sus ámbitos de aplicación no conducen a un efecto observado de esa clase.

45 En base a esa observación, el gel de alginato puede disolverse entonces con un tampón caotrópico o con una mezcla de solución salina caotrópica y fenol, la cual a continuación puede usarse al mismo tiempo para el proceso del aislamiento del ARN en una función dual. En ese caso preferente, a modo de ejemplo, en una forma de realización, después de la centrifugación y la separación del líquido sobrenadante, el gel de alginato se disuelve con un tampón caotrópico y la carga, a continuación, se pone en contacto con un material soporte mineral. Bajo esas condiciones, el ARN puede fijarse en el material mineral. De manera opcional, al tampón caotrópico pueden añadirse también otros componentes (alcoholes, detergentes o mezclas de alcoholes y detergentes), los cuales pueden reforzar una optimización de la fijación del ARN en el material soporte mineral. El ARN fijado se lava y finalmente se separa otra vez del material soporte. El enriquecimiento de exosomas desde una muestra y el aislamiento subsiguiente del ARN

50 incluido en los exosomas, mediante el procedimiento según la invención, desde una muestra de gran volumen, puede entonces posibilitarse en general ya dentro de aproximadamente 30 minutos. El procedimiento según la invención, de este modo, es marcadamente más sencillo y más rápido que todos los otros procedimientos correspondientes, y también es marcadamente más rápido que las técnicas conocidas hasta el momento. De este modo, el procedimiento según la invención soluciona de modo ideal el planteo del problema descrito.

60 A continuación, la invención se explica en detalle mediante ejemplos de realización, donde los ejemplos de realización no representan una limitación del procedimiento según la invención.

### Ejemplo de realización

Ejemplo de realización: Enriquecimiento de exosomas en base a una muestra de plasma y aislamiento subsiguiente del ARN

El enriquecimiento y el aislamiento subsiguiente del ARN tuvieron lugar desde una muestra de plasma de 5 ml y se realiza del siguiente modo:

- 10 1. Adición de 100 µl de una solución de alginato acuosa (1 %), así como de 500 µl de una solución de cloruro de calcio (1M). Agitación mediante agitador de tipo Vórtex e incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos.
2. Centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos. Separación completa del líquido sobrenadante.

- 15 3. Adición de 5 ml de agua a los gránulos y nueva centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos

A continuación, el ARN se aísla del siguiente modo con un kit comercial para el aislamiento de ARN (innuPREP micro RNA Kit; Analytik Jena AG):

- 20 4. Resuspensión de los gránulos con 600 µl de solución de lisis RL. Adición de 20 µl de proteinasa K e incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos.

- 25 5. Traslado de la carga a una columna de espín de filtrado de ADN para separar el ADN contenido. Centrifugación a 12.000 rpm por 1 minuto. Separación de la columna de filtrado de ADN.

6. Adición de un volumen idéntico de isopropanol al filtrado, mezclado de la muestra y traslado a una columna de espín de filtrado de ARN. Centrifugación a 12.000 rpm durante 1 minuto. El filtrado se desecha.

- 30 7. Segundo lavado de la columna de espín de filtrado con tampones de lavado que contienen etanol (Washing Solution HS y Washing Solution LS). Centrifugación a 12.000 rpm durante 1 minuto. El filtrado se desecha.

8. Secado de la columna de espín de filtrado mediante centrifugación.

- 35 9. La columna de espín de filtrado se coloca en un nuevo recipiente de reacción. Adición de 50 µl de ribonucleasa a agua libre de ribonucleasa y elución del ARN de la columna.

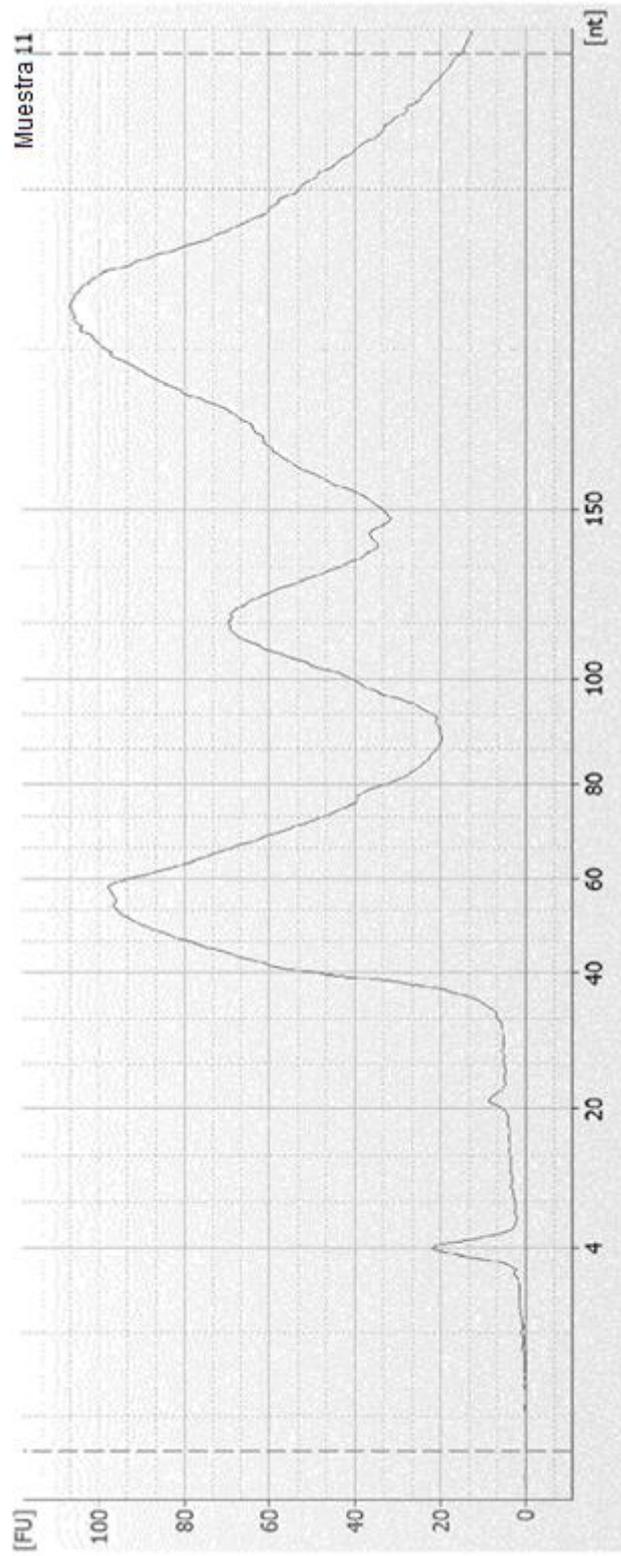
Para comprobar la extracción exitosa del ARN libre de células, a continuación, el ARN aislado se analizó en un bioanalizador Agilent con un kit Small RNA Kit.

- 40 La figura 1 muestra un electroferograma en el cual puede observarse el enriquecimiento de los exosomas.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para el enriquecimiento de microvesículas (exosomas) desde una muestra y extracción/aislamiento subsiguiente de componentes contenidos en esas microvesículas, preferentemente ARN, **caracterizado porque** los siguientes pasos:
- 5 a) adición de una solución acuosa de una sal de un ácido poliurónico a la muestra
- b) adición de una sustancia que induce la formación de gel/la formación de gránulos
- 10 c) mezclado de la muestra e incubación
- d) centrifugación de la muestra y eliminación del líquido sobrenadante
- 15 e) disolución de los gránulos o de los trozos de gel
- f) aislamiento de los componentes, preferentemente del ARN, de manera conocida.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** los componentes se tratan de ARN o
- 20 de proteínas.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** como sales de un ácido poliurónico se utilizan alginatos.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** como sustancia que induce la formación de gel/la formación de gránulos del ácido poliurónico se utilizan ácidos y/o soluciones que contienen iones de calcio.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado porque** la concentración de los iones de calcio
- 30 - solución asciende a 1 mol/l.
6. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado porque** como ácido se utiliza un ácido al 1 %.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** para la disolución de los
- 35 gránulos o de los trozos de gel se utilizan álcalis, agentes quelantes, sales caotrópicas o una mezcla de sales caotrópicas con fenol.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado porque** se utilizan EDTA, sales de guanidinio o
- 40 citratos.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** antes del comienzo del procedimiento o después de finalizado el procedimiento se realiza una lisis de la muestra.
10. Utilización de sales del ácido poliurónico en combinación con sustancias que inducen la formación de
- 45 gel/la formación de gránulos del ácido poliurónico, para el enriquecimiento de microvesículas y el aislamiento subsiguiente de ARN contenido en las microvesículas.

**Figura 1**



Concentración de ARN pequeño [pg/  $\mu$ l]: 19.382,1

Concentración de micro-ARN [pg/  $\mu$ l]: 1.035,1

Proporción de micro-ARN/ARN pequeño [%]: 5