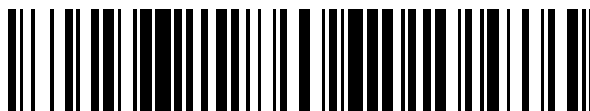


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 569**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**A61K 31/24** (2006.01)

**A61K 31/197** (2006.01)

**C12Q 1/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2013 PCT/US2013/044351**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13184830**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2013 E 13800852 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2859350**

54 Título: **5-ALA para la detección de tumores cerebrales**

30 Prioridad:  
**07.06.2012 US 201261656945 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.12.2019**

73 Titular/es:  
**PIOMA INC. (100.0%)  
1827 South Bayshore Lane  
Miami, FL 33133, US**

72 Inventor/es:  
**EZRIN, ALAN, M.**

74 Agente/Representante:  
**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 734 569 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

5-ALA para la detección de tumores cerebrales

**Campo de la invención**

5 La presente divulgación se refiere a métodos para detectar tumores cerebrales y evaluar la presencia y recaída de tales tumores.

**Antecedentes**

10 La forma más común de cáncer que se origina en el cerebro es la variedad de grado IV más agresiva y avanzada denominada glioblastoma. Los gliomas de grado más bajo a menudo progresan para convertirse más tarde en GBM de grado IV. Actualmente, la diferenciación de la recaída de la enfermedad durante la gestión convencional de esta enfermedad potencialmente mortal es muy compleja y difícil de distinguir de la necrosis tumoral después de la radioterapia, lo que hace que el tratamiento y la definición de riesgo sean muy complejos e inexactos.

15 El régimen de tratamiento convencional actual para GBM incluye extirpación quirúrgica, radiación de haz externo y quimioterapia oral. Sin embargo, la esperanza de vida es normalmente de sólo 12-16 meses debido a los desafíos del tratamiento incluyendo las protrusiones de tipo tentáculo del tumor que son difíciles de extraer y el acceso limitado a fármacos debido a la barrera hematoencefálica. Dada la eficacia limitada del tratamiento y la probabilidad de recaída, es importante monitorizar de cerca a los pacientes tras el tratamiento. En la actualidad, la IRM no puede discriminar adecuadamente entre radionecrosis debido a tratamiento de radiación y recaída del tumor cerebral sólido. Por eso, los profesionales sanitarios se ven obligados a evaluar empíricamente el progreso del paciente mediante métodos como la IRM o deben usar biopsias de tumores para estudios avanzados de obtención de imágenes PET y SPECT. Estos procesos tienen un impacto significativo sobre el bienestar del paciente y el coste de la atención.

20 Los regímenes de tratamiento convencionales y los desafíos para el tratamiento de otros tumores de grado III y grado IV de la OMS son similares.

25 Gliolan, del cual 5-ALA es un principio activo, está aprobado en Europa para su uso como reactivo para permitir la visualización diferencial de tejido tumoral frente a tejido cerebral normal bajo fluorescencia y permitir que el neurocirujano tenga tasas de extirpación más completas. (Valdes y col, J. Biomed. Optics, 16, 116007) Los tumores cerebrales de grado alto (grado III y IV de la OMS, por ejemplo, GBM, gliosarcoma, astrocitoma anaplásico) metabolizan 5-ALA en porfirinas fluorescentes a tasas mayores que el tejido cerebral normal y los tumores cerebrales de grado bajo (grado I y II de la OMS, por ejemplo, meduloblastoma, oligodendroglioma) y por tanto tienen fluorescencia aumentada. Sin embargo, se desconoce si la señal de 5-ALA puede detectarse de manera no invasiva.

30 Por consiguiente, sigue habiendo la necesidad de métodos simples y no invasivos para detectar tumores cerebrales de grado III y IV de la OMS y evaluar la presencia y recaída de tales tumores en una variedad de sujetos.

35 Además, permanece la necesidad general de métodos simples y no invasivos para detectar y evaluar todos los tipos de tumores sólidos y para detectar la respuesta al tratamiento o progresión que da como resultado recaída de la enfermedad.

**Breve resumen**

Con el fin de cumplir las necesidades anteriores, la presente divulgación proporciona los métodos descritos en el presente documento.

40 La presente divulgación describe métodos para detectar tumores cerebrales de grado III y grado IV de la OMS y evaluar la presencia y recaída de tales tumores mediante la cuantificación de biomarcadores enzimáticos o los productos finales en el metabolismo del metabolismo de ácido aminolevulínico asociado con micropartículas liberadas de estos tumores y aisladas de líquidos corporales tras la administración de una composición farmacéutica que tiene ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) como principio activo y detectar 5-ALA asociado con micropartículas derivadas del cerebro.

45 En un aspecto, la divulgación proporciona métodos *in vitro* para detectar un tumor cerebral de grado III o grado IV de la OMS, en el que el método incluye detectar el nivel de conversión de 5-ALA en protoporfirina IX (PPIX) asociado con micropartículas derivadas del cerebro en una muestra de suero o sangre completa de un sujeto al que se le ha administrado una composición farmacéutica que comprende ácido 5-aminolevulínico (5-ALA); detectando de ese modo el tumor cerebral de grado III o grado IV de la OMS.

50 Cuando se ponen en práctica los métodos anteriores, puede detectarse el nivel de conversión de 5-ALA en PPIX midiendo la fluorescencia, midiendo el nivel de un metabolito a lo largo de la ruta de conversión de 5-ALA en PPIX, o midiendo el nivel de una enzima de conversión tal como coproporfirinógeno oxidasa (CPOX).

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, los métodos incluyen una etapa de aislar las micropartículas

derivadas del cerebro a partir de la muestra biológica antes de detectar 5-ALA asociado con las micropartículas derivadas del cerebro.

En otro aspecto, la presente divulgación describe ácido 5-aminolevulínico para su uso en métodos para evaluar la recaída de tumores cerebrales de grado III y grado IV de la OMS, en el que el método incluye las etapas de administrar una composición farmacéutica que comprende ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) a un sujeto; y evaluar la recaída de tumores cerebrales de grado III y grado IV de la OMS detectando 5-ALA asociado con micropartículas derivadas del cerebro en una muestra biológica del sujeto. La recaída de tumores cerebrales de grado III y grado IV de la OMS puede evaluarse detectando la cantidad de 5-ALA asociada con micropartículas derivadas del cerebro. En algunas realizaciones, los métodos detectan la recaída detectando el nivel de conversión de 5-ALA en PPIX usando los métodos descritos para el aspecto anterior.

En determinadas realizaciones de los aspectos anteriores, el sujeto se trató previamente de un tumor cerebral, en particular, un tumor cerebral de grado III o grado IV de la OMS. El tumor tratado puede ser astrocitoma anaplásico, glioblastoma, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico, oligoastrocitoma anaplásico, espongioblastoma polar, astroblastoma o gliomatosis cerebri.

En determinadas realizaciones de todos los aspectos anteriores, la muestra biológica es sangre completa o suero.

La composición farmacéutica usada en determinadas realizaciones de todos los aspectos anteriores puede ser cualquier composición que incluye 5-ALA, pero es normalmente una composición en la que 5-ALA está presente a una concentración de 30 mg/ml en polvo en la composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede administrarse por vía oral, por vía intravenosa, por vía intratecal o por vía intratumoral. En realizaciones preferidas, la composición farmacéutica incluye 5-ALA a una concentración de 20 mg/kg. La composición puede administrarse durante tres, cuatro o cinco horas.

### Descripción de los dibujos

La figura 1A muestra mediciones de cromatografía de exclusión molecular (eje izquierdo, trazo azul, absorbancia a 280 nm) y conductividad (eje derecho, trazo marrón) de suero de control en ddH<sub>2</sub>O. La figura 1B muestra mediciones de cromatografía de exclusión molecular (eje izquierdo, trazo azul, absorbancia a 280 nm) y conductividad (eje derecho, trazo marrón) de suero de control en PBS al 100%.

La figura 2A muestra mediciones de cromatografía de exclusión molecular (eje izquierdo, trazo azul, absorbancia a 280 nm) y conductividad (eje derecho, trazo marrón) de suero del paciente en ddH<sub>2</sub>O. La figura 2B muestra mediciones de cromatografía de exclusión molecular (eje izquierdo, trazo azul, absorbancia a 280 nm) y conductividad (eje derecho, trazo marrón) de suero del paciente en PBS al 10%. La figura 2C muestra mediciones de cromatografía de exclusión molecular (eje izquierdo, trazo azul, absorbancia a 280 nm) y conductividad (eje derecho, trazo marrón) de suero del paciente en PBS al 100%.

Las figuras 3 se refieren a una muestra de paciente con GBM microparticulada típica analizada mediante NTA de dispersión de luz. La figura 3A muestra la concentración y distribución de tamaño de la muestra de micropartículas. La figura 3B muestra un fotograma de vídeo de muestra del análisis NTA con puntos rojos que representan partículas rastreadas. La figura 3C muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas. La figura 3D muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas en un gráfico en 3D.

Las figuras 4 se refieren a una micropartícula fluorescente azul de control analizada mediante NTA en modo de fluorescencia. La figura 4A muestra la concentración y distribución de tamaño de la muestra de micropartículas. La figura 4B muestra un fotograma de vídeo de muestra del análisis NTA con puntos rojos que representan partículas rastreadas. La figura 4C muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas. La figura 4D muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas en un gráfico en 3D con valores menores y valores mayores representados en azul y rojo, respectivamente.

Las figuras 5 se refieren a una muestra de paciente procesada con PBS analizada mediante NTA en modo de fluorescencia, dando la muestra una clara distribución de grandes micropartículas con algunas pequeñas micropartículas y un índice de polidispersidad. La figura 5A muestra la concentración y distribución de tamaño de la muestra de micropartículas. La figura 5B muestra un fotograma de vídeo de muestra del análisis NTA con puntos rojos que representan partículas rastreadas. La figura 5C muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas. La figura 5D muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas en un gráfico en 3D con valores menores y valores mayores representados en azul y rojo, respectivamente.

Las figuras 6 se refieren a una muestra de paciente procesada con PBS analizada mediante NTA en modo de fluorescencia, dando la muestra una clara distribución de grandes micropartículas con algunas pequeñas micropartículas y un índice de polidispersidad. La figura 6A muestra la concentración y distribución de tamaño de la muestra de micropartículas. La figura 6B muestra un fotograma de vídeo de muestra del análisis NTA con puntos azul claro que representan partículas rastreadas de manera fluorescente. La figura 6C muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas. La figura 6D muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas en un gráfico en 3D con valores menores y valores mayores representados en azul y rojo,

respectivamente.

5 Las figuras 7 se refieren a una muestra de paciente procesada con agua analizada mediante NTA en modo de fluorescencia, dando la muestra un gran número de pequeñas micropartículas con una clara distribución de grandes micropartículas y un alto índice de polidispersidad. La figura 7A muestra la concentración y distribución de tamaño de la muestra de micropartículas. La figura 7B muestra un fotograma de vídeo de muestra del análisis NTA con puntos azul claro que representan partículas rastreadas de manera fluorescente. La figura 7C muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas. La figura 7D muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas en un gráfico en 3D con valores menores y valores mayores representados en azul y rojo, respectivamente.

10 Las figuras 8 se refieren a una muestra de paciente procesada con agua analizada mediante NTA en modo de fluorescencia, dando la muestra un gran número de pequeñas micropartículas con una clara distribución de grandes micropartículas y un alto índice de polidispersidad. La figura 8A muestra la concentración y distribución de tamaño de la muestra de micropartículas. La figura 8B muestra un fotograma de vídeo de muestra del análisis NTA con puntos azul claro que representan partículas rastreadas de manera fluorescente. La figura 8C muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas. La figura 8D muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas en un gráfico en 3D con valores menores y valores mayores representados en azul y rojo, respectivamente.

20 Las figuras 9 se refieren a una muestra de paciente procesada con agua analizada mediante NTA en modo de fluorescencia, dando la muestra un gran número de pequeñas micropartículas sin distribución de grandes micropartículas obvia y un alto índice de polidispersidad. La figura 9A muestra la concentración y distribución de tamaño de la muestra de micropartículas. La figura 9B muestra un fotograma de vídeo de muestra del análisis NTA con puntos azul claro que representan partículas rastreadas de manera fluorescente. La figura 9C muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas. La figura 9D muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas en un gráfico en 3D con valores menores y valores mayores representados en azul y rojo, respectivamente.

25 Las figuras 10 se refieren a una muestra de paciente procesada con agua analizada mediante NTA en modo de fluorescencia, dando la muestra un gran número de pequeñas micropartículas sin distribución de grandes micropartículas obvia y un alto índice de polidispersidad. La figura 10A muestra la concentración y distribución de tamaño de la muestra de micropartículas. La figura 10B muestra un fotograma de vídeo de muestra del análisis NTA con puntos azul claro que representan partículas rastreadas de manera fluorescente. La figura 10C muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas. La figura 10D muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas en un gráfico en 3D con valores menores y valores mayores representados en azul y rojo, respectivamente.

30 Las figuras 11 se refieren a una muestra de paciente procesada con agua analizada mediante NTA en modo de fluorescencia, dando la muestra un gran número de pequeñas micropartículas sin distribución de grandes micropartículas obvia y un índice de polidispersidad muy alto. La figura 11A muestra la concentración y distribución de tamaño de la muestra de micropartículas. La figura 11B muestra un fotograma de vídeo de muestra del análisis NTA con puntos rojos que representan partículas rastreadas. La figura 11C muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas. La figura 11D muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas en un gráfico en 3D con valores menores y valores mayores representados en azul y rojo, respectivamente.

35 Las figuras 12 se refieren a una muestra de paciente procesada con agua analizada mediante NTA en modo de fluorescencia, dando la muestra un gran número de pequeñas micropartículas sin distribución de grandes micropartículas obvia y un índice de polidispersidad muy alto. La figura 12A muestra la concentración y distribución de tamaño de la muestra de micropartículas. La figura 12B muestra un fotograma de vídeo de muestra del análisis NTA con puntos rojos que representan partículas rastreadas. La figura 12C muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas. La figura 12D muestra la intensidad relativa y tamaño de muestra de micropartículas en un gráfico en 3D con valores menores y valores mayores representados en azul y rojo, respectivamente.

40 La figura 13 ilustra un resumen de los resultados de cuantificación de micropartículas tras cromatografía de exclusión molecular en agua frente a PBS por medio de NTA de fluorescencia y dispersión de luz. La figura 13A ilustra los resultados de la preparación de PBS. La figura 13B ilustra los resultados de la preparación de agua.

La figura 14 muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo para detectar niveles de PPIX en células U87 no tratadas, células tratadas con 5-ALA durante 4 horas, y células tratadas con 5-ALA durante 24 horas.

La figura 15 es una inmunotransferencia de tipo Western que muestra que CPOX se encuentra en micropartículas derivadas de cáncer.

## 55 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

### Definiciones

El término "5-ALA" tal como se usa en el presente documento se refiere a ácido 5-aminolevulínico.

El término "PPIX" tal como se usa en el presente documento se refiere a protoporfirina IX.

El término "micropartícula" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier vesícula pequeña liberada de cualquier tipo de célula. Las micropartículas incluyen, por ejemplo, exosomas y microvesículas.

- 5 El término "grado III o IV" tal como se usa en el presente documento se refiere a tumores que se han clasificado en la actualidad como que cumplen los criterios para el grado III o IV de la OMS, o que se habrían clasificado como tal si se hubiesen evaluado bajo los criterios de la OMS.

#### Visión global

- 10 La presente divulgación proporciona métodos para detectar un tumor sólido administrando un fármaco anticanceroso usado para visualización guiada por fluorescencia de células tumorales que se localiza preferiblemente en un tumor sólido, y detectar metabolitos del fármaco o enzimas de conversión asociadas con micropartículas derivadas de tumor sólido en una muestra biológica del sujeto.

- 15 Más particularmente, la presente divulgación proporciona métodos para detectar un tumor cerebral de grado III o grado IV de la OMS o para detectar la recaída de tales tumores administrando una composición farmacéutica que tiene ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) como principio activo a un sujeto, y detectar el nivel de la conversión de 5-ALA en PPIX en una muestra biológica del sujeto.

- 20 La presente divulgación también proporciona métodos para detectar un tumor sólido administrando altas dosis de un aminoácido endógeno usado como complemento a la cirugía guiada por fluorescencia para tumores sólidos y detectar metabolitos o enzimas de conversión asociadas con micropartículas derivadas de tumor sólido en una muestra biológica del sujeto.

- La presente divulgación también proporciona métodos para medir el nivel de un fármaco anticanceroso dirigido a un tumor sólido administrando un fármaco anticanceroso que se localiza preferiblemente en un tumor sólido, detectar el nivel de metabolitos asociado con micropartículas derivadas de tumor sólido en una muestra biológica del sujeto; y determinar los niveles de un fármaco anticanceroso en el tumor sólido basándose en el nivel de metabolitos.

- 25 La presente divulgación se basa al menos en parte en el conocimiento de que PPIX, el metabolito de porfirina de 5-ALA, se acumula selectivamente en células tumorales de cerebro y el descubrimiento novedoso de que PPIX se encuentra en micropartículas liberadas de tumores cerebrales de grado III y grado IV de la OMS a concentraciones en equilibrio con las concentraciones intracelulares de PPIX.

#### Métodos para detectar tumores sólidos

- 30 Los métodos descritos en el presente documento detectan tumores cerebrales de grado III y grado IV de la OMS, tales como astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico, oligoastrocitoma anaplásico, espongiblastoma polar, astroblastoma o gliomatosis cerebri.

- 35 La composición farmacéutica que tiene 5-ALA como principio activo puede usarse para detectar tumores cerebrales de grado III y grado IV de la OMS en cualquier sujeto para el que los beneficios de detección de tales tumores usando este método superan cualquier efecto perjudicial potencial de la administración de la composición farmacéutica. En algunas realizaciones, esto incluye sujetos que padecen síntomas indicativos del tumor cerebral en los que otros medios no invasivos para la detección no son adecuados o en los que la detección usando 5-ALA tiene mayor sensibilidad que otros métodos.

- 40 En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a aquellos sujetos que se trataron previamente de al menos un tumor cerebral, en algunos casos un tumor de grado III o grado IV de la OMS. Estos sujetos pueden haberse tratado previamente con cirugía, radioterapia, quimioterapia, una combinación de las mismas, o cualquier otro tratamiento adecuado. En los casos específicos en los que el método se usa en sujetos que se habían tratado previamente de un tumor de grado III o grado IV, el método se usa para detectar la recaída del tumor.

#### Otros métodos

También pueden usarse los métodos en el presente documento para evaluar la recaída de tumores sólidos detectando el nivel de conversión de 5-ALA en PPIX asociada con microvesículas derivadas de tumor usando los métodos descritos en el presente documento.

#### Composiciones farmacéuticas que tienen ácido 5-aminolevulínico como principio activo

- 50 Las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento tienen ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) como principio activo. Las concentraciones de 5-ALA a modo de ejemplo preferidas en la composición farmacéutica incluyen 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40

mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 55 mg/ml y 60 mg/ml en forma de polvo. El 5-ALA puede estar en cualquier forma que es adecuada para su administración a un sujeto, tal como polvo suelto, polvo reconstituido en líquido, comprimido o cápsula.

- 5 En algunas realizaciones, 5-ALA es el único principio activo en las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento. En otras realizaciones, las composiciones contienen otros principios activos que o bien potencian la capacidad de 5-ALA de localizarse específicamente en células de tumores sólidos, o por sí mismas se localizan específicamente en células de tumores sólidos.

En una realización particularmente preferida, la composición farmacéutica que tiene ácido 5-aminolevulínico como principio activo es Gliolan™, donde 5-ALA está presente a una concentración de 30 mg/ml en polvo.

10 Administración de la composición farmacéutica que tiene ácido 5-aminolevulínico como principio activo

15 La composición farmacéutica puede administrarse al sujeto a cualquier dosis que no tenga efectos secundarios significativos y que pueda metabolizar el sujeto de modo que el citosol del tumor esté suficientemente cargado después de un tiempo adecuado para los métodos descritos en el presente documento. Las dosis a modo de ejemplo incluyen 5-ALA a dosis de 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg y 60 mg/kg.

Debido a su conveniencia, se prefiere la administración oral de la composición farmacéutica. Sin embargo, la composición farmacéutica también puede formularse para administrarse por medio de otras vías, tales como por vía intravenosa, por vía intratecal, por vía intratumoral o directamente al espacio quístico de manera intraoperatoria como lavado o infusión.

- 20 La composición farmacéutica se administra suficientemente antes del tiempo deseado para la detección del 5-ALA asociado a micropartícula de modo que el citosol del tumor se carga con 5-ALA y comienza a liberar micropartículas. Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra lo suficientemente pronto para que el contenido de 5-ALA en las micropartículas esté en equilibrio con el 5-ALA en el citosol del tumor. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 24 horas ó 48 horas antes de la detección del 5-ALA asociado a micropartícula. Lo más preferiblemente, el 5-ALA se administra entre dos y cuatro horas antes del acto de detección, lo más preferiblemente, cuatro horas antes.

Muestras biológicas

30 Las muestras biológicas que van a usarse en los métodos descritos en el presente documento incluyen cualquier muestra biológica que contiene micropartículas derivadas de tumor sólido en cantidades suficientes para permitir la detección de 5-ALA. La muestra es sangre completa o suero.

Detección del nivel de conversión de ácido 5-aminolevulínico en PPIX asociado con micropartículas derivadas de tumor sólido

El nivel de conversión de ácido 5-aminolevulínico en PPIX asociado con micropartículas derivadas de tumor sólido puede detectarse usando cualquiera de los métodos conocidos para los expertos en la técnica.

35 *Aislamiento de micropartículas*

40 Una etapa inicial en estos métodos puede incluir aislamiento de micropartículas derivadas de todos los tipos de tejidos usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica que incluyen pero no se limitan a ultracentrifugación, gradiente de sacarosa, purificación por afinidad, filtración, filtración en gel o captura por afinidad dando como resultado aislamiento de micropartículas con marcadores de identidad específicos (por ejemplo, anexina).

La siguiente etapa en estos métodos puede ser aislar una población de micropartículas específicas de tejido.

45 Si se necesitan micropartículas derivadas del cerebro y se espera que la muestra biológica contenga micropartículas derivadas del cerebro, entonces no se requiere etapa específica para aislar o identificar aquellas específicamente derivadas del cerebro. Sin embargo, puesto que 5-ALA se asocia con tejidos distintos del cerebro, si la muestra biológica es una que puede contener micropartículas derivadas de tejidos distintos del cerebro, el método debe incluir una etapa que o bien aísla o bien identifica micropartículas derivadas del cerebro. Los marcadores tumorales específicos de cerebro a modo de ejemplo incluyen EGFRviii, tenascina-C. Los métodos alternativos incluyen usar otros antígenos de anticuerpo encontrados en otros tipos de células para eliminar otros tejidos como fuentes de las micropartículas. Por ejemplo, pueden usarse integrinas RGD (alfa V beta 3) y monoclonales de glicoforina A para distinguir entre micropartículas que se originan de células mieloides frente a células cerebrales frente a células endoteliales. Por ejemplo, las micropartículas que tienen glicoforina se derivan de médula ósea.

*Detección de conversión de 5-ALA en PPIX*

Tras el aislamiento de micropartículas derivadas de tumor, el nivel de conversión de 5-ALA en PPIX asociado con

estas micropartículas puede medirse mediante varios métodos. Un método a modo de ejemplo es la detección del PPIX en el que se metaboliza 5-ALA. Luego puede realizarse detectando fluorescencia del PPIX. Cuando se excita con luz azul (longitud de onda 400-410 nm), PPIX emite una luz roja-violeta. Puede detectarse fluorescencia en el contexto de análisis de rastreo de nanopartículas, por ejemplo, usando el procedimiento de análisis NTA (Nanosight Ltd, Wiltshire, RU), que mide directamente y cuantifica el número total de micropartículas.

Otro método es la detección de las enzimas de conversión de 5-ALA en PPIX incluyendo, pero sin limitarse a protoporfirinógeno oxidasa, ALA deshidratasa, PBG desaminasa, uroporfirinógeno III sintasa, uroporfirinógeno descarboxilasa, y coproporfirinógeno III oxidasa (CPOX). Aún otro método es la detección de productos intermedios o metabolitos clave en la ruta de conversión incluyendo, pero sin limitarse a, porfobilinógeno (PBG), hidroximetilbilano, uroporfirinógeno III, coproporfirinógeno III o protoporfirinógeno.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Detección y caracterización de micropartículas derivadas de sangre de pacientes con GBM tratados con 5-ALA

Este ejemplo demuestra la detección de un fármaco de molécula pequeña tras la administración oral. El fármaco puede absorberse por las células tumorales, modificarse enzimáticamente, y liberarse de nuevo en micropartículas circulantes a las pocas horas de la administración. Además, la modificación enzimática del fármaco de molécula pequeña en las células tumorales era detectable mediante fluorescencia de micropartículas derivadas de sangre.

El fin de este estudio era (i) aislar micropartículas de diámetro nanométrico del suero de pacientes con glioblastoma (GBM) que han tomado Gliolan™ PO, (ii) cuantificar su número usando dos métodos de aislamiento diferentes (ddH<sub>2</sub>O y cromatografía basada en PBS) y (iii) evaluar si estas micropartículas contienen niveles detectables de fluorescencia endógena cuando se excitan con un láser UV.

Gliolan® (clorhidrato de ácido 5-aminolevulínico) está aprobado actualmente en Europa para la visualización intraoperatoria de tejido maligno durante glioma cirugía (grado III y IV de la OMS). El agente se está estudiando actualmente como complemento a la cirugía guiada por fluorescencia para maximizar la extirpación del tumor. El presente estudio se realizó para definir si los tumores cargados con Gliolan® podían liberar micropartículas circulantes que contienen fluoróforo derivado de 5-ALA como herramienta novedosa para marcar, rastrear y cuantificar de manera endógena micropartículas derivadas de tumores.

Se recogieron muestras de suero de pacientes con GBM (n=19, especificidad de tumor oral, resultado quirúrgico potenciado) que se someten a cirugía antes de, y en diferentes puntos de tiempo hasta 48 horas tras la administración oral con Gliolan® (20 mg/kg). Se aislaron micropartículas mediante filtración en gel y se caracterizaron usando análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) y BCA para determinar el tamaño/número de micropartículas y el contenido de proteínas. Se evaluó la fluorescencia endógena de las micropartículas usando NTA en el modo de detección por fluorescencia ( $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} > 430 \text{ nm}$ ). Los resultados sugieren que las micropartículas (moda del diámetro de 50-100 nm) están presentes a una concentración de  $\sim 10^{11}$  partículas/ml de suero (contenido de proteínas =  $283,5 + 47 \mu\text{g/ml}$  de sueros). Se observaron múltiples fenotipos de micropartículas basándose en el tamaño ( $\sim 20 \text{ nm}$  a  $\sim 200 \text{ nm}$ ) en el modo de fluorescencia lo que implica captura de fluoróforo citosólico durante la biogénesis de al menos dos poblaciones principales de micropartículas liberadas. Las micropartículas de pacientes con GBM a los que se les administró Gliolan® contienen una especie fluorescente que se observa en una fracción pequeña ( $\sim 0,1\%$ ) del número total de micropartículas tras la administración, lo que sugiere que el citosol celular puede circular con micropartículas liberadas. Estos resultados pueden cuantificarse a partir de 4-48 horas.

Esta es la primera prueba de que un fármaco de molécula pequeña tras la dosificación oral puede absorberse por células tumorales, modificarse enzimáticamente y liberarse de nuevo en micropartículas circulantes a las pocas horas de la administración. Esta medición directa de la función tumoral proporciona múltiples implicaciones de desarrollo del fármaco y terapéuticas para este procedimiento de "biopsia líquida" novedoso.

#### Breves materiales y métodos

##### *Aislamiento de micropartículas*

Se recibieron muestras de suero congeladas de pacientes con GBM que se someten a cirugía en dos centros clínicos. Estas muestras de suero se recogieron inmediatamente antes de, y en diferentes puntos de tiempo tras, la administración por vía oral con Gliolan™ (ácido 5-aminolevulínico, 5-ALA).

Se aislaron micropartículas de control (suero AB "sano", Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y de muestras de suero o plasma del paciente usando cromatografía de exclusión molecular con agarosa al 2% (agarosa 2B, ABT, www.abtbeads.com) como fase sólida y ddH<sub>2</sub>O o PBS, pH 7,4 como fase móvil. Se llenó la columna en una columna Bio-Rad Econo (2,5 cm ID x 10 cm) con 100 ml de suspensión de agarosa al 40% en ddH<sub>2</sub>O, dando como resultado una columna de  $\sim 40 \text{ ml}$  de volumen de lecho relleno final y se equilibró durante la noche a 4°C. Se lavó la columna con 300 ml de la fase móvil para equilibrar la columna en el día de experimentación. La muestra de carga

con respecto al volumen de lecho varió entre el 1-2,5% v/v, bien dentro de la guía del fabricante para SEC (< 5% v/v).

5 Se procesaron muestras de suero, plasma y micropartículas en la medida de lo posible en condiciones de ambiente oscuro. Las micropartículas se recogieron y almacenaron en tubos Eppendorf ámbar. Se usó una mezcla de proteína convencional y dextrano azul para definir el volumen vacío (excluido) de la columna (~ 10 ml, donde se predeciría que las micropartículas se eluyen) y del volumen retenido (incluido) de la columna (~ 40 ml).

10 Se procesaron muestras usando un sistema GE AKTA Purifier 10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) con un recolector de fracciones Frac 950 a temperatura ambiente con una serie de diluyente a la velocidad de 2 ml/min mientras se monitoriza la muestra  $A_{280}$  y la conductividad de muestra. Al usar una velocidad de flujo de 2 ml/min y una periodicidad de recogida de 30 segundos, se obtuvieron muestras de elución de 1 ml.

15 El suero de cualquiera de las muestras de estudio o controles sanos humanos (suero AB, Sigma Aldrich) produjo dos picos parcialmente resueltos (n.º 1 y n.º 2) con volúmenes de retención de ~ 10 ml y ~ 40 ml cuando se monitoriza mediante  $A_{280}$ . El suero de múltiples sitios del donante produjo perfiles de elución similares. La mayoría de la conductividad en la muestra se asoció con el último de los dos picos (volumen de elución ~ 40 ml) como puede esperarse de iones, aminoácidos/péptidos cargados y otras especies de bajo peso molecular cuando se eluye de una columna de exclusión molecular de agarosa al 2%. Se usó este parámetro para demarcar el inicio del segundo pico (pico n.º 2).

20 Dado su alto peso molecular, las micropartículas se eluyen en el volumen vacío (excluido) de la columna de agarosa (pico n.º 1). Las primeras fracciones de 7 x 1 ml asociadas con la absorbancia  $A_{280}$  del pico n.º 1 se recogieron, se agruparon, se separaron en alícuotas de 7 x 1 ml para posterior procesamiento y se almacenaron a -80°C. Se analizaron fracciones de un mililitro del pico n.º 1 para cada muestra en el conjunto de estudio para determinar el contenido de proteínas y micropartículas total (véase a continuación).

#### *Contenido de micropartículas y proteínas*

25 Se determinó la concentración de proteína total en la preparación de micropartícula usando un ensayo de proteína de ácido bicinconínico (BCA) Thermo Scientific Micro según las instrucciones del fabricante usando BSA para generar la curva patrón.

#### *Contenido de micropartícula y distribución de tamaño*

30 Se cuantificaron micropartículas, aquellas con un diámetro hidrodinámico medio de entre 50 - 500 nm, usando el método de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) (Nanosight, LM 10 System, NanoSight Ltd. Wiltshire, RU). Este método estocástico de detección de partículas individuales se basa en dispersión de luz de partículas individuales usando la relación de Stokes-Einstein para medir el número promedio (tiempo promedio, campo de visión) y su diámetro hidrodinámico predicho. Están disponibles detalles adicionales en [www.nanosight.com](http://www.nanosight.com) y en Dragovic y col., (2011) y referencias en el mismo.

35 Se calibró el instrumento y se validó con perlas convencionales, desde 50 - 400 nm. Se ejecutaron perlas de cien nm cada día para calibrar el sistema. Las perlas convencionales (100 nm de diámetro) dieron diámetros experimentales de ~ 97 ( $\pm 2$ ) nm en disoluciones acuosas de baja viscosidad (~1 cP) a temperatura ambiente. Se prevé que las micropartículas de interés tengan un diámetro hidrodinámico medio de 50-150 nm.

40 Todas las mediciones se realizaron usando las instrucciones del fabricante, por ejemplo, para seleccionar partículas por trama, duración de la recogida de datos; voltajes de PMT, ajustes de discriminación etc. (véase [www.nanosight.com](http://www.nanosight.com) y Dragovic y col., (2011) (Sizing and phenotyping of celular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis). Nanomedicine: NBM 2011;7:780-788, doi:10.1016/j.nano.2011.04.003) para detalles de los ajustes instrumentales típicos.

45 Durante el transcurso de una lectura de fluorescencia típica (60 segundos), sólo se observarán fluoróforos muy fotoestables dado que las partículas fluorescentes, si las hay, residen en el campo de iluminación durante una fracción considerable del periodo de recogida total. Por tanto, se usó una variante del software de análisis NTA LM10 que analiza datos de fluorescencia recogidos de muestras que se mueven a una velocidad de flujo lenta y constante a través de la célula de observación. Se analizó cada muestra con tres repeticiones de cada medición analítica.

### Resultados

#### 50 *Aislamiento de micropartículas*

Suero de control AB: usando ddH<sub>2</sub>O como fase móvil, la muestra sérica de control AB cargada condujo a dos picos de  $A_{280}$  nm parcialmente resueltos y una elución medible de la conductividad (presuntamente debido a iones, péptidos/metabolitos cargados, etc.) que se correlacionaron casi exclusivamente con el segundo pico de elución ( $V_{\text{pico}} \sim 40$  ml, figura 1A). En cambio, no se asoció conductividad con el pico n.º 1 ( $V_{\text{pico}} \sim 10$  ml) y que está previsto



que contenga las micropartículas de alto peso molecular de interés.

5 Cuando se usa PBS (100% v/v) como fase móvil, las alturas de pico de  $A_{280}$  relativas para el pico n.º 1 frente al pico n.º 2 disminuyen significativamente (~ 90%) en comparación con las observadas usando ddH<sub>2</sub>O como fase móvil (figura 1B). La conductividad asociada con el pico n.º 2 disminuyó de manera transitoria desde la referencia para PBS de ~ 17 mS/cm y que es coherente con la conductividad de pico del pico n.º 2 siendo << 17 mS/cm.

10 Suero de paciente con GBM: se observó un efecto similar, aunque algo menos pronunciado usando suero de pacientes con GBM clínico (figuras 2A-2C). Para este paciente particular, la  $A_{280}$  del pico n.º 1 disminuyó desde ~ 2000 mUA en ddH<sub>2</sub>O hasta ~ 1000 mUA y ~ 800 mUA en PBS al 10% y PBS al 100%, respectivamente. Proporcionalmente, la  $A_{280}$  del pico n.º 2 aumentó desde ~ 1500 mUA, hasta ~ 1900 mUA y hasta ~ 200 mUA, respectivamente. De nuevo, el perfil de conductividad cambió según lo previsto entre condiciones.

15 Usando seis muestras de pacientes, se aislaron micropartículas en ddH<sub>2</sub>O y en PBS tal como se describió anteriormente usando 0,5 ml de suero y se midió posteriormente la concentración de proteína en una (de las siete) alícuotas contenidas en pico n.º 1 (tal como se describe para las figuras 1A-1B, las figuras 2A-2C). Los resultados se muestran en la tabla 1. Para estos 6 pacientes, la concentración de proteína total osciló entre ~200-300 µg/ml en agua y ~5-10 µg/ml en PBS.

Tabla 1: Aislamiento de micropartículas de proteínas a partir de cromatografía de exclusión molecular de 0,5 ml de suero

ID de muestra	[Proteína] (µg/ml)		Razón de [proteína] (PBS/ddH <sub>2</sub> O) (x100)
	ddH <sub>2</sub> O	PBS	
E43/E41	218,9	5,1	2,3
E44/E35	346,8	5,9	1,7
E45/E38	270,6	3,9	1,4
E46/E39	258,3	9,6	3,7
E53/E31	328,5	12	3,7
E54/E32	277,9	7,7	2,8
Media	283,5	7,4	2,6
Mediana	274,3	6,8	2,6
DE	47,0	3,0	1,0

20 Cuando se comparan las dos fases móviles en el procedimiento de aislamiento, se observó una mayor absorbancia de UV tanto para las muestras de control como para las de pacientes cuando las muestras se eluyeron en una fase móvil de agua en comparación con una fase móvil de PBS al 10% o, progresivamente, al 100% v/v. La concentración de proteína total en 1 ml (de un pico agrupado de 7 ml) de micropartículas de pacientes con GBM fue de ~ 200-300 µg/ml (est. 5 mg/ml en el suero original) cuando se eluyó con agua y 5-10 µg/ml (est. 100-200 µg/ml en el suero original) cuando se eluye en PBS. El origen molecular o supramolecular de la proteína detectada en el pico n.º 1 (por ejemplo, "exosomal", otras partículas de alto PM) no puede determinarse a partir de los datos actuales. Estos datos representan el promedio ponderado de la proteína total de todas las fuentes de micropartículas que eluyen en el volumen vacío.

#### Cuantificación de micropartículas

30 Se realizó la cuantificación de micropartículas del pico n.º 1 de las separaciones cromatográficas (véanse las figuras 1A-1B, las figuras 2A-2C), usando el procedimiento de análisis NTA (Nanosight Ltd, Wiltshire, RU).

Se muestra un informe del análisis NTA Nanosight típico en las figuras 3A-3D y que incluye la distribución de partícula/tamaño (arriba a la izquierda), una imagen de vídeo de la muestra (arriba a la derecha), y tamaño de partícula frente a intensidad (paneles inferiores). Se diluyeron las muestras normalmente 1000 veces antes del análisis.

#### 35 Efecto de agua y PBS sobre la cuantificación de micropartículas

Para dos muestras de micropartículas (tal como se hace referencia en las figuras 2A-2C), se determinó el número total de micropartículas por medio de NTA mediante dispersión de luz cuando se aíslan en las tres condiciones, agua, PBS al 10% y PBS al 100% (tabla 2).

40 Factor de dilución: N.B.: se estimó que la fracción de alto peso molecular de la carga de suero de 1 ml se diluyó 7-10 veces durante cromatografía (15-20 veces para volumen de suero de carga de 0,5 ml). Por tanto, mientras que el n.º total de partículas en las fracciones de micropartículas agrupadas mostradas en la tabla 2 son ~ 3 x 10<sup>11</sup>/ml, el n.º de partículas estimadas en el suero original se estima que es de ~ 2 x, ó 10<sup>12</sup>/ml. "LS" se refiere a modo de detección de dispersión de luz, y "FL" se refiere a modo de detección de fluorescencia.

Tabla 2: Cuantificación de micropartículas mediante NTA tras cromatografía de exclusión molecular

Modo	ID	Parámetro	Agua (promedio)	PBS 0,1X (promedio)	PBS 1X (promedio)
LS	Munster 150	n.º de partículas (x 10 <sup>11</sup> /ml)	3,8 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0
		Tamaño del modo (nm)	68,7 ± 8,1	105 ± 47,3	129 ± 6,1
		Índice de polidispersidad	3,9 ± 0,3	4,1 ± 0,7	3,5 ± 0,1
LS	Munster 151	n.º de partículas (x 10 <sup>11</sup> /ml)	3,4 ± 0,4	0,4 ± 0	0,4 ± 0,0
		Tamaño del modo (nm)	74,3 ± 10,7	64,7 ± 5,7	145 ± 29,1
		Índice de polidispersidad	4 ± 0,5	3,6 ± 0,2	3,5 ± 0,2
FL	Munster 150	n.º de partículas (x 10 <sup>8</sup> /ml)	1,6 ± 0,1	0,5 ± 0	0,8 ± 0,1
		Tamaño del modo (nm)	17 ± 3,5	13,3 ± 3,2	21,3 ± 9,8
		Índice de polidispersidad	33,5 ± 1,9	29,9 ± 9	13,5 ± 4,6
FL	Munster 151	n.º de partículas (x 10 <sup>8</sup> /ml)	1,5 ± 1,5	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,3
		Tamaño del modo (nm)	13,3 ± 0,6	43,7 ± 54	14,3 ± 2,5
		Índice de polidispersidad	25,4 ± 6,2	7,4 ± 1,3	16,1 ± 4,3

Puesto que el procedimiento de NTA es, por definición, un procedimiento de análisis de partículas individuales, tiene las ventajas y limitaciones asociadas a todas las mediciones estocásticas. Se seleccionaron los tiempos de medición (30-60 s) como compromiso pragmático entre la gestión del volumen de datos y la búsqueda de precisión de datos que representan la muestra de población como un todo. Necesariamente, un pequeño número de partículas grandes (y por tanto, comparativamente inmóviles) puede influir en la estadística basándose tanto en su tiempo de residencia como en el campo de visión y en sus propiedades de dispersión de luz. A nivel poblacional, NTA proporciona un análisis de distribución del tamaño a partir del cual pueden resumirse la media, la moda, la mediana y otros parámetros estadísticos para resumir la distribución de número frente a tamaño. En este estudio, el algoritmo usado para representar la distribución del número frente al tamaño era el índice D90/D10, el diámetro de partícula que abarcó el 10% más grande de las partículas y el diámetro que abarcó el 10% más pequeño de las partículas; siendo la razón de D90/D10 un "índice de polidispersidad". Una población completamente homogénea de partículas con diámetros hidrodinámicos idénticos tendría un índice de polidispersidad de 1,0. Se reconoce que esta es sólo una medida de la polidispersidad que podría aplicarse y que se usa simplemente como sustituto de la curva de distribución de tamaño de partícula completa (figura 3A).

Al igual que con todas las técnicas de detección de partículas individuales/estocásticas tales como PCS, FCS o FIDA, hay un número óptimo de eventos medidos por trama/campo de visión. Las muestras se diluyeron para obtener un promedio de tiempo de ~ 50 partículas por campo de visión, normalmente con una dilución de 200-2000 veces de la muestra de micropartículas cuando se miden las partículas totales a través de la dispersión de luz. Como tales, los números de micropartículas fueron del orden de ~10<sup>8</sup>/ml en el campo de visión y por tanto ~ 10<sup>11</sup>/ml antes de la dilución de la muestra de micropartículas.

La tabla 2, cuando se mide bajo el modo de dispersión de luz (LS), muestra una disminución de aproximadamente 10 veces en micropartículas detectadas en la muestra cuando se realiza la cromatografía de suero de 1 ml en agua (~ 3 x 10<sup>11</sup> ml<sup>-1</sup>) en comparación con PBS (~ 0,3 x 10<sup>11</sup> ml<sup>-1</sup>). Coherente con los valores de A<sub>280</sub> (figuras 2A-2C), se observó la mayor diferencia entre agua pura y PBS al 10% v/v, se observaron diferencias marginales entre PBS al 10% y PBS al 100%. La moda del tamaño de partícula parece aumentar para muestras aisladas en PBS aunque la diferencia no es grande y el índice de polidispersidad de D90/D10 no está significativamente alterado (intervalo 3,5 - 4,1).

No obstante, la conclusión de la tabla 2 es que el pico de A<sub>280</sub> reducido observado en las figuras 2A-2C está asociado con una reducción correspondiente en micropartículas con un diámetro hidrodinámico de 50 - 150 nm cuando se mide mediante NTA en modo de dispersión de luz.

El número de micropartículas se define operativamente como el número de entidades que dispersan luz (o fluorescen, véase a continuación) con un diámetro hidrodinámico de 15-500 nm independientemente de la composición molecular u origen celular.

#### *Efecto de agua y PBS sobre la cuantificación de micropartículas y concentración de proteína*

Se realizaron experimentos similares a los descritos en la tabla 2, pero con la exclusión de PBS al 10%, en una serie de 6 muestras de suero adicionales de 0,5 ml de pacientes con GBM (tabla 3). En este sumario, se incluye la razón del n.º de micropartículas/ml (en dispersión de luz) con respecto al contenido de proteína total (µg/ml). Las unidades para esta razón son ug<sup>-1</sup> (x 10<sup>8</sup>).

Para las 6 muestras, el aislamiento de micropartículas en agua dio un n.º de micropartículas 4-5 veces mayor cuando se mide mediante NTA de dispersión de luz (~ 10 veces mayor – tabla 2). Sin embargo, puesto que las concentraciones de proteínas son 40-50 veces menores cuando se aíslan micropartículas en PBS (tabla 5), la razón del n.º partículas/µg de proteína es ~ 10 veces mayor en PBS.

- 5 La base molecular para esta diferencia no resulta inmediatamente evidente. Sin embargo, tal como se comentó previamente y a continuación, las micropartículas medidas pueden tener una contribución de lípidos, proteolípidos y otros componentes además de “exosomas celulares”. Algunas o todas estas especies pueden tener propiedades de solubilidad y agregación que podrían estar afectadas por el pH, fuerza iónica o interacciones de sal específicas que podrían ser notablemente diferentes entre agua, PBS al 10% y PBS y podrían, por tanto, afectar a sus propiedades en cromatografía de exclusión molecular y tras posterior medición de NTA.

Tabla 3: Aislamiento de micropartículas de proteínas a partir de cromatografía de exclusión molecular de 0,5 ml de suero

ID de muestra	n.º de micropartículas (x10 <sup>10</sup> /ml)		Razón de n.º de partículas (PBS/H <sub>2</sub> O)	Partículas/proteína (ug <sup>-1</sup> x 10 <sup>8</sup> )		Razón de partículas/proteína (PBS/H <sub>2</sub> O)
	ddH <sub>2</sub> O	PBS		ddH <sub>2</sub> O	PBS	
E43/E41	7,6 ± 1,2	1,5 ± 0,2	0,20	3,5	29,4	8,4
E44/E35	8,6 ± 0,6	2,1 ± 0,0	0,24	2,5	35,6	14,2
E45/E38	9,5 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,12	3,5	28,2	8,1
E46/E39	8,5 ± 1,7	2,9 ± 0,2	0,34	3,3	30,2	9,2
E53/E31	10,3 ± 0,3	2,5 ± 0,2	0,24	3,1	20,8	6,7
E54/E32	8,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,24	3,2	27,3	8,5
Media	8,9	2,0	0,23	3,2	28,6	9,2
DE	0,9	0,7	0,07	0,4	4,8	2,6

- 10 El software e instrumento de NTA LM10 pueden hacerse funcionar en dos modos, o bien sin un filtro de paso de banda (modo de dispersión de luz) o bien con un paso de banda u otro filtro de interferencia (modo de fluorescencia). En la configuración de instrumento actual, se coloca un filtro de corte entre la cámara de observación de muestra y el detector CCD. Este filtro tiene la propiedad óptica de modo que tiene una baja transmitancia por debajo de ~ 430 nm y una alta transmitancia a longitudes de ondas por encima de ~ 430 nm (sin embargo, la transición desde baja hasta alta transmitancia no es absoluta a exactamente 430 nm).

- 15 No obstante, en modo de fluorescencia con este filtro de corte colocado en el camino óptico, pudieron detectarse fácilmente microesferas fluorescentes de 100 nm a una concentración de ~ 10<sup>8</sup> ml<sup>-1</sup> y que dieron normalmente un diámetro hidrodinámico calculado de ~ 95-105 nm cuando se mide a temperatura ambiente. Un resumen del análisis de la distribución de partícula de fluorescencia se muestra en las figuras 4A-4C. Por tanto, se concluye que pueden detectarse y cuantificarse fácilmente fluoróforos extrínsecos de tamaño nanométrico con un gran desplazamiento de Stokes, buena fotoestabilidad y alto coeficiente de extinción/rendimiento cuántico a una concentración de ~ 10<sup>8</sup> partículas/ml.

#### *Detección de microesferas fluorescentes en pacientes con GBM*

- 25 En la figura 13, se resumen los datos obtenidos cuando se realizan experimentos similares en micropartículas no marcadas aisladas de pacientes con GBM usando o bien agua (figura 13B) o bien PBS (figura 13A) como fase móvil para cromatografía de exclusión molecular tal como se indica. Se pone énfasis en que la luz transmitida a través del filtro de corte de 430 nm y detectada por el CCD tras la excitación de la muestra con un láser de 405 nm (a continuación en el presente documento denominado “fluorescencia”), sólo surgiría de un fluoróforo endógeno dentro de la micropartícula puesto que no se ha realizado marcaje extrínseco (comparar con Dragovic y *col.*, (2011)).

- 30 En estos experimentos, se observaron micropartículas aparentemente fluorescentes en las muestras, aunque a una concentración muy baja (~10<sup>8</sup>/ml) en comparación con el número total de partículas (dispersas) (~10<sup>10</sup>/ml). Como tal, cuando se analizaron muestras de micropartículas, no se diluyeron previamente a partir de las alícuotas obtenidas a partir del procedimiento de cromatografía (también denominado “puro”).

- 35 En segundo lugar, se observó que la fluorescencia aparente según parece sufrió fotoblanqueo a lo largo del tiempo y por tanto, se realizó una medición basada en el flujo mediante la cual la muestra se inyectó dentro y fuera de la célula de flujo a una velocidad lenta (nl/min) para “reponer” el campo de visión con alícuotas de micropartículas nuevas (“no fotoblanqueadas”). Se usó software de análisis NTA que controla y justifica el flujo de muestra. Finalmente, el camino óptico del instrumento usado en estos experimentos tuvo interferencia en el campo de visión que requería una modificación del procedimiento de análisis para retirar este artefacto. Esto comprometió necesariamente la calidad de los datos resultantes. Con estas tres principales modificaciones de procedimiento e instrumento con respecto al procedimiento de dispersión de luz, se obtuvieron los datos mostrados en la figura 13.

#### Discusión

- 45 Es importante tener en cuenta que el cálculo de la moda del tamaño, el número de partícula y el índice de polidispersidad (D90/D10) mostrado para las mediciones de fluorescencia en la figura 13 son idénticos a los usados para la dispersión de la luz y se obtienen del software de análisis NTA.

Específicamente, para los datos en este informe, el software de análisis NTA devuelve valores de la moda del tamaño y n.º de partícula sin ninguna selección de parámetros. Para muchas muestras se observó un gran número de partículas pequeñas (15-30 nm) dentro de una distribución comparativamente estrecha, y como tal se indican normalmente como la moda del tamaño de partícula (más común). Este análisis automatizado para determinar la moda del tamaño no justifica micropartículas más grandes (50-500 nm) que están presentes en la mayoría de muestras. La amplia variedad de tanto partículas fluorescentes pequeñas como grandes está reflejada en los altos índices de polidispersidad D90/D10 (> 10 para la mayoría de muestras). Para muestras preparadas en PBS, la moda del valor es a veces el mayor de las dos poblaciones de partículas y, por tanto, en estos casos, el análisis automatizado devuelve este intervalo de tamaño de partícula como valor automatizado.

Como resultado de las limitaciones del análisis automatizado tal como se emplea actualmente, se revisó cada archivo de población de fluorescencia manualmente y se agruparon cualitativamente según su distribución de tamaño (tabla 5; véase el Apéndice de datos al final del ejemplo 1) en 4 cubetas. Se resumen descripciones de datos e informes de XPS de ejemplo en el Apéndice de datos.

Resumen de los datos

Se aislaron micropartículas con una moda de diámetro hidrodinámico de 50-100 nm usando cromatografía de exclusión molecular y se caracterizaron usando análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) y BCA para determinar el contenido de proteína y tamaño/número de micropartículas, respectivamente. Se obtuvieron micropartículas mediante cromatografía usando o bien ddH<sub>2</sub>O o bien PBS, pH 7,4 como fase móvil. También se evaluó la fluorescencia endógena en las micropartículas así obtenidas usando NTA en el modo de detección de fluorescencia ( $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} > 430 \text{ nm}$ ).

Estos resultados sugieren que las micropartículas con una moda del diámetro de 50-100 nm medidas por dispersión de luz están presentes en el suero del paciente GBM a una concentración de  $\sim 10^{12}$  partículas/ml de suero cuando se aíslan usando cromatografía en ddH<sub>2</sub>O. Sin embargo, se obtienen significativamente (4-10 veces) menos micropartículas de esta moda del tamaño cuando se realiza cromatografía de exclusión molecular en PBS en comparación con el agua. Además, las micropartículas aisladas en PBS parecen tener un contenido de proteína más bajo en comparación con las aisladas en agua. La base de esta diferencia no es evidente de inmediato.

Las micropartículas de aproximadamente estas dimensiones (aunque con una distribución de tamaño aparente muy heterogénea de  $\sim 15 - 500+$  nm) se observan en el modo de fluorescencia. Esto implica que estas micropartículas contienen un fluoróforo endógeno que tiene una fluorescencia por encima de 430 nm cuando se excita a 405 nm. El número de estas micropartículas fluorescentes parece ser  $\ll 1\%$  del número total de micropartículas, medido por la dispersión de luz.

En conclusión, las micropartículas preparadas a partir del suero de pacientes con GBM que han tomado Gliolan/5-ALA por vía oral contienen una especie fluorescente de manera endógena que se observa en una fracción pequeña ( $\ll 1\%$ ) del número total de micropartículas cuantificable a aproximadamente 4-48 horas tras la administración cuando se aíslan mediante cromatografía de exclusión molecular.

La tabla 4 esboza un resumen de los datos presentados a partir de las micropartículas aisladas de suero. Se proporcionan la cantidad de micropartículas, su tamaño y el grado de fluorescencia evaluado por análisis NTA.

Tabla 4: Resumen de datos de micropartículas de suero

	Dispersión de luz	Modo de fluorescencia	Notas
n.º de partícula (preoperatorio)	5,6 + 0,3 (x 10 <sup>10</sup> /ml)	3,3 + 0,7 (x 10 <sup>8</sup> /ml)	N = 19 (p < 0,01)
Moda del tamaño (nm)	56 +/- 21	46,5 +/- 10	
4 HR	1,4 x 10 <sup>10</sup> /ml	0,8 x 10 <sup>8</sup> /ml	0,8 x 10 <sup>8</sup> /ml a 7+ HRS
n.º de tampón SEC clásico (x 10 <sup>8</sup> ) (N = 18) preoperatorio	2,04 x 10 <sup>10</sup> /ml	1,2 x 10 <sup>8</sup> /ml	<1% recuento total (p < 0,01)

Métodos y materiales detallados para el ejemplo 1

*Materiales*

Suero AB (suero humano de donantes de grupo sanguíneo AB): Sigma Aldrich, St. Louis, MO.

Columna de cromatografía Econom de Bio-Rad Column, (2,5 cm ID x 10 cm)

Kit de ensayo de proteína Micro BCA (Thermo Scientific)

Perlas de PS: perlas de poliestireno de 100 nm

Agarosa reticulada al 2% (ABT, www.abtbeads.com, Florida, EE.UU.)

5 PBS: solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4

Purificador GE AKTA 10 y sistema FRAC 950 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)

Parámetros de cromatografía de exclusión molecular

Tabla 6:

Sistema	Parámetro	Ajuste
Columna de cromatografía Bio-Rad Econom Column en un purificador GE Healthcare AKTA 10	Etapa 1. Fase de lavado	300 ml
	Etapa 2. Carga de muestra	0,4 - 1 ml de suero/plasma
	Etapa 3. Lavado	1 ml de lavado para completar el drenaje por gravedad
	Etapa 4. Lavado	1 ml de lavado para completar el drenaje por gravedad
	Etapa 5. Lavado	3 ml de carga
	Etapa 6. Elución isocrática	2 ml/min durante 30 min, periodicidad de recogida: 0,5 min
Absorbancia UV	Absorbancia UV recogida	280 nm (UA)
Conductividad	Conductividad	S/m
Recolector de fracciones Frac 950	Fracciones recogidas (sólo durante la etapa de elución isocrática)	1 ml de fracciones recogidas durante 30 min; total de 60 fracciones recogidas

10

*Muestras clínicas*

El patrocinador proporcionó muestras de estudio de suero de Munster, Alemania y la Universidad de Emory, EE.UU., se recibieron en el DHMRI congeladas en hielo seco en alícuotas de ~ 1-2 ml. Una vez descongeladas en el banco a temperatura ambiente (~ 22°C), se procesaron alícuotas de 0,4 - 1 ml para aislar micropartículas tal como se describe a continuación. La muestra restante, si la hubiera, se volvió a congelar y se almacenó a -80°C.

15

*Informes de XPS de NTA de fluorescencia*

En las figuras 5-12, se generó el número de partículas (n) directamente mediante el software NTA, no se aplicó selección de parámetros, de modo que todas las partículas se contaron por igual a lo largo del intervalo de distribuciones de tamaño. Se generó la moda (nm) directamente mediante el software NTA y se refiere al tamaño más común. Se generó la media (nm) directamente mediante el software NTA y se refiere al promedio de todos los valores. Se calculó D90/D10 a partir de los valores obtenidos mediante el software NTA y se refiere a una medición de la anchura/dispersidad de la muestra. El pico cualitativo se refiere a una evaluación cualitativa de donde puede producirse un segundo "gran" pico si el software pudo encontrar una distribución bimodal. "Categoría" se refiere a una de las 4 categorías (o características) seleccionadas subjetivamente (A-D).

20

25 Apéndice de los datos

Este apéndice contiene la Tabla 5, a la que se hace referencia en la sección de Resultados y Discusión anterior

Tabla 5: Cuantificación de micropartículas después de la cromatografía de exclusión molecular en agua frente a PBS

## ES 2 734 569 T3

a través de NTA de fluorescencia con agrupación de distribuciones de tamaño

ID DHMRI	n.º de partícula, n (x10) <sup>8</sup> /ml	Razón D90/D10	Moda (nm)	Media (nm)	Pico (nm)	cualitativo	Clasificación
Pre-e3	4,43	2,7	267	261	267		A (partículas predominantemente grandes)
E54	1,66	19,5	25	243	180		B (población mixta de grandes y pequeños)
	0,88	14,4	17	334	250		B
	0,98	10,7	20	342	250		B
E53	1,00	16,8	18	262	200		B
	1,44	18,3	20	245	200		B
	1,02	14,4	24	373	250		B
E52	0,43	17,2	12	292	192		B
	0,48	19,8	13	329	250		B
	0,51	12,2	13	304	200		B
E51	0,46	6,2	14	208	191		B
	0,52	17,2	17	181	150		B
	0,37	12,3	9	186	125		B
E50	0,46	3,1	15	22	15		C (partículas predominantemente pequeñas)
	0,61	13,8	14	71	50		C
	0,29	14	11	178	150		B
E49	0,25	4,6	13	470	200		B
	0,31	5,0	215	443	215		A
	0,29	5,2	246	474	246		A
E48	0,36	3,7	13	23	15		C
	0,03	1,2	87	87	87		C
	0,06	17,9	11	118	104		B
E47	0,60	7,9	12	37	15		C
	0,32	4,8	18	23	20		C

## ES 2 734 569 T3

	0,48	7,0	15	41	20	C
E46	0,92	14,2	22	308	250	B
	0,49	5	18	332	250	B
	0,46	5	29	359	230	B
E45	1,02	8,3	22	84	80	B
	0,54	10	12	119	100	B
	0,21	4,0	76	129	100	B
E44	0,84	18,9	12	249	170	B
	1,4	13	21	134	150	B
	0,92	17	14	326	200	B
E43	0,65	14	14	320	200	B
	0,68	8,2	13	312	180	B
	1,23	7,7	20	350	300	B
E42	1,46	20	12	302	200	B
	0,72	5,5	209	372	209	A
	0,89	4,6	249	331	249	A
E41	1,42	14	14	245	200	B
	1,19	6,7	144	263	144	A
	0,81	4,3	148	294	148	A
E40	0,78	14,6	13	396	280	B
	1,08	8,2	10	473	250	B
	1,6	15,9	28	292	290	B
E39	2,12	6,6	234	381	234	A
	3,43	6,2	90	153	90	A
	3,72	6,1	100	182	100	A
E38	1,18	6,1	160	278	160	A
	1,11	5,4	185	284	185	A
	1,41	6,5	200	250	200	A

ES 2 734 569 T3

E37	0,67	18	10	128	100	B
	0,74	15	21	104	140	B
	0,46	5,8	193	313	193	A
E36	0,27	13,2	8	342	200	B
	0,86	9,2	19	86	100	B
	0,68	6,9	12	391	227	B
E35	1,86	5,4	159	264	159	A
	1,45	4,2	157	288	157	A
	1,58	5,7	215	271	215	A
E34	0,28	5,2	14 (195)	388	195	B (A)
	0,17	5,2	18 (349)	440	349	B (A)
	0,23	6,7	13 (239)	310	239	B (A)
E33	0,86	4,5	226	413	226	A
	0,87	4,3	348	454	348	A
	0,70	3,2	215	422	215	A
E32	1,63	5,4	223	367	223	A
	1,33	4,8	239	383	239	A
	1,39	5,0	326	416	326	A
E31	1,83	8,1	32 (293)	398	293	B (A)
	1,76	6,4	21 (190)	399	190	B (A)
	1,69	6,9	16 (348)	403	348	B (A)
E30	1,83	16	12	154	100	B
	1,51	11,7	17	339	200	B
	1,28	20,4	14	344	180	B
E29	0,67	10,8	27 (97)	286	97	B
	0,92	22,3	11	238	150	B
	2,13	9,7	179	247	179	A
E28	0,85	6,7	13	545	280	B



## ES 2 734 569 T3

	0,96	10	23	475	350	B
	0,87	10	21	307	200	B
E27	0,59	42	11	414	?	D (cola larga)
	0,52	37	10	335	?	D
	0,54	29	10	298	300?	D
E26	1,66	26,5	15	432	200?	D
	1,38	28	12	343	?	D
	1,44	26	13	420	200?	D
E25	1,07	32	10	287	?	D
	1,05	32	10	296	?	D
	1,11	31	14	307	?	D

Las características mostradas en la tabla 5 se describen a continuación:

5 Características de tipo A: pocas partículas pequeñas (10-30 nm), distribución clara de partículas grandes (normalmente 100-300 nm), media y moda del diámetro comparables (dentro de 2 veces), baja D90/D10 (<10, normalmente 4-7), a menudo asociada con un alto número de partículas (normalmente > 1,0x10<sup>8</sup>/mL) y tampón de elución PBS.

10 Características de tipo B: gran número de partículas pequeñas (10-50 nm), distribución clara de partículas grandes (normalmente 100-500 nm), media y moda del diámetro significativamente diferentes (normalmente > 10 veces), alta D90/D10 (normalmente 10-20), a menudo asociada con número de partículas medio o bajo (normalmente 0,5 – 1,0x10<sup>8</sup>/ml). Visto con ambos PBS, y en particular, con agua como tampón de elución.

Características de tipo C: gran cantidad de partículas pequeñas (10-50 nm), sin una distribución obvia de partículas grandes, media y moda del diámetro comparables (y pequeños), alta D90/D10 (normalmente 10-20), a menudo asociada con un número de partículas medio o bajo (normalmente 0,5 – 1,0x10<sup>8</sup>/ml) y agua como tampón de elución.

15 Características de tipo D: gran número de partículas pequeñas (10-50 nm), sin una distribución obvia de partículas grandes, media y moda del diámetro comparables (y pequeños), muy alta D90/D10 (normalmente 20-40), a menudo asociada con un número bajo o medio de partículas (normalmente 0,5 – 1,0x10<sup>8</sup>/ml) y agua o PBS al 10% como tampón de elución.

Ejemplo 2: La línea celular U87 convierte 5-ALA en PPIX mediante un proceso de conversión mediado por CPOX que puede monitorizarse en micropartículas liberadas

20 Este ejemplo demuestra que los cultivos de células U87 convierten activamente 5-ALA en PPIX, que estas células producen coproporfirinógeno III oxidasa (proteína CPOX), y que las proteínas CPOX y PPIX están presentes en micropartículas liberadas en líneas de células cancerosas.

*Estudios in vitro en U87*

25 Se expusieron células U87 representativas de tumores de GBM hechas crecer en matraces T-75, en ausencia de suero, a ácido 5-aminolevulínico (5-ALA; 250 µg/ml) durante 4 ó 24 horas. Tras la exposición, las células se sometieron a excitación fluorescente en un citómetro de flujo LSRII con una excitación de longitud de onda violeta a 406 nm. Las especificaciones del filtro se establecieron o bien a 450/50, o bien se establecieron a 610/20 para la detección de protoporfirina IX (PPIX).

30 Se encontró que el índice de fluorescencia medio (MFI), en función del tiempo, no cambió en ausencia de 5-ALA. En cambio, MFI aumentó tras la exposición a 5-ALA observada a las 4 horas y 24 horas tras la exposición a 5-ALA (figura 14). Estos datos indican la aparición temporal de PPIX como producto metabólico de la conversión de 5-ALA en su metabolito como producto del metabolismo celular en la ruta de biosíntesis de hemo.

*Las micropartículas derivadas de células cancerosas acumulan CPOX*

La enzima coproporfirinógeno III oxidasa (CPOX) está implicada en el metabolismo de porfirina de hemo. Para investigar si esta enzima está presente en micropartículas derivadas de células cancerosas liberadas y para explorar un papel para esta enzima en la conversión metabólica de 5-ALA en PPIX, se llevó a cabo análisis de proteínas en muestras de micropartículas de proteína derivadas de células cancerosas.

Se recuperaron micropartículas en los medios acondicionados de sobrenadantes de cultivo usando uno de los péptidos Venceremin (New England Peptide, Gardner MA). Para recuperar micropartículas, se usaron el péptido Venceremin Vn96reverse, denominado Heladonin (Hdn; H2N-LKLFEGTLAGWSFRSLSLGRGKGQSP-OH), y el péptido aleatorizado NDN. Se cultivaron células U87 (GBM) y HELA en un biorreactor Integra y se recogieron muestras de sobrenadante de la cámara inferior (2 ml) y se mezclaron con 10 µl de inhibidor de proteasa y 50 µg de disolución madre de péptido Hdn. Se prepararon micropartículas a partir de muestras de sobrenadante del biorreactor y se analizaron en una inmunotransferencia de tipo Western para determinar la presencia de CPOX. Se expusieron alícuotas adicionales de medio acondicionado a ExoQuick (SBI, Systems Biology) para el aislamiento de micropartículas liberadas. También se analizó la proteína total del lisado celular de líneas celulares MCF7 y K562. La tabla 7 proporciona una leyenda de la fuente de la muestra de proteína analizada en cada carril tal como se muestra en la figura 14.

Tabla 7: Identificación de la fuente de proteína en los carriles de transferencia especificados

n.º de carril	Muestra de proteína de:
1	Células de GBM aisladas con péptido Hdn
2	Células de GBM aisladas con péptido Ndn
3	Células de GBM aisladas con ExoQuick
4	Células HELA aisladas con péptido Hdn
5	Células HELA aisladas con péptido Ndn
6	Células HELA aisladas con ExoQuick
7	Lisado de células MCF7
8	Lisado de células K562

Tal como puede observarse en la figura 15, las micropartículas aisladas de tanto líneas de células de GBM como HELA acumularon una proteína CPOX tal como se observa en la inmunotransferencia de tipo Western con sonda con un anticuerpo anti-CPOX. Las muestras aisladas con el péptido Ndn inespecífico no acumularon proteína CPOX. Estos datos demuestran la presencia de enzima CPOX en micropartículas liberadas de células cancerosas. Sin desear limitarse a ninguna teoría, se cree que CPOX está implicada en la conversión de 5-ALA en PPIX en micropartículas. Estos datos revelan además la capacidad de rastrear biomarcadores intramitocondriales (CPOX) en micropartículas implicadas en la conversión de 5-ALA en PPIX y sugieren el uso de CPOX como biomarcador para células tumorales.

Ejemplo 3: Detección de GBM mediante la administración de Gliolan™

Se trata un paciente de GBM mediante extirpación quirúrgica, radiación de haz externo y temozolomida.

Según el protocolo convencional del hospital, el paciente se evalúa de forma regular (mensualmente) para detectar síntomas clínicos de recaída de la enfermedad con evaluación observacional e IRM para determinar la recaída de GBM.

Gliolan™ (5-ALA) se administra a una dosis de 20 mg/kg tres horas antes del momento programado para la extracción de sangre.

La sangre se extrae y se permite que coagule para producir suero o se centrifuga a 1000g durante 5 minutos para producir plasma. El fluido biológico se congela a -80°C y se conserva para su posterior procesamiento. Las micropartículas se aíslan mediante cromatografía de exclusión molecular con agarosa al 2% como fase sólida. Se usa H<sub>2</sub>O doble destilada o PBS (100% v/v) como fase móvil con un volumen de carga de suero o plasma <2% del volumen del lecho y separación de elución para entidades de peso molecular validadas con patrones de proteínas.

Se detecta la fluorescencia mediada por 5-ALA asociada con estas micropartículas usan un procedimiento de análisis NTA (Nanosight Ltd, Wiltshire, RU).

**REIVINDICACIONES**

1. Método *in vitro* para detectar un tumor cerebral de grado III o grado IV de la OMS, en el que el método comprende detectar el nivel de conversión de 5-ALA en protoporfirina IX (PPIX) asociado con micropartículas derivadas del cerebro en una muestra de suero o sangre completa de un sujeto al que se le ha administrado una composición farmacéutica que comprende ácido 5-aminolevulínico (5-ALA); detectando de ese modo el tumor cerebral de grado III o grado IV de la OMS.  
5
2. Método según la reivindicación 1, en el que el sujeto se trató previamente de un tumor cerebral.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el tumor de grado III o grado IV de la OMS se selecciona del grupo que consiste en astrocitoma anaplásico, glioblastoma, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico, oligastrocitoma anaplásico, espongioblastoma polar, astroblastoma y gliomatosis cerebri.  
10
4. Método según la reivindicación 1, en el que el tumor cerebral de grado III o grado IV de la OMS es glioblastoma (GBM).
5. Método según la reivindicación 1, en el que 5-ALA está presente a una concentración de 30 mg/ml en polvo en la composición farmacéutica.
- 15 6. Método según la reivindicación 1, en el que la composición farmacéutica que comprende 5-ALA se administra por vía oral o por vía intratumoral.
7. Método según la reivindicación 1, en el que la composición farmacéutica comprende 5-ALA a una concentración de 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg ó 30 mg/kg.
8. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de conversión de 5-ALA en PPIX se detecta midiendo la fluorescencia, el nivel de un metabolito a lo largo de la ruta de conversión de 5-ALA en PPIX, o el nivel de una enzima de conversión.  
20
9. Método según la reivindicación 1, en el que la enzima de conversión es coproporfirinógeno oxidasa (CPOX).
10. Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) para su uso en un método para evaluar la recaída de tumores cerebrales de grado III y grado IV de la OMS, en el que el método comprende  
25  
- administrar una composición farmacéutica que comprende ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) a un sujeto; y  
- evaluar la recaída de tumores cerebrales de grado III y grado IV de la OMS detectando 5-ALA asociado con micropartículas derivadas del cerebro en una muestra biológica del sujeto.
11. Método según la reivindicación 1 o compuesto para su uso según la reivindicación 10, que comprende además aislar las micropartículas derivadas del cerebro a partir de la muestra biológica antes de detectar 5-ALA asociado con las micropartículas derivadas del cerebro.  
30