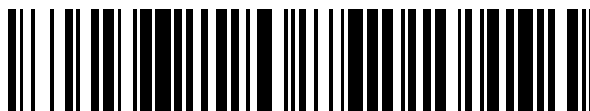


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 109**

51 Int. Cl.:

G01N 21/00 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2018 E 18205202 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3483588**

54 Título: **Usos de vesículas extracelulares recombinantes**

30 Prioridad:

09.11.2017 EP 17200743

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.05.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (50.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE y
VIB VZW (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HENDRIX, AN;
DE WEVER, OLIVIER;
GEEURICKX, EDWARD;
VANDESOMPELE, JOKE;
MESTDAGH, PIETER y
EYCKERMANN, SVEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 762 109 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

Usos de vesículas extracelulares recombinantes.

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere al campo de la investigación y el uso clínico de vesículas extracelulares. Más en particular, la presente invención se refiere a usos de vesículas extracelulares recombinantes que comprenden a) una proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a una membrana luminal y b) un marcador heterólogo. De hecho, la presente invención proporciona vesículas extracelulares recombinantes que pueden usarse como un material de referencia biológico en métodos para cuantificar vesículas extracelulares en una muestra y/o, que pueden usarse para calibrar un dispositivo para el análisis de vesículas extracelulares de muestra, y/o, que pueden usarse para evaluar el proceso de aislamiento de vesículas extracelulares. La presente invención se refiere por consiguiente a mejorar la exactitud de un diagnóstico basado en vesículas extracelulares.

Antecedentes de la técnica

Las biopsias líquidas tienen cada vez más atención como un patrón dorado para el futuro uso clínico por el menor riesgo para el paciente, la posibilidad de monitorizar el tratamiento, el menor coste y la vista heterogénea de la enfermedad en comparación con las biopsias tisulares^{1,2}. Desde que se acepta de forma general que las vesículas extracelulares (EV) están presentes en los fluidos corporales y que representan una huella digital de la célula que la origina están enfocadas como un candidato para proporcionar información para la toma de decisiones médicas^{2,3}.

EV son vesículas de tamaño de nanómetro secretadas por todos los tipos de células y encontradas circulando en los fluidos corporales como plasma, suero, orina, fluido cerebroespinal, etc. Consisten en una doble membrana lipídica que rodea su carga de proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos haciéndolas transportes de información útiles ya que la membrana lipídica proporciona protección frente a proteínas degradativas, tales como proteasas y RNAsas, presentes en los biofluidos⁴. Se encuentran que las EV están implicadas en la progresión del cáncer. Pueden secretarse por las células cancerígenas y o activar o incorporar células cancerígenas o estromales localmente o educar a un nicho premetastático en una posición distante, y facilitar así la formación de metástasis^{5,6}. Recientemente, se ha encontrado que las EV aisladas de diferentes biofluidos contienen un contenido específico de ARNm, miARN y proteína relacionados con el estado de la enfermedad de cánceres de mama, urogenital, pancreático y de ovario⁷⁻¹⁰. Sin embargo, se han hecho pocos avances hacia la aplicación clínica. Esto se debe principalmente al hecho de que la investigación de EV es difícil de reproducir debido a la plétora de métodos de aislamiento usados y la falta de estandarización y normalización¹¹⁻¹³. Los últimos problemas pueden resolverse usando un material de referencia estándar que tenga las mismas características que la EV de muestra, pero que pueda distinguirse fácilmente de ellas.

Hasta la fecha hay pocos materiales usados como un material de referencia para la investigación de EV. Las perlas de poliestireno o sílice de tamaño de nanómetro se usan a menudo como un calibrador para la citometría de flujo (FC) o el análisis de rastreo de nanopartículas (NTA). Esto lleva normalmente a medidas inexactas de EV ya que el índice de refracción (RI) de estas perlas es mayor que el RI de EV (1,61, 1,46 frente a 1,40)^{14,15}. Otra alternativa podría ser liposomas inspirados en EV diseñados para contener proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, las EV naturales son heterogéneas en tamaño, y los estándares que carecen de esta heterogeneidad pueden impactar consecuentemente en los ajustes de referencia estándar de los métodos de cuantificación de EV. Para superar estos problemas, un material de referencia biológico parece obligatorio. Un sondeo reciente realizado por investigadores del programa METVES (Caracterización metrológica de microvesículas a partir del fluido corporal) expresó de hecho que un material de referencia de EV ideal debería ser de origen biológico y tendría las mismas características físicas y bioquímicas que las EV de muestra y debería ser preferiblemente distinguible de ellas¹⁶. Los documentos US20130078658, US2013157300 y US2013302822 describen unas EV recombinantes que comprenden una fusión de una proteína de membrana y una proteína emisora de luz que puede usarse para cuantificar las EV de muestra. Sin embargo, las últimas EV recombinantes son difíciles de producir en altas cantidades y no pueden detectarse de una manera muy sensible.

Tomado junto, permanece una necesidad no cubierta para la estandarización y normalización de medidas de EV, especialmente en métodos diagnósticos basados en EV.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Producción de vesículas extracelulares recombinantes (rEV). (a) Resumen esquemático de la producción de rEV a nivel celular: 1) La proteína de fusión GAG-EGFP se inserta en regiones de la membrana plasmática enriquecida para tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 por medio de su dominio MA N-terminal que contiene un grupo miristilo. 2) La proteína de fusión GAG-EGFP oligomeriza e incorpora proteínas ESCRT-1 (TSG101) por medio del motivo PTAP en su dominio P6. 3) La incorporación de proteínas ESCRT-2/3 inicia el brote hacia afuera de la membrana plasmática que contiene GAG-EGFP. 4) La escisión mediada por ESCRT-3 de las membranas finalmente provoca la liberación de rEV en el medio acondicionado. (b) Resumen esquemático del flujo de trabajo para aislar rEV del medio acondicionado de células HEK293T transfectadas con GAG-EGFP. (c) Imágenes de microscopía de

contraste de fases de células HEK293T transfectadas con ADN MOCK (arriba) y GAG-EGFP (abajo). (d) Viabilidad celular de células HEK293T transfectadas con GAG-EGFP y MOCK calculada usando azul de tripano. (e) Imagen de microscopía fluorescente de células HEK293T transfectadas con GAG-EGFP con la eficiencia de transfección calculada. La barra de escala es 50 μm . (f) Eficiencia de transfección medida por FC de células HEK293T con GAG-EGFP regulado por EGFP. (g) Electroinmunotransferencia para EGFP y tubulina de control de carga de células HEK293T transfectadas con GAG-EGFP en 6 replicados biológicos. Se cargaron 20 μg de proteína. (h) Estabilidad de transfección evaluada mediante la señal EGFP relativa de la electroinmunotransferencia en la Fig. 1g.

Figura 2: Las rEV reflejan las características físicas y bioquímicas de las EV de muestra. (a) Comparación de partículas por célula entre células HEK293T transfectadas con GAG-EGFP y transfectadas con MOCK cuantificadas mediante análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) ($n=24$). (b) Comparación de los modos de tamaño de las rEV frente a las EV de células HEK293T transfectadas con MOCK medidos por NTA ($n=27$). (c) Comparación del potencial zeta tanto de las rEV como de las EV MOCK ($n=6$). (d) Electroinmunotransferencia en todas las fracciones ODG de arriba a abajo a partir del medio acondicionado de células HEK293T transfectadas con GAG-EGFP y MOCK para EGFP y proteínas enriquecidas con EV TSG101, CD81 y Alix. Se cargaron volúmenes iguales. (e) imágenes de microscopía electrónica (EM) de campo amplio y detallada tanto de rEV (izquierda) como EV MOCK (derecha). (f) Distribución de tamaño de rEV (izquierda) y EV MOCK (derecha) como se mide a partir de las imágenes de EM en la Fig. 2e. (g) Distribuciones de índice de refracción de rEV y EV MOCK calculadas mediante análisis de rastreo de nanopartículas y teoría de Mie.

Figura 3: Comparación proteómica de rEV y EV de muestra. (a) Electroinmunotransferencia de rEV y EV de células HEK293T transfectadas con MOCK y EV de células MCF7-Rab27B para proteínas enriquecidas con EV Alix, TSG101, CD81, Flotilina-1, Sintenina-1, CD9 y CD63. Se cargó igual cantidad de proteínas (5,7 μg). (b) Electroinmunotransferencia para EGFP y CD81 de rEV inmunes precipitadas (IP) con perlas magnéticas recubiertas con anti-CD81 (izquierda) y perlas magnéticas vacías (derecha) junto con el flujo continuo (FT). (c) Imágenes de microscopía electrónica (EM) inmune de campo amplio y detallada de rEV y EV MOCK frente a CD63. (d) Gráfico en volcán de los cambios de plegamiento de todas las proteínas detectadas a partir de EV MOCK (izquierda) y rEV (derecha) con un FDR de 0,01 con las proteínas asociadas a EV indicadas como puntos rojos. (e) Diagrama de Venn de proteínas de la ruta ESCRT, proteínas enriquecidas en rEV y EV MOCK y proteínas expresadas de igual forma en ambos tipos de EV.

Figura 4: Comparación lipídómica de rEV y EV MOCK. (a) Valores de expresión Log2 de todos los fosfolípidos detectados en rEV y EV MOCK. (b) μg de colesterol por partícula de rEV y EV MOCK a partir de cuatro replicados biológicos.

Figura 5: Posibilidades de lectura de rEV (a) Gráficos de distribución de tamaño de rEV medidas con análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) en modo tanto de dispersión como de fluorescencia (izquierda) y el porcentaje de partículas fluorescentes de diferentes lotes de rEV ($n=20$) (derecha). (b) Detección de rEV con FC de alta resolución. (c) Electroinmunotransferencia para EGFP en el intervalo máximo de concentración detectable (arriba) e intervalo lineal de concentración detectable (abajo) de diluciones de rEV en PBS. (d) Detección lineal de tres replicados biológicos de rEV diluidas en PBS con un lector de placas de fluorescencia y la variabilidad lote a lote. (e) Detección lineal de tres replicados biológicos de rEV diluidas en PBS con una ELISA para p24, una subunidad de la poliproteína Gag, y la variabilidad lote a lote. (f) Detección semi-logarítmica de ARNm de EGFP con qPCR a partir de partículas rEV diluidas en PBS. En (d) y (e) cada replicado biológico se midió por triplicado.

Figura 6: Estabilidad de rEV. (a) Partículas fluorescentes/mL medidas por medio de análisis de rastreo de nanopartículas fluorescentes (fNTA) de rEV a partir de diferentes lotes justo después del aislamiento (frescos) y después de 2 ciclos de congelación descongelación (FT) consecutivos a -80°C . (b) Partículas fluorescentes/mL medidas por medio de fNTA de rEV frescas o después de dilución 1 en 10 y almacenamiento a 4°C . (c) Concentración relativa de rEV medida por fNTA inmediatamente tras el aislamiento de rEV (frescas) o después del almacenamiento a 4°C hasta tres semanas sin dilución. (d) Perfil de distribución de tamaño de rEV antes (izquierda) y después (derecha) de liofilización medido con fNTA. (e) Partículas fluorescentes/mL como se mide con fNTA de rEV a diferentes puntos temporales en condiciones con o sin exposición a la luz. (f) Recuperación de rEV adicionadas en plasma mediante cromatografía de exclusión por tamaños en plasma fresco o después de congelar el plasma adicionado una semana a -80°C .

Figura 7: La implementación de rEV para estimar la eficiencia de aislamiento de métodos de aislamiento usados frecuentemente. (a) Electroinmunotransferencia para TSG101 y EGFP en fracciones de SEC de PBS adicionadas con EV procedentes de MCF7-RAB27B o rEV y plasma adicionado con rEV. (b) Cálculo de la tasa de recuperación usando NTA de fluorescencia (fNTA) y ELISA para p24 después de aislamiento de rEV procedentes del plasma usando SEC. (c) Cálculo de la pérdida de rEV usando fNTA después de etapas de aislamiento consecutivas en plasma tratado con PK (SEC-ultrafiltración (UF), ODG y SEC). (d) Cálculo de la tasa de recuperación usando fNTA y ELISA para p24 después de ODG y granulado a alta velocidad consecutivo en DMEM suplementado con 10% de suero. (e) Pérdida durante el granulado después del centrifugado por gradiente de densidad de DMEM adicionado suplementado con 10% de suero (muestra 2 de la Fig. 7d). (f) Cálculo de la tasa de recuperación usando fNTA y ELISA para p24 después de ultracentrifugación diferencial en plasma. (g) Cálculo de la tasa de recuperación usando

una ELISA para p24 después de precipitación exoquick en plasma. Todos los cálculos de recuperación se realizaron por triplicado.

Figura 8: Desplazamientos de rEV a mayores densidades en plasma y en presencia de IgM e IgG administradas de forma exógena. (a) Partículas fluorescentes en fracciones ODG de plasma tratado con PK y de control adicionado con rEV como se mide con el análisis de rastreo de nanopartículas de fluorescencia (fNTA). (b) Electroinmunotransferencia para EGFP e IgG humana en fracciones ODG de plasma tratado con PK y de control adicionado con rEV. (c) Imagen de EM de fracciones ODG granuladas 12-13 de plasma adicionado con rEV. (d) Partículas fluorescentes medidas por medio de fNTA en fracciones ODG de plasma y DMEM suplementado con 10% de FBS ambos adicionados con rEV. (e) Partículas fluorescentes medidas por medio de fNTA en fracciones ODG de gradientes de ODG de arriba abajo (TD) y abajo arriba (BU) de orina adicionada con rEV. (f) Porcentaje de partículas fluorescentes por fracción ODG de partículas de rEV adicionadas en PBS en presencia o ausencia de IgM o IgG humana. (g) Cantidad total de partículas en plasma tratado con PK y de control después de SEC seguido por ODG. (h) Análisis de electroinmunotransferencia para proteínas enriquecidas en EV flotilina-1 y sintenina-1 en 6 mL de plasma cancerígeno tratado con PK después de SEC seguido por ODG.

Figura 9: Modificación de rEV e implementación en aplicaciones para la normalización. (a) Las rEV modificadas con PEG son compatibles con múltiples biofluidos y pueden separarse de EV por métodos corriente abajo. (b) Distribución de densidad de rEV-PEG y rEV adicionadas en plasma, medida por fNTA. (c) Análisis de electroinmunotransferencia para EGFP y sintenina-1 de rEV y rEV-PEG precipitadas inmunes en PBS con perlas magnéticas recubiertas de anti-PEG o IgG de cabra específica. (d) Log del número de EV medido por NTA antes y después de la normalización por cuantificación de rEV con fNTA para reducir la variabilidad entre usuarios. (e) Log de las EV/mL de plasma de voluntarios sanos y pacientes con cáncer de mama (n=6 y n=18) después de aislamiento por SEC-ODG-SEC y normalización por cuantificación de rEV con fNTA. ** P<0,01.

Descripción de la invención

En la presente invención se evaluó el uso de una clase particular de vesículas extracelulares recombinantes (rEV) como un material de referencia biológico para la investigación de EV. Estas rEV están inducidas por proteínas de autoensamblaje que dirigen su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal y comprenden además un marcador heterólogo que puede condensarse a dichas proteínas de autoensamblaje. Un ejemplo no limitante de dicha proteína de autoensamblaje es el antígeno específico del grupo retroviral (Gag) condensado con un marcador heterólogo tal como la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) emisora de luz. Se analizaron y se compararon las características físicas y bioquímicas de las partículas purificadas por gradiente de densidad del sobrenadante de células HEK293T transfectadas con Gag-EGFP y EV de muestra endógenas de diferentes líneas celulares y biofluidos al nivel de NTA, microscopía (inmuno)electrónica, proteómica, lipidómica y potencial zeta. La alta abundancia de proteínas de fusión fluorescentes por partícula puede explotarse para deducir la cantidad de partículas, como se mide con NTA de fluorescencia, midiendo las señales fluorescentes con un lector de placas de fluorescencia, FC de alta resolución o midiendo la concentración de – por ejemplo – la poliproteína Gag o, lo más preferiblemente, midiendo la concentración de – por ejemplo – ARNm de EGFP. Se mostró que las últimas medidas no basadas en fluorescencia son mucho más sensibles que las medidas de fluorescencia. Se mostró además que las rEV pueden usarse como un material de referencia para adicionar en diferentes biofluidos antes del aislamiento y después rastrearse, dando la posibilidad de calcular la tasa de recuperación de diferentes métodos de aislamiento de EV. Los métodos de la presente invención permiten al usuario final elegir si desea aislar el material de referencia junto con las EV de muestra o separado de las EV de muestra. Además, se describe que las rEV pueden usarse para calibrar un dispositivo para analizar EV de muestra y que las rEV pueden usarse para evaluar los métodos de aislamiento de EV. Tomados junto, los métodos de la presente invención permiten claramente la comparación de resultados entre diferentes grupos de investigación, y respaldan el uso de medidas de EV para el diagnóstico, pronóstico y toma de decisiones terapéuticas de enfermedades tales como, aunque no limitadas a, cáncer, diabetes y enfermedad cardiovascular.

La presente invención proporciona por consiguiente un método para determinar la tasa de recuperación de EV de muestra, comprendiendo el método:

- mezclar una muestra de biofluido que comprende EV de muestra con una cantidad conocida de rEV en donde rEV comprende: a) una proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a membrana luminal, y b) un marcador heterólogo, para obtener una mezcla,
- aislar las EV de dicha mezcla,
- detectar la cantidad de las rEV entre las EV aisladas, y
- determinar la tasa de recuperación de dichas EV de muestra en base a la relación de la cantidad de rEV después de la etapa de aislamiento a la cantidad conocida de rEV mezcladas con la muestra de biofluido antes de la etapa de aislamiento.

Como se usa en la presente memoria, el término “vesícula extracelular de muestra (EV de muestra)” se refiere a EV endógenas presentes en una muestra – tal como un biofluido – tomado de un paciente. El término “EV endógenas”

se refiere a vesículas con estructura de membrana que se secretan por un amplia gama de tipos de células que incluyen glóbulos rojos, células tumorales y células inmunes ⁴. Se sabe que las EV endógenas se liberan en condiciones tanto normales como patológicas y se sabe que contienen proteínas, lípidos, ácidos nucleicos tales como miARNs y metabolitos. Se ha descrito que las cantidades de varios tipos de – por ejemplo – miARNs presentes en EV endógenas correlacionan con enfermedades particulares ¹⁷. Por tanto, la cuantificación exacta de EV en diagnósticos basados en EV es crucial.

Como se usa en la presente memoria, el término “vesículas extracelulares recombinantes (rEV)” se refiere a EV obtenibles transfectando una célula huésped apropiada con ADN que codifica “una proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal” y con ADN que codifica “un marcador heterólogo”. El último “marcador heterólogo” puede proporcionarse por consiguiente por transferencia directa en células productoras usando procedimientos de transfección celular conocidos por un experto en la técnica. Para marcadores heterólogos que consisten en ARN, esta molécula puede suministrarse o en su forma nativa (es decir, desprotegida) o en una forma protegida. ARN protegido se refiere a modificaciones en la molécula de ARN que mejoran la estabilidad de la molécula reduciendo la actividad RNasa (véase Fisher TL, Terhorst T, et al. (1993) *Nucleic Acids Res*, 21:3857-3865). Ejemplos de modificaciones son enlaces fosforotioato, bases 2'-O-metilo y bases 2'-fluoro. De forma alternativa, y como se indica anteriormente, la molécula de ARN heteróloga puede transcribirse desde un casete de expresión, o bien transfectada en células como un fragmento de ADN bicatenario, como parte de un plásmido, o después de la integración del casete de expresión en el genoma. En su forma más sencilla, un casete de expresión consiste en un promotor, una secuencia que se transcribe y una secuencia que termina la transcripción. Pueden añadirse elementos adicionales para mejorar el proceso de transcripción: 1) El fragmento de ADN transcrito puede condensarse directamente al ADN que codifica la proteína de autoensamblaje; 2) El ADN transcrito codifica una proteína marcadora heteróloga (una proteína luminiscente, fluorescente o cualquier otra proteína detectable) que se traduce como una proteína de fusión a la proteína de autoensamblaje.

La molécula marcadora de ARN heteróloga puede incorporarse a las vesículas mediante una unión específica a la proteína de autoensamblaje (véase Comas-García M. et al., *eLife* 2017 (6):1-27) o mediante incorporación específica a la proteína de autoensamblaje por medio de la señal de empaquetamiento retroviral psi (véase Comas-García M. et al. *eLife* 2017 (6):1-27). De forma alternativa, el marcador heterólogo se incorpora mediante un polipéptido de unión al nucleótido que reconoce una secuencia diana de nucleótidos específica. Para este fin, el polipéptido de unión al nucleótido se condensa directamente a la proteína de autoensamblaje. Ejemplos no limitantes de polipéptidos de unión a ARN son Lambda N, dominio de unión a ARN de MS2, NS3 y Cas9. La secuencia diana de nucleótidos puede usarse directamente como marcador heterólogo, o puede condensarse a la secuencia marcadora heteróloga. Ejemplos no limitantes de secuencias diana de nucleótidos son los aptámeros de NutL, MS2, NS3 y los ARNg.

Los términos “marcador heterólogo” significan un marcador derivado de un organismo diferente del organismo del cual son las EV de muestra bajo examen, o un marcador sintético, que no se origina de ningún organismo existente. El término “marcador” como se usa en la presente memoria se refiere a una proteína o ácido nucleico heterólogo, medible, cuya detección indica la presencia de unas rEV de la presente invención. Un marcador de proteína heteróloga preferido de la presente invención es una proteína emisora de luz como se define también más adelante.

Por tanto, la presente invención se refiere además a un método como se describe anteriormente en el que dicho marcador heterólogo es una molécula de ácido nucleico heterólogo o una proteína heteróloga.

Además, la presente invención se refiere a un método como se describe anteriormente en el que dicha proteína heteróloga se condensa con dicha proteína de autoensamblaje.

Además, la presente invención se refiere a un método como se describe anteriormente en el que dicho ácido nucleico heterólogo se condensa con la señal de empaquetamiento retroviral psi.

La presente invención se refiere además a un método como se describe en el que dicha etapa de detección se comienza determinando la cantidad de cualquier ácido nucleico heterólogo mediante – como ejemplos no limitantes – PCR a tiempo real, RT-qPCR, PCR digital o secuenciación de ARN. Un experto entenderá que pueden usarse también otras técnicas para cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos heterólogos tales como nanostring (véase Geiss et al. *Nature Biotechnology* 26 (2008):317-325), amplificación de ADN ramificada (véase Collins et al., *Nucleic Acids Res*. 25 (1997):2979-2984) o análisis en serie de expresión génica (SAGE; véase Yamamoto M. et al., *J. Immunol. Methods* 250 (2001):45-66).

La presente invención se refiere además – como una realización preferida – a un método como se describe anteriormente en el que dicha proteína heteróloga es una proteína emisora de luz o en el que dicho ácido nucleico heterólogo es ARNm de proteína emisora de luz.

El término “una proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal” significa una proteína que comprende: a) un dominio de inserción de membrana que es un dominio de proteína que se inserta directamente en la doble capa lipídica o que incorpora una cadena lipídica

para la inserción. Un ejemplo no limitante de dicho dominio es el dominio MA del bien conocido antígeno específico del grupo retroviral (Gag), b) un dominio de autoensamblaje que es un dominio de proteína que es responsable de la oligomerización. El último se necesita para un empaquetamiento ajustado de proteínas en un dominio pequeño de la membrana lipídica, de manera que una vesícula contiene una alta cantidad de copias de esa misma proteína. Un ejemplo no limitante de dicho dominio es el dominio CA en la poliproteína Gag, y c) un dominio de gemación tardía que es un dominio de proteína que comprende una secuencia de aminoácidos PTAP, PPXY o FPIV para la incorporación de proteínas ESCRT necesarias para la morfogénesis de la vesícula. Un ejemplo no limitante de dicho dominio es el dominio P6 de la poliproteína Gag^{18,19}. Ejemplos no limitantes de dicha "proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal" son – además de Gag – variaciones de Gag como se describe por Coffin y Hughes²⁰, la proteínas M1 de la gripe como se describe por Lamb y Krung²¹, la proteína Arrdc1 como se describe por Kuo et al.²², la proteína VP40 del virus del ébola como se describe por Harry et al.²³, la proteína Arc como se describe por Pastuzyn et al.²⁴ y las proteínas M del virus de estomatitis vesicular como se describe por Justice et al.²⁵.

Por tanto, la presente invención se refiere a métodos como se describe anteriormente y como se describe más adelante en los que dicha proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal se elige del grupo que consiste en: el antígeno específico del grupo retroviral, variaciones de antígeno específico del grupo retroviral, la proteína M1 de la gripe, la proteína Arrdc1, la proteína Arc, la proteína VP40 del virus del ébola y las proteínas M de virus de la estomatitis vesicular.

Un ejemplo no limitante de unas "rEV" de la presente invención es la obtenible transfectando células HEK293T con ADN que codifica la poliproteína Gag retroviral unida de forma C-terminal con proteína fluorescente verde mejorada (EGFP), seguida o no por la señal de empaquetamiento retroviral psi, que sobreexpresa la proteína de fusión Gag-EGFP en dichas células renales embrionarias durante un cierto periodo de tiempo y aislando las rEV del medio acondicionado por medio de ultracentrifugación de gradiente de densidad.

Como se usa en la presente memoria, el término "proteína emisora de luz" se refiere a cualquier proteína que emite luz mediante un cambio en las condiciones físicas o mediante un proceso químico. Ejemplos no limitantes de dichas proteínas son proteínas fluorescentes tal como proteína fluorescente verde, proteína fluorescente verde mejorada, proteína fluorescente amarilla y proteína fluorescente roja, proteínas luminiscentes, fotoproteínas o luciferasa. La proteína emisora de luz se coloca dentro de las rEV como se explica – por ejemplo – en detalle en el documento US 20130078658. Por tanto, la presente invención proporciona un método como se describe anteriormente en el que dicha proteína emisora de luz es una proteína fluorescente o una proteína luminiscente. La presente invención proporciona específicamente un método como se describe anteriormente en el que dicha proteína fluorescente es proteína fluorescente verde.

Como se usa en la presente memoria, el término "muestra de biofluido" (que contiene EV de muestra) puede ser cualquier biofluido adecuado tomado del cuerpo o en cultivos in vitro. Ejemplos no limitantes de dichos biofluidos son plasma, suero, sangre, orina, moco, saliva, heces, fluido broncoalveolar (BALF), sudor, humor vítreo, gotas de lágrima o medio de cultivo derivado de cultivos celulares o tisulares in vitro. Sin embargo, la presente invención proporciona específicamente un método que se describe además como una segunda realización en el que dicha muestra de biofluido es una muestra de plasma o suero ya que estos biofluidos pueden contener inmunoglobulinas endógenas tales como IgM y/o IgG.

Después de mezclar una muestra de biofluido que comprende EV de muestra con una cantidad conocida de rEV, el método comprende aislar ambos tipos de EV usando cualquier tipo de método de aislamiento tal como cualquier tipo de método de aislamiento basado en la densidad, aislamiento basado en el tamaño, aislamiento basado en la proteína, aislamiento basado en la precipitación, aislamiento basado en la electrostática, aislamiento basado en la acústica, aislamiento basado en la microfluídica o aislamiento basado en lípidos^{13,26-30}.

Detectar la cantidad de las rEV entre las EV aisladas puede comenzarse – como ya se mencionó anteriormente – por qPCR o cualquier otro método como se describe anteriormente para el ARNm de proteína emisora de luz o cualquier otro ácido nucleico heterólogo. En otras palabras, la cuantificación de las rEV puede realizarse usando cualquier método apropiado conocido en la técnica. Ejemplos no limitantes de dichos métodos son métodos de medida de la intensidad de fluorescencia usando un lector de microplacas de fluorescencia, FC, NTA de fluorescencia (fNTA), qPCR para ARNm de proteína emisora de luz o un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima frente a una subunidad de la "proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal" o la proteína emisora de luz.

El método de la presente invención incluye además determinar la tasa de recuperación de las EV de muestra a partir de una relación de la cantidad de rEV después del aislamiento a la cantidad conocida de rEV añadidas a la muestra – que contiene las EV de muestra – antes del aislamiento. La relación de las rEV después del aislamiento a la cantidad conocida de las rEV añadidas a la muestra que contiene EV de muestra puede calcularse y usarse en el cálculo de la tasa de recuperación de las EV de muestra. La última tasa de recuperación puede usarse en la cuantificación y normalización de – por ejemplo – miARNs o proteínas en una muestra obtenida de un paciente y puede usarse por consiguiente en el diagnóstico basado en las EV de muestra.

En otra realización, la presente invención se refiere más específicamente a un método como se describe anteriormente, en el que dicha etapa de aislamiento comprende una etapa de separación y/o se combina con una etapa de separación para obtener una primera fracción que comprende dichas rEV y una segunda fracción que comprende dichas EV de muestra, en el que dicha detección de la cantidad de las rEV se da en dicha primera fracción. La última etapa de separación es preferiblemente una etapa de separación basada en la densidad. Sin embargo, como esta separación está basada en la adherencia de inmunoglobulinas a las rEV también puede conseguirse mediante inmunocaptura de las rEV con por ejemplo perlas (magnéticas) que expresan anticuerpos anti-IgM/anti-IgG en su superficie. La separación mencionada anteriormente puede también conseguirse usando una FC de alta resolución que puede clasificar las vesículas en base a una señal fluorescente como se explica por Van de vlist et al.³¹. La etapa de “detección de la cantidad de las rEV en dicha primera fracción” puede comenzarse mediante – por ejemplo – un análisis fNTA, qPCR para el ARNm de proteína emisora de luz o, un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima frente a una subunidad de dicha proteína de autoensamblaje.

Después de mezclar una muestra de biofluido que comprende EV de muestra con una cantidad conocida de rEV, el método descrito en esta realización comprende separar ambos tipos de EV usando cualquier tipo de método de separación dando por resultado una primera fracción que comprende dichas rEV y una segunda fracción que comprende dichas EV de muestra. Esta sorprendente y única característica del método de la presente invención permite al usuario final aislar las rEV separadas de las EV de muestra. Esto permite el análisis corriente abajo adicional de las EV de muestra sin interferencia por las rEV. Esta única característica es debido al hecho de que las proteínas de inmunoglobulina, tales como IgM y/o IgG, presentes de forma endógena en dicha muestra de biofluido o añadidas de forma exógena a dichas rEV se unen a la superficie de dichas rEV como consecuencia de la orientación de la membrana externa de lípidos específicos (fosfatidilserina o lisofosfatidilcolina). Estos lípidos se reconocen entonces por los anticuerpos, tales como IgM y/o IgG, como un patrón molecular asociado a daño/patógeno (DAMP/PAMP)^{32,33}.

Ejemplos no limitantes de dichos métodos de separación, preferiblemente métodos de aislamiento basados en densidad, son la ultracentrifugación por gradiente de densidad y centrifugación por amortiguamiento de la densidad.

Además, la presente invención proporciona específicamente un método como se describe anteriormente en el que dicha separación basada en la densidad es ultracentrifugación por gradiente de densidad de iodixanol.

Además, la presente invención proporciona un método como se describe anteriormente en el que dicha centrifugación por gradiente de densidad está precedida o no por una etapa de aislamiento biofísico adicional.

Ejemplos no limitantes de las últimas etapas de aislamiento biofísico son ultrafiltración, cromatografía por exclusión de tamaño y ultracentrifugación diferencial.

Más específicamente, la presente invención proporciona un método como se describe anteriormente en el que dicha etapa de aislamiento adicional es una cromatografía de exclusión por tamaño.

Después de separar ambos tipos de EV, el método de la última realización de la presente invención incluye la etapa de detección o cuantificación de la cantidad de las rEV en dicha primera fracción. La cuantificación de las rEV puede realizarse usando cualquier método apropiado conocido en la técnica. Ejemplos no limitantes de dichos métodos son los métodos de medida de intensidad de fluorescencia usando un lector de microplacas de fluorescencia, FC, fNTA, qPCR para ARNm de la proteína emisora de luz o un ensayo de inmunoabsorbente unido a enzima frente a una subunidad de la “proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal” o la proteína emisora de luz. Por tanto, la presente invención proporciona además un método como se describe anteriormente en el que dicha detección de la cantidad de las rEV en dicha fracción se comienza específicamente mediante FC de alta resolución o análisis por fNTA, o qPCR para el ARNm de proteína emisora de luz y un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima frente a un subunidad de la proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal.

Además, y como se expone anteriormente, el método de la presente invención permite realmente al usuario final elegir si desea aislar las rEV junto con las EV de muestra o separadas de las EV de muestra. De hecho, la presente invención también proporciona un método como se describe anteriormente en el que dicha mezcla se trata con una proteasa antes de dicho aislamiento basado en la densidad de manera que dichas rEV y dichas EV de muestra estén presentes en la misma fracción de densidad después de dicho aislamiento basado en la densidad. Cualquier proteasa tal como papaína, tripsina o subtilisina puede usarse. Sin embargo, la presente invención proporciona específicamente un método como se describe anteriormente en el que dicha proteasa es proteinasa K. Para tener dichas rEV y dichas EV de muestra presentes en la misma fracción de densidad, dichas rEV pueden incubarse con PEG conjugado con lípidos antes de mezclar dichas rEV con dicha muestra de biofluido. En este método el PEG conjugado con lípidos – por ejemplo DMPE-PEG – se inserta en la membrana de las rEV orientando las cadenas PEG de bajo peso molecular al exterior de las rEV. Esta orientación exterior de las cadenas PEG de bajo peso molecular inhiben entonces de forma estérica la adherencia de las inmunoglobulinas a la superficie de las rEV. Después del aislamiento de dichas rEV incubadas con PEG conjugado con lípidos y dichas EV de muestra en la misma fracción de densidad, dichas rEV incubadas con PEG conjugado con lípidos pueden separarse de dichas EV

de muestra mediante inmunoprecipitación usando anticuerpos anti-PEG. Por tanto, la presente invención se refiere a un método como se describe anteriormente en el que dichas rEV incubadas con PEG y dichas EV de muestra en la misma fracción después de dicho aislamiento se incuban con perlas magnéticas recubiertas con anti-PEG de manera que dichas rEV incubadas con PEG se separan de dichas EV de muestra. Un experto entenderá que pueden usarse también otras técnicas para capturar dichas vesículas extracelulares recombinantes incubadas con PEG como inmunocaptura en dispositivos microfluídicos, cromatografía de inmunoafinidad o inmunocaptura en pocillos de plástico recubiertos.

Por otro lado, la presente invención también proporciona un método como se describe anteriormente en el que dichas rEV se incuban con proteínas de inmunoglobulina tales como IgG y/o IgM antes de dicha mezcla de dicho biofluido con una cantidad conocida de dichas rEV de manera que dichas rEV y dichas EV de muestra estén presentes en una fracción diferente después de dicha etapa de separación. El último método está adaptado especialmente para muestras de biofluido que contienen cantidades traza o nada de proteínas de inmunoglobulina endógenas.

Perlas de sílice o poliestireno de tamaño de nanométrico se usan a menudo como un calibrador para FC o NTA. Esto lleva normalmente a medidas inexactas de EV ya que el índice de refracción (RI) de estas perlas es mayor que el RI de EV (1,61, 1,46 frente a 1,40). Este mayor RI da por resultado una dispersión aumentada y en consecuencia ajustes del dispositivo erróneos para las medidas de EV que tienen un menor RI y por consiguiente dispersan menos luz^{14,15}. Un material de referencia biológico con el mismo RI que las EV de muestra se necesita para calibrar estos dispositivos¹⁶. Por medio de NTA y cálculos de la teoría de MIE¹⁴ el RI de dichas vesículas extracelulares recombinantes se pudo determinar de forma exacta y se encontró que era igual al RI de dichas vesículas extracelulares de muestra.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para calibrar un dispositivo para el análisis de EV de muestra, comprendiendo el método:

- mezclar un fluido con rEV de las que se conocen las propiedades y en las que dichas rEV comprenden: a) una proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal, y opcionalmente b) un marcador heterólogo, para obtener una mezcla,

- introducir dicha mezcla en dicho dispositivo,

- analizar una propiedad de dichas rEV en dicha mezcla,

- opcionalmente analizar dicha propiedad de nuevo con una o más nuevas combinaciones de ajustes del dispositivo,

- derivar a partir de dicho análisis de dichas rEV una combinación de ajustes del dispositivo que dé la propiedad exacta de dichas rEV usadas para obtener dicha mezcla, y

- usar dicha combinación de ajustes del dispositivo para calibrar el dispositivo frente a futuros análisis posteriores de muestras que contengan EV de propiedades desconocidas, para determinar las propiedades exactas de las mismas.

El término “calibrar” como se usa en la presente memoria significa definir los ajustes apropiados de un dispositivo para analizar las EV de muestra.

El término “fluido” como se usa en la presente memoria significa – por ejemplo – un tampón en que las EV de muestra se aíslan.

El término “opcionalmente” se refiere al hecho de que un marcador heterólogo no se usa bajo todas las circunstancias en el método de calibrado reivindicado porque hay un número de análisis – excepto en el caso de por ejemplo un análisis basado en citometría de flujo umbral fluorescente – que están basados en las características de EV de muestra que no expresan un marcador heterólogo.

El término “una propiedad” como se usa en la presente memoria significa la concentración y/o una característica específica como: el tamaño, la morfología, la presencia de marcadores de EV, el potencial zeta, etc., de EV.

Ejemplos no limitantes de “analizar una propiedad” en relación a un dispositivo que tiene que calibrarse son: 1) elegir los ajustes óptimos de una EM que revele la morfología normal de rEV, 2) definir los ajustes óptimos de los instrumentos de NTA o FC que da por resultado la concentración o tamaño aproximados de las rEV, 3) definir los ajustes óptimos de un zetasizer que da el potencial zeta aproximado de rEV, etc.

El término “ajustes del dispositivo” como se usa en la presente memoria significa – por ejemplo – el nivel de cámara para NTA, el umbral de detección para NTA o FC, el voltaje correcto para medidas de EM y o potencial zeta, el tamaño de poro correcto para TRPS, etc.

La presente invención se refiere además a un método como se describe anteriormente en el que dicho dispositivo es un citómetro de flujo, un dispositivo de análisis de rastreo de nanopartículas, un dispositivo sensor de pulso resistivo

ajustable, un lector de placas, un dispositivo microfluídico, un lector de ELISA, un zetasizer, un microscopio de fuerza atómica, analizadores de resonancia por plasmón superficial o un microscopio electrónico.

La presente invención también se refiere a un método para evaluar el aislamiento de EV, comprendiendo el método:

- 5 - mezclar un fluido con rEV en el que las rEV comprenden: a) una proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal, y b) un marcador heterólogo, para obtener una mezcla,
- aislar las rEV de dicha mezcla, y
- detectar la presencia de las rEV aisladas de dicha mezcla.

- 10 El término "evaluar el aislamiento" como se usa se refiere al hecho de que los productores de nuevos métodos de aislamiento de EV pueden usar las rEV descritas en la presente invención para evaluar si su nueva técnica aísla EV. Por ejemplo: los desarrolladores de un chip de detección de EV pueden probar su chip con rEV (que son fácilmente detectables) antes de probar las muestras que contienen EV endógenas.

El término "que detecta" se refiere a las técnicas de detección mencionadas anteriormente del marcador heterólogo (ELISA, fNTA, FC de fluorescencia, RT-qPCR,...).

- 15 La presente invención se describirá en más detalle en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Materiales y métodos

Anticuerpos

- 20 Los siguientes anticuerpos primarios y secundarios se usaron para inmunotinción: anti-Alix monoclonal de ratón (1:1000) (2171, Cell Signaling, Danvers MA, EE.UU.), clon anti-CD9 monoclonal de conejo D3H4P (1:1000) (13403S, Cell Signaling), clon anti-CD63 monoclonal de ratón MEM-259 (1:200) (ab8219, Abcam, Cambridge, RU), anti-CD81 monoclonal de ratón (1:1000) (SC-166029, Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, EE.UU.), anti-Flotilina-1 monoclonal de ratón (1:1000) (610820, BD Biosciences, Franklin Lakes NJ, EE.UU.), proteína fluorescente anti-verde monoclonal de ratón (GFP) (1:1000) (MAB3580, Merck Millipore, Billerica MA, EE.UU.), anti-IgG monoclonal de conejo (1:1000) (ab181236, Abcam), anti-IgM policlonal de pollo (1:1000) (ab26867, Abcam), anti-sintetina-1 (1:1000) (ab133267, Abcam), anti- α -tubulina monoclonal de ratón (1:4000) (T5168, Sigma, San Luis, MO, EE.UU.), anticuerpo unido a peroxidasa de rábano picante anti-ratón de oveja (1:3000) (NA931V, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia), anticuerpo unido a peroxidasa de rábano picante anti-conejo de burro (1:4000) (NA934V, GE Healthcare Life Sciences) y anticuerpo unido a peroxidasa de rábano picante IgY anti-pollo de cabra (1:5000) (A16054, Thermo Fisher scientific, Erembodegem, Bélgica). La microscopía inmunoelectrónica se realizó con un anticuerpo anti-CD63 monoclonal de ratón primario (clon H5C6) (557305, Becton Dickinson) y una IgG anti-ratón de conejo (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, EE.UU.). Para la inmunoprecipitación de CD81 se usó anticuerpo anti-CD81 monoclonal de ratón (MA5-13548, Thermo Fischer scientific).

- 35 Cultivo y transfección celular

Se cultivaron células HEK293T en una atmósfera humidificada al 10% de CO₂ usando DMEM alto en glucosa (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Las células se pasaron a 70-80% de confluencia en matraces T175 y se descartaron después de diez pasadas. Los cultivos celulares se probaron de forma regular y se encontraron negativos para la contaminación con micoplasma usando el kit de detección de micoplasma MycoAlert (Lonza, Verviers, Bélgica).

- 40 Los plásmidos pMET7-GAG-EGFP y pMET7mcs vacío (MOCK) se purificaron a partir de DH10B E. coli usando el kit de nucleoenlace PC2000 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo los procedimientos del fabricante ³⁴. Las células se sembraron en matraces T175 y se transfectaron al 70-80% de confluencia (día 1) usando polietilenimina (PEI) lineal 25 K (Polysciences, Warrington PA, EE.UU.) en una relación PEI:ADN de 5:1 con una concentración final de 1 µg de ADN/mL de medio de cultivo en un volumen total de 120 mL por matraz de cultivo celular multicapa.

Aislamiento de rEV

- 48 h después de la transfección (día 3) las células se lavaron tres veces usando medio sérico reducido Opti-MEM (31985070, Thermo Fischer Scientific) seguido por 24 h de incubación con 15 mL de medio sérico reducido Opti-MEM suplementado con 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin a 37°C y 10% de CO₂. El medio acondicionado (CM) se cosechó y centrifugó durante 10 minutos a 200g y 4°C para eliminar las células separadas, seguido por una filtración en 0,45 µm de acetato de celulosa (Corning, Nueva York, EE.UU.) para eliminar partículas más grandes. Después, el CM se concentró aproximadamente 300 veces usando un dispositivo de filtro centrífugo Centricon Plus-70 con un límite de peso molecular nominal de 10K (Millipore, MA, EE.UU.). El CM concentrado
- 50

(CCM) resultante se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,2 µm (Whatman) y 1 mL se usó para la ultracentrifugación por gradiente de densidad Optiprep. Después de la recogida del medio, los cultivos celulares se tripsinaron y la viabilidad celular se midió en un Contador de Células Automático Countess (Invitrogen) usando una prueba de exclusión de azul de triptano al 0,1%.

- 5 Se hizo un gradiente de iodixanol discontinuo haciendo capas de disoluciones de 4 mL de 40%, 4 mL de 20%, 4 mL de 10% y 3,5 mL de 5% de iodixanol en la parte superior las unas de las otras en un tubo de polialómero con la parte superior abierta de 16,8 mL (337986, Beckman Coulter) ²⁶. 1 mL de muestra de CCM se recubrió en la parte superior del gradiente que se centrifugó entonces durante 18 h a 100.000g y 4°C (rotor SW 32.1 Ti, Beckman Coulter). Todos los gradientes se hicieron usando una estación de trabajo automatizada biomek 4000 (Beckman Coulter). Las
- 10 disoluciones de 5%, 10%, 20% y 40% de iodixanol se hicieron mezclando cantidades apropiadas de un tampón de homogeneización (sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, [pH 7,4]) y una disolución de trabajo de iodixanol. Esta disolución de trabajo se preparó combinando un tampón de disolución de trabajo (sacarosa 0,25 M, EDTA 6 mM, Tris-HCl 60 mM, [pH 7,4]) y una disolución estándar de OptiPrep™ (disolución de iodixanol acuosa al 60% (p/v)) (Axis-Shield, Oslo, Noruega). Después de la centrifugación (día 4) se recogieron fracciones de gradiente de 1 mL
- 15 desde la parte superior a la parte inferior usando una estación de trabajo automatizada biomek 4000, se diluyeron las fracciones 8 y 9 a 16 mL en PBS y se centrifugaron durante 3 h a 100.000g y 4°C. Los gránulos resultantes se suspendieron de nuevo en 100 µL de PBS y se almacenaron a -80°C. Para la proteómica y lipidómica la última etapa de granulada a 100.000g se substituyó por una cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) y se recogieron las fracciones 4-7 ³⁵. Para estimar la densidad de cada fracción se hizo una curva estándar de los valores de
- 20 absorbancia a 340 nm de diluciones acuosas 1:1 de disoluciones al 5%, 10%, 20% y 40% de iodixanol. Esta curva estándar se usó para determinar la densidad de las fracciones recogidas de un gradiente de control puesto encima con 1 mL de PBS.

Recogida de la muestra

- 25 La recogida de muestras de los pacientes fue según la aprobación del comité ético del hospital universitario de Ghent y de acuerdo con directrices relevantes. Se recogió sangre venosa de voluntarios sanos y pacientes con cáncer de mama usando tubos de citrato Venosafe (VF-054SBCS07, Terumo Europe, Leuven, Bélgica). Directamente después de la recogida, la sangre completa se centrifugó dos veces durante 15 min a 2500 g a temperatura ambiente dando por resultado plasma libre de plaquetas (PFP). El PFP se almacenó a -80°C hasta un uso posterior o se usó de forma instantánea (fresco) cuando así se indique. Se recogió orina de voluntarios sanos y
- 30 se centrifugó durante 10 minutos a 1000g y 4°C seguido por aislamiento de EV directo.

Aislamiento de EV

- La ultracentrifugación diferencial (dif UC) se realizó según Thery et al. ³⁰. En resumen, el plasma se diluyó con volúmenes iguales de PBS y se centrifugó a 2000g durante 30 min a 4°C, el sobrenadante se centrifugó entonces una vez a 12000g durante 45 min y 2 horas a 111000g a 4°C en un rotor SW32.1 Ti (Beckman Coulter). El gránulo
- 35 resultante se diluyó entonces con 5 mL de PBS, se filtró con 0,22 µm y se centrifugó de nuevo a 110000g durante 70 min en un rotor SW55 Ti (Beckman Coulter). El gránulo final se suspendió de nuevo en 100 µL de PBS y se analizó directamente con NTA o se almacenó a -80°C para el análisis de proteína.

- La cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) se realizó en una jeringa de 10 mL con una red de nailon con 20 µm de tamaño de poro (NY2002500, Merck Millipore, Billerica MA, EE.UU.) en la parte de abajo. La jeringa se empaquetó con 10 mL de Sepharose CL-2B pre-lavada (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y una muestra de 2 mL se cargó en la parte superior, después de lo cual se recogieron fracciones de 1 mL de eluido bajo flujo gravitacional constante añadiendo continuamente PBS que contenía dihidrato de trisodiocitrato al 0,32% (ChemCruz, Dallas, Texas, EE.UU.). Las fracciones recogidas se analizaron directamente con NTA o se congelaron a -80°C para el análisis de proteína.
- 40

- 45 Para purificar adicionalmente las EV, después de SEC, se concentraron las fracciones eluidas 4-5-6 a 1 mL con filtros centrifugos Amicon Ultra-2mL con un valor de corte de 10K (UFC201024, Merck Millipore, Billerica MA, EE.UU.) y se pusieron en la parte superior de un gradiente de iodixanol discontinuo y se centrifugaron como se describe anteriormente en la sección de aislamiento de rEV. Si así se indica, se realiza un tratamiento de proteinasa K (PK) adicional después de la concentración y antes de la centrifugación por gradiente de densidad. Esto se hizo a
- 50 una concentración de PK de 1 mg/mL durante 60 min a 37°C y se acabó a 4°C.

Se usó ExoQuick-TC según las instrucciones del fabricante (System Biosciences). Brevemente, se mezclaron 250 µL de plasma desfibrinado con 63 µL de disolución ExoQuick-TC y se incubaron a 4°C durante 30 min. Después la mezcla se centrifugó a 1500 g durante 30 min y el gránulo resultante se suspendió de nuevo en 200 µL de agua libre de RNasa y se almacenó a -80°C.

- 55 Microscopía (inmuno)electrónica

Las EV aisladas se depositaron en rejillas recubiertas de carbono formvar sometidas a descarga luminiscente y se tiñeron con uranilacetato neutro y se incrustaron en metilcelulosa/acetato de uranilo. Para la inmunoelectromicroscopía, las rejillas que contenían las vesículas se incubaron con 1% de BSA en disolución de

bloqueo de PBS. Los anticuerpos y conjugados con oro se diluyeron en 1% de BSA en PBS. Las rejillas se expusieron al anticuerpo anti-CD63 primario durante 20 min, seguido por anticuerpo secundario a IgG anti-ratón de conejo (Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.) durante 20 min y el complejo proteína A-oro (CMC Utrecht, Países Bajos) durante 20 min. Las rejillas se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit (FEI, Eindhoven, Países Bajos). Las imágenes se capturaron mediante una cámara de dispositivo acoplado con carga Quemasa (Olympus Soft Imaging Solutions, Munster, Alemania).

Análisis de rastreo de nanopartículas

El análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) se realizó usando un microscopio NanoSight LM10-HS (NanoSight, Amesbury, RU) equipado con un láser de 488 nm y un sistema automático de bombeo por jeringa. Para el NTA convencional se grabaron tres vídeos de 30 segundos de cada muestra con un nivel de cámara de 14, un umbral de detección de 3 y una velocidad de infusión por bombeo de jeringa de 20. Para las medidas de NTA de fluorescencia (fNTA) se usó un filtro de longitud de paso de 500 nm adicional, y el nivel de la cámara se aumentó a 16. Las temperaturas se monitorizaron durante las medidas y los vídeos se analizaron con software NTA 3.2. Para medidas óptimas, las muestras se diluyeron con PBS hasta que la concentración de partículas estuvo en el intervalo de concentración óptima del Software NTA (3×10^8 - 1×10^9). Para cálculos de recuperación la cantidad de partículas fluorescentes se midió antes de la adición.

Citometría de flujo de alta resolución

Se realizó la citometría de flujo de alta resolución de EV en un citómetro de flujo BD Influx basado en chorro en aire (BD Biosciences, San José, CA) usando una configuración optimizada³¹. En resumen, el BD Influx se activó por la señal de fluorescencia derivada de las rEV marcadas de forma fluorescente, y se aplicó un umbral en este canal. El nivel umbral se ajustó para permitir una velocidad del suceso ≤ 10 /s cuando se pasa PBS limpio. Se midió la dispersión frontal con un ángulo de recogida de 15-25° (dispersión frontal con ángulo amplio reducido [rw-FSC]). Se usaron tres láseres: un láser a 488 nm de 200 mW (Sapphire; Coherent, Santa Clara, CA), un láser a 561 nm de 150 mW (Jive, Cobolt, Solna, Suecia), y un láser a 640 nm de 120 mW (Melles Griot, Carlsbad, CA). Se usó una boquilla de calibre grande (140 μ m), la presión de la cobertura se monitorizó permanentemente y se mantuvo en 33,71 a 34,61 KPa (4,89 a 5,02 psi), y la presión de la muestra se ajustó a 29,58 kPa (4,29 psi), para asegurar el diámetro idéntico del núcleo en la corriente de chorro. Los conteos de EV se determinaron midiendo cada muestra durante 30 s. La velocidad del suceso estuvo por debajo de <10.000 /s para evitar la detección de partícula coincidente y la ocurrencia de aglomeración.

Medidas de potencial zeta

Las medidas del potencial zeta se realizaron con un zetasisizer nano ZS, que hace uso de electroforesis doppler con láser, (Malvern Instruments Ltd, Malvern, RU) en células capilares plegadas desechables a 22°C en agua destilada. Las partículas EV MOCK y rEV se suspendieron en cantidades iguales de partículas en agua destilada y se realizaron cinco medidas de 10-100 ciclos usando la opción "automodo". Los valores de potencial zeta dados son las medias de las cinco respectivas medidas.

Cuantificación de rEV por medio de medida de la intensidad de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se realizaron con un lector de microplacas multi-modo de paradigma spectramax (molecular devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.) equipado con un láser de 488 nm y filtro de 500 nm. Como un control positivo se usó un anticuerpo Alexafluor488, y las unidades de fluorescencia relativa (RFU) se calcularon restando las FU de un control negativo (PBS) de las FU de las muestras. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Cuantificación de rEV por medio de ELISA anti-P24

Las concentraciones de proteína GAG-EGFP se determinaron con el kit para ELISA anti-P24 de mAB del antígeno de VIH Innostest (Innogenetics, Ghent, Bélgica) disponible comercialmente. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los cálculos de recuperación se incluyó una curva estándar de rEV, del mismo lote que se usó para la adición, que osciló de 10^7 a 10^6 partículas fluorescentes como se midió previamente con fNTA.

Análisis de proteína

Se midieron las concentraciones de proteína de EV, después de la lisis con dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,2%, con el kit de ensayo Qubit Protein (ThermoFisher, Waltham MA, EE.UU.) y fluorómetro Qubit 3.0 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de proteína de lisados celulares, obtenidos en tampón de lisis Laemmli (Tris-HCl 0,125 M [pH 6,8], 10% de glicerol, 2,3% de SDS), se determinaron usando el ensayo de proteína Bio-Rad DC (Bio-Rad, Hércules, EE.UU.). Para el análisis de proteína, las muestras se disolvieron en tampón de muestra reductor (Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 40% de glicerol, 9,2% de SDS, 3% de 2-mercaptoetanol, 0,005% de azul de bromofenol) y se hirvieron a 95°C durante 5 min. Para el análisis de CD63 las muestras se disolvieron en tampón de muestra no reductor que carecía de 2-mercaptoetanol. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hércules CA, EE.UU.). Las membranas se bloquearon durante 30 min en tampón de bloqueo (5% de leche desnatada en PBS con 0,5% de Tween-20) y se incubaron toda la noche

a 4°C con anticuerpos primarios. Se añadieron anticuerpos secundarios durante 60 min a temperatura ambiente después de lavado extensivo con tampón de bloqueo. Después del lavado final, se añadió sustrato de quimioluminiscencia (WesternBright Sirius, Advanta, Menlo Park CA, EE.UU.) y se realizó la formación de imágenes usando Proxima 2850 Imager (IsoGen Life Sciences, De Meern, Países Bajos). La cuantificación de la intensidad de señal se realizó usando el software ImageJ.

LC-MS/MS

Se añadió Amphipol A8-35 a 1 mg/mL a ambas muestras que contenían la misma cantidad de partículas como se midió con NTA. Las muestras se giraron generando un vórtice y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente (pH 7). Después las muestras se redujeron y se alquilaron con respectivamente TCEP 15 mM y yodoacetamida 30 mM durante 15 min en la oscuridad a 37°C. Las muestras se acidularon con ácido fórmico al 5% a pH 3 y se centrifugaron. Los gránulos resultantes que contenían proteína se disolvieron de nuevo en 0,5 mL de bicarbonato de amonio 50 mM seguido por digestión toda la noche con 2,5 µg de tripsiona a 37°C. Después de la digestión, las muestras se acidularon una vez final a pH 3 dando por resultado la precipitación de Amphipol A8-35. El sobrenadante que contenía el material peptídico se concentró secando al vacío a 20 µl y se analizaron 8 µl por LC-MS/MS en el espectrómetro de masas Q-Exactive con un gradiente de 120 min. El dato obtenido se buscó usando Maxquant frente a una base de datos que contenía las entradas "Homo sapiens" de Swiss-Prot (versión 05/2016: 20195 secuencias) suplementada con la secuencia de la proteína de fusión GAG-EGFP. La identificación se realizó a un nivel de confianza del 99%. Los espectros que se originaron a partir de proteínas potencialmente contaminantes se identificaron añadiendo una lista fasta de contaminantes predeterminada a la búsqueda. Un conteo de relación mínima de péptidos únicos o razor se necesitó para la cuantificación. El análisis de datos adicional se realizó con software Perseus (versión 1.5.4.1). Los contaminantes y los resultados de la base de datos inversa se eliminaron y las intensidades LFQ se transformaron en log2 para obtener distribuciones de relación normal. Las muestras replicadas se agruparon. Las proteínas con menos de tres valores válidos en al menos un grupo se eliminaron y los valores perdidos se imputaron desde una distribución normal alrededor del límite de detección.

Inmunoprecipitación

Las perlas magnéticas con IgG anti-ratón de cabra o IgG anti-conejo de cabra MagnaBind (Thermo Fischer scientific, Erembodegem, Bélgica) se incubaron con 10 µg de anti-CD81, anti-CD63, anticuerpo anti-PEG o PBS (control negativo) por 200 µL de perlas durante 2 h a 4°C mientras se rotaban. Las perlas se lavaron tres veces con 500 µL de PBS suplementado con 0,001% de Tween20 (Sigma, Diegem, Bélgica) y se incubaron con la muestra que contenía rEV o rEV-PEG durante 2 h a 4°C mientras se rotaban. Las perlas se lavaron tres veces y el sobrenadante se acumuló y se hizo gránulos usando un rotor SW55 (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.) a 100.000 g durante 70 min.

Análisis de ARN

Se aisló el ARN total de las vesículas usando el kit miRNeasy Micro según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). La concentración de ARN se midió usando un espectrofotómetro UV-Vis (Nanodrop Technologies, Wilmington DE, EE.UU.). El análisis de expresión de ARNm de GFP en rEV se realizó por medio de reacción de cadena polimerasa en tiempo real cuantitativa (PCR) (RT-qPCR) usando ensayos PrimePCR (Bio-Rad). Los 10,0 µL de mezcla de reacción de PCR contenían Ensayo PrimePCR (0,5 µL), supermezcla SsoAdvanced SYBR Green (5,0 µL), ADNc (1 µL que correspondía al ADNc transcrito de forma inversa a partir de aproximadamente 10 ng de ARN), y agua libre de nucleasa (4,5 µL). La placa de 384 pocillos se procesó en el CFX 384 (Bio-Rad) a 95°C durante 30 segundos, después 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 15 segundos (durante 45 ciclos). Se usaron los siguientes cebadores: par 1 de cebador de EGFP con secuencia directa GACGACGGCAACTACAAGAC (SEQ ID NO 1) y secuencia inversa TCCTTGAAGTCGATGCCCTT (SEQ ID NO 2) y par 2 de cebador de EGFP con secuencia directa TAAACGGCCACAAGTTCAGC (SEQ ID NO 3) y secuencia inversa GAACTTCAGGGTCAGCTTGC (SEQ ID NO 4). Los datos se procesaron y normalizaron usando el software qbase+2.6 (www.biogazelle.com).

Análisis lipídico

Los lípidos se extrajeron usando un protocolo Bligh-Dyer modificado y los fosfolípidos se analizaron mediante espectrometría de masas en tándem con ionización por electropulverización (ESI-MS/MS) en un espectrómetro de masas híbrido triple cuadrupolo con trampa de iones lineal (4000 QTRAP, AB SCIEX, Framingham, Massachusetts, EE.UU.) equipado con un dispositivo robótico de inyección de muestra e ionización (TriVersa NanoMate, Advion). La energía de colisión se varió como sigue: prec 184, 50 eV; nl 141, 35 eV; nl 87, -40 eV; prec 241, -55 eV. El sistema se operó en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) para la cuantificación de especies individuales. Para cuantificar la cantidad total de fosfolípidos, se sumaron las abundancias de especies medidas individualmente en cada clase de fosfolípidos y se normalizaron en base a la cantidad de proteína. Se midieron las concentraciones de colesterol total con el kit de ensayo de colesterol Amplex Red (A12216, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

PEGilación de rEV

Se incubaron rEV (2E10) en 100 μ L de DMPE-PEG 5k 0,015 μ g/mL (PG1-DM-5K, Nanocs, NY, EE.UU.) a 40°C durante 2 h mientras se mezclaba suavemente.

Liofilización

- 5 Para la liofilización, las muestras se diluyeron a 1:200 en 1 mL de PBS que contenía 5% de trehalosa a una concentración final mayor después 5×10^{10} partículas/mL. Los viales se pusieron en estantes pre-enfriados a -45°C durante 2 h después de lo cual la presión de la cámara se disminuyó hasta 10 Pa (0,1 mbar). Desde el momento en que se alcanzó la presión deseada, la temperatura del estante se aumentó a 1°C/min a -25°C y se mantuvo durante 24 h. Cuando todo el hielo se sublimó completamente la temperatura se aumentó a 0,15°C/min a la temperatura de secado final de 20°C y esta temperatura se mantuvo durante 4 h. Finalmente la temperatura se disminuyó de nuevo a 1°C/min a una temperatura de almacenamiento de 3°C mientras se mantenía el vacío hasta que se paró el ciclo.

Ejemplo 1: Las vesículas extracelulares recombinantes (rEV) comparten características físicas y bioquímicas con las vesículas extracelulares de muestra endógenas (EV de muestra).

- 15 Para la producción para rEV se hizo uso de la sobreexpresión de una proteína de fusión de la poliproteína de antígeno específico del grupo retroviral (Gag) unida de forma C-terminal con proteína fluorescente verde mejorada (EGFP). Las rEV se aislaron del medio acondicionado (CM) 72 h después de la transfección de aproximadamente 3×10^9 células HEK293T con ADN de Gag-EGFP mediante ultracentrifugación por gradiente de densidad Optiprep (ODG) y formación de gránulos consecutiva dando por resultado aproximadamente 5×10^{11} vesículas (Fig. 1b). La eficiencia de transfección, calculada por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, fue en promedio 75% (Fig. 1e,f) sin cambios significativos en la morfología y viabilidad celular en comparación con células transfectadas MOCK (Fig. 1 c,d). El análisis de electroinmunotransferencia para EGFP de 6 transfecciones en diferentes puntos temporales probaron que la transfección de Gag-EGFP era reproducible (Fig. 1 g,h). La expresión de la proteína de fusión Gag-EGFP dio por resultado en más de 5 veces más partículas por célula en comparación con células transfectadas MOCK (Fig. 2 a).

- 25 Para comprobar la similitud de rEV con EV de muestra, se compararon las EV de células HEK293T transfectadas tanto con Gag-EGFP (rEV) como con MOCK (EV MOCK) en base a las características físicas y bioquímicas encontradas anteriormente que son importantes para un posible material de referencia de EV ¹⁶.

- El análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) mostró un modo de tamaño medio 24,51 nm $\pm$ 3,631 mayor para rEV en comparación con EV MOCK (Fig. 2b), pero mostró un modo de tamaño medio 7,769 nm $\pm$ 3,246 más pequeño y similar que las EV aisladas de células de cáncer de mama MCF7 humanas transfectadas con Rab27b y WT, células de cáncer de mama 4T1 de ratón y fibroblastos asociados a cáncer humano respectivamente y un modo de tamaño medio similar a las EV aisladas de plasma y orina. El potencial zeta promedio para rEV en agua fue similar a los de las EV de diferentes líneas celulares y biofluidos (-34 mV) y el análisis de electroinmunotransferencia de todas las fracciones ODG desde la parte superior a la inferior a partir de CM de células HEK293T transfectadas con GAG-EGFP y MOCK identificó proteínas enriquecidas en EV TSG101, CD81 y Alix en la fracción 8-9 que corresponden a una densidad flotante de 1,094 g/mL (Fig. 2c,d) ²⁶. EGFP se caracterizó por una distribución Gaussiana, con los niveles de proteína mayores en la fracción enriquecida en EV de CM. Las imágenes de EM visualizaron una población heterogénea de vesículas en muestras de rEV y EV MOCK con distribuciones de morfología y tamaño similares, de acuerdo con las medidas de NTA (Fig. 2 e,f). El RI de rEV, calculado por la teoría de Mie y flujo-SR, es aproximadamente 1,36, que corresponde al RI de EV MOCK y EV de diversas fuentes (Fig. 2g).

- El análisis de electroinmunotransferencia de rEV, EV MOCK y EV aisladas a partir de células MCF7 que sobreexpresan Rab27b identificó la presencia de proteínas enriquecidas en EV Alix, TSG101, CD81, Flotilina-1, sintenina-1 y CD9 (Fig. 3 a). La mancha de CD63 difirió entre las rEV y EV MOCK, y EV aisladas de células MCF7. La inmunocaptura de rEV con perlas magnéticas recubiertas con anti-CD81, anti-CD63 o anti-CD9 confirmó el co-aislamiento de CD81, CE63 o CD9 con GAG-EGFP (Fig. 3 b). La microscopía inmunoelectrónica (IEM) con un anticuerpo secundario marcado con oro que reconoce anticuerpo anti-CD63 que está dirigido a un epítipo en el bucle extracelular grande, confirmó la presencia de CD63 en la membrana de rEV (Fig. 3c).

- Las proteínas de rEV y EV MOCK aisladas por ODG seguido por cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) se digirieron con tripsina y se analizaron por LC-MS/MS seguido por cuantificación de las proteínas identificadas mediante una método libre de marcas. Se identificaron un total de 869 y 900 proteínas en las rEV y EV MOCK respectivamente de las que 46 y 77 proteínas estaban significativamente enriquecidas en las rEV y EV MOCK respectivamente. En el grupo de proteínas que se expresaron igualmente en las rEV y EV MOCK (n=823) se encontraron la mayoría de las proteínas asociadas con EV (Fig. 3d). Cuando se compararon las proteínas asociadas a ESCRT, las proteínas que juegan un papel en la biogénesis de las EV, con proteínas enriquecidas en las rEV y EV MOCK e igualmente expresadas se encontró que 27 proteínas asociadas con ESCRT se expresaban igualmente en las rEV y EV MOCK; solo 2 estaban significativamente enriquecidas en las EV MOCK, mientras que ninguna proteína asociada a ESCRT estaba significativamente enriquecida en las rEV (Fig. 3e).

Además se realizó una lipidómica basada en espectrometría de masas para fosfolípidos, esfingomielinas, ceramidas y lisofosfolípidos en tres replicados biológicos tanto de rEV como de EV MOCK. Se encontró una correlación positiva entre la composición lipídica de las rEV y EV MOCK excepto por un fosfolípido, PS 32:1, que estaba 5 veces más expresado en las rEV en comparación con las EV MOCK (Fig. 4 a). La evaluación de la concentración del colesterol por partícula de rEV y EV MOCK por medio de un kit colorimétrico reveló sin embargo una diferencia significativa de $2,265 \times 10^{-12} \pm 6,479 \times 10^{-13}$ μg de colesterol/partícula más para las rEV en comparación con las EV MOCK ($p=0,0129$), pero similar a las concentraciones de colesterol de las EV aisladas de diferentes cultivos celulares y biofluidos (Fig. 4 b). Esto se esperaba debido al alto número de moléculas Gag-EGFP unidas a la membrana organizadas en pilas de lípidos que contenían colesterol^{36,37}.

Ejemplo 2: Identificación de métodos de detección de las rEV

Se analizaron diferentes métodos de detección por su capacidad para cuantificar las rEV en presencia de EV de muestra explotando su proteína de fusión Gag-EGFP fluorescente y no humana.

La identificación de las rEV por NTA de fluorescencia (fNTA), haciendo uso de un láser de 488 nm y un filtro de paso largo de 500 nm, midió en promedio 79% de partículas fluorescentes. No se observaron diferencias en la distribución de tamaño de rEV medidas con NTA convencional (medidas por medio de dispersión de luz) y fNTA (Fig. 5 a). De forma alternativa, las rEV pueden evaluarse por citometría de flujo de alta resolución (FC) (Fig. 5b). FC y fNTA detectaron cantidades relativas similares de tres replicados biológicos de rEV. Las rEV se midieron por triplicado en una serie de dilución 2/3 en PBS con un lector de placas de fluorescencia. Se obtuvo una tendencia de señal lineal de 10^{10} a 2×10^8 partículas, con una R^2 media de 0,969 para tres replicados biológicos (Fig. 5 d). La electroinmunotransferencia para EGFP en una serie de diluciones $\frac{1}{2}$ de rEV en PBS identificó un límite de detección inferior de $7,8 \times 10^7$ partículas, con un estrecho intervalo lineal de 10^9 a 4×10^8 partículas (Fig. 5c). Con un kit ELISA comercial para P24, una subunidad de la poliproteína Gag, la concentración de P24 (ng/mL) podría correlacionarse con la cantidad de partículas (como se cuantifica por fNTA). Esta técnica se encontró que era la más sensible con un intervalo de concentración lineal de 10^7 a 10^6 partículas suspendidas en PBS en una serie de dilución $\frac{1}{2}$ por triplicado con una R^2 media de 0,978 para tres replicados biológicos (Fig. 5e). Las señales RFU y concentraciones de P24 obtenidas con un lector de placas de fluorescencia y una ELISA anti-P24 difirieron respectivamente entre diferentes lotes de rEV. Cuando se midió la concentración de ARNm de EGFP de una serie de dilución $\frac{1}{2}$ en PBS se encontró una relación semi-logarítmica entre la cantidad de partículas y los valores Cq para Q-PCR de EGFP ($R^2=0,9925$) en un amplio intervalo de 2×10^9 a 4×10^7 partículas de rEV (Fig. 5f).

Ejemplo 3: Identificación de condiciones de almacenamiento optimizadas de rEV

Se evaluó la estabilidad de las rEV en diferentes condiciones.

Después de dos ciclos consecutivos de congelación descongelación a -80°C no se observaron cambios significativos en la concentración y distribución de tamaño en comparación con rEV recién aisladas (Fig. 6 a). El almacenamiento diluido a 4°C dio por resultado 18,85% de reducción en la concentración después de 24 h y 72,56% después de una semana (Fig. 6 b), mientras que el almacenamiento a 4°C de rEV a una mayor concentración fue estable hasta una semana (Fig. 6 c). Las rEV liofilizadas en PBS suplementado con 5% de trehalosa no mostró ningún cambio en la distribución de tamaño y concentración (Fig. 6 d).

El efecto de la exposición a la luz en las rEV se analizó por fNTA a diferentes puntos temporales del mismo lote de rEV incubadas a 4°C en un tubo microcentrífugo, claro frente a negro, omitido de luz. No se detectaron diferencias en la concentración en las rEV expuestas u omitidas a la luz. Después de 5 h la concentración se redujo en los tubos tanto claro como negro como resultado de la inestabilidad de las rEV diluidas a 4°C (Fig. 6 e).

Para comprobar la estabilidad de las rEV en plasma, se almacenaron muestras de plasma adicionado durante 1 semana a -80°C . La recuperación de rEV después de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) se comparó con plasma recién adicionado. La recuperación fue 50% menos eficiente a partir del plasma congelado en comparación con el plasma fresco (Fig. 6 f).

Ejemplo 4. El uso de rEV para estimar la eficiencia de los métodos de aislamiento de EV

Se adicionó PBS o plasma de donante sano con rEV y se realizó la SEC, ultracentrifugación diferencial (dUC), precipitación Exoquick y ODG. La recuperación de rEV, y por consiguiente la eficiencia del método de aislamiento, se evaluó por electroinmunotransferencia para EGFP y se cuantificó por fNTA y ELISA anti-P24.

El análisis de electroinmunotransferencia para EGFP reveló que las rEV eluyen en fracciones similares a las EV de muestra después del aislamiento con SEC (Fig. 7 a). Cuando se adicionan en PBS, las rEV eluyen en las fracciones 4 a 6 que corresponde a la señal TSG101 de EV de células MCF7-Rab27b (Fig. 7 a). Las rEV adicionadas en plasma eluyen en las mismas fracciones que las EV de muestra en plasma (Fig. 7a), La señal de EGFP en la fracción 6 se enmascaró por la co-elución de abundantes proteínas plasmáticas (albúmina). La cuantificación de R-EV por fNTA y ELISA anti-P24 reveló una eficiencia de aislamiento de casi 100% (Fig. 7b).

Después, las fracciones SEC 4 a 6 del plasma adicionado con rEV se concentraron a 1 mL y se cargaron en la parte superior de un gradiente de iodoxanol discontinuo. Después de 18 h de centrifugación a 100.000 g se recogieron todas las fracciones de arriba a abajo. Las medidas del análisis de electroinmunotransferencia y fNTA revelaron que la rEV estaba localizada en las fracciones de mayor densidad 12-13 (1,14-1,18 g/mL), en contraste con las EV de muestra plasmáticas, localizadas en las fracciones 8-9 (Fig. 8a,b). La microscopía electrónica y análisis de electroinmunotransferencia identificaron la agregación de rEV e interacción con proteínas plasmáticas que incluían inmunoglobulinas (IgG) (Fig. 8b,c). La cuantificación con fNTA reveló una eficiencia de aislamiento de solo 27,5% en las fracciones ODG 12-13 (datos no mostrados). La agregación de rEV solo parecía darse cuando se adicionaban en plasma, ya que el 40% de las partículas de rEV se recuperaron después de centrifugación ODG cuando se adicionaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS (Fig. 8d). Cuando se realizó un ODG de abajo arriba o de arriba abajo en orina adicionada con rEV todas las partículas de rEV pudieron encontrarse en las fracciones de densidad enriquecida con EV endógenas (Fig. 8e). Este desplazamiento en la densidad pudo también imitarse mediante incubación de las partículas de rEV con 100 µg de IgM o 5 mg de IgG aisladas de suero humano sano antes de adicionar en PBS y aislamiento por medio de ODG (Fig. 8f).

De forma alternativa se realizó el tratamiento de proteinasa K (PK) (1 mg/mL durante 1 h a 37°C) en las fracciones SEC concentradas del plasma adicionado antes de centrifugación ODG. El tratamiento PK desplazó las rEV desde las fracciones de densidad 12-13 a 8-9 (Fig. 8a). Para eliminar los remanentes de iodoxanol, las fracciones ODG 8 y 9 se acumularon y se sometieron a SEC. Las fracciones 4 a 7 se recogieron y se cuantificaron por fNTA. Esto reveló una eficiencia de aislamiento de 30% (Fig. 7c). El tratamiento PK no influyó en el aislamiento de las EV de muestra en plasma ya que la cantidad de partículas fue similar para el plasma no tratado y los marcadores de EV sinténica-1 y flotilina-1 se detectaron aún mediante análisis de electroinmunotransferencia después del aislamiento por SEC-ODG (Fig. 8g,h). Aunque este desplazamiento de densidad es una única característica para separar rEV de EV, no está hecho a medida para otros métodos de aislamiento de EV y puede ser incompatible con ciertas aplicaciones corriente abajo. Por lo tanto, se han modificado las rEV mediante PEGilación post-inserción para evitar las interacciones de las proteínas plasmáticas mientras se proporciona la única oportunidad para la separación independiente de proteinasa de rEV adicionadas de EV en cualquier biofluido (Fig. 9 a). El enmascaramiento superficial de las rEV por DMPE-PEG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina conjugada con polietilenglicol) no altera la intensidad de fluorescencia y la distribución de tamaño, aunque evita la interacción con las proteínas plasmáticas (Fig. 9 b). Más del 85% de rEV-PEG adicionadas en plasma flota a densidades similares que las EV (1,086-1,119 g/mL). La inmunoprecipitación usando perlas magnéticas recubiertas con anti-PEG captura específicamente rEV-PEG en comparación con rEV (Fig. 9 c).

Las rEV pudieron aislarse también cuando se adicionaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS después de centrifugación ODG seguido por formación de gránulos a alta velocidad (100.000 g durante 3 h), aunque esto con muy baja eficiencia (2 a 7% de la cantidad adicionada inicialmente se recuperó) (Fig. 7d). Como la centrifugación ODG tenía una recuperación del 40% (fNTA en las fracciones ODG puras 8-9) se hipotetizó que la formación de gránulos a alta velocidad de EV podría ser responsable de dicha gran pérdida. Se probó esto enjuagando el fondo de un tubo UC con 1 mL de PBS después de la resuspensión del gránulo en 100 µL de PBS hasta que no pudo detectarse señal fluorescente por fNTA y se observó que más EV se pegaron al fondo del tubo que pudieron resuspenderse en volúmenes bajos de PBS (100 µL) (Fig. 7e). Para probar si la adherencia al fondo y probablemente también a la pared del tubo no era un producto de las rEV en sí mismas se repitieron estas condiciones experimentales con EV aisladas de células MCF7-Rab27b adicionadas en PBS y se concluyeron observaciones similares como con las rEV. dUC en plasma adicionado con rEV recuperó alrededor del 10% de rEV como se mide con fNTA y ELISA (Fig. 7f). Esta baja recuperación estaba provocada probablemente por la adherencia al fondo/pared como se describe anteriormente.

La precipitación Exoquick de plasma adicionado con rEV dio por resultado el 100% de eficiencia de aislamiento de EV como se mide por ELISA anti-p24 (Fig. 7g).

Ejemplo 5: Las rEV permiten una comparación exacta de los números de EV en plasma de pacientes con cáncer frente a individuos sanos

Para demostrar la aplicabilidad de las rEV para definir y mitigar las variaciones entre usuarios, las rEV se adicionaron en plasma y se aislaron mediante SEC-ODG-SEC (n=6). El número total de EV y rEV se cuantifican por NTA y fNTA, respectivamente. La variación entre usuarios, expresada como el coeficiente de variación (CV), se reduce en 66% (de 17,5% a 6,1%) por normalización según las eficiencias de aislamiento de rEV (Fig. 9 d). En una prueba de experimento conceptual se adicionan 5×10^{10} partículas de rEV fluorescentes en 2 mL de plasma de pacientes con cáncer de mama (n=18) y voluntarios sanos por grupos de edad (n=6). Se aíslan después las EV y rEV de las muestras de plasma adicionadas tratadas con PK a través de una combinación de SEC-ODG-SEC y se cuantifican la cantidad total de vesículas aisladas y las rEV fluorescentes por medio de NTA y fNTA respectivamente. A partir de la última cuantificación la recuperación de cada aislamiento de EV se calcula y la cantidad total de vesículas se normaliza en base a esta recuperación. Las concentraciones de EV por mL de plasma normalizadas según las eficiencias de aislamiento de las rEV se aumentan en 2,2 veces (p=0,0023, prueba de Mann-Whitney) en pacientes de cáncer de mama en comparación con individuos sanos. Este cambio de veces es de mayor importancia después de la normalización en comparación con los valores absolutos (p=0,0023 frente a p=0,2204, prueba de Mann-Whitney) (Fig. 9 e).

Ejemplo 6: Implementación de la secuencia PSI para cargar ARNm de EGFP en rEV

Se observó la presencia de ARNm de EGFP en las rEV. Como no se introduce señal de empaquetado durante la transfección, el ARNm de EGFP presumiblemente no está específicamente clasificado en las rEV. Se modificó el plásmido pMET7-GAG-EGFP, usado para la producción de rEV, condensando la señal de empaquetado de ARNm de VIH-1 (PSI) al gen de fusión GAG-EGFP³⁸. El fNTA confirmó la carga del ARNm de GFP condensado con PSI en las rEV. Usando esta señal de empaquetamiento de ARN PSI, es posible clasificar cualquier ARN exógeno o sintético dentro de las rEV.

Referencias

1. Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakakis, F. y Bardelli, A. *Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood*. Nat. Rev. Clin. Oncol. 10, 472-484 (2013).
2. Brock, G., Castellanos-Rizaldos, E., Hu, L., Coticchia, C. y Skog, J. *Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring*. Transl. Cancer Res. 4, 280-290 (2015).
3. Kalluri, R. *The biology and function of fibroblasts in cancer*. Nat. Rev. Cancer 16, 582-598 (2016).
4. Kalra, H., Drummen, G. P. C. y Mathivanan, S. *Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing*. Int. J. Mol. Sci. 17, (2016).
5. Tkach, M. y Théry, C. *Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go*. Cell 164, 1226-1232 (2016).
6. Hoshino, A. et al. *Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis*. Nature 1-19 (2015). doi:10.1038/nature15756
7. Sadvoska, L., Eglitis, J. y Line, A. *Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Targets in Breast Cancer*. Anticancer Res. 35, 6379-90 (2015).
8. Nawaz, M. et al. *The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers*. Nat. Rev. Urol. 11, 688-701 (2014).
9. Tang, M. K. S. y Wong, A. S. T. *Exosomes: Emerging biomarkers and targets for ovarian cancer*. Cancer Lett. 367, 26-33 (2015).
10. Melo, S. A. et al. *Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer*. Nature 523, 177-182 (2015).
11. Lötvall, J. et al. *Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles*. J. Extracell. Vesicles 3, 1-6 (2014).
12. Witwer, K. W. et al. *Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research*. J. Extracell. vesicles 2, (2013).
13. Van Deun, J. et al. *EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research*. Nat. Methods 14, 228-232 (2017).
14. Van Der Pol, E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., Nieuwland, R. y Van Leeuwen, T. G. *Refractive index determination of nanoparticles in suspension using nanoparticle tracking analysis*. Nano Lett. 14, 6195-6201 (2014).
15. Gardiner, C., Ferreira, Y. J., Dragovic, R. A., Redman, C. W. G. y Sargent, I. L. *Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis*. Journal of Extracellular Vesicles 2, (2013).
16. Valkonen, S. et al. *Biological reference materials for extracellular vesicle studies*. Eur. J. Pharm. Sci. 98, 4-16 (2017).
17. Zhang, L. et al. *Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth*. Nature (2015). doi:10.1038/nature15376
18. Saad, J. S. et al. *Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 11364-9 (2006).
19. Bieniasz, P. D. *Late budding domains and host proteins in enveloped virus release*. Virology 344, 55-63 (2006).
20. Coffin JM, Hughes SH, V. H. *Retroviruses*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997).
21. Lamb, R. A. y Krug, R. M. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. (1996).
22. Nabhan, J. F., Hu, R., Oh, R. S., Cohen, S. N. y Lu, Q. *Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 4146-51 (2012).
23. Harty, R. N., Brown, M. E., Wang, G., Huibregtse, J. y Hayes, F. P. *A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 13871-6 (2000).
24. Pastuzyn, E. D. et al. *The Neuronal Gene Arc Encodes a Repurposed Retrotransposon Gag Protein that Mediates Intercellular RNA Transfer*. Cell 172, 275-288.e18 (2018).
25. Justice, P. A. et al. *Membrane vesiculation function and exocytosis of wild-type and mutant matrix proteins of vesicular stomatitis virus*. J. Virol. 69, 3156-60 (1995).
26. Van Deun, J. et al. *The Impact of Disparate Isolation Methods for Extracellular Vesicles on Downstream RNA Profiling*. J. Extracell. vesicles (2014).
27. Petersen, K. E. et al. *A review of exosome separation techniques and characterization of B16-F10 mouse melanoma exosomes with AF4-UV-MALS-DLS-TEM*. Anal. Bioanal. Chem. 406, 7855-66 (2014).
28. Lee, K., Shao, H., Weissleder, R. y Lee, H. *Acoustic purification of extracellular microvesicles*. ACS Nano 9, 2321-7 (2015).

29. Nakai, W. et al. *A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles*. Sci. Rep. 6, 33935 (2016).
30. Théry, C., Clayton, A., Amigorena, S. y Raposo, G. *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants*. Curr. Protoc. Cell Biol. 3.22.1-3.22.29 (2006).
- 5 31. Van der Vlist, E. J., Nolte-'t Hoen, E. N. M., Stoorvogel, W., Arkesteijn, G. J. A. y Wauben, M. H. M. *Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry*. Nat. Protoc. 7, 1311-26 (2012).
32. Grönwall, C., Vas, J. y Silverman, G. J. *Protective roles of natural IgM antibodies*. Frontiers in Immunology 3, 66 (2012).
- 10 33. Blanc, L., Barres, C., Bette-Bobillo, P. y Vidal, M. *Reticulocyte-secreted exosomes bind natural IgM antibodies: Involvement of a ROS-activatable endosomal phospholipase iPLA2*. Blood 110, 3407-3416 (2007).
34. Eyckerman, S. et al. *Trapping mammalian protein complexes in viral particles*. Nat. Commun. 7, 11416 (2016).
35. Vergauwen, G. et al. *Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research*. Sci. Rep. 7, 2704 (2017).
- 15 36. Hogue, I. B., Grover, J. R., Soheilian, F., Nagashima, K. y Ono, A. *Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane*. J. Virol. 85, 9749-66 (2011).
37. Jouvenet, N. et al. *Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly*. PLoS Biol. 4, e435 (2006).
- 20 38. Comas-Garcia, M. et al. *Efficient support of virus-like particle assembly by the HIV-1 packaging signal*. Elife 7, (2018).

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la tasa de recuperación de vesículas extracelulares de muestra, comprendiendo el método:
 - mezclar una muestra de biofluido que comprende vesículas extracelulares de muestra con una cantidad conocida de vesículas extracelulares recombinantes en el que las vesículas extracelulares recombinantes comprenden: a) una proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal, y b) un marcador heterólogo, para obtener una mezcla,
 - aislar las vesículas extracelulares de dicha mezcla,
 - detectar la cantidad de las vesículas extracelulares recombinantes entre las vesículas extracelulares aisladas, y
- 5 - determinar la tasa de recuperación de dichas vesículas extracelulares de muestra en base a la relación de la cantidad de vesículas extracelulares recombinantes después de la etapa de aislamiento a la cantidad conocida de vesículas extracelulares recombinantes mezcladas con la muestra de biofluido antes de la etapa de aislamiento.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1 en el que dicho marcador heterólogo es una molécula de ácido nucleico heterólogo o una proteína heteróloga.
- 15 3. Un método según la reivindicación 2 en el que dicha proteína heteróloga está condensada a dicha proteína de autoensamblaje.
4. Un método según la reivindicación 2 en el que dicho ácido nucleico heterólogo está condensado a la señal de empaquetamiento retroviral psi.
- 20 5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 2-4 en el que dicha etapa de detección se comienza determinando la cantidad de cualquier ácido nucleico heterólogo por PCR en tiempo real, RT-qPCR, PCR digital, secuenciación de ARN, nanostring, amplificación de ADN ramificado o análisis en serie de la expresión génica.
6. Un método según las reivindicaciones 2-3 en el que dicha proteína heteróloga es una proteína emisora de luz.
7. Un método según las reivindicaciones 2-5 en el que dicho ácido nucleico heterólogo es ARNm de proteína emisora de luz.
- 25 8. Un método según las reivindicaciones 1-7 en el que dicha proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal se elige del grupo que consiste en: el antígeno específico del grupo retroviral, variaciones del antígeno específico del grupo retroviral, la proteína M1 de la gripe, la proteína ARRDC1, la proteína ARC, la proteína VP40 del virus del ébola y las proteínas M del virus de la estomatitis vesicular.
- 30 9. Un método según las reivindicaciones 1-8, en el que dicha etapa de aislamiento comprende y/o se combina con una etapa de separación que da por resultado la obtención de una primera fracción que comprende dichas vesículas extracelulares recombinantes y una segunda fracción que comprende dichas vesículas extracelulares de muestra, en las que dicha detección de la cantidad de las vesículas extracelulares recombinantes se da en dicha primera fracción.
- 35 10. Un método según la reivindicación 9 en el que dicha etapa de separación es una etapa de separación basada en la densidad.
11. Un método según las reivindicaciones 9-10 en el que dicha muestra de biofluido es una muestra de plasma o suero.
12. Un método según las reivindicaciones 9-11 en el que dicha mezcla se trata con una proteasa antes de dicho aislamiento o en el que dichas vesículas extracelulares recombinantes se incuban con polietilenglicol (PEG) de manera que dichas vesículas extracelulares recombinantes y dichas vesículas extracelulares de muestra están presentes en la misma fracción después de dicho aislamiento.
- 40 13. Un método según las reivindicaciones 1-8 en el que dichas vesículas extracelulares recombinantes se incuban con las proteínas de inmunoglobulina IgG y/o IgM antes de dicha mezcla con dicho biofluido con una cantidad conocida de dichas vesículas extracelulares recombinantes de manera que dichas vesículas extracelulares recombinantes y dichas vesículas extracelulares de muestra están presentes en una fracción diferente después de dicho aislamiento.
- 45 14. Un método según la reivindicación 12 en el que dichas vesículas extracelulares recombinantes incubadas con PEG y dichas vesículas extracelulares de muestra aisladas en la misma fracción después de dicho aislamiento se incuban con anticuerpos anti-PEG inmovilizados de manera que dichas vesículas extracelulares recombinantes incubadas con PEG se separan de dichas vesículas extracelulares de muestra.
- 50

15. Un método según la reivindicación 14 en el que dichos anticuerpos anti-PEG están recubiertos en perlas magnéticas.
16. Un método según la reivindicación 12 en el que dicha proteasa es proteinasa K.
17. Un método según la reivindicación 10 en el que dicha separación en base a la densidad es una ultracentrifugación por gradiente de densidad de iodixanol.
18. Un método según la reivindicación 10 en el que dicha separación en base a la densidad está precedida por una etapa de aislamiento biofísico adicional.
19. Un método para calibrar un dispositivo para el análisis de vesículas extracelulares de muestra, comprendiendo el método:
 - mezclar un fluido con vesículas extracelulares recombinantes de las que se conocen las propiedades y en el que dichas vesículas extracelulares recombinantes comprenden: a) una proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal, y opcionalmente b) un marcador heterólogo, para obtener una mezcla,
 - introducir dicha mezcla en dicho dispositivo,
 - analizar una propiedad de dichas vesículas extracelulares recombinantes en dicha mezcla,
 - opcionalmente analizar dicha propiedad de nuevo con una o más nuevas combinaciones de ajustes del dispositivo,
 - derivar de dicho análisis de dichas vesículas extracelulares recombinantes una combinación de ajustes del dispositivo que da la propiedad exacta de dichas vesículas extracelulares recombinantes usadas para obtener dicha mezcla, y
 - usar dicha combinación de ajustes del dispositivo para calibrar el dispositivo frente a un futuro análisis posterior de muestras que contengan vesículas extracelulares con propiedades desconocidas, para determinar las propiedades exactas de las mismas.
20. Un método según la reivindicación 18 en el que dicho dispositivo es un citómetro de flujo, un dispositivo de análisis de rastreo de nanopartículas, un dispositivo sensor de pulso resistivo ajustable, un lector de placas, un dispositivo microfluídico, lector ELISA, un zetasizer, un microscopio de fuerza atómica, un analizador de resonancia de plasmón superficial o un microscopio electrónico.
21. Un método para evaluar el aislamiento de vesículas extracelulares, comprendiendo el método:
 - mezclar un fluido con vesículas extracelulares recombinantes en el que las vesículas extracelulares recombinantes comprenden: a) una proteína de autoensamblaje que dirige su propia liberación a través de vesículas como una proteína unida a la membrana luminal, y b) un marcador heterólogo, para obtener una mezcla,
 - aislar las vesículas extracelulares recombinantes de dicha mezcla, y
 - detectar la presencia de las vesículas extracelulares recombinantes aisladas de dicha mezcla.

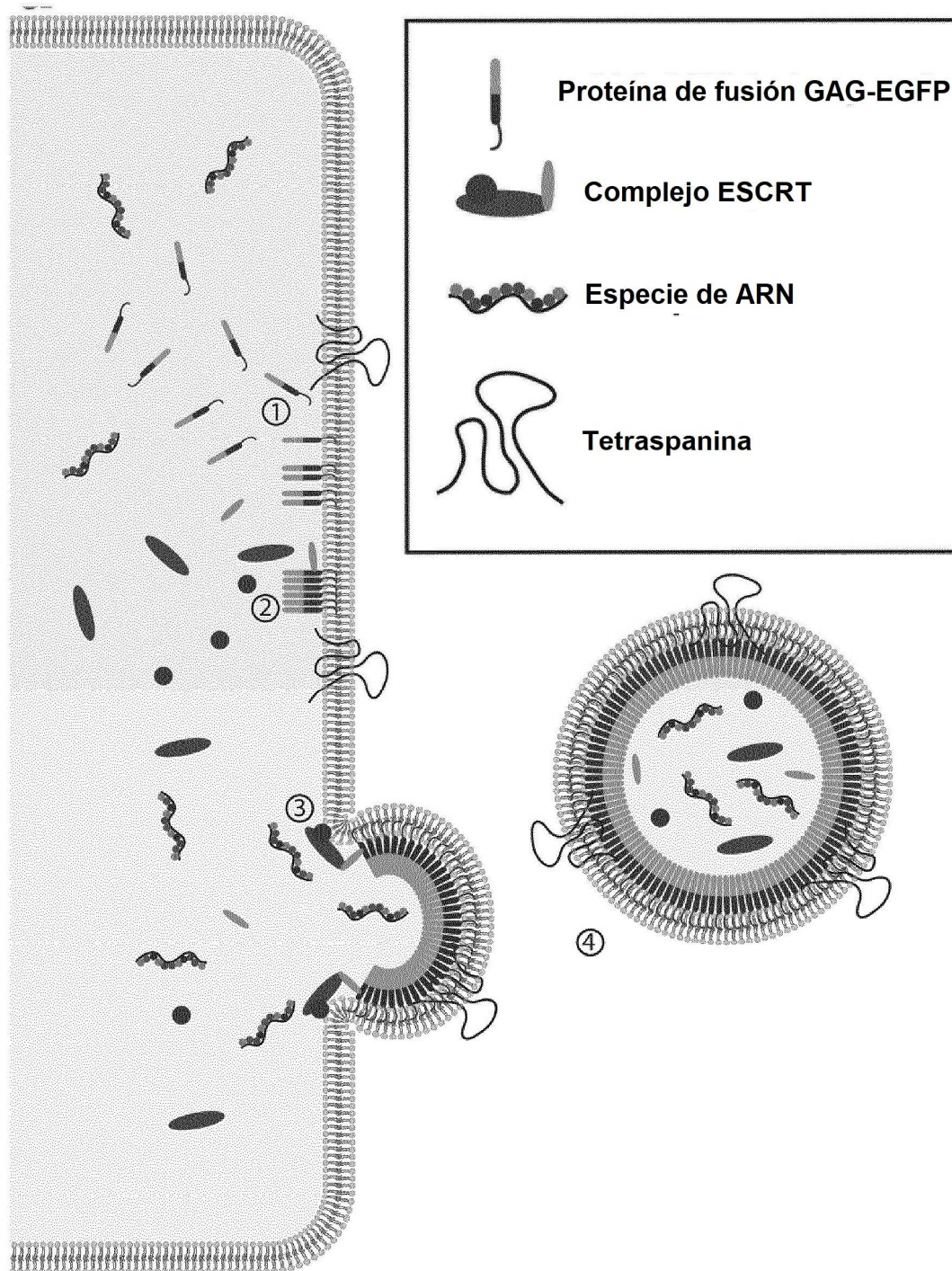


FIG. 1a

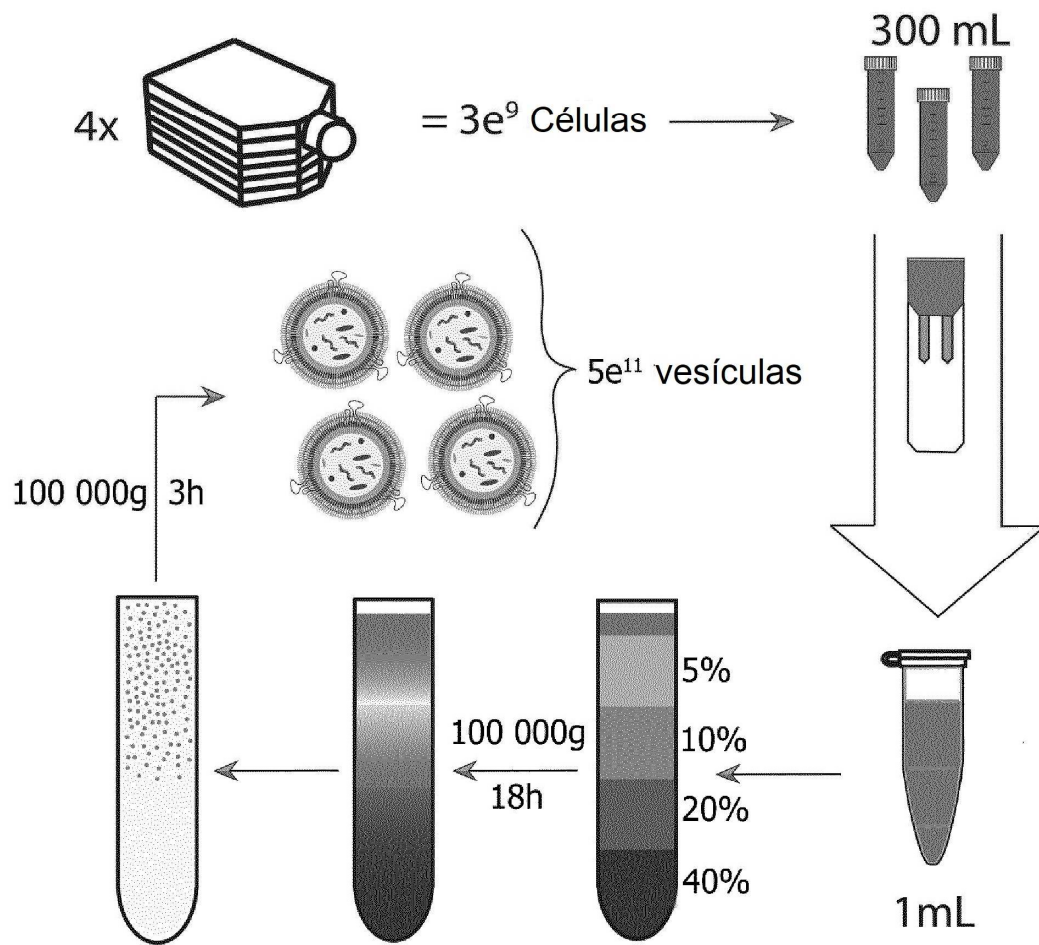
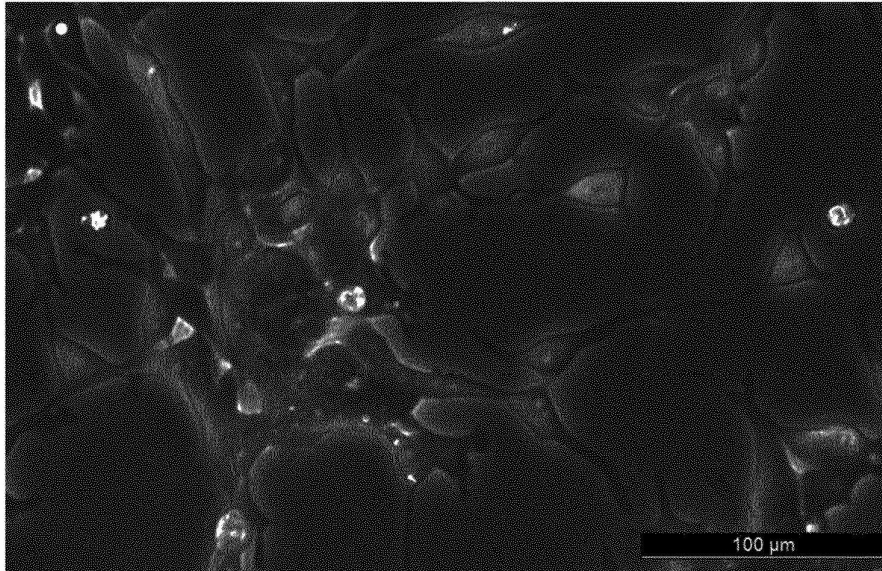


FIG. 1b

MOCK



GAG-EGFP

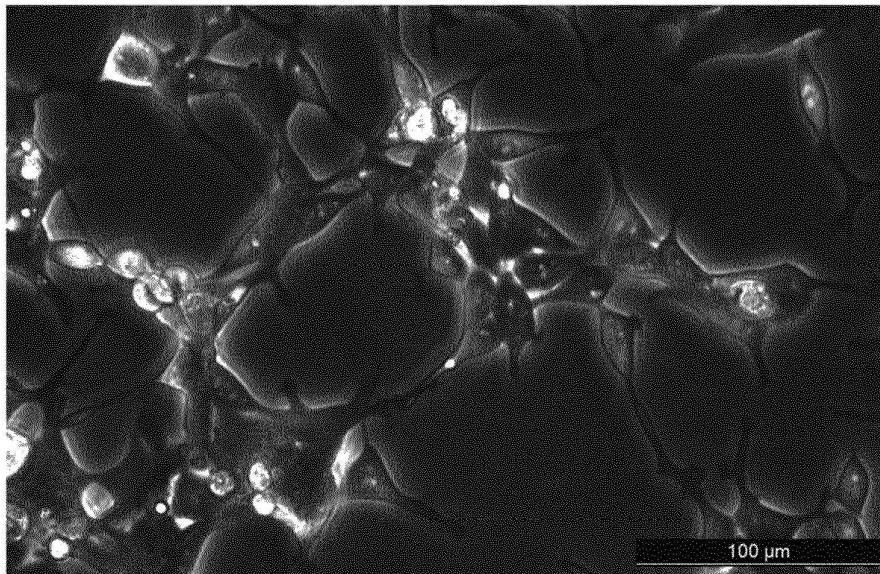


FIG. 1C

Viabilidad celular

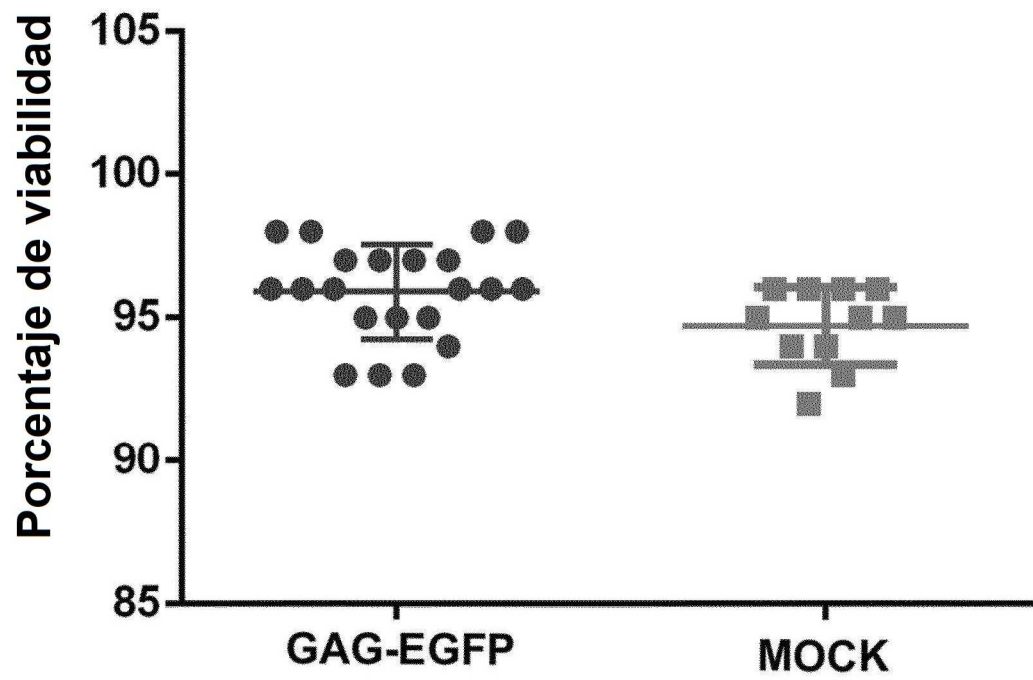


FIG. 1d

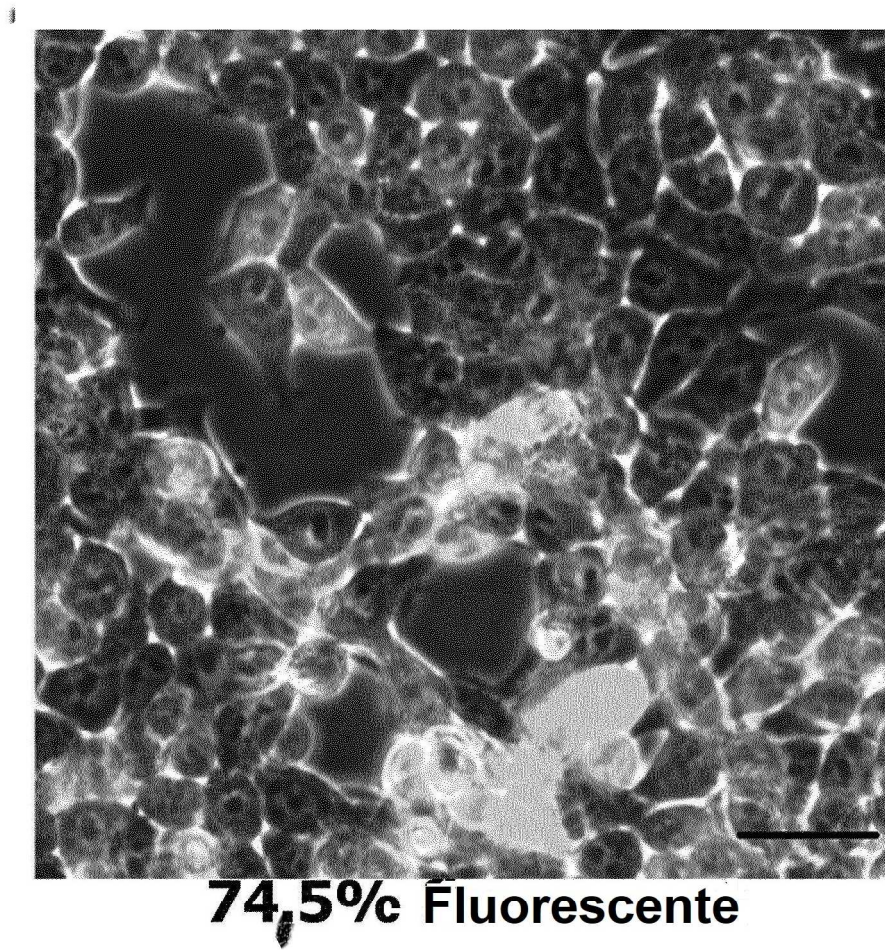


FIG. 1e

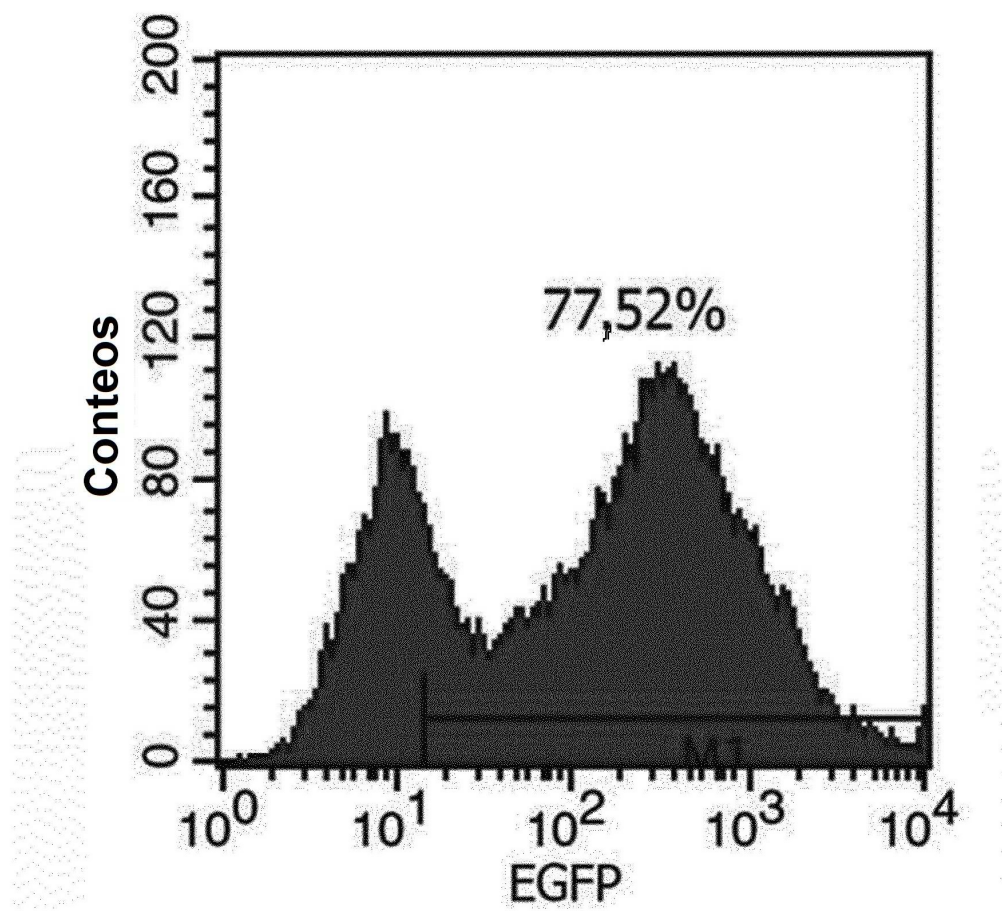


FIG. 1f

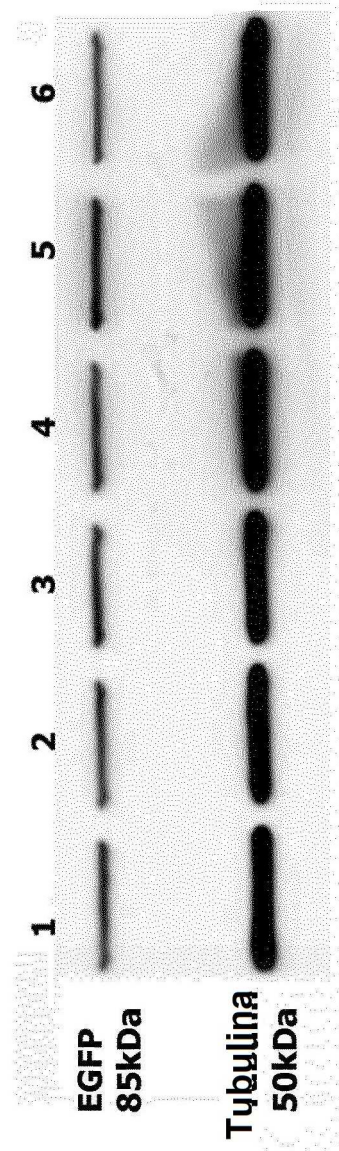


FIG. 1g

Estabilidad de transfección

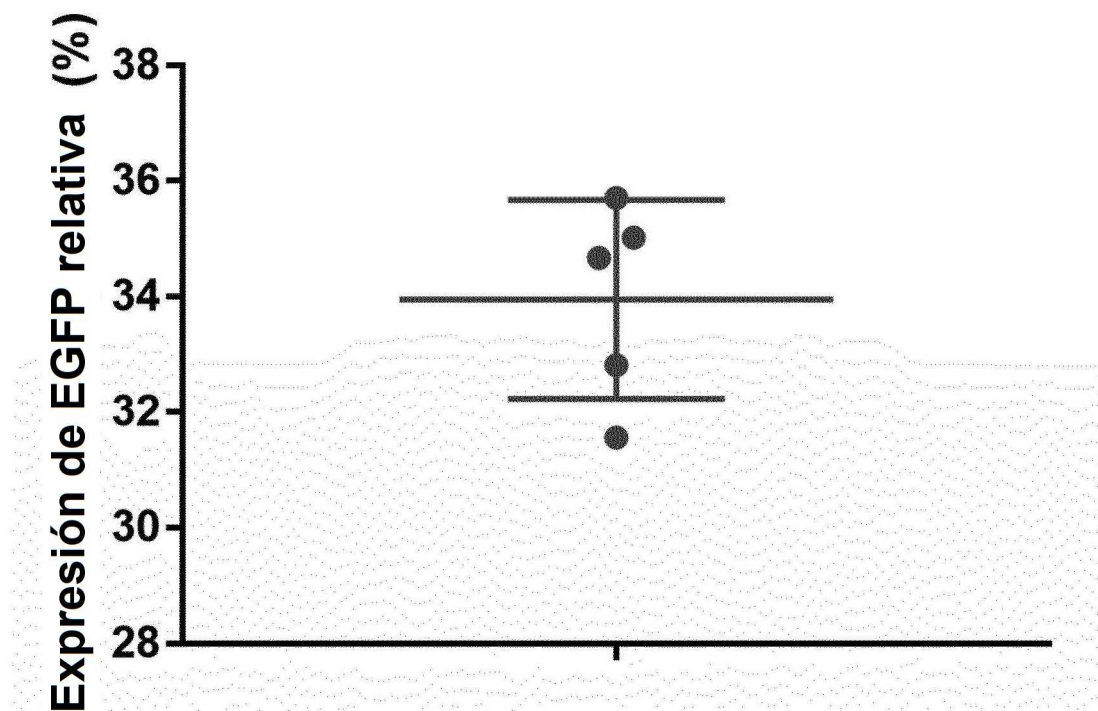


FIG. 1h

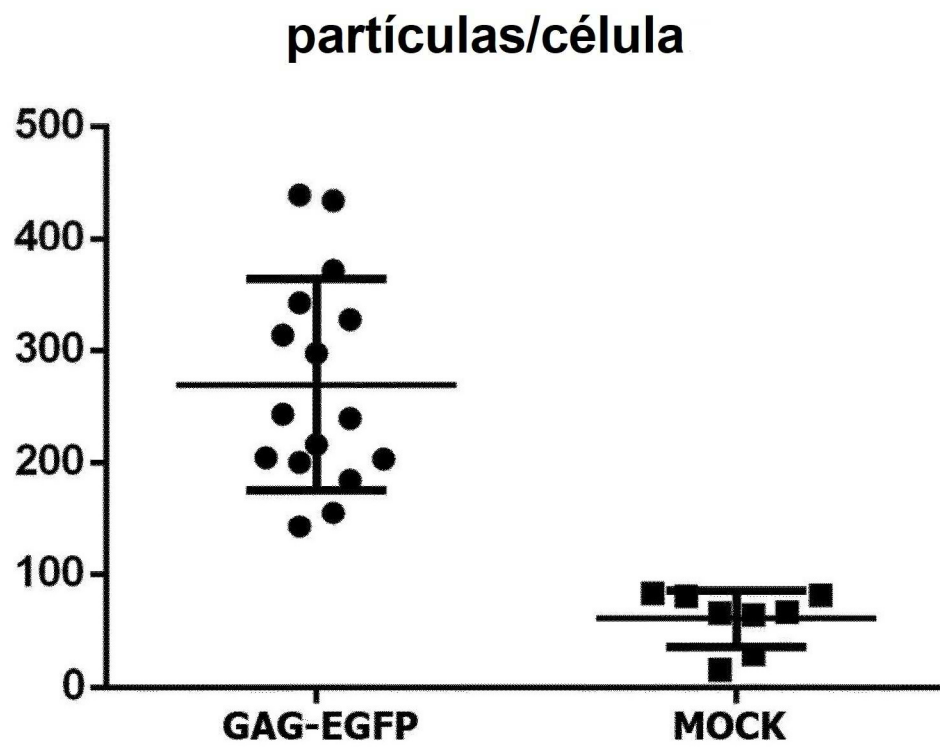


FIG. 2a

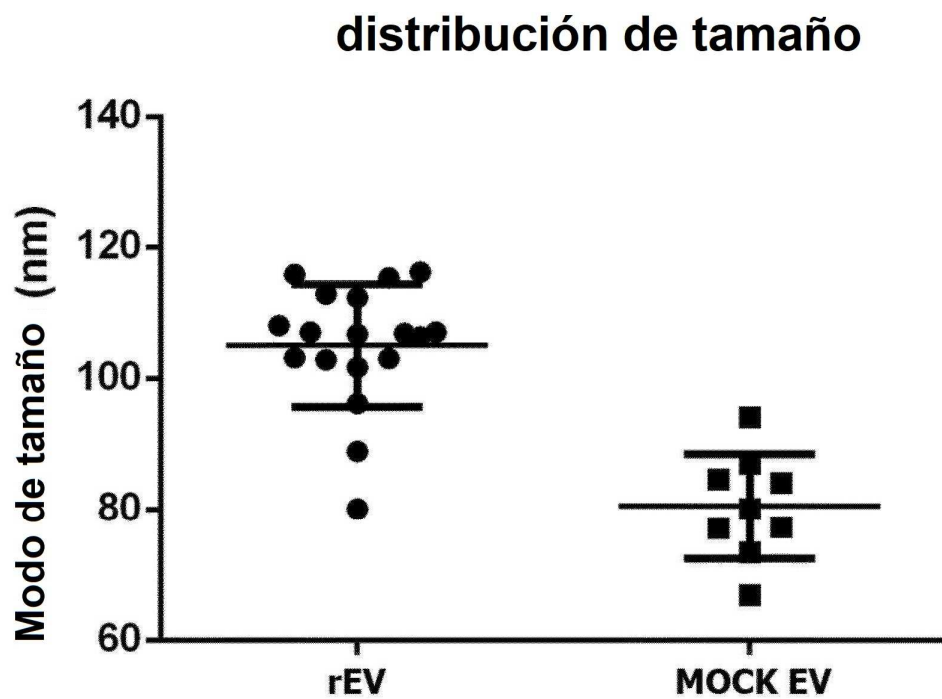


FIG. 2b

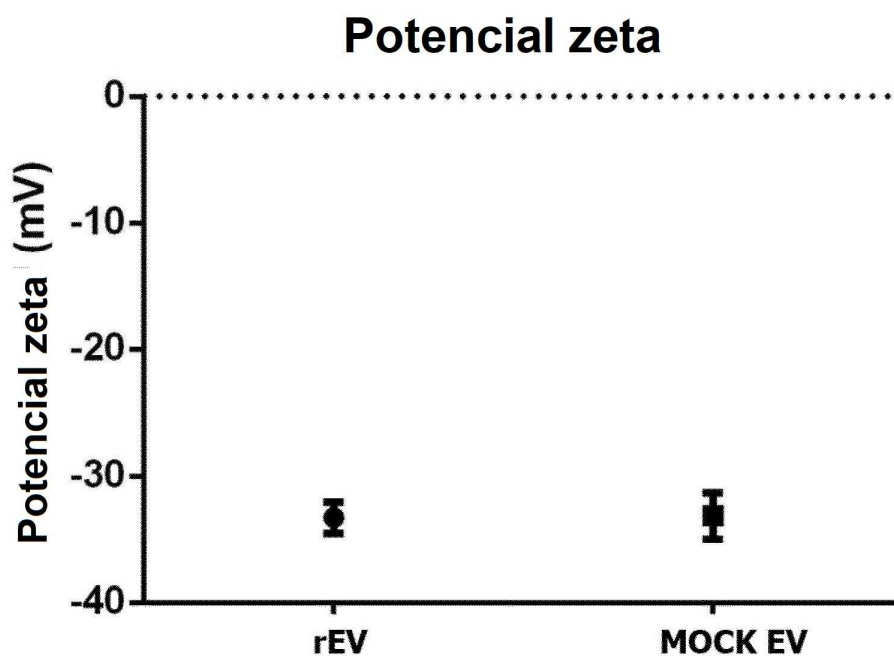


FIG. 2c

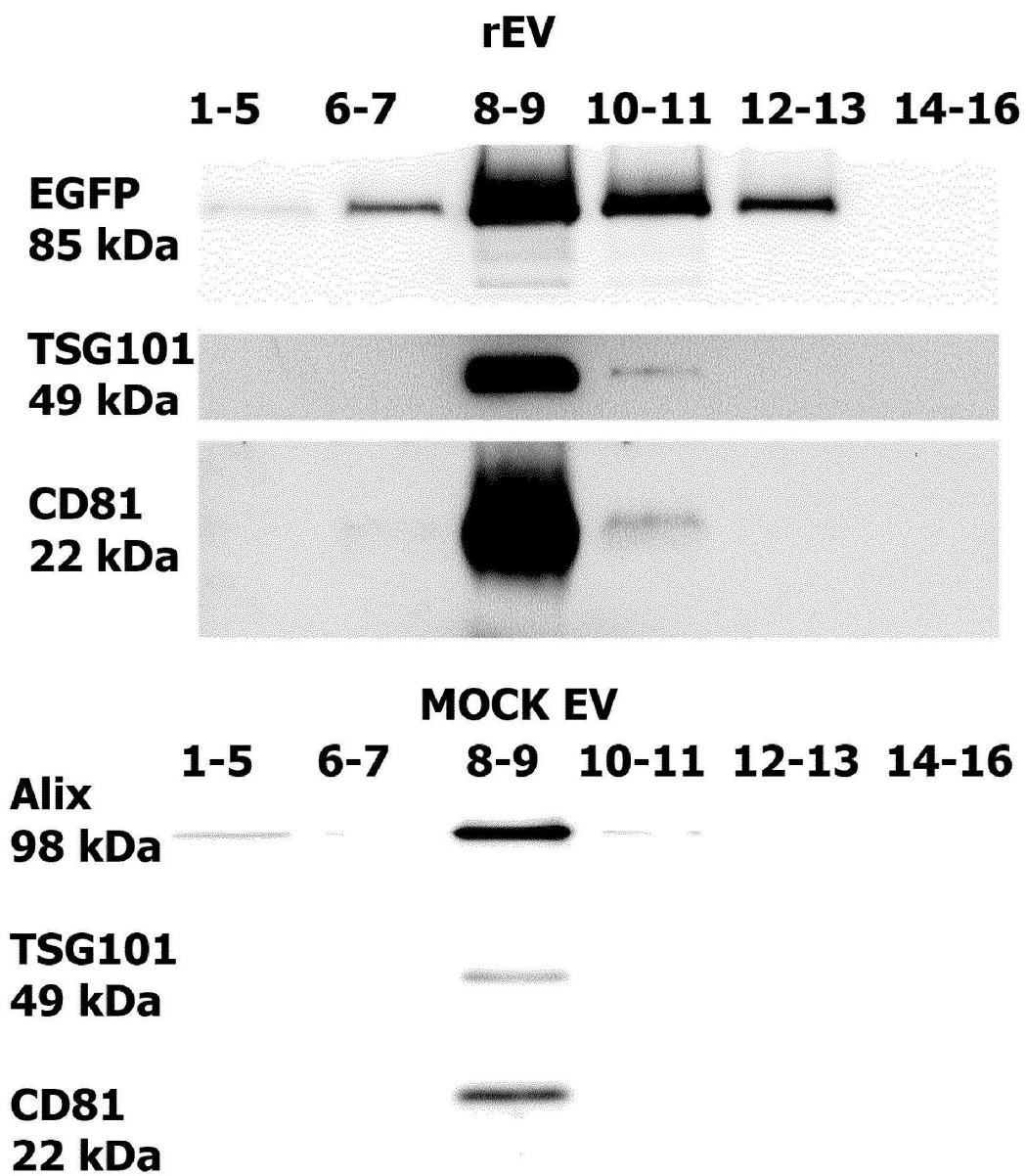


FIG. 2d

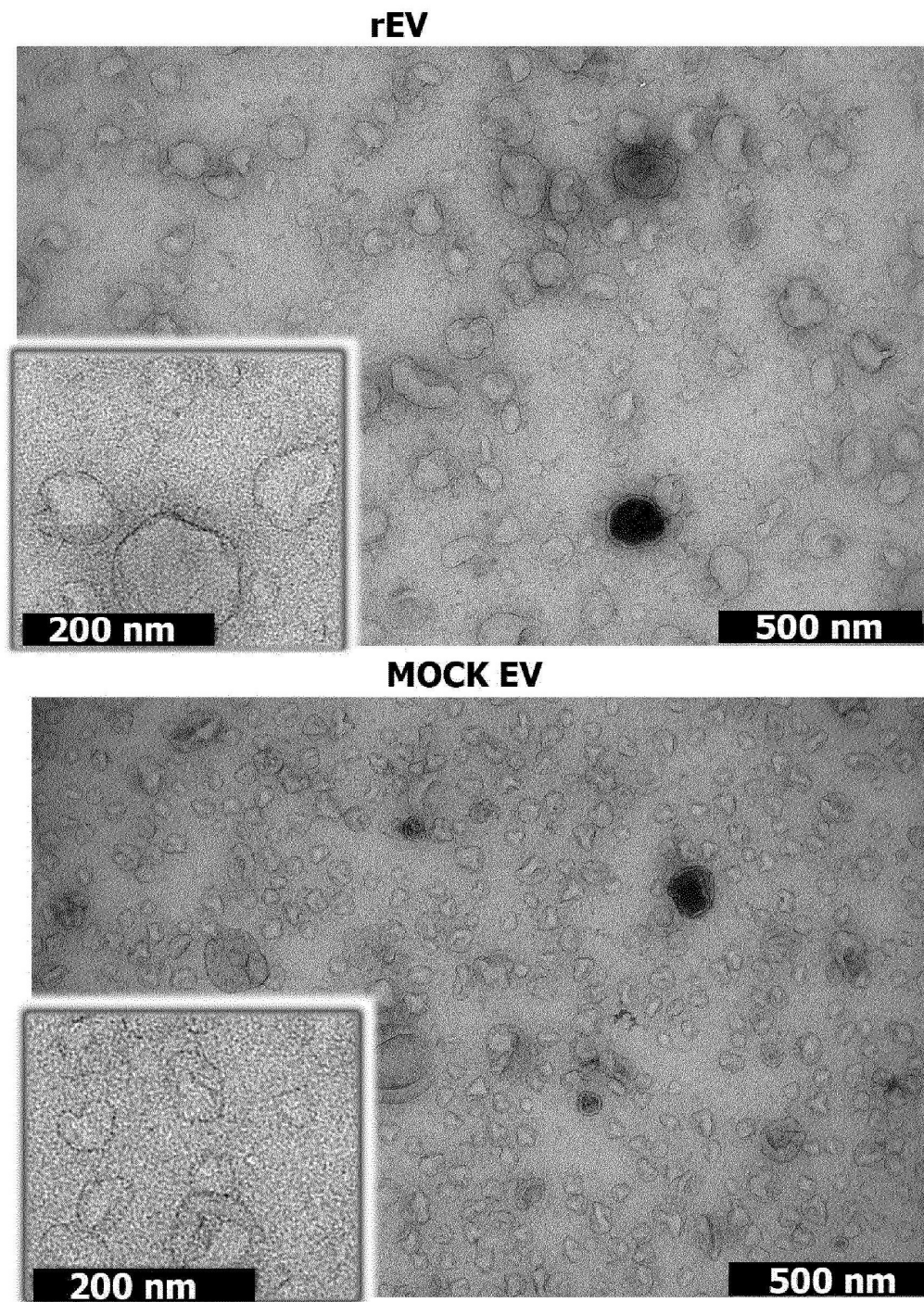


FIG. 2e

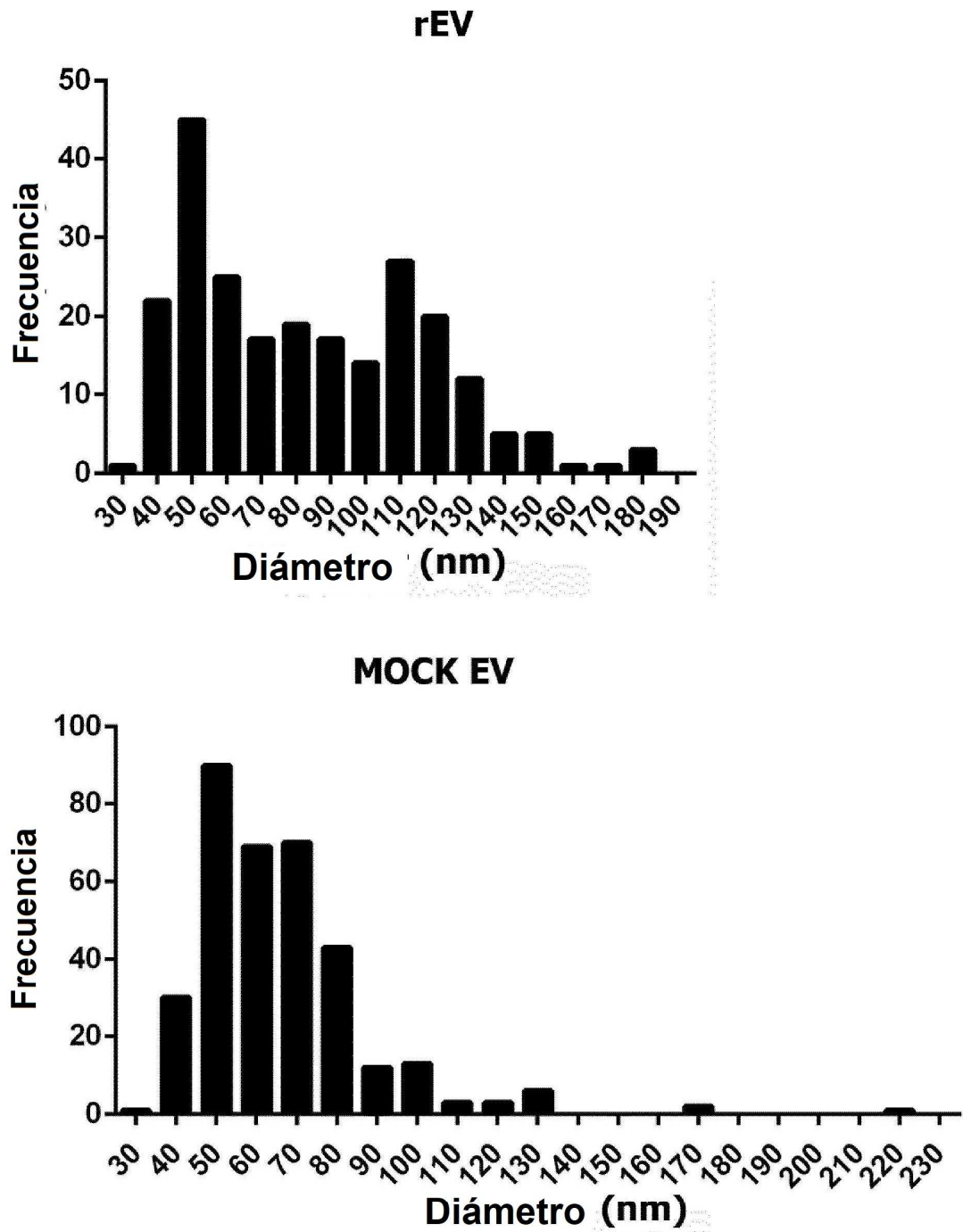


FIG. 2f

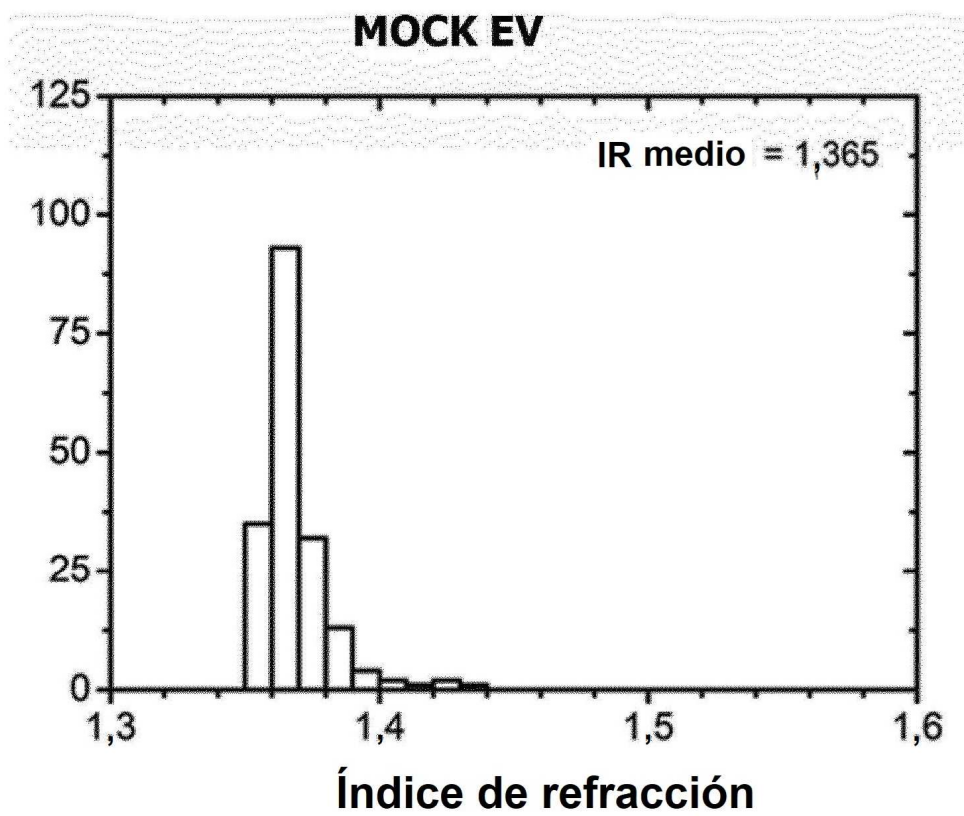
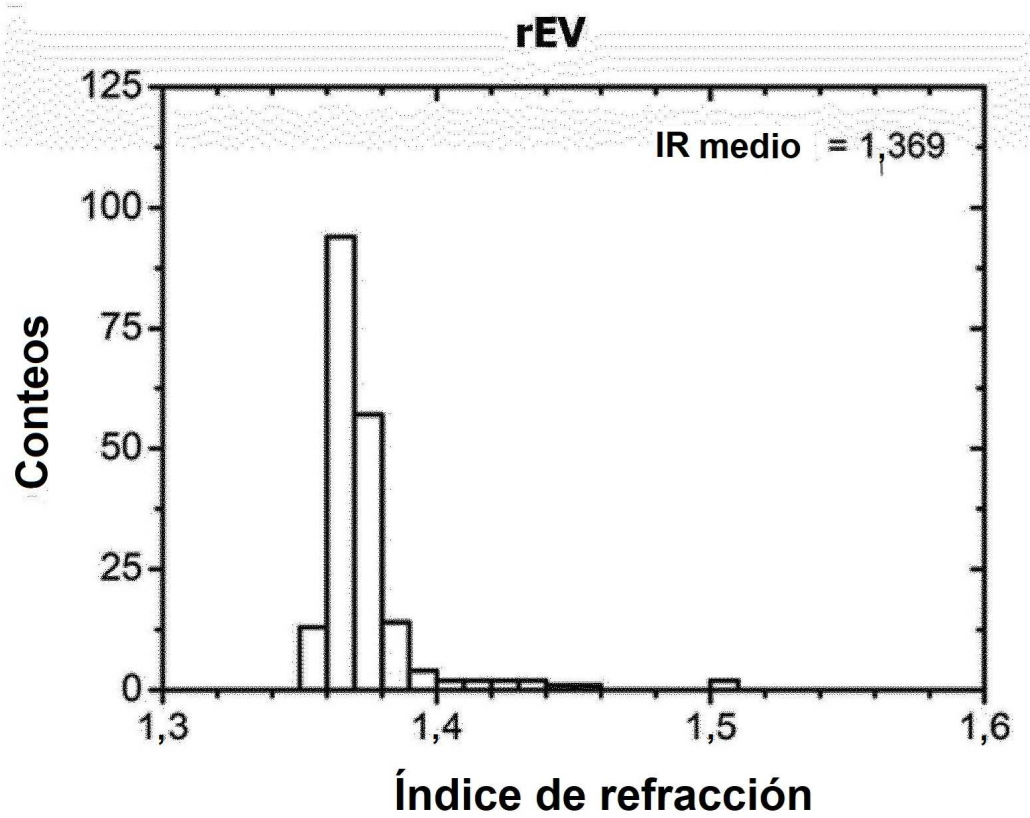


FIG. 2g

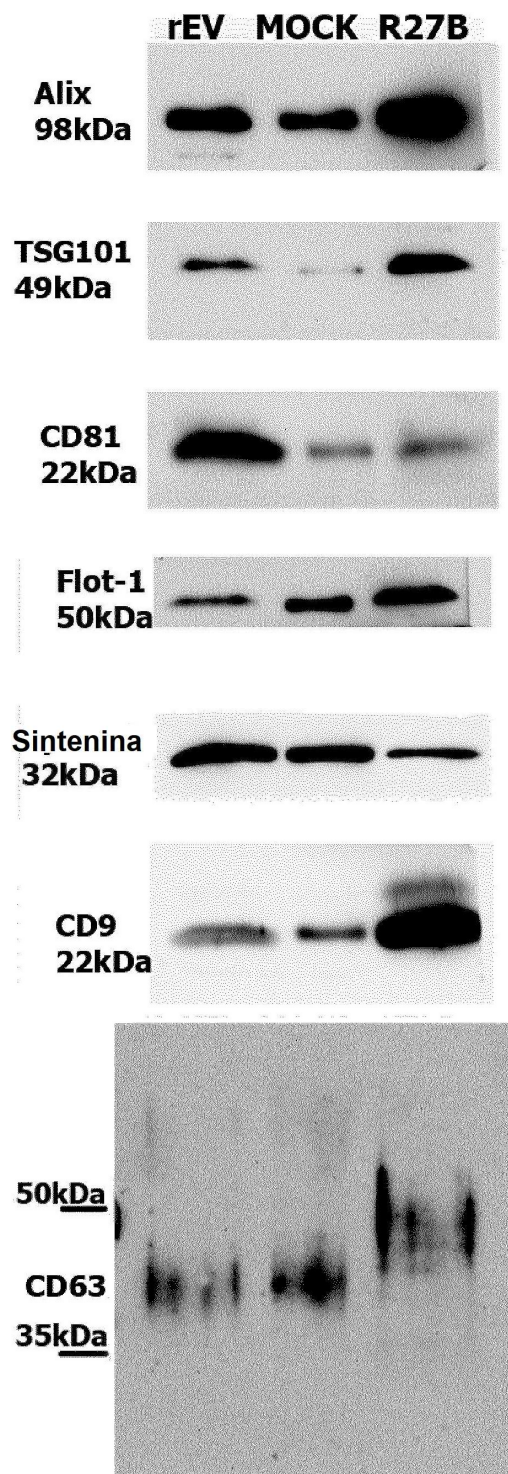


FIG. 3a

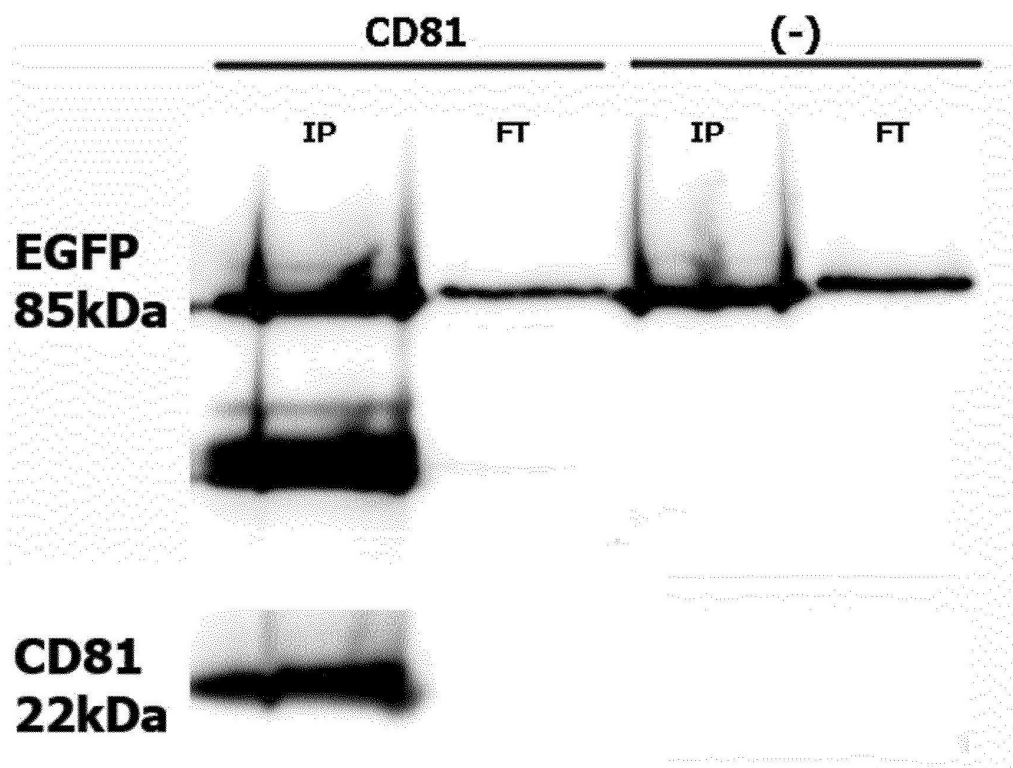
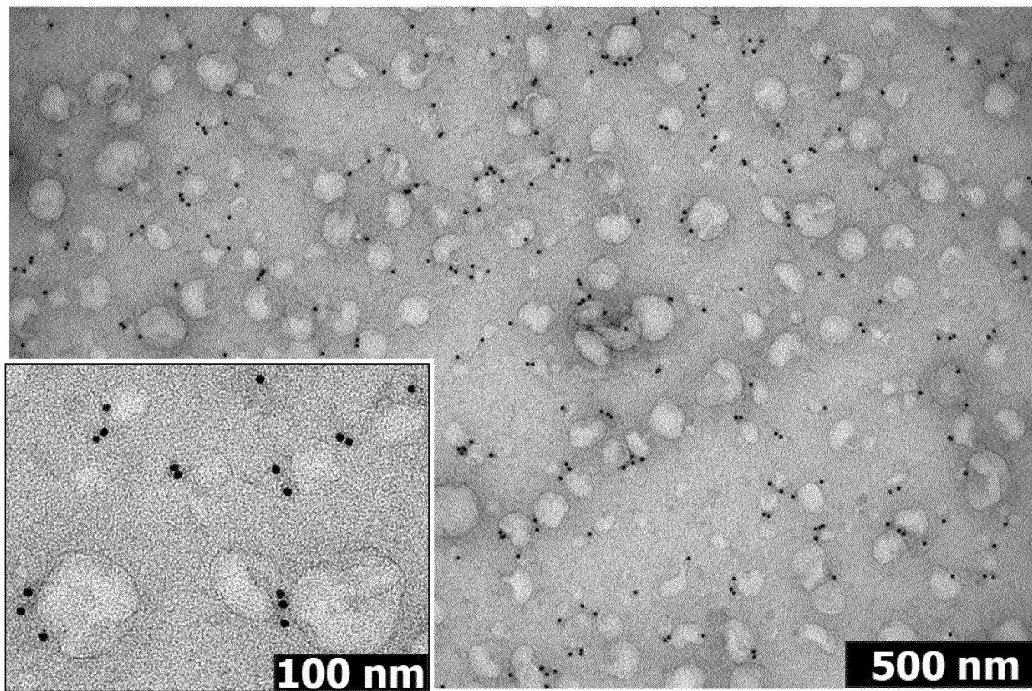


FIG. 3b

rEV



MOCK EV

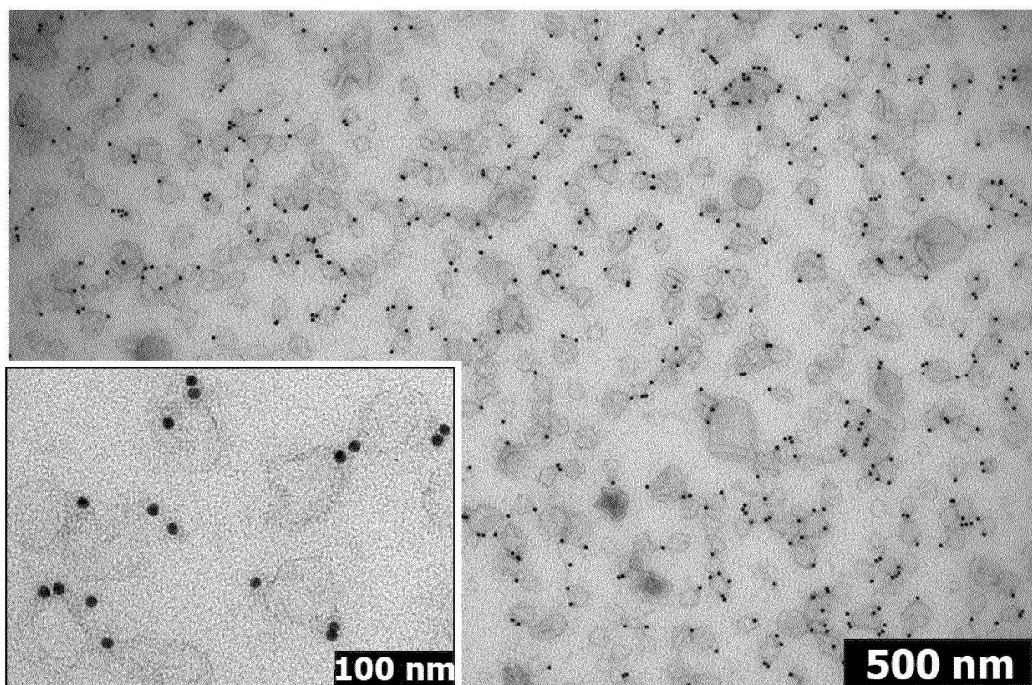


FIG. 3c

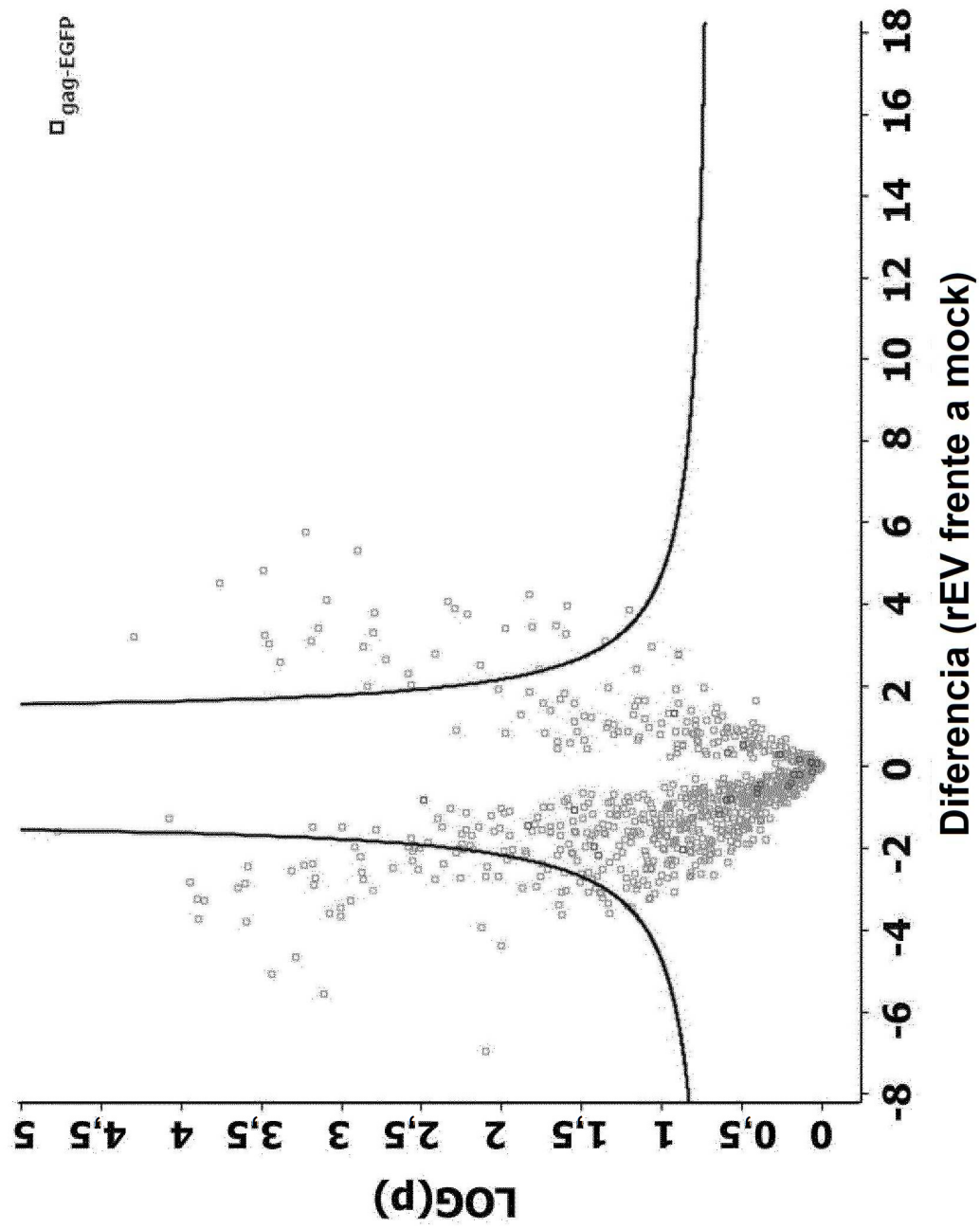


FIG. 3d

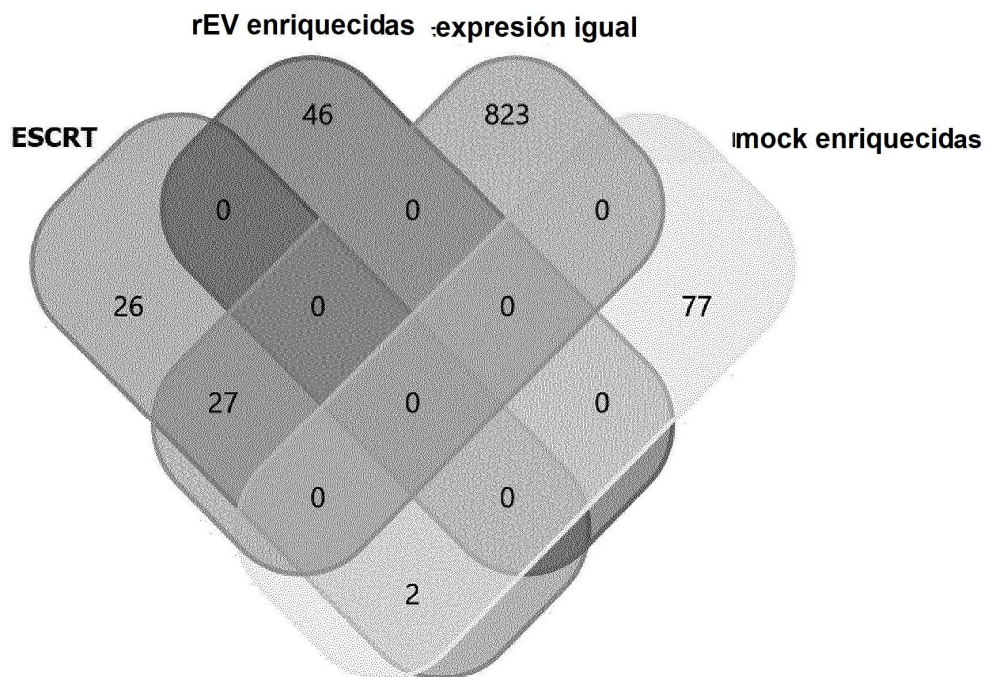


FIG. 3e

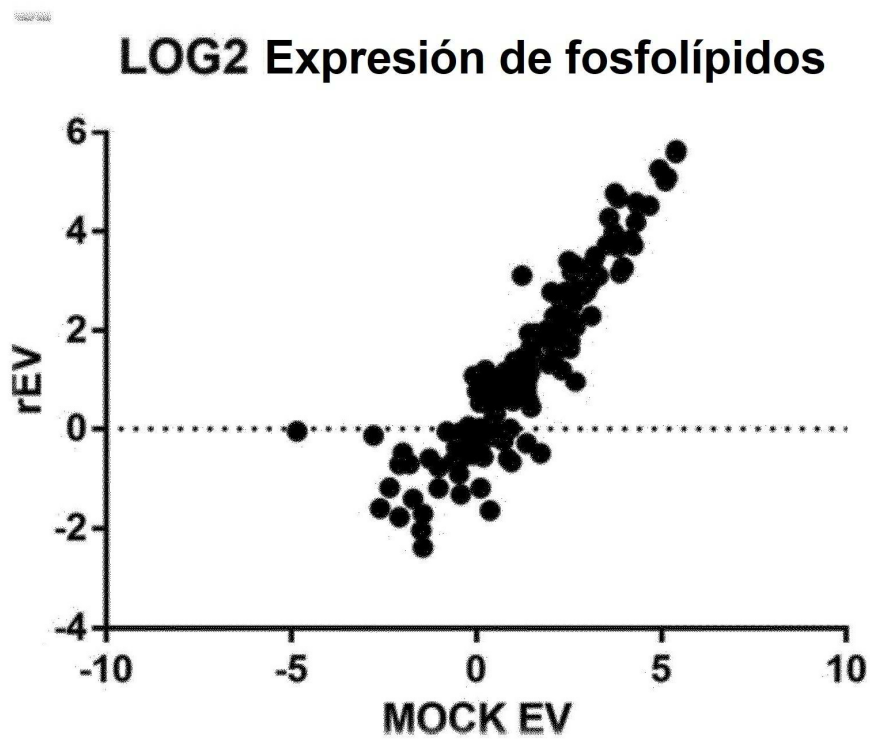


FIG. 4a

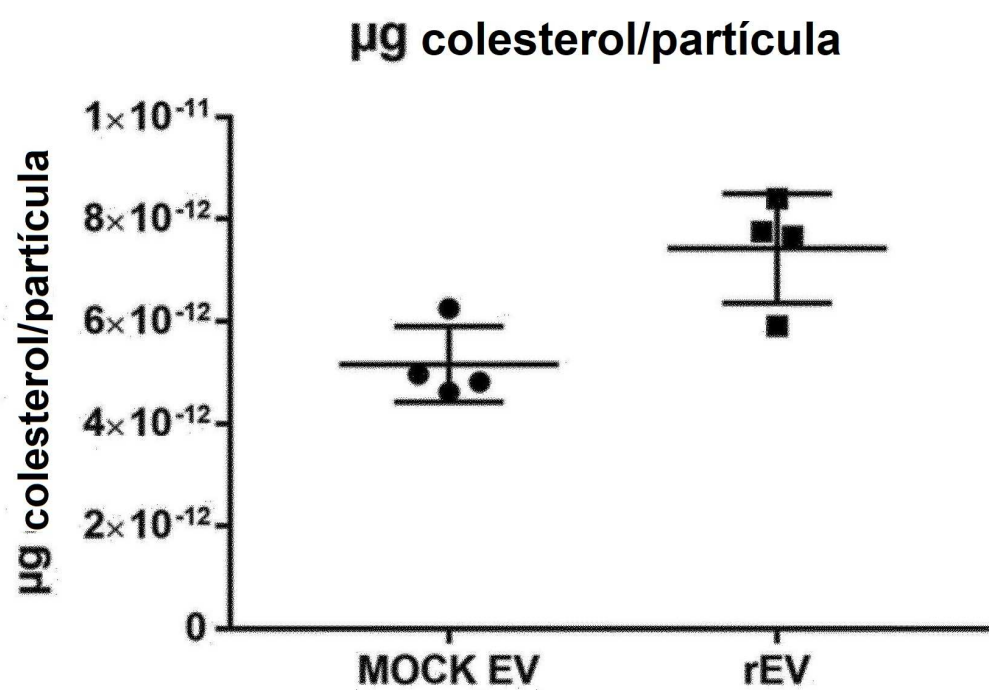


FIG. 4b

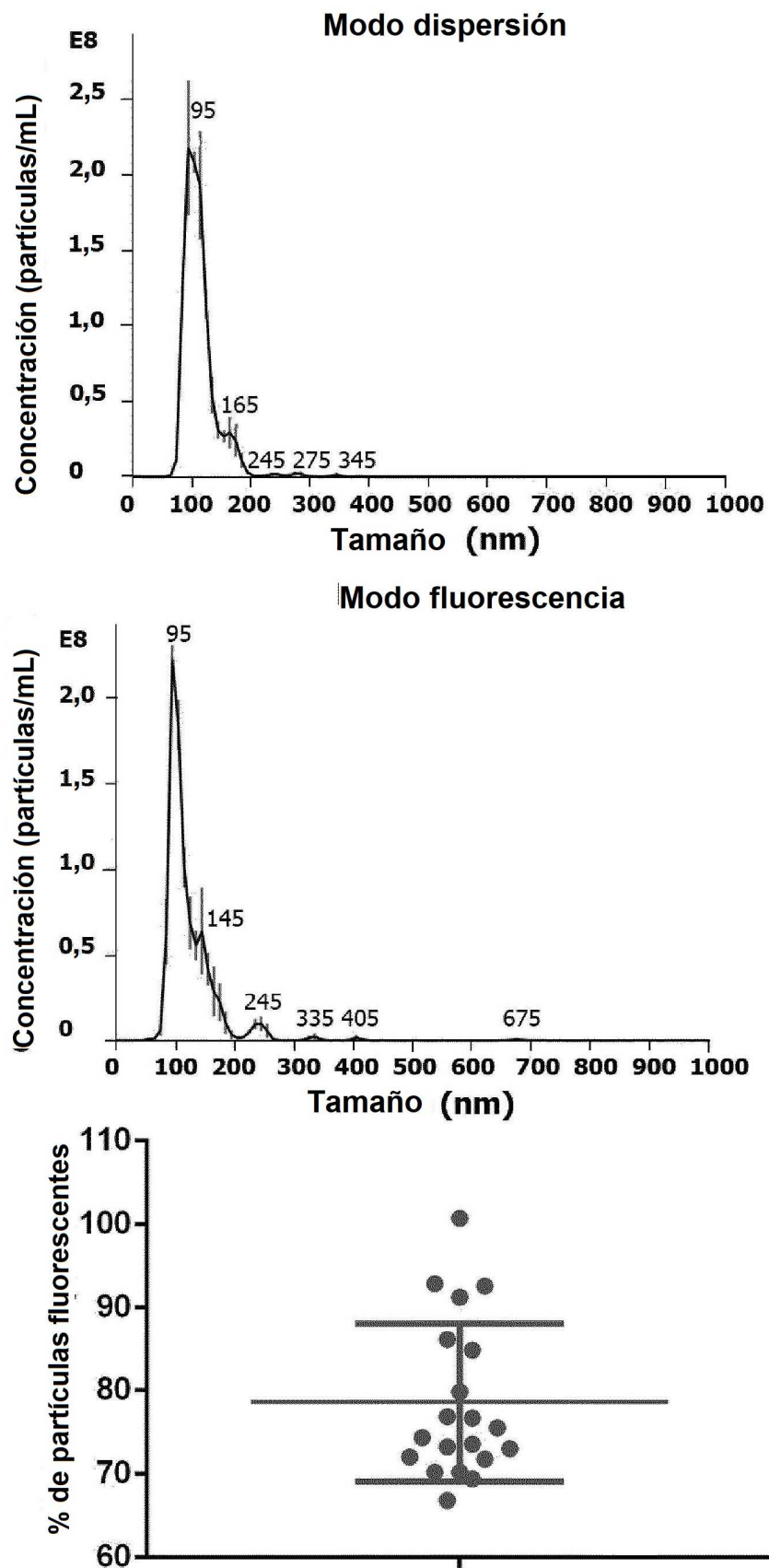


FIG. 5a

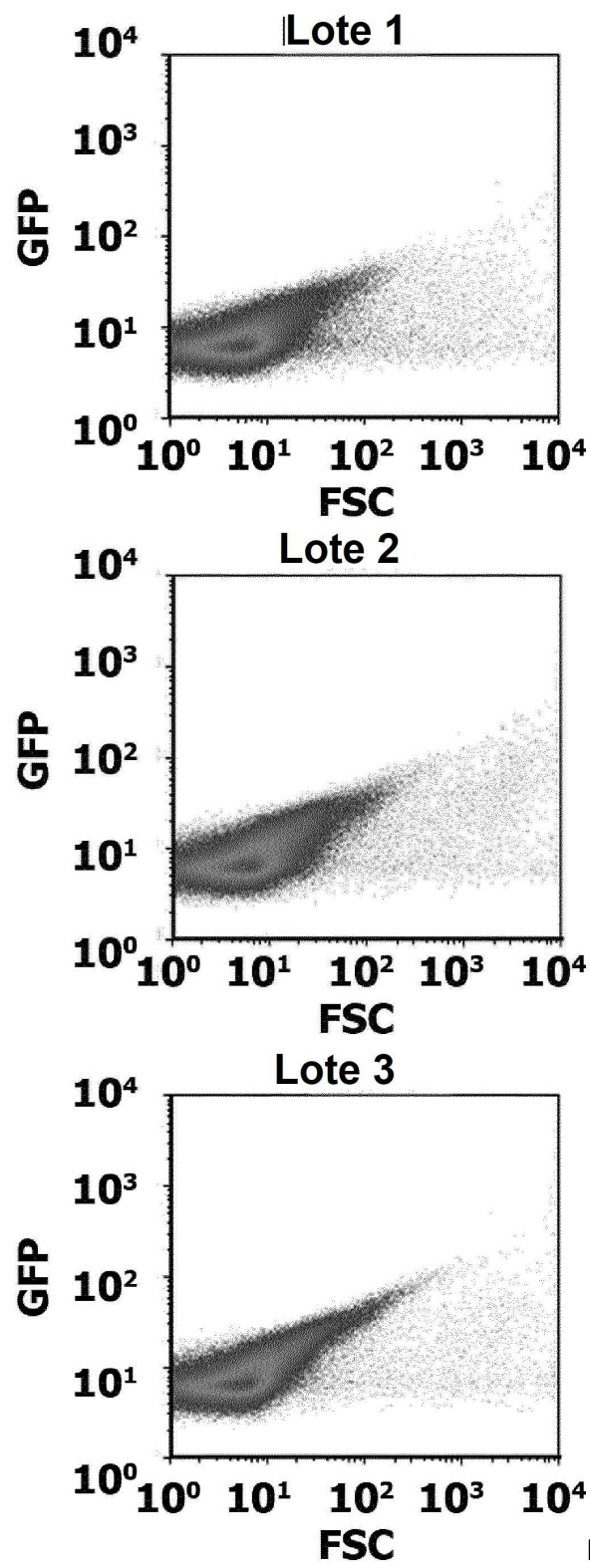


FIG. 5b

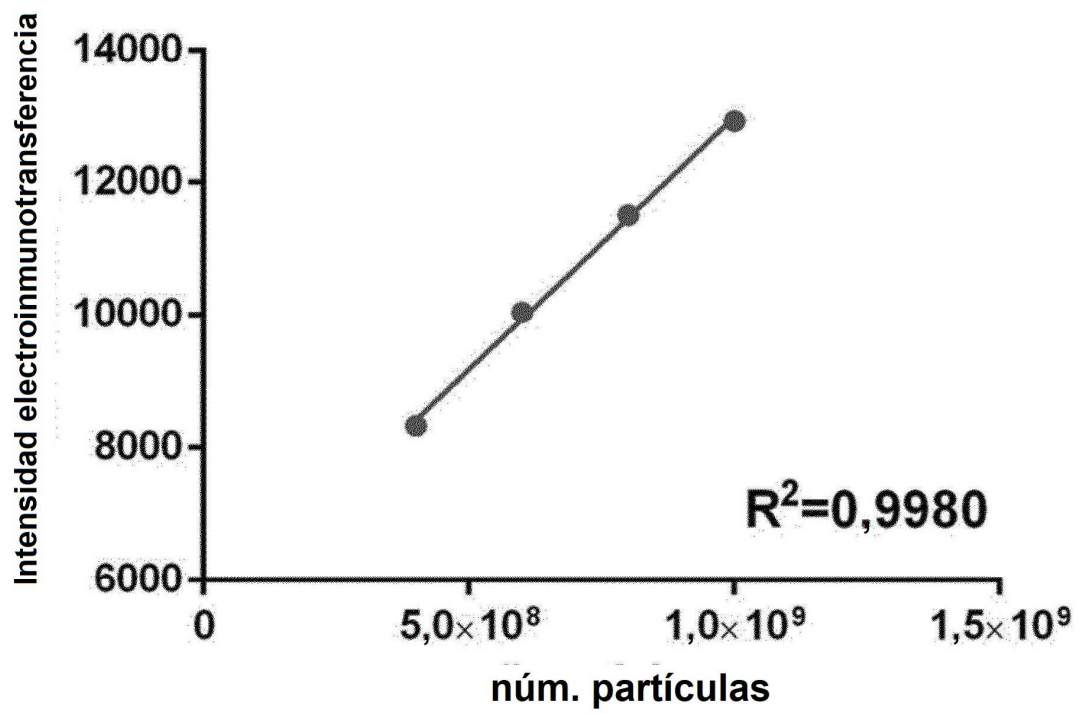
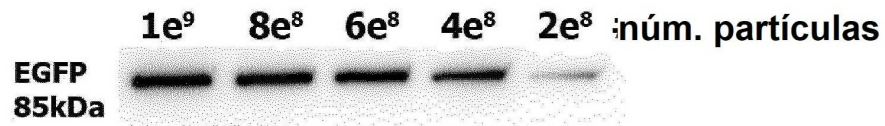
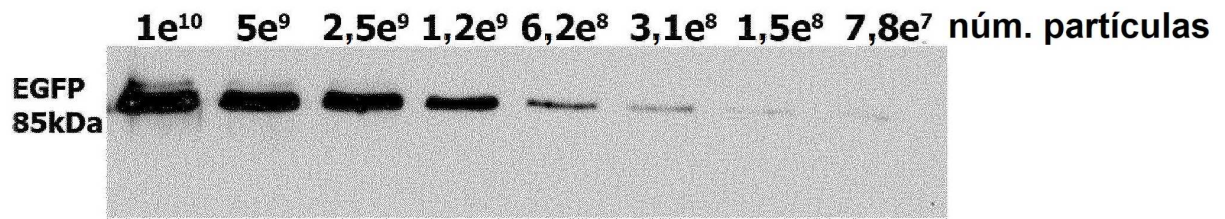


FIG. 5c

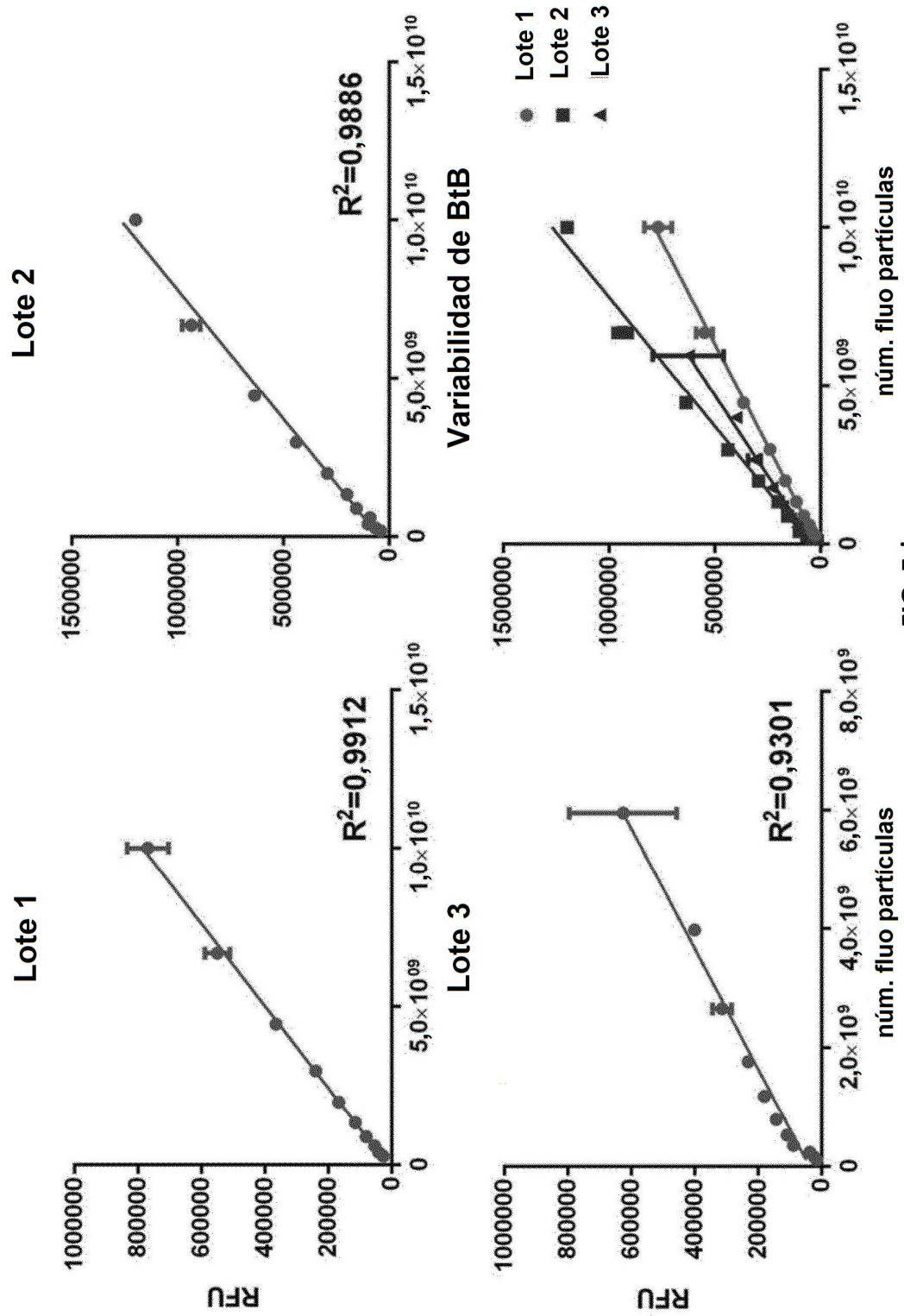


FIG. 5d

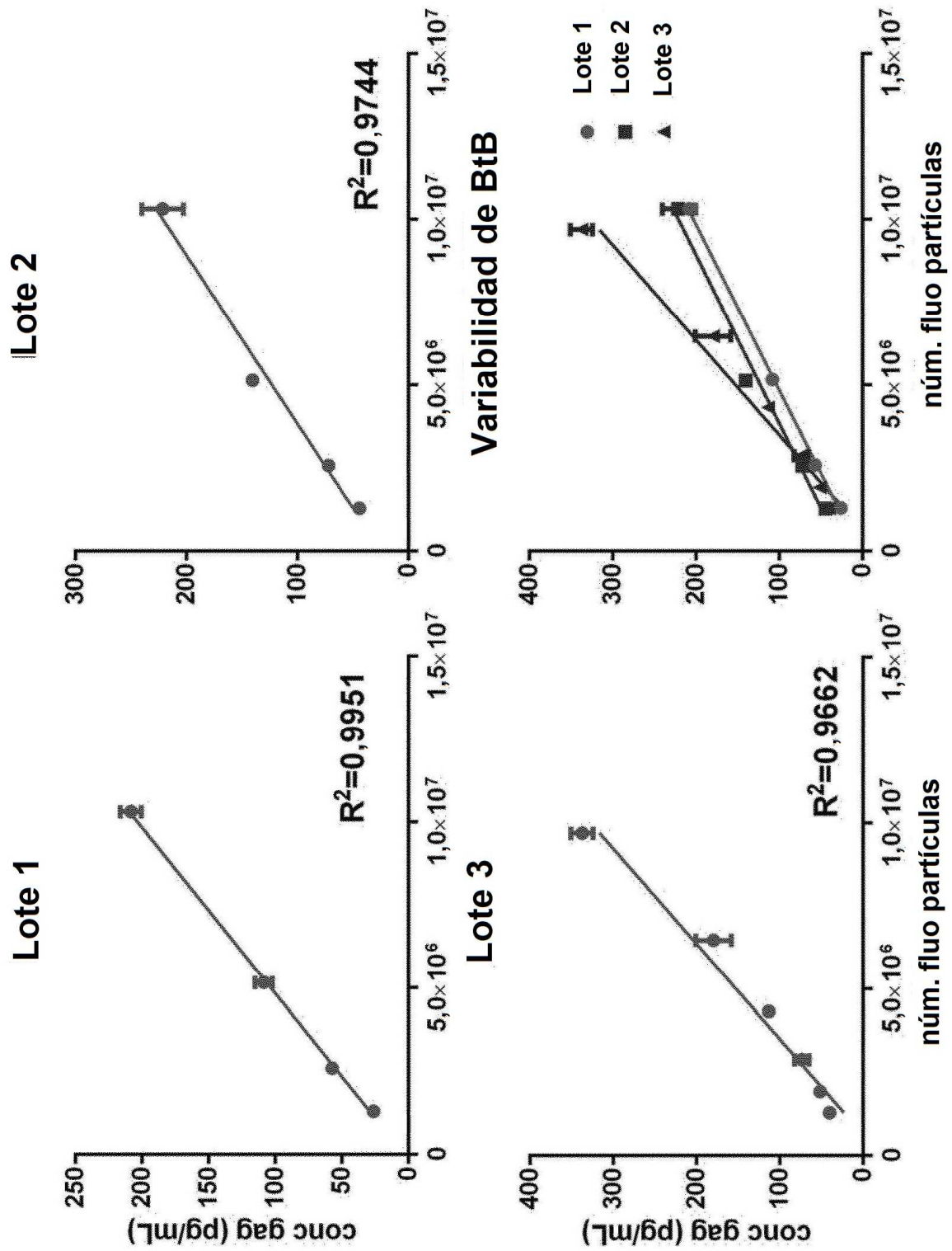


FIG. 5e

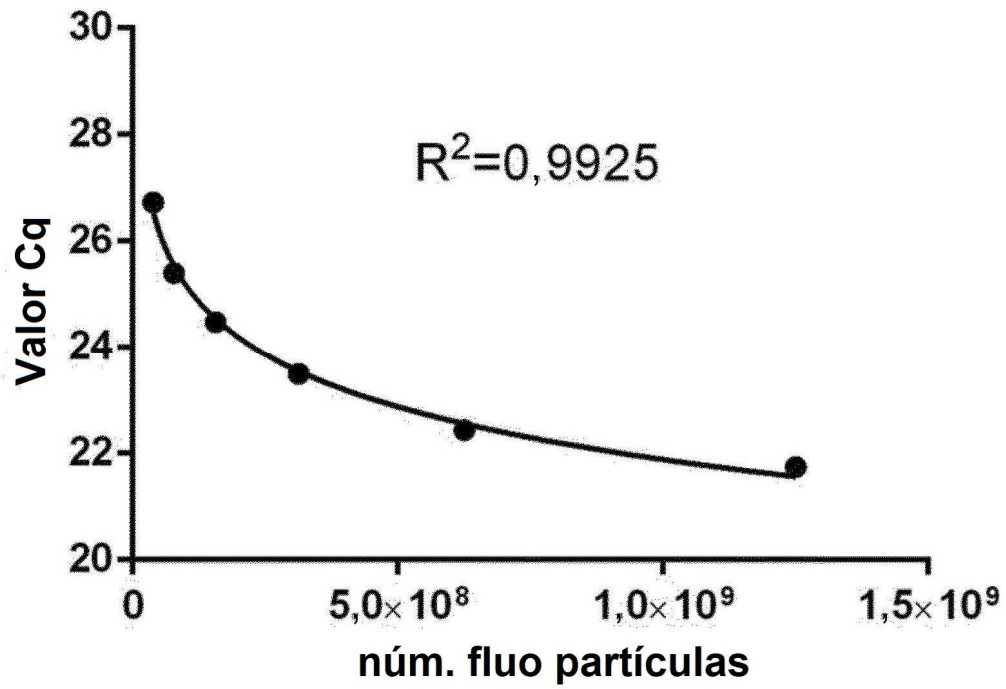


FIG. 5f

Estabilidad congelación descongelación

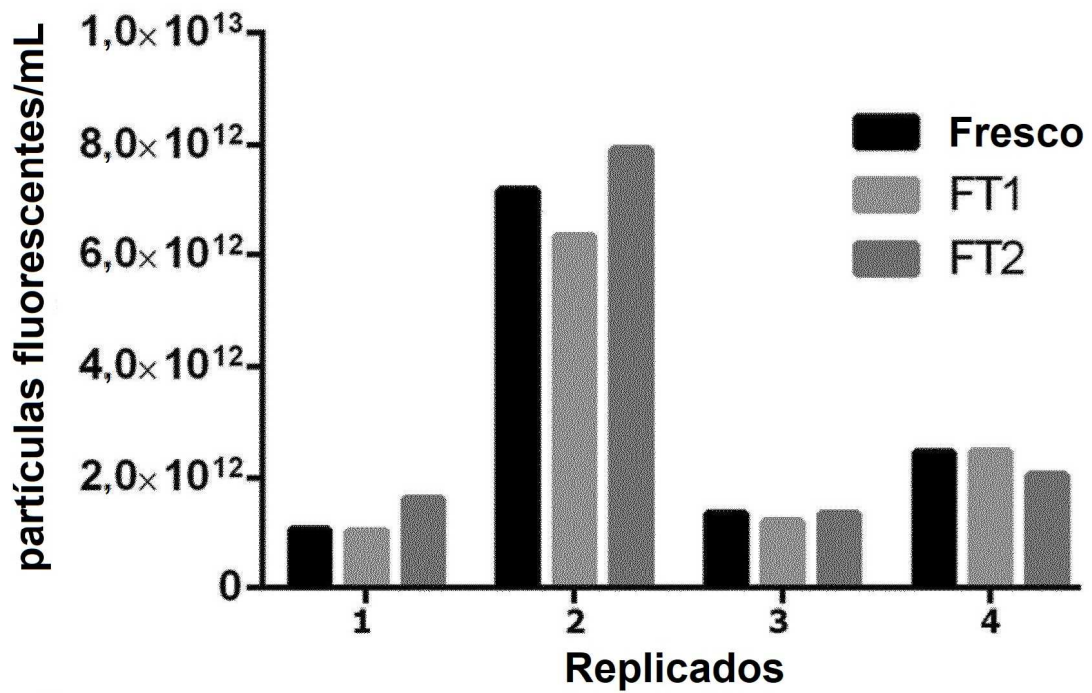


FIG. 6a

Estabilidad diluida a 4°C

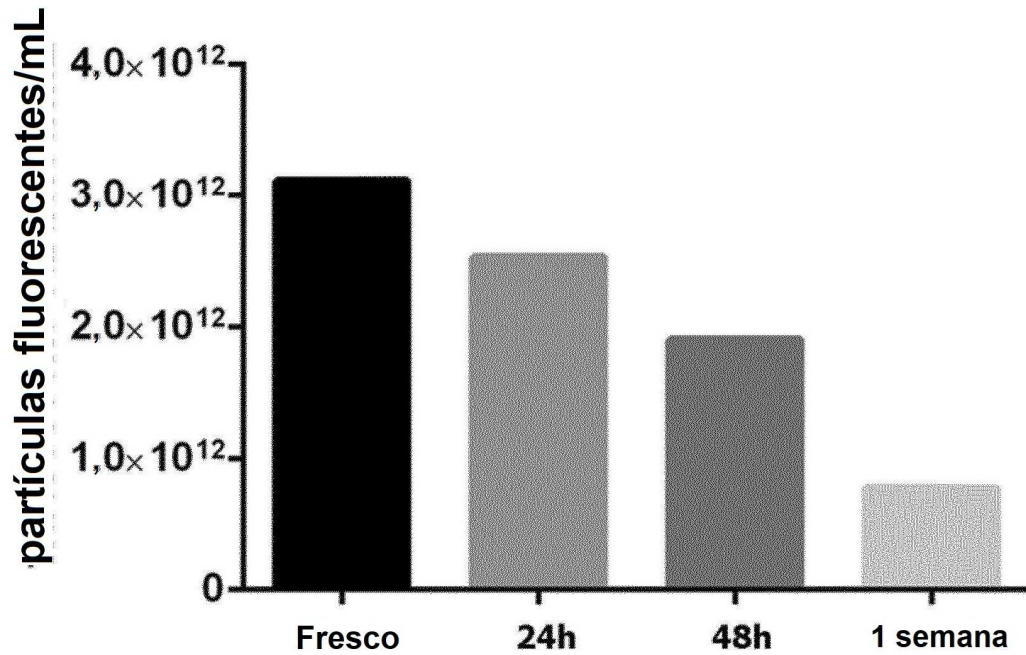


FIG. 6b

Estabilidad concentrada a 4°C

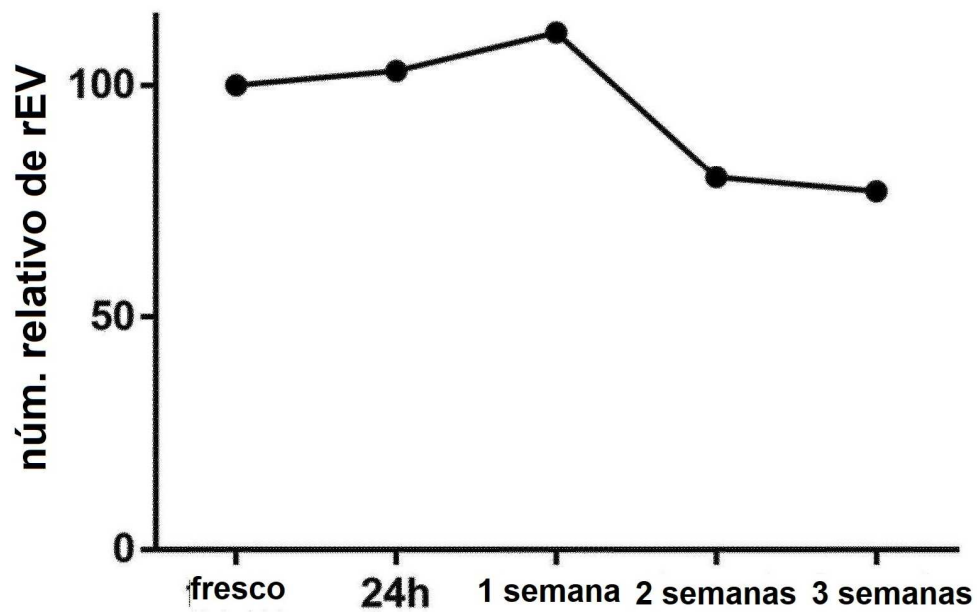


FIG. 6c

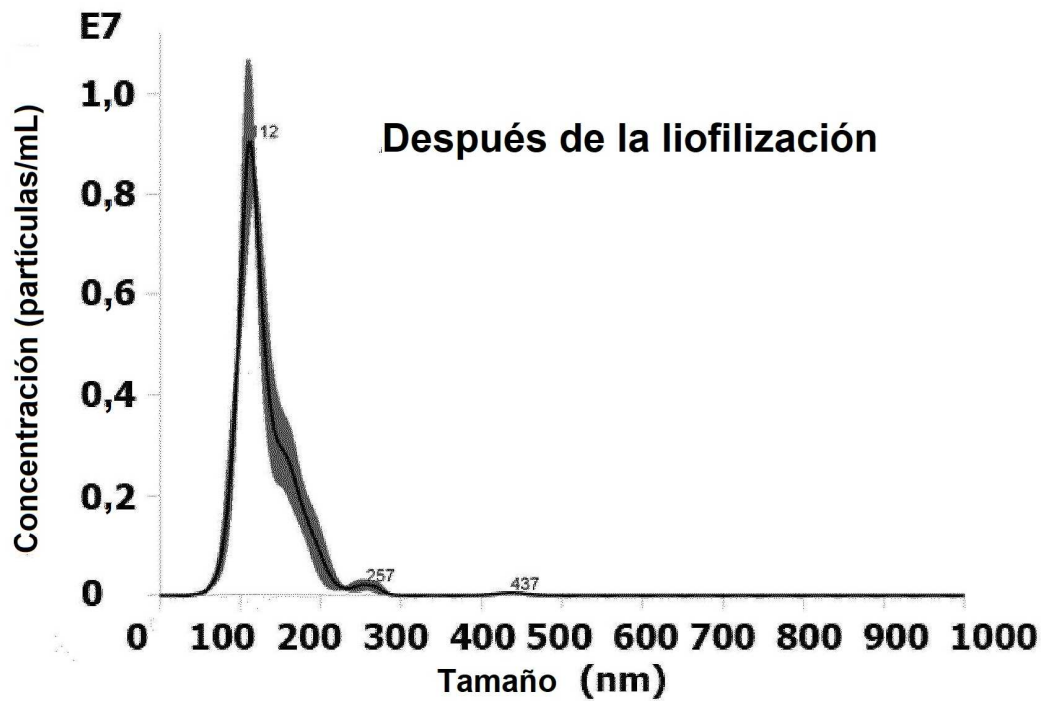
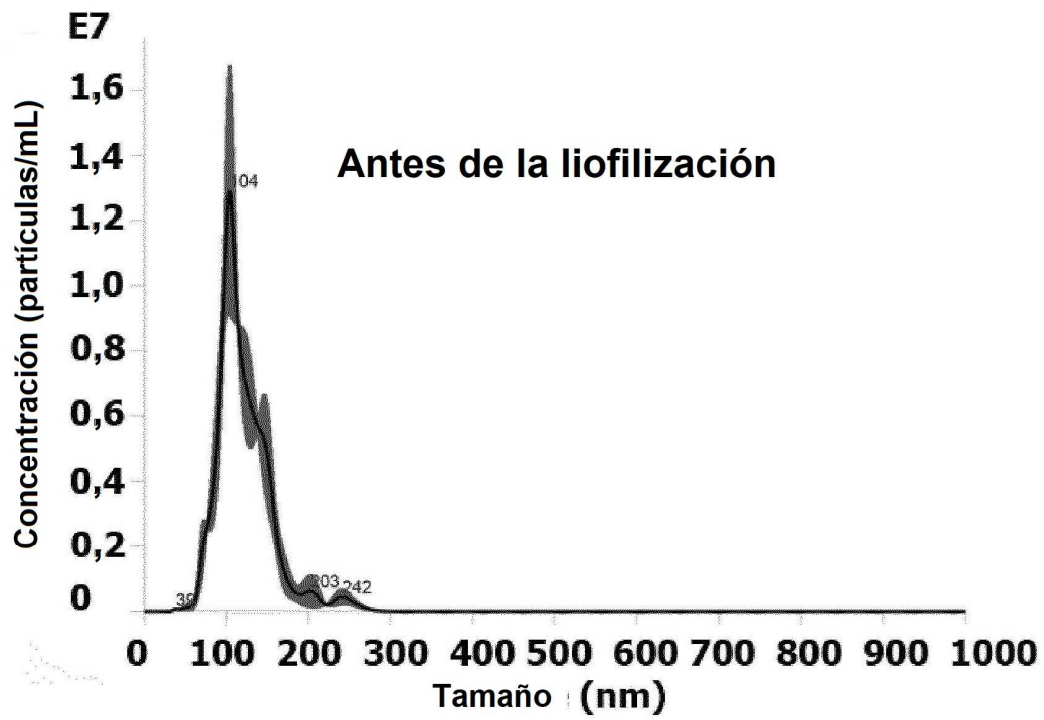


FIG. 6d

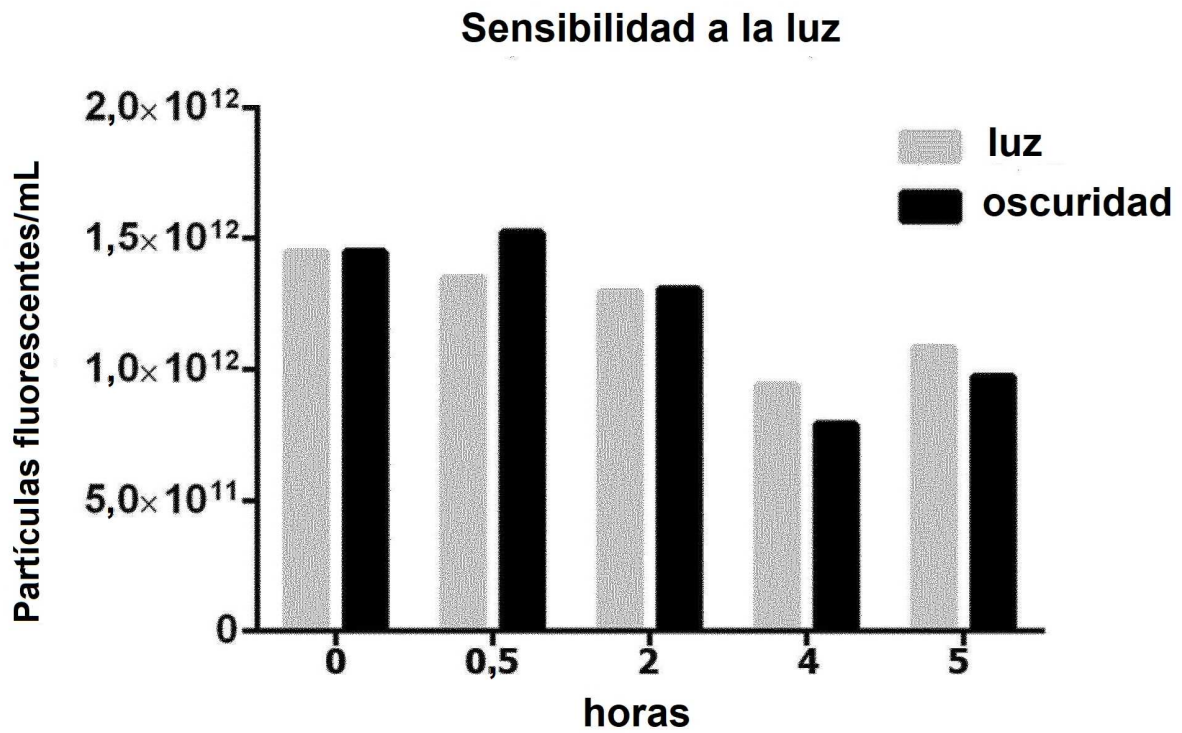


FIG. 6e

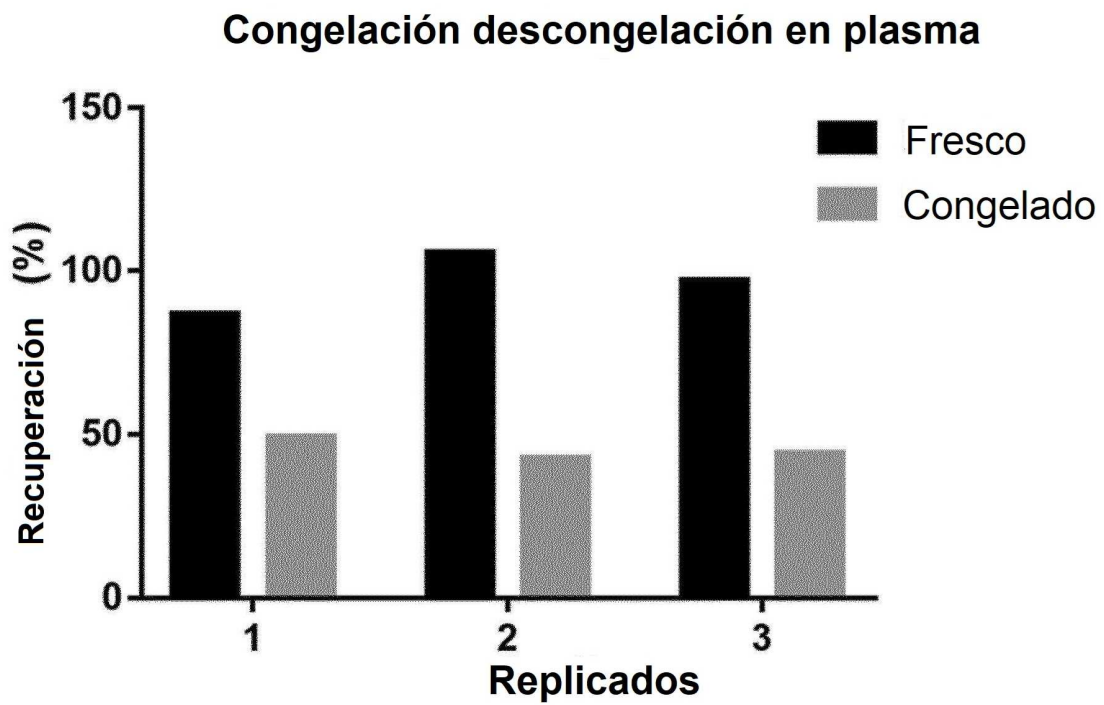


FIG. 6f

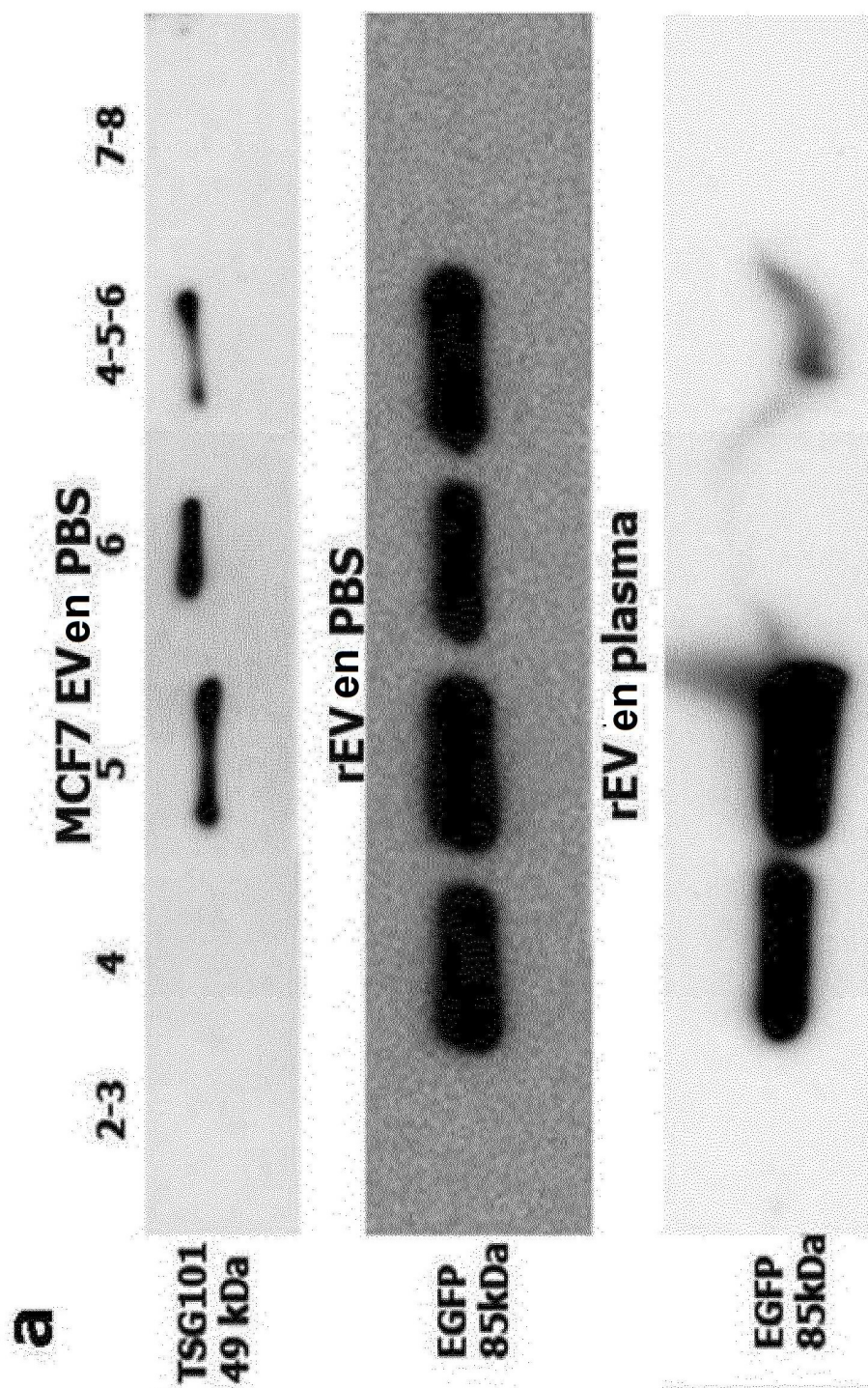


FIG. 7a

Recuperación de SEC

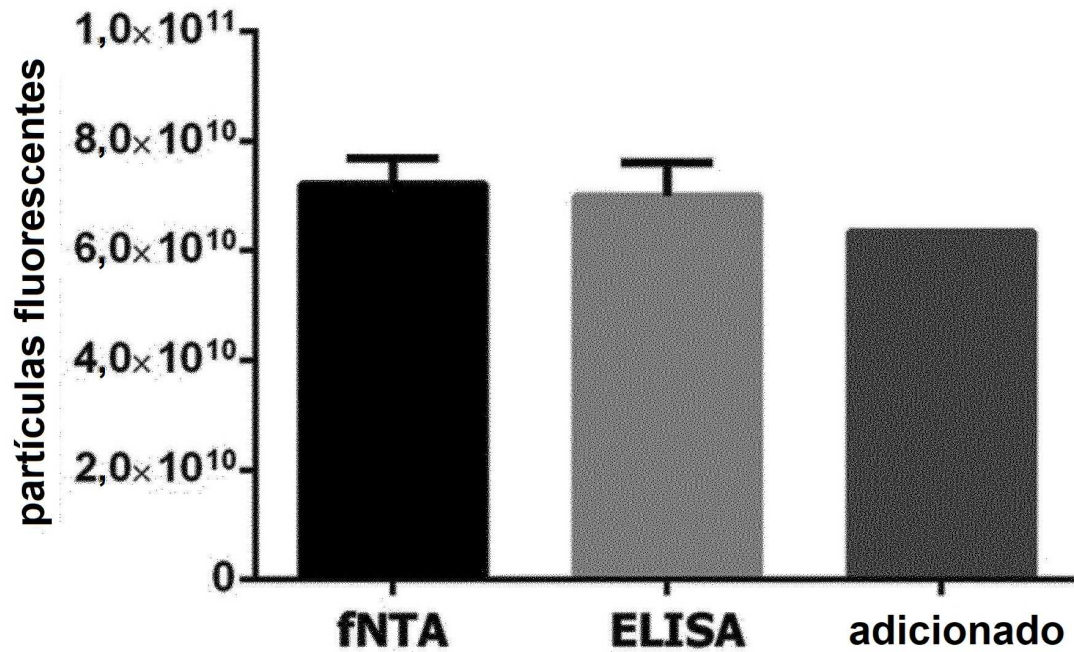


FIG. 7b

SEC-PK-ODG-SEC

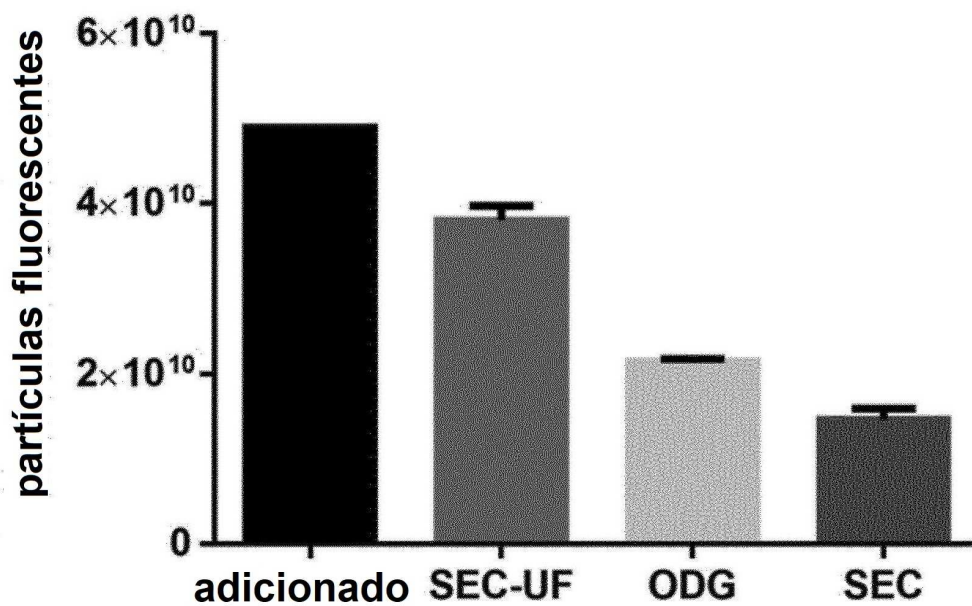


FIG. 7c

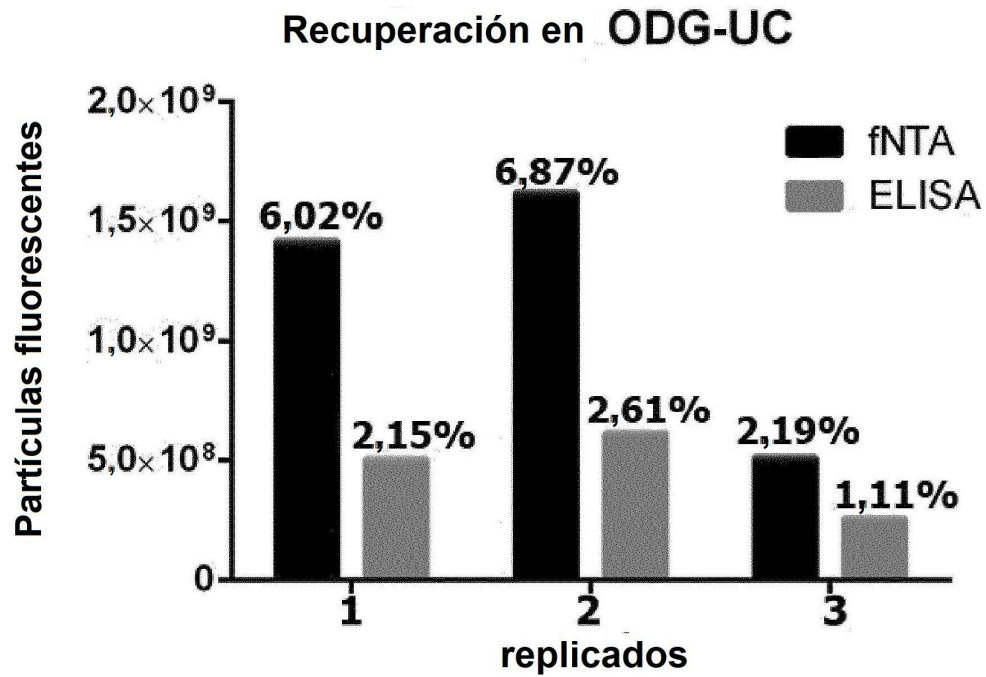


FIG. 7d

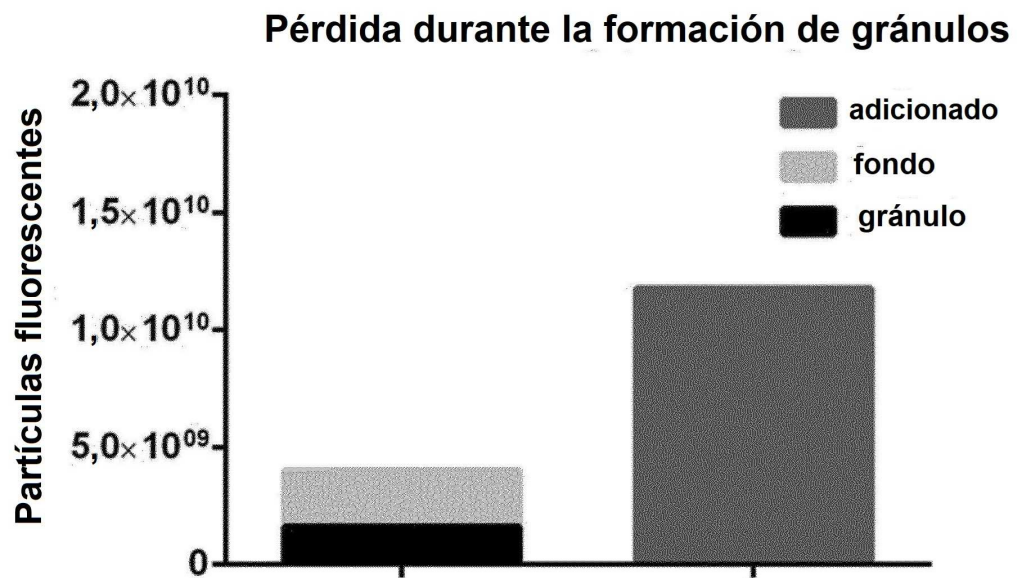


FIG. 7e

Recuperación de dif UC

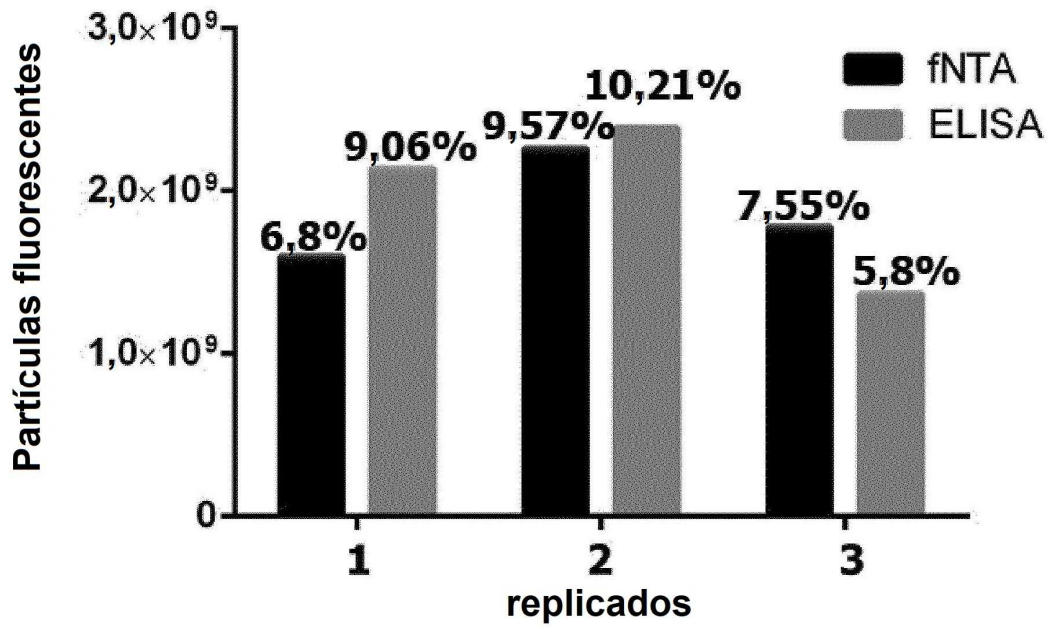


FIG. 7f

Recuperación de Exoquick

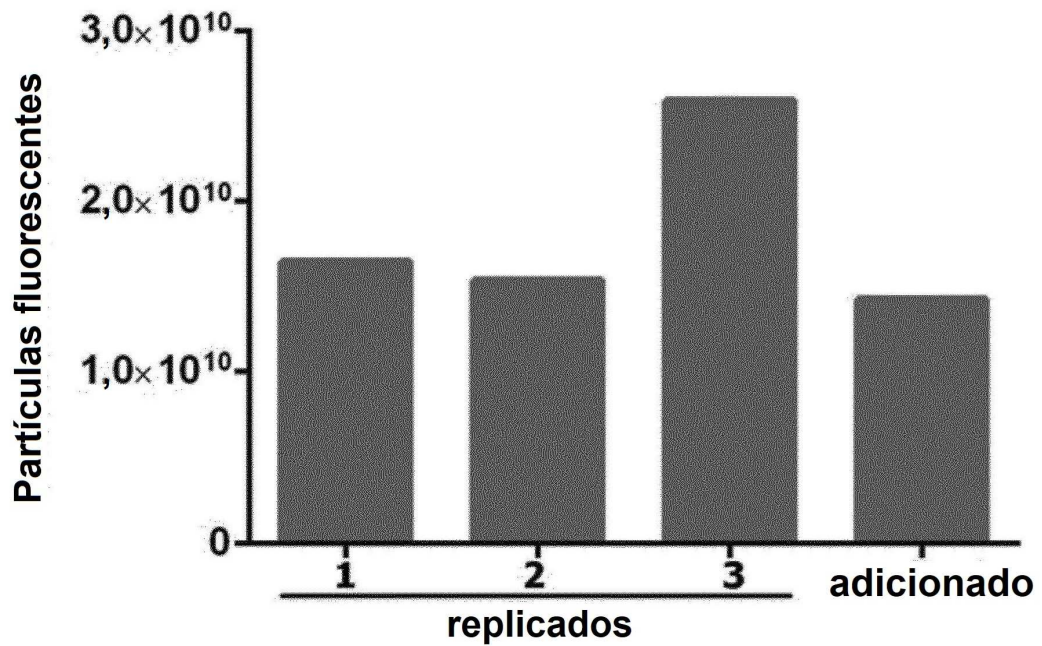


FIG. 7g

Control frente a adición de plasma tratado con PK

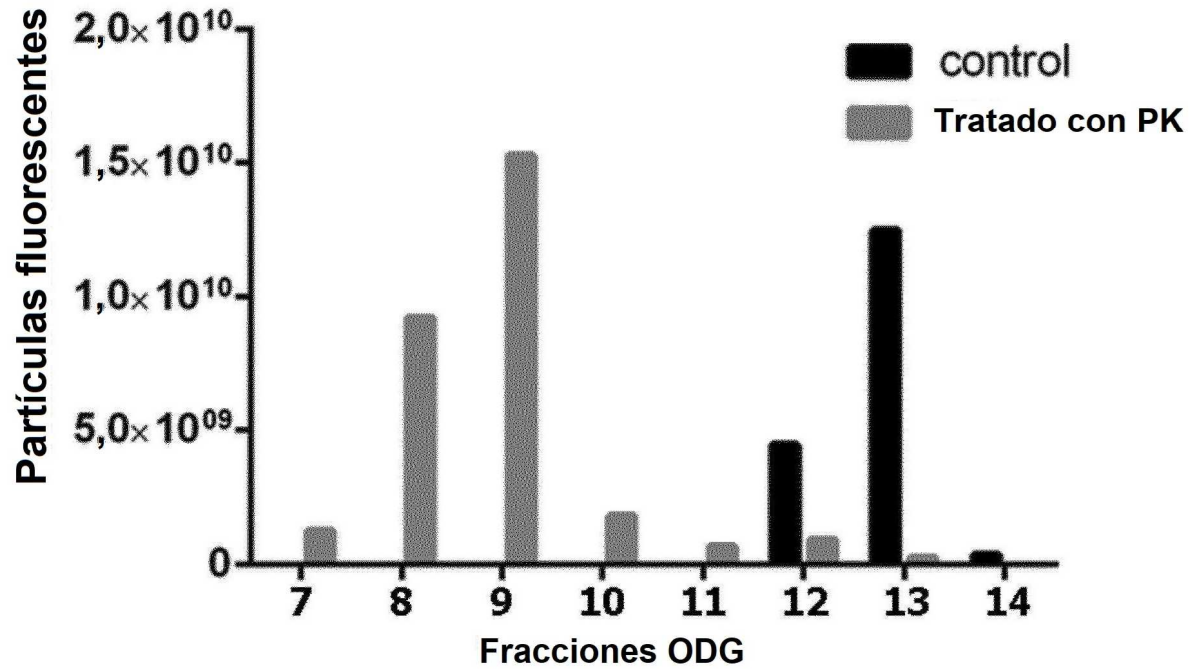


FIG. 8a

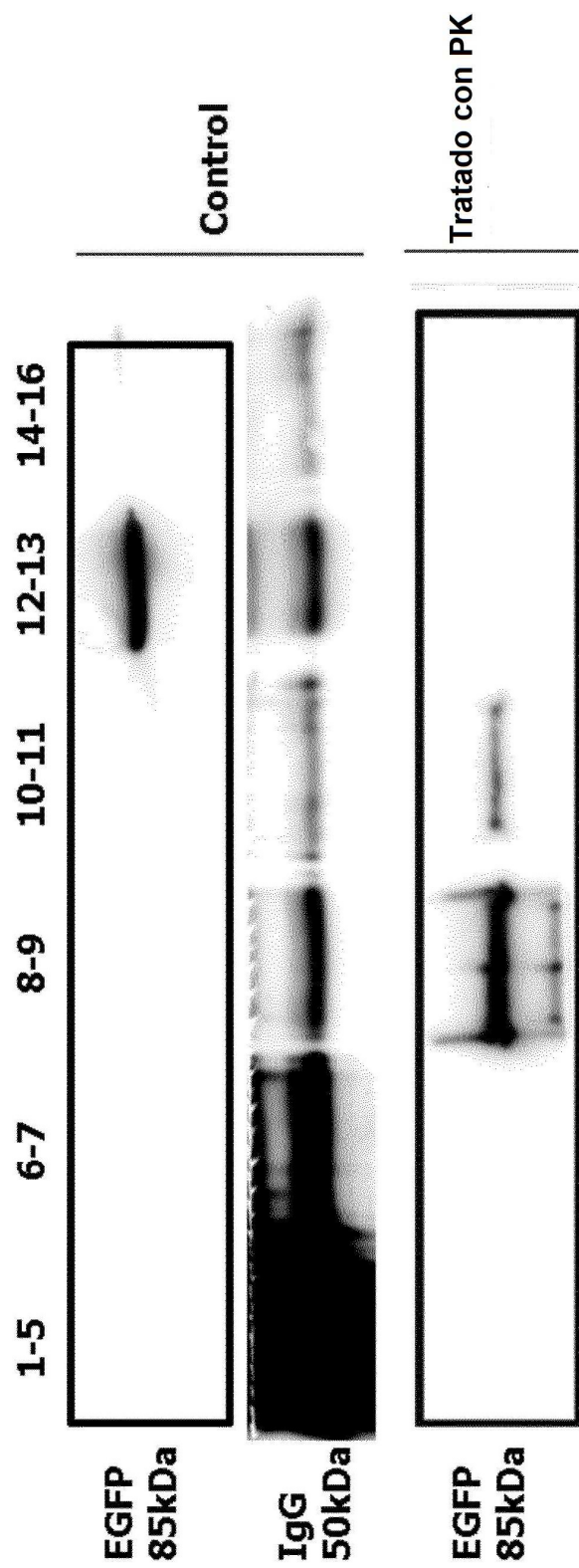


FIG. 8b

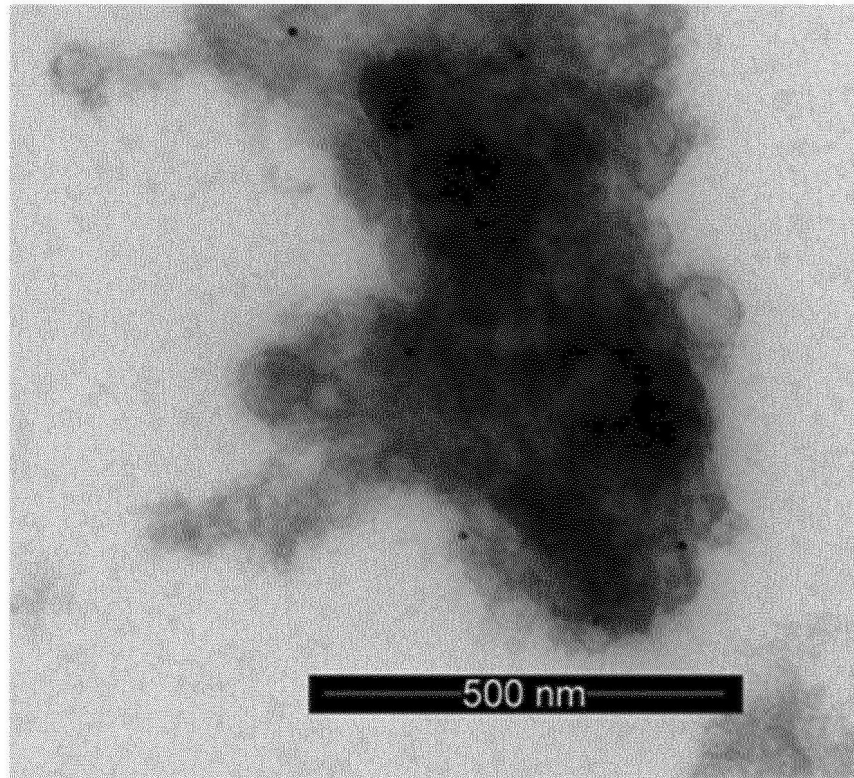


FIG. 8c

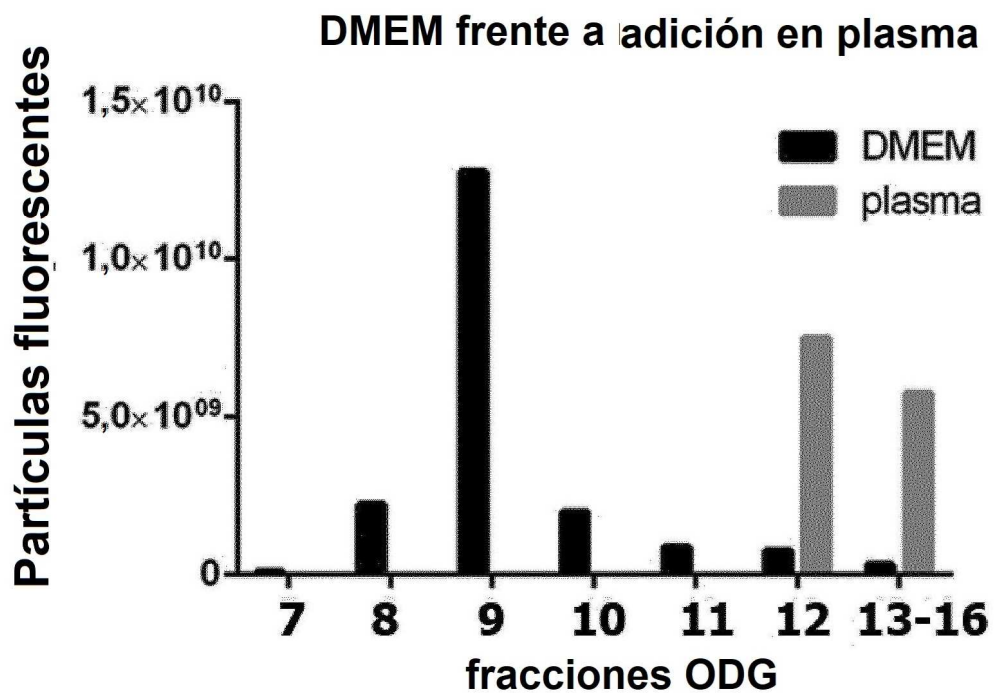


FIG. 8d

Orina TD frente a BU

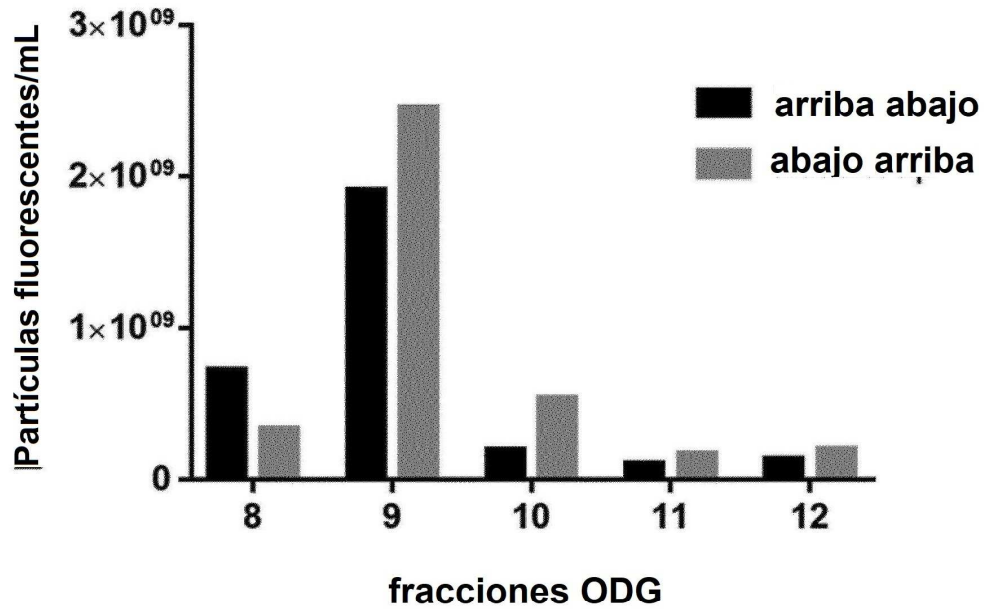


FIG. 8e

adición en PBS e IgM/IgG

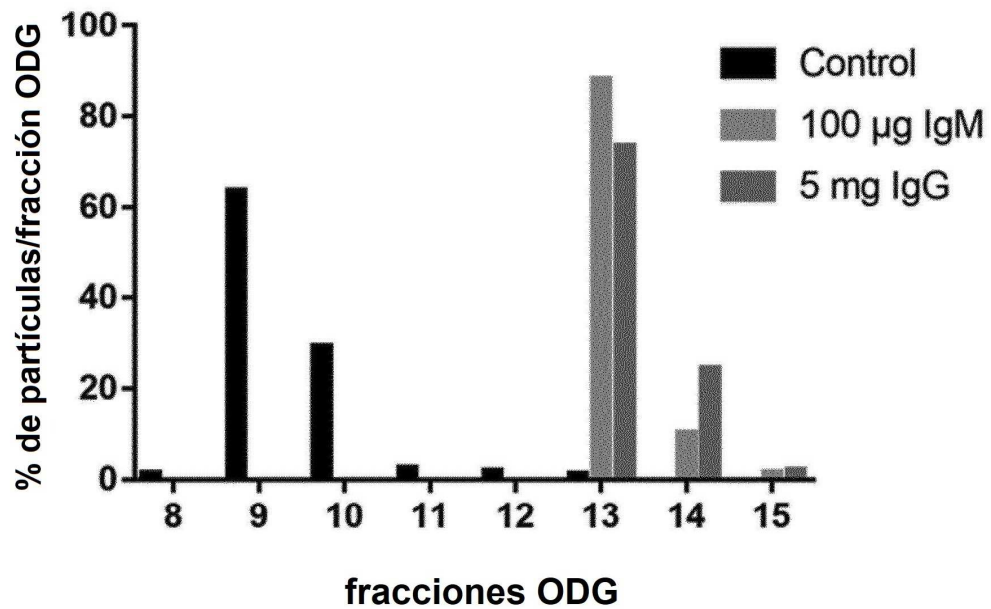


FIG. 8f

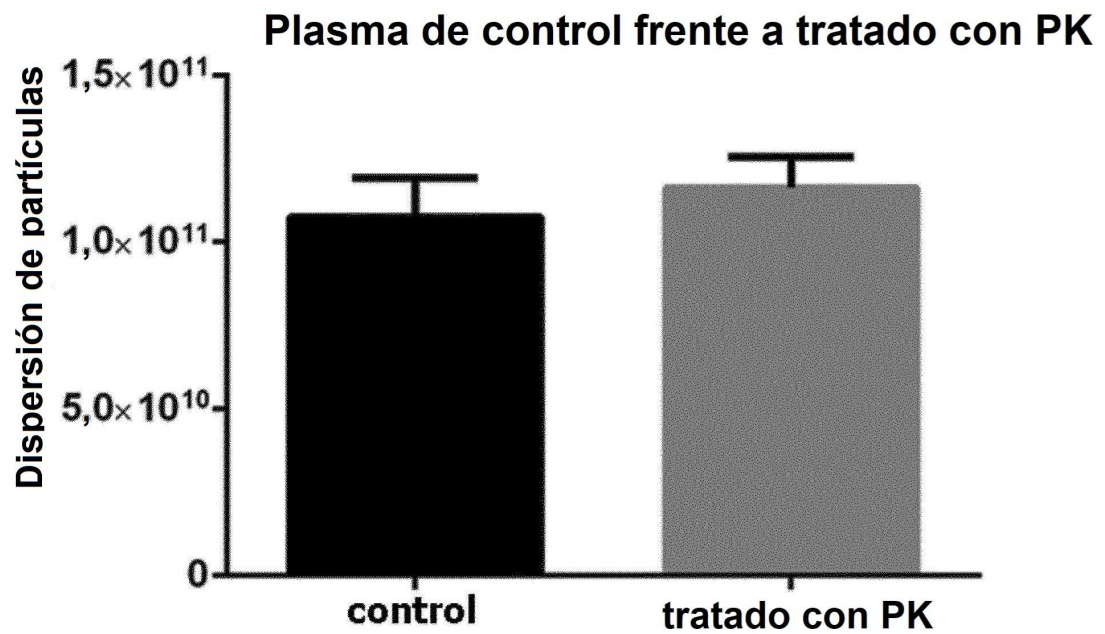


FIG. 8g

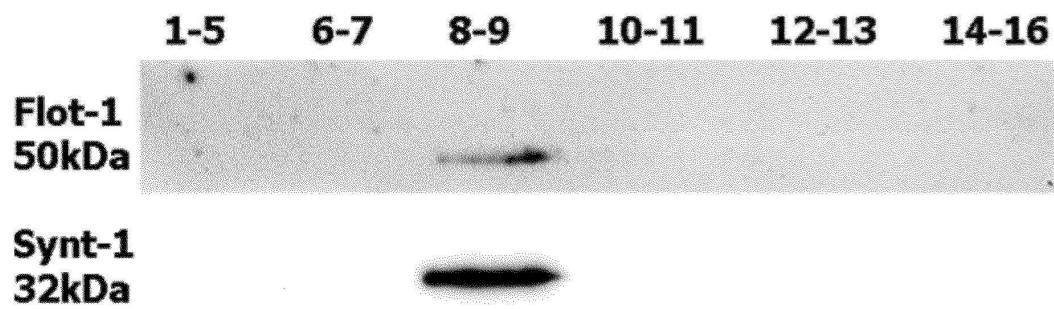


FIG. 8h

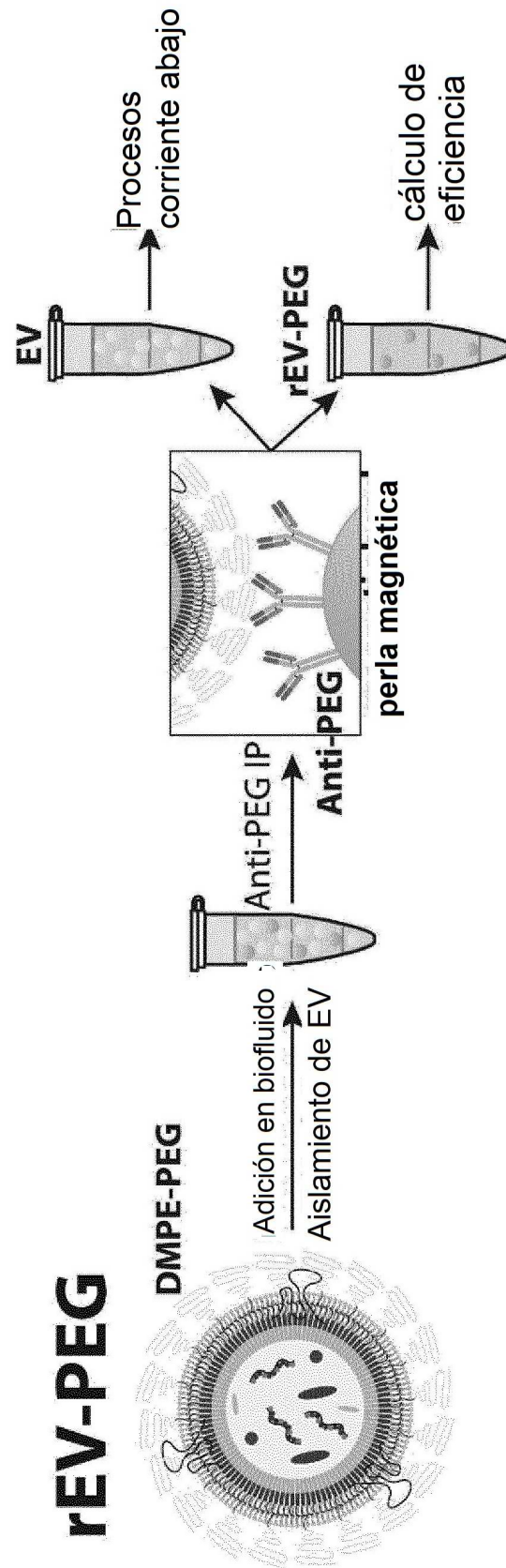


FIG. 9a

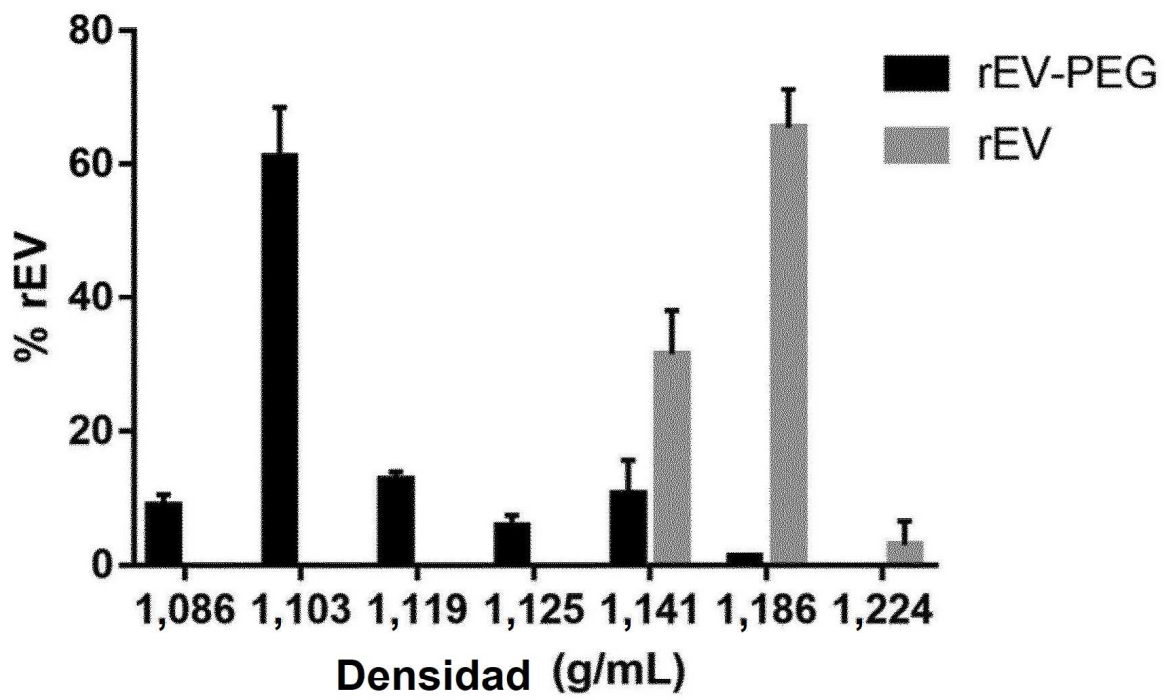


FIG. 9b

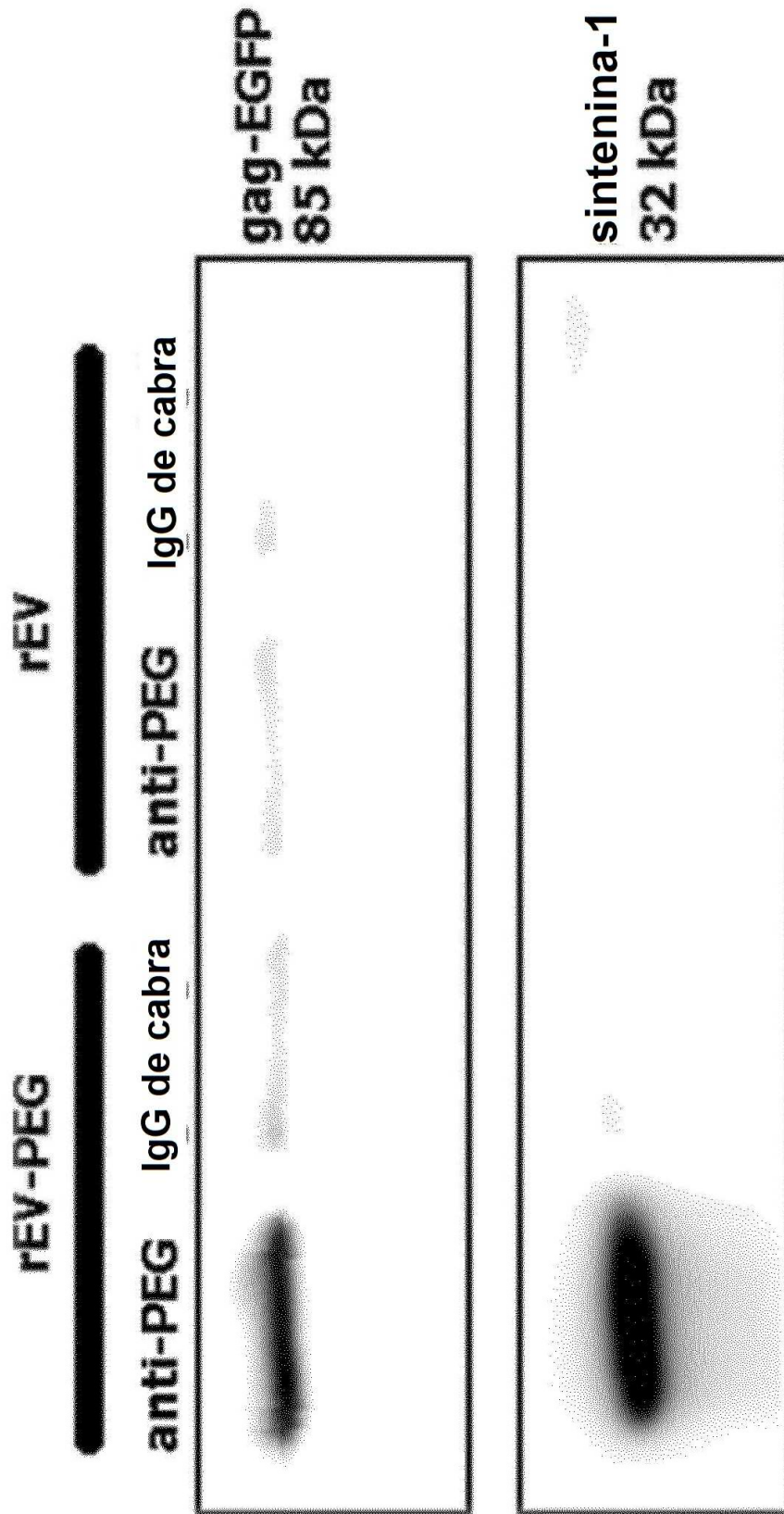


FIG. 9c

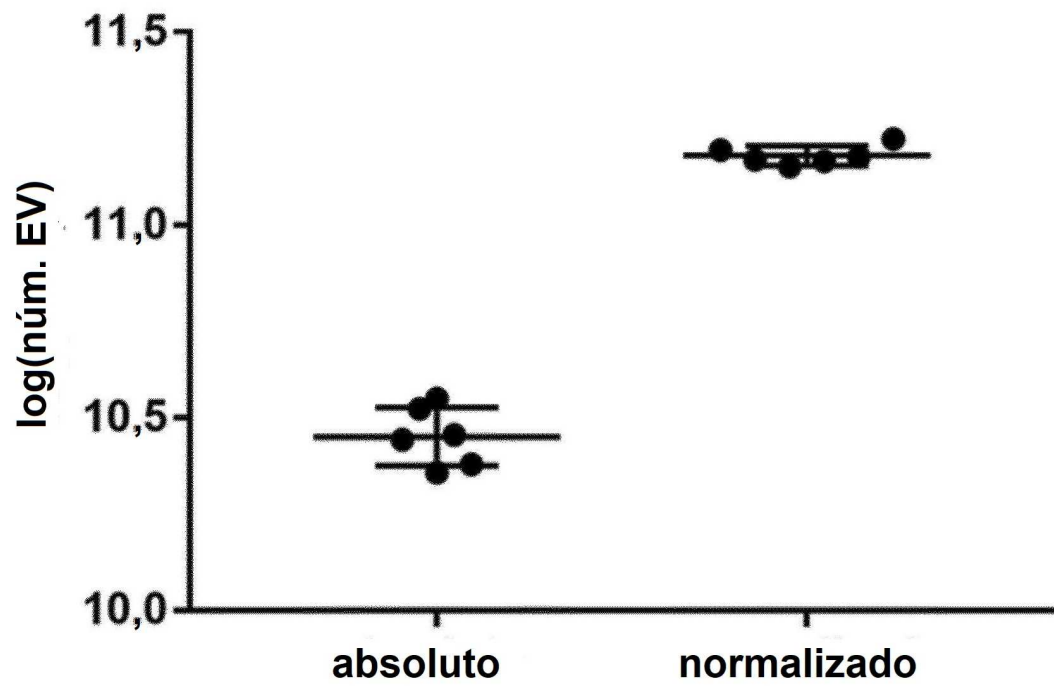


FIG. 9d

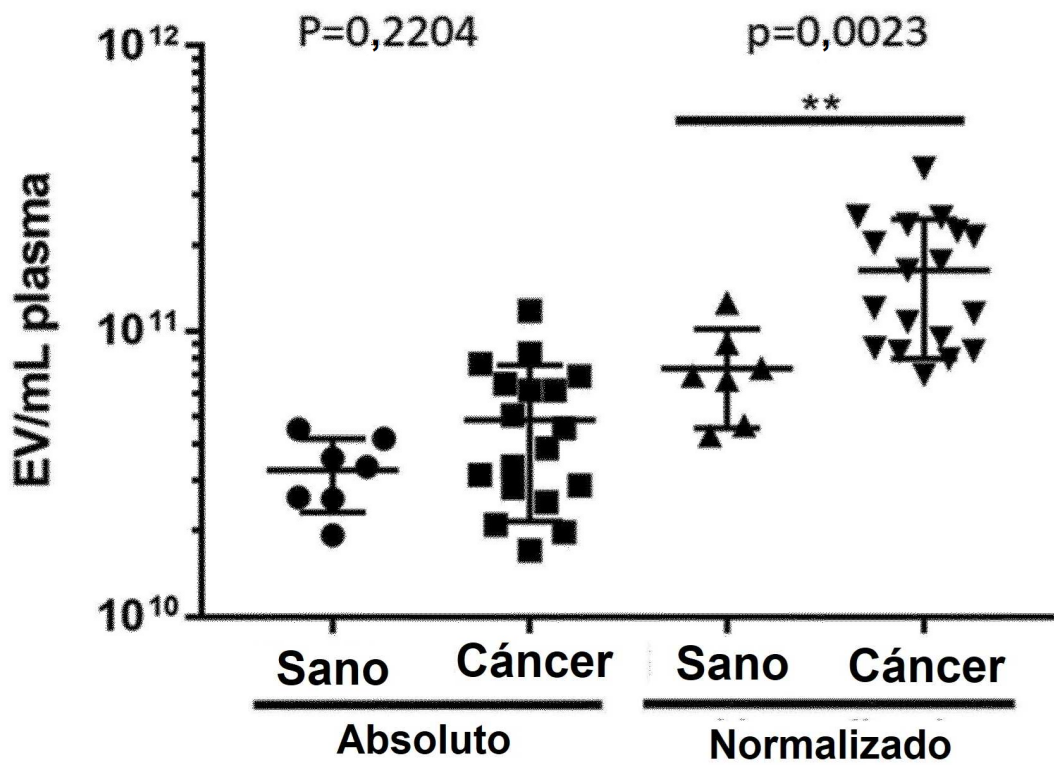


FIG. 9e