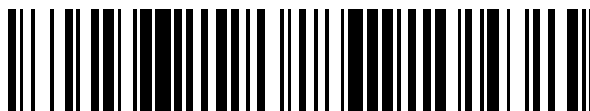


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 098**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/16 (2015.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 8/98 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014** **PCT/US2014/024629**
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14159662**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014** **E 14774189 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019** **EP 2972193**

54 Título: **Método de aislamiento y purificación de microvesículas de sobrenadantes de cultivo celular y fluidos biológicos**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361778591 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
1400 NW 10th Avenue, Suite 1214
Miami, Florida 33136, US

72 Inventor/es:

BADIAVAS, EVANGELOS V.;
SHABBIR, ARSALAN Q. y
DAVIS, STEPHEN C.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 778 098 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

Método de aislamiento y purificación de microvesículas de sobrenadantes de cultivo celular y fluidos biológicos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a los campos de la medicina, biología celular, biología molecular y genética. En particular, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas de microvesículas para potenciar o mejorar la cicatrización de heridas.

10

Antecedentes

Las microvesículas son secretadas por muchos, si no todos, tipos de células *in vitro* e *in vivo*, y están presentes en fluidos biológicos, tales como, por ejemplo, sangre, líquido intersticial, orina, saliva y lágrimas. Las microvesículas son vesículas que comprenden bicapas lipídicas, formadas a partir de la membrana plasmática de las células, y son de tamaño heterogéneo, que varía de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 5.000 nm. La célula a partir de la cual se forma una microvesícula se denomina en el presente documento "la célula hospedadora". Las microvesículas son una población heterogénea de vesículas e incluyen, por ejemplo, ectosomas, micropartículas, microvesículas, nanovesículas, Vesículas de separación y partículas de membrana.

20

Las microvesículas presentan proteínas de membrana de su célula hospedadora en su superficie de membrana, y también pueden contener moléculas dentro de la microvesícula de la célula hospedadora, tales como, por ejemplo, ARNm, miARN, ARNt, ARN, ADN, lípidos, proteínas o partículas infecciosas. Estas moléculas pueden proceder de, o ser, moléculas recombinantes introducidas en la célula hospedadora. Las microvesículas desempeñan un papel fundamental en la comunicación intercelular y pueden actuar local y distalmente dentro del cuerpo, induciendo cambios en las células al fusionarse con una célula diana, introduciendo las moléculas transportadas sobre y/o en la microvesícula a la célula diana. Por ejemplo, las microvesículas han estado implicadas en la reversión antitumoral, el cáncer, la supresión inmunitaria tumoral, la metástasis, las interacciones entre el tumor y el estroma, la angiogénesis y la regeneración de tejidos. Las microvesículas también se pueden usar para el diagnóstico de enfermedades, pues se ha demostrado que portan biomarcadores de varias enfermedades, incluyendo, por ejemplo, cardiopatía, VIH y leucemia.

25

30

A pesar de la importancia de las microvesículas, el aislamiento de microvesículas en cantidades útiles, preservando su integridad estructural y funcional, sigue siendo un problema. El procedimiento tradicional utiliza ultracentrifugación para aislar microvesículas de muestras.

35

Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 7.807.438 desvela un método de aislamiento del virus de la hepatitis C. El método comprende la separación de partículas denominadas exosomas del plasma sanguíneo de un individuo infectado con el virus de la hepatitis C (VHC) y la extracción de ARN de estas partículas exosomas.

40

En otro ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. n.º US20030198642A1 desvela [e]xosomas [...] derivados de compartimentos enriquecidos con MHC de clase II en células presentadoras de antígeno [...] [para] un [...] vehículo de vacunación.

45

En otro ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. n.º US20060116321A1 desvela métodos y composiciones para su uso en la mediación de una reacción inmunosupresora. Las composiciones [...] comprenden exosomas que tienen actividad inmunosupresora. Dichos exosomas pueden derivarse de una variedad de diferentes tipos de células, incluyendo las células presentadoras de antígeno, tales como las células dendríticas y los macrófagos. Antes del aislamiento de los exosomas, las células se pueden modificar genéticamente para expresar moléculas capaces de potenciar la actividad inmunosupresora de dichos exosomas y/o se pueden exponer a uno o más agentes, tales como citocinas o inhibidores de citocinas, que también son capaces de potenciar la actividad inmunosupresora de los exosomas. La presente invención también se refiere al uso de dichos exosomas para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la activación no deseada del sistema inmunitario. La presente invención también incluye exosomas aislados directamente del suero que han demostrado ser inmunosupresores.

50

La ultracentrifugación puede dañar las microvesículas, produciendo la lisis o ruptura de las vesículas. El daño a las microvesículas puede causar una reacción adversa en el cuerpo, si se introdujeran dichas microvesículas dañadas.

60

Otros han intentado métodos alternativos para aislar microvesículas. Sin embargo, los métodos alternativos empleados con frecuencia aíslan una subfracción de microvesículas, o son poco eficaces. Por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. n.º US2011003008A1 desvela una partícula secretada por una célula madre mesenquimal y que comprende al menos una propiedad biológica de una célula madre mesenquimal. La propiedad biológica puede comprender una actividad biológica de un medio acondicionado con células madre mesenquimales (MSC-CM, *Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium*) tal como cardioprotección o reducción del tamaño del infarto. La partícula puede comprender una vesícula o un exosoma.

65

En otro ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. n.º US20120070858A1 desvela un método de aislamiento de exosomas de plaquetas sanguíneas usando nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (Fe_3O_4), mediante un mecanismo de atracción de la carga basado en el potencial Zeta predeterminado de los exosomas. El método implica el uso de nanopartículas de óxido de hierro que se sintetizan previamente [sic] con una carga positiva predeterminada, y que se unen a los exosomas cargados negativamente contenidos en la muestra biológica. Durante la incubación, las nanopartículas magnéticas catiónicas son absorbidas por la superficie de la membrana de los exosomas debido a la interacción electrostática. La exposición del material a un campo magnético permite separar los exosomas unidos a las nanopartículas. El éxito de esta técnica ha sido confirmado por la caracterización [sic] de los exosomas por citometría de flujo [sic]. Se ha demostrado que el método es adecuado para este fin, ya que permite aislar y purificar exosomas, sin sufrir alteraciones de sus características morfológicas y estructurales originales.

En otro ejemplo, la solicitud de patente PCT WO2012169970A1 desvela materiales y métodos de uso de agentes de cohidratación restringidos en la purificación de materiales biológicos tales como anticuerpos, virus, células y orgánulos celulares en relación con la cromatografía convectiva, aplicaciones de lecho fluidizado o coprecipitación.

Ahí permanece, por lo tanto, la necesidad de proporcionar un método de aislamiento y purificación de microvesículas sin daño, y en cantidades suficientes para que las microvesículas aisladas se puedan usar posteriormente para diagnosticar enfermedades, terapias o investigaciones.

El documento WO 2013/022786 A2 se refiere a métodos de caracterización y evaluación del tratamiento y/o progresión de un cáncer de pulmón o de cabeza y cuello midiendo cantidades de uno o más ARN presentes en microvesículas aisladas de una muestra biológica de un sujeto. Se describen diferentes métodos de aislamiento de las microvesículas, tales como los métodos que usan cromatografía, selección de afinidad o precipitación de PEG.

n.º de cat. EXOTCxxA-1, Manual de usuario de ExoQuick-TC™, "ExoQuick-TC™ Exosome Precipitation Solution", 2013-02-21, páginas 1-9, XP055290575, (URL: https://www.systembio.com/downloads/Manual_ExoTC_WEB.pdf) se refiere a un producto comercial que es un reactivo de precipitación de exosomas. Se proporcionan protocolos para métodos de precipitación de exosomas de biofluidos.

El documento WO 2012/020307 A2 describe métodos y composiciones basados en microvesículas para el tratamiento de diferentes enfermedades, trastornos y afecciones. Se menciona una gran cantidad de enfermedades, trastornos y afecciones, incluyendo la cicatrización de heridas. Se describen diferentes métodos de aislamiento o enriquecimiento de microvesículas, entre otros, mediante ultracentrifugación, precipitación, por ejemplo, con Exo-Quick-TC™, fusión inducida por PEG o fusión ultrasónica.

Se describen métodos de aislamiento de microvesículas de fluidos biológicos sin dañar la integridad estructural y/o funcional de las microvesículas.

Resumen

Se describe un método de aislamiento y/o purificación de microvesículas de sobrenadantes de cultivo celular o fluidos biológicos utilizando un agente de precipitación que hace precipitar la microvesícula del sobrenadante de cultivo celular o fluido biológico mediante el desplazamiento del agua de solvatación.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica de microvesículas aisladas para su uso en la terapia para potenciación o mejora de la cicatrización de heridas, en donde las microvesículas aisladas se preparan con un método que comprende las etapas de:

- (a) obtener un fluido biológico que contenga microvesículas;
- (b) aclarar el fluido biológico para eliminar los residuos celulares;
- (c) hacer precipitar las microvesículas añadiendo un agente precipitante que sea polietilenglicol al fluido biológico aclarado;
- (d) recoger las microvesículas precipitadas;
- (e) lavar las microvesículas precipitadas para eliminar el agente precipitante; y
- (f) opcionalmente, suspender las microvesículas en una solución para el almacenamiento o uso posterior a fin de producir una preparación aislada de microvesículas,

en donde el fluido biológico que contiene microvesículas se obtiene de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.

La presente invención proporciona una preparación aislada de microvesículas que potencia o mejora la cicatrización de las heridas. En una realización, la herida es una quemadura de espesor completo. En una realización, la herida es una quemadura de segundo grado.

En una realización, la presente invención proporciona una preparación aislada de microvesículas que pueden regenerar al menos un tejido en un paciente con piel enferma, dañada o ausente seleccionado del grupo que consiste

en: tejido epitelial, tejido estromal, tejido nervioso, tejido vascular y estructuras anexiales. En una realización, la presente invención proporciona una preparación aislada de microvesículas que pueden regenerar tejidos y/o células de las tres capas germinales.

- 5 Se describe una preparación aislada de microvesículas que contienen al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en ARN, ADN y proteína de una célula hospedadora. En una realización, la célula hospedadora está diseñada para expresar al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en ARN, ADN y proteínas. La preparación aislada de microvesículas que contienen al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en ARN, ADN y la proteína de una célula hospedadora se usa como agente terapéutico.

10

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en el presente documento y forman parte de la memoria descriptiva, ilustran diferentes realizaciones de la presente invención y, junto con la descripción, sirven además para explicar los principios de la invención y para permitir que una persona con conocimientos habituales en la materia haga y use la invención. En los dibujos, los mismos números de referencia indican elementos idénticos o funcionalmente similares. Se obtendrán fácilmente una apreciación más completa de la invención y muchas de las ventajas que conlleva a medida que la misma se entienda mejor con referencia a la siguiente descripción detallada considerada en relación con los dibujos adjuntos, en donde:

20

La Figura 1 muestra un esquema de un protocolo usado para aislar microvesículas mediante ultracentrifugación.

La Figura 2 muestra una realización de un método de aislamiento de microvesículas.

25

La Figura 3 muestra una realización alternativa de un método de aislamiento de microvesículas.

La Figura 4 muestra una realización de un aparato que facilita el aclarado del fluido biológico y la recolección de las microvesículas precipitadas por filtración.

30

La Figura 5 muestra micrografías electrónicas de microvesículas derivadas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana aisladas mediante el método de ultracentrifugación descrito en el Ejemplo 1 (paneles A y B) y aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención (paneles C y D) con los aumentos que se muestran en los paneles.

35

La Figura 6 muestra micrografías electrónicas de microvesículas derivadas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales derivadas de médula ósea porcina aisladas mediante el método de ultracentrifugación descrito en el Ejemplo 1 (paneles A y B) y aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención (paneles C y D) con los aumentos que se muestran en los paneles.

40

La Figura 7 muestra micrografías electrónicas de microvesículas derivadas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales derivadas de médula ósea murina aisladas mediante el método de ultracentrifugación descrito en el Ejemplo 1 (paneles A y B) y aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención (paneles C y D) con los aumentos que se muestran en los paneles.

45

La Figura 8 muestra micrografías electrónicas de microvesículas aisladas de plasma humano. Los paneles A a C muestran las microvesículas con aumentos crecientes, como se muestra en las barras de escala en los paneles.

La Figura 9 muestra micrografías electrónicas de microvesículas aisladas de plasma porcino. Los paneles A a C muestran las microvesículas con aumentos crecientes, como se muestra en las barras de escala en los paneles.

50

La Figura 10 muestra micrografías electrónicas de microvesículas aisladas de orina humana. Los paneles A a C muestran las microvesículas con aumentos crecientes, como se muestra en las barras de escala en los paneles.

55

La Figura 11 muestra una transferencia Western, que presenta la expresión de HSP70, CD63, STAT 3 y STAT3 fosforilado en lisados de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana, microvesículas aisladas de medio acondicionado usando células madre derivadas de médula ósea humana, preparadas mediante ultracentrifugación (Ultracentrifugación de MV de MSC humanas), o los métodos usados en la presente invención, como se describe en el Ejemplo 3 (Precipitación con PEG de MSC humanas). También se analizaron las microvesículas derivadas de plasma humano y orina humana, preparadas mediante los métodos, como se describe en el Ejemplo 3. (Precipitación con PEG en plasma humano) y (Precipitación con PEG en orina humana) respectivamente.

60

La Figura 12 muestra el efecto de las microvesículas aisladas del medio acondicionado usando células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana sobre la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos normales (A), fibroblastos dérmicos obtenidos de una úlcera del pie diabético (B) y fibroblastos dérmicos obtenidos de una úlcera del pie por presión (C). Se compararon el efecto de las microvesículas aisladas mediante

65

ultracentrifugación (MV U/C) y las microvesículas aisladas mediante los métodos usados en la presente invención (MV PEG). Se incluyeron como control los fibroblastos tratados con PBS o medio de cultivo empobrecido en microvesículas. La proliferación se determinó usando un ensayo de MTT.

La Figura 13 muestra el efecto de las microvesículas aisladas del medio acondicionado usando células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana sobre la migración de fibroblastos dérmicos humanos, según lo determinado por la capacidad de los fibroblastos para migrar a una región que había sido rascada. El panel marcado como "pretratamiento" muestra un área representativa de una placa de cultivo celular donde se extrajeron las células, antes de la adición de los tratamientos de prueba. Se probó el efecto de la migración de los fibroblastos usando microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención (precipitación con PEG) y microvesículas aisladas mediante ultracentrifugación (Ultracentrifugación) a las concentraciones mostradas. Se incluyeron como control los fibroblastos tratados con PBS o medio de cultivo empobrecido en microvesículas.

La Figura 14 muestra el efecto de las microvesículas aisladas del medio acondicionado usando células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana sobre la migración de fibroblastos dérmicos humanos obtenidos de una úlcera del pie diabético, según lo determinado por la capacidad de los fibroblastos para migrar a una región que había sido rascada. El panel marcado como "pretratamiento" muestra un área representativa de una placa de cultivo celular donde se extrajeron las células, antes de la adición de los tratamientos de prueba. Se probó el efecto de la migración de los fibroblastos usando microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención (precipitación con PEG) y microvesículas aisladas mediante ultracentrifugación (Ultracentrifugación) a las concentraciones mostradas. Se incluyeron como control los fibroblastos tratados con PBS o medio de cultivo empobrecido en microvesículas.

La Figura 15 muestra la absorción de las microvesículas de la presente invención en fibroblastos dérmicos humanos. Los núcleos celulares, resueltos usando el colorante Hoechst 33342, se muestran en los paneles marcados como "Hoechst33342". Las células, resueltas con colorante vybrant, se muestran en el panel marcado como "Vybrant-Dio". Las microvesículas, resueltas con colorante PKH, se muestran en el panel marcado como "MV marcadas con PKH". Un panel donde se superponen las imágenes obtenidas de los tres colorantes se ve en el panel marcado como "Material compuesto".

La Figura 16 muestra la absorción de las microvesículas en fibroblastos dérmicos humanos. Los núcleos celulares, resueltos usando el colorante Hoechst 33342, se muestran en los paneles marcados como "Hoechst33342". Las células, resueltas con colorante vybrant, se muestran en el panel marcado como "Vybrant-Dio". Las microvesículas, resueltas con colorante PKH, se muestran en el panel marcado como "MV marcadas con PKH". Un panel donde se superponen las imágenes obtenidas de los tres colorantes se ve en el panel marcado como "Material compuesto".

La Figura 17 muestra una transferencia Western de lisados de fibroblastos dérmicos humanos tratados con: microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención a partir de plasma obtenido de un paciente que padece artritis reumatoide (precipitación con PEG de MV de plasma humano); microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención a partir de medio acondicionado con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (precipitación con PEG de MV humanas de MSC humanas); microvesículas aisladas a través de ultracentrifugación a partir de medio acondicionado con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (ultracentrifugación de MV humanas de MSC humanas); control de PBS; y un control de medio agotado (medio acondicionado con MSC humanas sin MV).

La Figura 18 muestra la presencia de la región que contiene el exón 15 de BRAF que contiene la mutación T1799A, en: células SK-MEL28, de ARN amplificado usando el cebador 1 (carril 3); células SK-MEL28, de ARN amplificado usando el cebador 2 (carril 4); microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención a partir de medio acondicionado con células SK-MEL28, de ARN amplificado usando el cebador 1 (carril 5); microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención a partir de medio acondicionado con células SK-MEL28, de ARN amplificado usando el cebador 2 (carril 6); células SK-MEL28, de ADN amplificado usando el cebador 1 (carril 7); células SK-MEL28, de ADN amplificado usando el cebador 2 (carril 8); microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención a partir de medio acondicionado con células SK-MEL28, de ADN amplificado usando el cebador 1 (carril 9); y microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención a partir de medio acondicionado con células SK-MEL28, de ADN amplificado usando el cebador 2 (carril 10).

La Figura 19 muestra la presencia de V600E BRAF en un lisado de células SK-MEL28 y un lisado de microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención a partir de medio acondicionado con células SK-MEL28.

La Figura 20 muestra la absorción de las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención a partir del medio de cultivo acondicionado usando células madre derivadas de médula ósea obtenidas de un ratón que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en fibroblastos dérmicos humanos. Los núcleos celulares, resueltos usando el colorante Hoechst 33342, se muestran en los paneles marcados como

"Hoechst33342". Las células, resueltas con colorante vybrant, se muestran en el panel marcado como "Vybrant-Dio". Las microvesículas marcadas con GFP se muestran en el panel marcado con "GFP". Un panel donde se superponen las imágenes obtenidas de los tres colorantes se ve en el panel marcado como "Material compuesto".

La Figura 21 muestra la absorción de las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención a partir del medio de cultivo acondicionado usando células madre derivadas de médula ósea obtenidas de un ratón que expresa la GFP en fibroblastos dérmicos humanos. Los núcleos celulares, resueltos usando el colorante Hoechst 33342, se muestran en los paneles marcados como "Hoechst33342". Las células, resueltas con colorante vybrant, se muestran en el panel marcado como "Vybrant-Dio". Las microvesículas marcadas con GFP se muestran en el panel marcado con "GFP". Un panel donde se superponen las imágenes obtenidas de los tres colorantes se ve en el panel marcado como "Material compuesto".

La Figura 22 muestra secciones histológicas de heridas de espesor completo de: (A) animales no tratados; (B) microvesículas aisladas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea de acuerdo con los métodos usados en la presente invención; (C) solución salina; y (D) microvesículas aisladas de células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea mediante ultracentrifugación, 5 días después de la herida.

La Figura 23 muestra imágenes de quemaduras de segundo grado en animales tratados con: (A) microvesículas aisladas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea mediante ultracentrifugación; (B) microvesículas aisladas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea de acuerdo con los métodos usados en la presente invención; y (C) animales no tratados, 7 días después de la herida. (D) muestra una herida de espesor completo en un animal tratado con microvesículas aisladas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea mediante ultracentrifugación 7 días después de la herida. Las flechas indican la formación de abscesos en una herida de espesor completo tratada con microvesículas aisladas por ultracentrifugación en el día 7 (x40). Esto no se observó en heridas de espesor completo tratadas con microvesículas preparadas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención.

La Figura 24 muestra un portaobjetos histológico de una herida de segundo grado, 28 días después de la herida, de un animal tratado con microvesículas aisladas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea de acuerdo con los métodos usados en la presente invención.

La Figura 25 muestra un portaobjetos histológico de una herida de segundo grado, 28 días después de la herida, de un animal tratado con solución salina.

La Figura 26 muestra un portaobjetos histológico de una herida de espesor completo, 28 días después de la herida, de un animal tratado con microvesículas aisladas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea de acuerdo con los métodos usados en la presente invención.

La Figura 27 muestra un portaobjetos histológico de una herida de espesor completo, 28 días después de la herida, de un animal tratado con microvesículas aisladas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea de acuerdo con los métodos usados en la presente invención. A muestra un nuevo crecimiento nervioso (flechas) y angiogénesis (círculos). B muestra nuevo crecimiento nervioso (flechas). C muestra el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (flechas).

La Figura 28 muestra un portaobjetos histológico de una herida de espesor completo, 7 días después de la herida en un animal tratado con microvesículas derivadas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea.

La Figura 29 muestra la presencia o ausencia de quimerismo en animales irradiados después de la administración de médula ósea marcada con GFP.

Los paneles A y B de la Figura 30 muestran los efectos del tratamiento con MSC sobre el crecimiento del cabello después de la irradiación gamma. El panel C muestra la ausencia de quimerismo en animales irradiados después de la administración de médula ósea marcada con GFP.

La Figura 31 muestra el efecto de las microvesículas derivadas de médula ósea obtenidas usando el método usado en la presente invención sobre la formación de vasos sanguíneos, usando un ensayo *in vitro* de angiogénesis. Los tres paneles superiores son imágenes representativas tomadas usando un microscopio epifluorescente de cultivos de células HUVEC tratadas con microvesículas derivadas de médula ósea obtenidas usando el método de la presente invención ("MV aspiradas de médula ósea"). Los tres paneles inferiores son imágenes representativas tomadas usando un microscopio epifluorescente de cultivos de células HUVEC tratadas con control de vehículo ("Control de vehículo").

La Figura 32 muestra el efecto de las microvesículas derivadas de médula ósea obtenidas usando el método usado

en la presente invención sobre el crecimiento o la proliferación celular, usando un ensayo *in vitro* de crecimiento celular. El panel A muestra imágenes representativas tomadas usando un microscopio epifluorescente de cultivos de fibroblastos adultos normales tratados con microvesículas derivadas de médula ósea obtenidas usando el método usado en la presente invención ("MV de médula ósea") o PBS ("PBS"), tres días después del tratamiento. El panel B muestra el número medio de células en cultivos de fibroblastos adultos normales tratados con microvesículas derivadas de médula ósea obtenidas usando el método usado en la presente invención ("MV de médula ósea") o PBS ("PBS"), tres días después del tratamiento.

Descripción detallada

Para mayor claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la presente invención.

Los métodos de aislamiento de las microvesículas

En una realización, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que contiene microvesículas en un método que comprende las etapas de:

- a) obtener un fluido biológico que contenga microvesículas;
- b) aclarar el fluido biológico para eliminar los residuos celulares;
- c) hacer precipitar las microvesículas mediante la adición de un agente precipitante al fluido biológico aclarado;
- d) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante; y
- e) suspender las microvesículas lavadas en una solución para almacenamiento o uso posterior.

En una realización, el fluido biológico se aclara mediante centrifugación. En una realización alternativa, el fluido biológico se aclara mediante filtración.

En una realización, las microvesículas precipitadas se recogen mediante centrifugación. En una realización alternativa, las microvesículas precipitadas se recogen mediante filtración.

En una realización, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que contiene microvesículas en un método que comprende las etapas de:

- a) obtener un fluido biológico que contenga microvesículas;
- b) aclarar el fluido biológico para eliminar los residuos celulares;
- c) hacer precipitar las microvesículas mediante la adición de un agente precipitante al fluido biológico aclarado;
- d) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante;
- e) suspender las microvesículas lavadas en una solución, y
- f) procesar las microvesículas para analizar el contenido de ácido nucleico, hidrato de carbono, hidrato de carbono, lípido, moléculas pequeñas y/o proteínas.

En una realización, el fluido biológico se aclara mediante centrifugación. En una realización alternativa, el fluido biológico se aclara mediante filtración.

En una realización, las microvesículas precipitadas se recogen mediante centrifugación. En una realización alternativa, las microvesículas precipitadas se recogen mediante filtración.

El fluido biológico puede ser médula ósea.

El fluido biológico también puede derivarse de una muestra de tejido o biopsia.

En una realización, el fluido biológico es medio de cultivo celular. En una realización, el medio de cultivo celular se acondiciona usando tejidos y/o células antes del aislamiento de microvesículas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención.

El término "acondicionado" o "medio acondicionado" se refiere a medio, en donde se cultiva una población de células o tejido, o una combinación de los mismos, y la población de células o tejidos, o una combinación de los mismos, contribuye con factores al medio. En uno de dichos usos, la población de células o tejido, o la combinación de los mismos se elimina del medio, mientras que los factores que producen las células permanecen. En una realización, los factores producidos son microvesículas.

El medio se puede acondicionar mediante cualquier método adecuado seleccionado por un experto en la materia. Por ejemplo, el medio puede cultivarse de acuerdo con los métodos descritos en el documento EP1780267A2.

En una realización, las microvesículas se aíslan de células o tejido que se han tratado previamente antes del aislamiento de las microvesículas. El pretratamiento puede incluir, por ejemplo, el cultivo en un medio específico, un medio que contenga al menos un aditivo, factor de crecimiento, medio desprovisto de suero, o una combinación de los mismos. Como alternativa, el pretratamiento puede comprender poner en contacto células o tejidos con aditivos (por ejemplo, interleucina, VEGF, inductores de factores de transcripción, factores de transcripción, hormonas, neurotransmisores, compuestos farmacéuticos, microARN), agentes transformadores (por ejemplo, liposomas, virus, agentes transfectados, etc.). Como alternativa, el pretratamiento puede comprender exponer células o tejido a condiciones físicas alteradas (por ejemplo, hipoxia, choque frío, choque térmico).

En una realización, las microvesículas se aíslan de medio acondicionado usando células o tejido que se han tratado previamente antes del aislamiento de las microvesículas. El pretratamiento puede incluir, por ejemplo, el cultivo en un medio específico, un medio que contenga al menos un aditivo, factor de crecimiento, medio desprovisto de suero, o una combinación de los mismos. Como alternativa, el pretratamiento puede comprender poner en contacto células o tejidos con aditivos (por ejemplo, interleucina, VEGF, inductores de factores de transcripción, factores de transcripción, hormonas, neurotransmisores, compuestos farmacéuticos, microARN), agentes transformadores (por ejemplo, liposomas, virus, agentes transfectados, etc.). Como alternativa, el pretratamiento puede comprender exponer células o tejido a condiciones físicas alteradas (por ejemplo, hipoxia, choque frío, choque térmico).

Si bien los métodos usados en la presente invención pueden llevarse a cabo a cualquier temperatura, un experto en la materia puede apreciar fácilmente que ciertos fluidos biológicos pueden degradarse, y dicha degradación se reduce si la muestra se mantiene a una temperatura inferior a la temperatura a la que se degrada el fluido biológico. En una realización, el método usado en la presente invención se lleva a cabo a 4 °C. En una realización alternativa, al menos una etapa del método de la presente invención se lleva a cabo a 4 °C.

En determinadas realizaciones, el fluido biológico puede diluirse antes de someterse a los métodos usados en la presente invención. Se puede requerir dilución para fluidos biológicos viscosos, para reducir la viscosidad de la muestra, si la viscosidad de la muestra es demasiado elevada como para obtener un rendimiento aceptable de microvesículas. La dilución puede ser una dilución 1:2. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:3. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:4. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:5. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:6. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:7. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:8. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:9. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:10. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:20. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:30. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:40. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:50. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:60. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:70. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:80. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:90. Como alternativa, la dilución puede ser una dilución 1:100.

El fluido biológico puede diluirse con cualquier diluyente, siempre que el diluyente no afecte a la integridad funcional ni/o estructural de las microvesículas. Un experto habitual en la materia puede seleccionar fácilmente un diluyente adecuado. Los diluyentes pueden ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, medio de cultivo celular y similares.

En una realización, el fluido biológico se aclara mediante la aplicación de una fuerza centrífuga para eliminar los residuos celulares. La fuerza centrífuga aplicada al fluido biológico es suficiente para eliminar cualquier célula, células lisadas, residuos de tejido del fluido biológico, pero la fuerza centrífuga aplicada es de una magnitud, una duración, o ambas cosas, insuficiente, para eliminar las microvesículas. El fluido biológico puede requerir dilución para facilitar el aclarado.

La duración y magnitud de la fuerza centrífuga usada para aclarar el fluido biológico puede variar de acuerdo con una serie de factores fácilmente apreciables por un experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, el fluido biológico, el pH del fluido biológico, la pureza deseada de las microvesículas aisladas, el tamaño deseado de las microvesículas aisladas, el peso molecular deseado de las microvesículas, y similares. En una realización, se aplica una fuerza centrífuga de 2.000 x g al fluido biológico durante 30 minutos.

El fluido biológico aclarado se pone en contacto con un agente de precipitación para hacer precipitar las microvesículas. El agente de precipitación rodea las microvesículas y desplaza el agua de solvatación. El agente de precipitación es polietilenglicol.

El fluido biológico aclarado se pone en contacto con el agente de precipitación durante un período de tiempo suficiente para hacer precipitar las microvesículas. El período de tiempo suficiente para hacer precipitar las microvesículas puede variar de acuerdo con una serie de factores fácilmente apreciados por un experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, el fluido biológico, el pH del fluido biológico, la pureza deseada de las microvesículas aisladas, el tamaño deseado de las microvesículas aisladas, el peso molecular deseado de las microvesículas, y similares. En una

realización, el período de tiempo suficiente para hacer precipitar las microvesículas es de 6 horas.

En una realización, el fluido biológico aclarado se pone en contacto con el agente de precipitación durante un período de tiempo suficiente para hacer precipitar las microvesículas a 4 °C.

La concentración del agente de precipitación usado para hacer precipitar las microvesículas de un fluido biológico puede variar de acuerdo con una serie de factores fácilmente apreciables por un experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, el fluido biológico, el pH del fluido biológico, la pureza deseada de las microvesículas aisladas, el tamaño deseado de las microvesículas aisladas, el peso molecular deseado de las microvesículas, y similares.

El agente de precipitación es polietilenglicol. El peso molecular del polietilenglicol usado en los métodos usados en la presente invención puede ser de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 10.000 Da. En una realización, el peso molecular del polietilenglicol usado en los métodos usados en la presente invención puede ser superior a 10.000 Da. La elección del peso molecular puede estar influenciada por una variedad de factores que incluyen, por ejemplo, la viscosidad del fluido biológico, la pureza deseada de las microvesículas, el tamaño deseado de las microvesículas, el fluido biológico usado.

En una realización, el peso molecular del polietilenglicol usado en los métodos usados en la presente invención puede ser de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 8.000 Da, o es aproximadamente cualquiera de 200, 300, 400, 600, 1.000, 1.500, 4.000, 6.000 u 8.000.

En una realización, el peso molecular del polietilenglicol usado en los métodos usados en la presente invención es de aproximadamente 6.000 Da.

En una realización, el peso molecular medio del polietilenglicol usado en los métodos usados en la presente invención es de aproximadamente 8.000 Da.

La concentración de polietilenglicol usada en los métodos usados en la presente invención puede ser de aproximadamente el 0,5 % p/v a aproximadamente el 100 % p/v. La concentración de polietilenglicol usada en los métodos usados en la presente invención puede estar influida por una variedad de factores que incluyen, por ejemplo, la viscosidad del fluido biológico, la pureza deseada de las microvesículas, el tamaño deseado de las microvesículas, el fluido biológico usado y similares.

En determinadas realizaciones, el polietilenglicol se usa a una concentración entre aproximadamente el 5 % y 25 % p/v. En determinadas realizaciones, la concentración es de aproximadamente el 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % o 15 %, o un intervalo entre cualquiera de estos dos valores.

En una realización, la concentración de polietilenglicol usada en los métodos usados en la presente invención es de aproximadamente el 8,5 % p/v.

En una realización, la concentración de polietilenglicol usada en los métodos usados en la presente invención es de aproximadamente el 6 % p/v.

En una realización, se usa polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de 6.000 Da, a una concentración de 8,5 % p/v. En una realización, el polietilenglicol se diluye en cloruro de sodio 0,4 M.

En una realización, la concentración del polietilenglicol usado en los métodos usados en la presente invención es inversamente proporcional al peso molecular medio del polietilenglicol. Por ejemplo, en una realización, se usa polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de 4000 Da, a una concentración de 20 % p/v. En una realización alternativa, se usa polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de 8000 Da, a una concentración de 10 % p/v. En una realización alternativa, se usa polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de 20.000 Da, a una concentración de 4 % p/v.

En una realización, las microvesículas precipitadas se recogen mediante la aplicación de fuerza centrífuga. La fuerza centrífuga es suficiente y se aplica durante un tiempo suficiente para que las microvesículas formen un microgránulo, pero insuficiente para dañar las microvesículas.

La duración y magnitud de la fuerza centrífuga usada para hacer precipitar las microvesículas de un fluido biológico puede variar de acuerdo con una serie de factores fácilmente apreciables por un experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, el fluido biológico, el pH del fluido biológico, la pureza deseada de las microvesículas aisladas, el tamaño deseado de las microvesículas aisladas, el peso molecular deseado de las microvesículas, y similares. En una realización, las microvesículas precipitadas se recogen mediante la aplicación de una fuerza centrífuga de 10.000 x g durante 60 minutos.

Las microvesículas precipitadas se pueden lavar con cualquier líquido, siempre que el líquido no afecte a la integridad funcional y/o estructural de las microvesículas. Un experto habitual en la materia puede seleccionar fácilmente un

líquido adecuado. Los líquidos pueden ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, medio de cultivo celular y similares.

En una realización, la etapa de lavado elimina el agente precipitante. En una realización, las microvesículas se lavan mediante filtración centrífuga, usando un dispositivo de filtración con un límite de peso molecular de 100 kDa.

Las microvesículas aisladas pueden suspenderse con cualquier líquido, siempre que el líquido no afecte a la integridad funcional y/o estructural de las microvesículas. Un experto habitual en la materia puede seleccionar fácilmente un líquido adecuado. Los líquidos pueden ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, medio de cultivo celular y similares.

En una realización, las microvesículas aisladas pueden procesarse adicionalmente. El procesamiento adicional puede ser el aislamiento de una microvesícula de un tamaño específico. Como alternativa, el procesamiento adicional puede ser el aislamiento de microvesículas de un determinado intervalo de tamaños. Como alternativa, el procesamiento adicional puede ser el aislamiento de una microvesícula de un determinado peso molecular. Como alternativa, el procesamiento adicional puede ser el aislamiento de microvesículas de un determinado intervalo de pesos moleculares. Como alternativa, el procesamiento adicional puede ser el aislamiento de una microvesícula que presente o contenga una molécula específica.

En una realización, las microvesículas usadas en la presente invención se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tengan un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 1.000 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tengan un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 500 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tengan un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 400 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tengan un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 300 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tengan un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 200 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tengan un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 100 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tengan un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tengan un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 20 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tengan un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 10 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica.

En una realización, la purificación posterior se realiza usando un método seleccionado del grupo que consiste en inmunoafinidad, HPLC, filtración de flujo tangencial, separación de fases/partición y microfluidos.

En una realización, las microvesículas aisladas se procesan adicionalmente para analizar las moléculas presentadas o contenidas dentro de las microvesículas. Las moléculas analizadas se seleccionan del grupo que consiste en ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido, moléculas pequeñas, iones, metabolitos, proteína y combinaciones de los mismos.

Fluido biológico que comprende medio de cultivo celular acondicionado usando células cultivadas: En una realización, se obtienen microvesículas del medio acondicionado usando células cultivadas. Cualquier célula cultivada o población de células puede usarse en los métodos usados en la presente invención. Las células pueden ser de origen alogénico, autólogo o xenogénico.

En una realización, las células son células derivadas del aspirado de médula ósea. Las células derivadas del aspirado de médula ósea son células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. En una realización, las células derivadas del aspirado de médula ósea son una mezcla de células mononucleares y células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea.

En una realización, las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea se aíslan del aspirado de médula ósea mediante el cultivo del aspirado de médula ósea en matraces de cultivo tisular de plástico durante un período de tiempo de hasta aproximadamente 4 días, seguido de un lavado para eliminar las células no adherentes.

En una realización, las células mononucleares se aíslan del aspirado de médula ósea mediante centrifugación de baja densidad usando un gradiente de Ficoll y recogiendo las células mononucleares en la superficie de contacto.

En una realización, antes del aislamiento de las microvesículas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención, las células se cultivan, se desarrollan o se mantienen a una temperatura apropiada y con una mezcla de gases (normalmente, 37 °C, CO₂ al 5 % para células de mamíferos) en una incubadora celular. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo de célula, y un experto en la materia las determina fácilmente.

En una realización, se varía una o más de una condición de cultivo. En una realización, esta variación produce un fenotipo diferente.

En una realización, donde las células requieren suero en su medio de cultivo, para comenzar el procedimiento de aislamiento de microvesículas, se complementa el medio de cultivo celular con suero libre de microvesículas y luego se añade a las células que se van a acondicionar. Las microvesículas se recogen del medio de cultivo celular acondicionado. El suero puede agotarse mediante cualquier método adecuado, tal como, por ejemplo, ultracentrifugación, filtración, precipitación y similares. La elección del medio, de la concentración en suero y de las condiciones de cultivo se ve influida por una variedad de factores fácilmente apreciables por un experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, el tipo de célula que se cultiva, la pureza deseada de las microvesículas, el fenotipo deseado de la célula cultivada y similares. En una realización, el medio de cultivo celular que se acondiciona para el procedimiento de aislamiento de microvesículas es el mismo tipo de medio de cultivo celular en el que se cultivaron las células, antes del procedimiento de aislamiento de las microvesículas.

En una realización, para comenzar el procedimiento de aislamiento de microvesículas, se elimina el medio de cultivo celular y se añade medio libre de suero a las células que se van a acondicionar. Las microvesículas se recogen luego del medio libre de suero acondicionado. La elección del medio y las condiciones de cultivo se ven influidas por una variedad de factores fácilmente apreciados por un experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, el tipo de célula que se cultiva, la pureza deseada de las microvesículas, el fenotipo deseado de la célula cultivada. En una realización, el medio libre de suero se complementa con al menos un factor adicional que potencie o mejore la supervivencia de las células en el medio libre de suero. Dicho factor puede, por ejemplo, proporcionar soporte trófico a las células, inhibir o prevenir la apoptosis de las células.

Las células se cultivan en el medio de cultivo durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células secreten microvesículas en el medio de cultivo. El período de tiempo suficiente para permitir que las células secreten microvesículas en el medio de cultivo está influido por una variedad de factores fácilmente apreciados por un experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, el tipo de célula que se cultiva, la pureza deseada de las microvesículas, el fenotipo deseado de la célula cultivada, el rendimiento deseado de microvesículas.

Las microvesículas se eliminan luego del medio de cultivo mediante los métodos usados en la presente invención.

En una realización, antes del procedimiento de aislamiento de las microvesículas, las células se tratan con al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un compuesto antiinflamatorio, un compuesto antiapoptótico, un inhibidor de la fibrosis, un compuesto que es capaz de potenciar la angiogénesis, un compuesto inmunosupresor, un compuesto potenciador de la supervivencia de las células, un agente quimioterapéutico, un compuesto capaz de potenciar la migración celular, un compuesto neurogénico y un factor de crecimiento.

En una realización, mientras las células se cultivan en el medio del que se recogen las microvesículas, las células se tratan con al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un compuesto antiinflamatorio, un compuesto antiapoptótico, un inhibidor de la fibrosis, un compuesto que es capaz de potenciar la angiogénesis, un compuesto inmunosupresor, un compuesto potenciador de la supervivencia de las células y un factor de crecimiento.

En una realización, el compuesto antiinflamatorio puede seleccionarse de los compuestos descritos en la patente de EE. UU. n.º 6.509.369.

En una realización, el compuesto antiapoptótico puede seleccionarse de los compuestos descritos en la patente de EE. UU. n.º 6.793.945.

En una realización, el inhibidor de la fibrosis puede seleccionarse de los compuestos desvelados en la patente de EE.UU. n.º 6.331.298.

En una realización, el compuesto que es capaz de potenciar la angiogénesis puede seleccionarse de los compuestos desvelados en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 2004/0220393 o la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2004/0209901.

En una realización, el compuesto inmunosupresor puede seleccionarse de los compuestos desvelados en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2004/0171623.

En una realización, el compuesto que potencie la supervivencia de las células puede seleccionarse de los compuestos desvelados en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2010/0104542.

En una realización, el factor de crecimiento puede ser al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en miembros de la familia TGF- β , incluyendo TGF- β 1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores de crecimiento de fibroblastos 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas AA, AB y BB, plasma rico en plaquetas, factor de diferenciación del crecimiento de factores de crecimiento de insulina (IGF-I, II) (GDF-5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (VEGF), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor inducible por hipoxia 1-alfa, péptido de tipo glucagón-1 (GLP-1), mimeticuerpo GLP-1 y GLP-2, y II, exendina-4, nodal, nogina, NGF, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen dominios de unión a células y heparina de proteínas de matriz extracelular adhesivas tales como fibronectina y vitronectina, e inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, los compuestos desvelados en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0209901 y la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0132729.

En una realización, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que comprende un medio de cultivo celular acondicionado usando un cultivo de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea que comprende las etapas de:

- a) obtener una población de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea y sembrar matraces a una dilución 1:4 de células;
- b) cultivar las células en medio hasta que las células tengan una confluencia del 80 al 90 %;
- c) eliminar y aclarar el medio para eliminar los residuos celulares;
- d) hacer precipitar las microvesículas añadiendo un agente precipitante al medio de cultivo aclarado;
- e) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante; y
- f) suspender las microvesículas lavadas en una solución para almacenamiento o uso posterior.

En una realización, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que comprende un medio de cultivo celular acondicionado usando un cultivo de células mononucleares derivadas de médula ósea que comprende las etapas de:

- a) obtener una población de células mononucleares derivadas de la médula ósea y sembrar matraces a una dilución 1:4 de células,
- b) cultivar las células en medio hasta que las células tengan una confluencia del 80 al 90 %;
- c) eliminar y aclarar el medio para eliminar los residuos celulares;
- d) hacer precipitar las microvesículas añadiendo un agente precipitante al medio de cultivo aclarado;
- e) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante; y
- f) suspender las microvesículas lavadas en una solución para almacenamiento o uso posterior.

En una realización, las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea se cultivan en un medio que comprende α -MEM complementado con suero bovino fetal al 20 % y penicilina/estreptomicina/glutamina al 1 % a 37 °C en aire humidificado al 95 % y CO₂ al 5 %.

En una realización, las células mononucleares derivadas de la médula ósea se cultivan en un medio que comprende α -MEM complementado con suero bovino fetal al 20 % y penicilina/estreptomicina/glutamina al 1 % a 37 °C en aire humidificado al 95 % y CO₂ al 5 %.

En una realización, el medio se aclara mediante centrifugación.

En una realización, el agente precipitante es polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de 6.000. En una realización, el polietilenglicol se usa a una concentración de aproximadamente el 8,5 % p/v. En una realización, el polietilenglicol se diluye en una solución de cloruro de sodio que tiene una concentración final de 0,4 M.

En una realización, las microvesículas precipitadas se recogen mediante centrifugación.

En una realización, las microvesículas aisladas se lavan mediante filtración centrífuga, usando una membrana con un límite de peso molecular de 100 kDa, usando solución salina tamponada con fosfato.

Fluido biológico que comprende aspirado de médula ósea: En una realización, las microvesículas se obtienen de aspirado de médula ósea. En una realización, las microvesículas se obtienen de la fracción celular del aspirado de médula ósea. En una realización, las microvesículas se obtienen de la fracción acelular del aspirado de médula ósea.

5 En una realización, se obtienen microvesículas de células cultivadas a partir de aspirado de médula ósea. En una realización, las células cultivadas a partir de aspirado de médula ósea se usan para acondicionar el medio de cultivo celular, del que se aíslan las microvesículas.

10 En una realización, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que comprende un aspirado de médula ósea que comprende las etapas de:

a) obtener el aspirado de médula ósea y separar el aspirado de médula ósea en una parte acelular y una parte celular;

15 b) diluir la parte acelular;

c) aclarar la parte acelular diluida para eliminar los residuos celulares;

20 d) hacer precipitar las microvesículas en la parte acelular añadiendo un agente precipitante a la parte acelular diluida,

e) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante; y

25 f) suspender las microvesículas lavadas en una solución para almacenamiento o uso posterior.

En una realización, la parte acelular se diluye a 1:10 con medio de cultivo.

En una realización, el medio de cultivo es α -MEM.

30 En una realización, la parte acelular diluida se aclara mediante centrifugación.

En una realización, el agente precipitante es polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de 6.000. En una realización, el polietilenglicol se usa a una concentración de aproximadamente el 8,5 % p/v. En una realización, el polietilenglicol se diluye en una solución de cloruro de sodio que tiene una concentración final de 0,4 M.

35 En una realización, las microvesículas precipitadas se recogen mediante centrifugación.

En una realización, las microvesículas aisladas se lavan mediante filtración centrífuga, usando una membrana con un límite de peso molecular de 100 kDa, usando solución salina tamponada con fosfato.

40 En una realización, la parte celular se procesa adicionalmente para aislar y recoger células. En una realización, la parte celular se procesa para aislar y recoger células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. En una realización, la parte celular se procesa adicionalmente para aislar y recoger células mononucleares derivadas de la médula ósea. En una realización, la parte celular se usa para acondicionar el medio, del que se pueden derivar

45 microvesículas posteriormente.

En una realización, las microvesículas se aíslan de la parte celular. La parte celular puede incubarse durante un período de tiempo previo al aislamiento de las microvesículas. Como alternativa, las microvesículas pueden aislarse de la parte celular inmediatamente después de que se recoja la parte celular.

50 En una realización, la parte celular también se trata con al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un compuesto antiinflamatorio, un compuesto antiapoptótico, un inhibidor de la fibrosis, un compuesto que es capaz de potenciar la angiogénesis, un compuesto inmunosupresor, un compuesto potenciador de la supervivencia de las células, un agente quimioterapéutico, un compuesto capaz de potenciar la migración celular, un compuesto

55 neurogénico y un factor de crecimiento.

En una realización, el compuesto antiinflamatorio puede seleccionarse de los compuestos descritos en la patente de EE. UU. n.º 6.509.369.

60 En una realización, el compuesto antiapoptótico puede seleccionarse de los compuestos descritos en la patente de EE. UU. n.º 6.793.945.

En una realización, el inhibidor de la fibrosis puede seleccionarse de los compuestos desvelados en la patente de EE.UU. n.º 6.331.298.

65 En una realización, el compuesto que es capaz de potenciar la angiogénesis puede seleccionarse de los compuestos

desvelados en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 2004/0220393 o la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2004/0209901.

5 En una realización, el compuesto inmunosupresor puede seleccionarse de los compuestos desvelados en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2004/0171623.

En una realización, el compuesto que potencie la supervivencia de las células puede seleccionarse de los compuestos desvelados en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2010/0104542.

10 En una realización, el factor de crecimiento puede ser al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en miembros de la familia TGF- β , incluyendo TGF- β 1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores de crecimiento de fibroblastos 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas AA, AB y BB, plasma rico en plaquetas, factor de diferenciación del crecimiento de factores de crecimiento de insulina (IGF-I, II) (GDF-5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (VEGF), pleiotrofina, 15 endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor inducible por hipoxia 1-alfa, péptido de tipo glucagón-1 (GLP-1), mimeticuerpo GLP-1 y GLP-2, y II, exendina-4, nodal, nogina, NGF, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen dominios de unión a células y heparina de proteínas de matriz extracelular adhesivas tales como fibronectina y vitronectina, e inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, los 20 compuestos desvelados en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0209901 y la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0132729.

En una realización, la parte celular se cultiva en condiciones hipóxicas.

25 En una realización, la parte celular está en choque térmico.

En una realización alternativa, los fluidos biológicos se aclaran mediante filtración. En una realización alternativa, las microvesículas precipitadas se recogen mediante filtración. En una realización alternativa, los fluidos biológicos se aclaran y las microvesículas precipitadas se recogen mediante filtración.

30 En determinadas realizaciones, la filtración del fluido biológico y/o de las microvesículas precipitadas requirió la aplicación de una fuerza externa. La fuerza externa puede ser la gravedad, ya sea gravedad normal o fuerza centrífuga. Como alternativa, la fuerza externa puede ser succión.

35 En una realización, la presente realización proporciona un aparato para facilitar el aclarado del fluido biológico mediante filtración. En una realización, la presente invención proporciona un aparato para facilitar la recogida de las microvesículas precipitadas mediante filtración. En una realización, la presente invención proporciona un aparato que facilita el aclarado del fluido biológico y la recogida de las microvesículas precipitadas mediante filtración. En una 40 realización, el aparato también lava las microvesículas.

En una realización, el aparato es el aparato que se muestra en la Figura 4. En esta realización, el fluido biológico se añade a la cámara interna. La cámara interna tiene un primer filtro con un tamaño de poro que permite el paso de las microvesículas, mientras retiene cualquier partícula con un tamaño superior al de una microvesícula en la cámara interna. En una realización, el tamaño de poro del filtro de la cámara interna es de 1 μ m. En esta realización, cuando 45 el fluido biológico pasó de la cámara interna a través del filtro, Las partículas mayores de 1 μ m se retienen en la cámara interna, y todas las demás partículas se acumulan en la región situada entre el fondo de la cámara interna y un segundo filtro.

El segundo filtro tiene un tamaño de poro que no permite el paso de las microvesículas. En una realización, el tamaño de poro del segundo filtro de la cámara interna es de 0,01 μ m. En esta realización, cuando el fluido biológico pasó a través del segundo filtro, las microvesículas se retienen en la región entre el fondo de la cámara interna y el segundo filtro, y todas las partículas y el fluido restantes se acumulan en el fondo del aparato.

50 Un experto en la materia puede apreciar fácilmente que el aparato puede tener más de dos filtros, de diferentes tamaños de poro para seleccionar microvesículas de tamaños deseados, por ejemplo.

En una realización, se añade un agente precipitante al fluido biológico en la cámara interna. En una realización, se añade un agente precipitante al filtrado después de que haya pasado a través del primer filtro.

60 Las membranas de filtro utilizadas por el aparato pueden estar hechas de cualquier material adecuado, siempre que la membrana del filtro no reaccione con el fluido biológico ni se una a los componentes dentro del fluido biológico. Por ejemplo, las membranas del filtro pueden estar hechas de un material de baja unión, tal como, por ejemplo, polietersulfona, nylon6, politetrafluoroetileno, polipropileno, microfibra de vidrio modificado zeta, nitrato de celulosa, acetato de celulosa, fluoruro de polivinilideno, celulosa regenerada.

65 Las microvesículas usadas en la presente invención

En una realización, las microvesículas usadas en la presente invención tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 5.000 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 1000 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 500 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 400 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 300 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 200 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 100 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 20 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica. En una realización alternativa, las microvesículas usadas en la presente invención tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 10 nm según lo determinado mediante microscopía electrónica.

En una realización, las microvesículas usadas en la presente invención tienen un peso molecular de al menos 100 kDa.

Uso de las microvesículas en terapias

Las microvesículas se usan para potenciar o mejorar la cicatrización de heridas. En una realización, la herida es una quemadura de espesor completo. En una realización, la herida es una quemadura de segundo grado.

En una realización, la preparación aislada de microvesículas puede regenerar al menos un tejido en un paciente con piel enferma, dañada o ausente seleccionado del grupo que consiste en: tejido epitelial, tejido estromal, tejido nervioso, tejido vascular y estructuras anexas. En una realización, la preparación aislada de microvesículas puede regenerar tejido y/o células de las tres capas germinales.

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero sin limitación, mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de microvesículas del medio de cultivo celular mediante ultracentrifugación (referencia)

Este ejemplo ilustra el método típico mediante el que se aíslan las microvesículas del medio de cultivo celular o de cualquier fluido biológico. En la Figura 1, se muestra un esquema del método de aislamiento de microvesículas del medio de cultivo celular. En resumen, las células se cultivan en un medio complementado con suero libre de microvesículas (el suero puede agotarse de las microvesículas mediante ultracentrifugación, filtración, precipitación, etc.). Después de cultivar las células durante un período de tiempo, el medio se retira y se transfiere a tubos cónicos y se centrifuga a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar las células. A continuación, el sobrenadante se transfiere a nuevos tubos cónicos y se centrifuga a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C para eliminar mejor las células y los residuos celulares. A esto, le puede seguir otra etapa de centrifugación (por ejemplo, 10.000 x g durante 30 minutos para agotar aún más los residuos celulares y/o eliminar microvesículas más grandes). El sobrenadante resultante se transfiere a tubos de ultracentrifugación, pesados para garantizar el mismo peso y ultracentrifugados a +70.000 x g durante 70 minutos a 4 °C para aglomerar las microvesículas.

Este sobrenadante se desecha posteriormente y el microgránulo se vuelve a suspender en PBS helado. La solución se ultracentrifuga a +70.000 x g durante 70 minutos a 4 °C para aglomerar las microvesículas. El sedimento enriquecido en microvesículas se vuelve a suspender en un pequeño volumen (aproximadamente 50-100 µl) de un tampón apropiado (por ejemplo, PBS).

Ejemplo 2: Aislamiento de microvesículas del medio de cultivo celular mediante los métodos usados en la presente invención

Este ejemplo ilustra cómo se aíslan las microvesículas del medio de cultivo celular mediante los métodos de la presente invención. En las Figuras 2 y 3, se muestra un esquema del método de aislamiento de microvesículas del medio que tiene células cultivadas. En resumen, las células se cultivan en un medio complementado con suero libre de microvesículas (el suero puede agotarse de las microvesículas mediante ultracentrifugación, filtración, precipitación, etc.). Después de cultivar las células durante un período de tiempo, el medio se retira y se transfiere a tubos cónicos y se centrifuga a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar las células. A continuación, el sobrenadante se transfiere a nuevos tubos cónicos y se centrifuga a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C para eliminar mejor las células

y los residuos celulares. A esto, le puede seguir otra etapa de centrifugación (por ejemplo, 10.000 x g durante 30 minutos para agotar aún más los residuos celulares y eliminar partículas más grandes).

Luego se hacen precipitar las microvesículas a 4 °C usando PEG 6000 al 8,5 % p/v y NaCl 0,4 M. Esta mezcla se centrifuga a 10.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se retira y el microgránulo se vuelve a suspender en un tampón apropiado (por ejemplo, PBS). Puede usarse para reacciones inmediatamente posteriores o purificarse aún más. Otros procedimientos de purificación pueden incluir el uso de filtros centrifugos (por ejemplo, MWCO de 100 kDa), inmunoafinidad, HPLC, filtración de flujo tangencial, separación de fases/partición, microfluidos, etc.

Ejemplo 3: Aislamiento de microvesículas a partir de medio de cultivo acondicionado usando células madre derivadas de médula ósea mediante los métodos usados en la presente invención

Se adquirió médula ósea humana de un donante normal de AllCells LLC (Emeryville, CA, <http://www.all-cells.com>). Se aislaron las MSC mediante un método convencional de adherencia a plásticos. Se aislaron células mononucleares de médula ósea mediante centrifugación de baja densidad usando Ficoll-Paque Premium (densidad: 1,077 g/ml) de acuerdo con el protocolo del fabricante (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Las células mononucleares se recogieron en la superficie de contacto, se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) complementada con FBS al 2 % (Atlanta Biologies, Atlanta, GA) y se volvieron a suspender en medio de MSC que consistía en medio esencial alfa-mínimo (α -MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) y FBS al 20 %, penicilina/estreptomicina al 1 % (Lonza, Allendale, NJ) y glutamina al 1 % (Lonza).

Se sembraron cultivos iniciales de MSC o células mononucleares entre $2-3 \times 10^5$ células/cm² en placas tratadas con cultivo tisular (BD Biosciences, San José, CA) y se colocaron en una incubadora celular a 37 °C en aire humidificado al 95 % y CO₂ al 5 %. Después de 48-72 horas, se eliminaron las células no adherentes, se enjuagaron los matraces de cultivo una vez con PBS y se añadió medio nuevo al matraz. Las células se cultivaron hasta alcanzar el 80 % de confluencia y luego se pasaron con Tripsina-EDTA (Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células se dividieron en una proporción de 1:4 en múltiples matraces de 5 capas (BD Biosciences). Como alternativa, se descongelaron las MSC criopreservadas a 37 °C y se cultivaron inmediatamente en α -MEM complementado con suero bovino fetal libre de microvesículas al 20 % y penicilina/estreptomicina/glutamina al 1 % a 37 °C en aire humidificado al 95 % y CO₂ al 5 %. Se expandieron de manera similar a la anterior.

Las células se cultivaron en los múltiples matraces hasta alcanzar el 80-90 % de confluencia. Los matraces se enjuagaron dos veces con PBS y se añadió α -MEM complementado con penicilina/estreptomicina/glutamina al 1 %. Tras 24 horas, se transfirió el medio acondicionado a tubos de centrifugación cónicos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) e inmediatamente se centrifugaron a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C para aglomerar las células no adherentes. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos cónicos de 50 ml y se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C para eliminar mejor las células y los residuos celulares.

Los sobrenadantes se recogieron y se colocaron en recipientes desechables de polipropileno de 250 ml estériles (Corning, Corning, NY). Al sobrenadante, se añadieron polietilenglicol libre de RNasa y proteasa, peso molecular medio de 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final de 0,4 M). Se dispuso la solución en una sala fría a 4 °C durante la noche con balanceo. La solución se transfirió a tubos de centrifugación cónicos de 50 ml y se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante y se volvió a suspender el microgránulo enriquecido en microvesículas en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrifugo Amicon ultra-15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5.000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtro se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y se centrifugaron nuevamente a 5.000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200 μ l) del fondo del dispositivo de filtración. Se determinó la concentración de proteínas mediante el kit de análisis de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso aguas abajo (por ejemplo, proteínas, extracción de ARN y ADN).

Ejemplo 4: Aislamiento de microvesículas a partir de plasma

Se recogieron aproximadamente 6-8 ml de sangre (humana y de cerdo) mediante punción venosa y se colocaron en tubos de lavanda y EDTA de plástico BD Vacutainer (BD Biosciences, San José, CA). Se centrifugaron los tubos de la punción venosa a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el plasma (aproximadamente 3-4 ml) y se colocó en nuevos tubos de centrifugación cónicos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL). Se añadió medio esencial alfa-mínimo estéril (α -MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) a una proporción (del plasma con respecto al medio) de 1:10.

A la solución, se añadieron polietilenglicol libre de RNasa y proteasa, peso molecular medio de 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final de 0,4 M). Se dispuso la solución en una sala fría a 4 °C durante la noche con balanceo. La solución se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante y se volvió a suspender el microgránulo enriquecido en microvesículas en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrifugo Amicon ultra-

15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5.000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtro se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y se centrifugaron nuevamente a 5.000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200-400 µl) del fondo del dispositivo de filtración. Se determinó la concentración de proteínas mediante el kit de análisis de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso aguas abajo (por ejemplo, proteínas, extracción de ARN y ADN).

Ejemplo 5: Aislamiento de microvesículas del aspirado de médula ósea mediante los métodos usados en la presente invención

Se aisló médula ósea de cerdo de la cresta ilíaca. Se limpió cuidadosamente el área de la piel con povidina yodada al 7,5 % e isopropanol al 70 %. Se introdujo un trocar de 3 mm de calibre 11 (Ranafac, Avon, MA) en la cresta ilíaca. Se cargó una jeringa de aspiración con 5.000 -1.000 unidades de heparina para evitar la coagulación de la muestra de médula. Se aspiraron aproximadamente 20-25 ml de médula y la solución se transfirió a tubos de centrifugación cónicos de 50 ml. Como alternativa, se adquirió médula ósea humana de un donante normal (aproximadamente 50 ml) de AllCells LLC (Emeryville, CA, <http://www.allcells.com>).

Se centrifugaron los tubos cónicos de 50 ml a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante (la parte acelular) (aproximadamente 10-12 ml por cada 50 ml) y se colocó en nuevos tubos de centrifugación cónicos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL). Se añadió medio esencial alfa-mínimo estéril (α-MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) en una proporción de 1:10 (de sobrenadante de médula ósea con respecto al medio). La solución se transfirió a nuevos tubos cónicos de 50 ml y se centrifugó a 2.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos cónicos de 50 ml y a esta solución, se añadieron polietilenglicol libre de RNasa y proteasa, peso molecular medio de 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final de 0,4 M).

Se dispuso la solución en una sala fría a 4 °C durante la noche con balanceo. La solución se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante y se volvió a suspender el microgránulo enriquecido en microvesículas en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrífugo Amicon ultra-15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5.000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtro se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y se centrifugaron nuevamente a 5.000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200-400 µl) del fondo del dispositivo de filtración. Se determinó la concentración de proteínas mediante el kit de análisis de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso aguas abajo (por ejemplo, proteínas, extracción de ARN y ADN).

La parte celular se recogió y se procesó para el aislamiento de células madre mesenquimales o para el aislamiento completo de la médula ósea.

Ejemplo 6: Aislamiento de microvesículas de orina (referencia)

Se aislaron aproximadamente 500 ml de orina humana de toma limpia y se colocaron en tubos cónicos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL).

Se centrifugaron los tubos cónicos de 50 ml a 400 x g durante 30 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se colocó en nuevos tubos de centrifugación cónicos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL). La solución se transfirió a nuevos tubos cónicos de 50 ml y se centrifugó a 2.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos cónicos de 50 ml y a esta solución, se añadieron polietilenglicol libre de RNasa y proteasa, peso molecular medio de 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final de 0,4 M).

Se dispuso la solución en una sala fría a 4 °C durante la noche con balanceo. La solución se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante y se volvió a suspender el microgránulo enriquecido en microvesículas en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrífugo Amicon ultra-15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5.000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtro se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y se centrifugaron nuevamente a 5.000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200-400 µl) del fondo del dispositivo de filtración. Se determinó la concentración de proteínas mediante el kit de análisis de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso aguas abajo (por ejemplo, proteínas, extracción de ARN y ADN).

Ejemplo 7: Aislamiento de microvesículas a partir de medio de un cultivo a largo plazo de células de médula ósea mediante los métodos usados en la presente invención

Se obtuvo médula ósea de un aspirado (véase el Ejemplo 1) y se lisaron los glóbulos rojos usando una solución de cloruro de amonio al 0,8 % que contenía EDTA 0,1 mM (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC). Las células

nucleadas se aglomeraron bajo un suero bovino fetal (Atlanta Biologics, Atlanta, GA) a 400 X g durante 5 minutos. Las células nucleadas se lavaron en medio McCoy's 5a (Mediatech Inc., Manassas, VA) aglomerando a 400 x g durante 5 min. Se volvieron a suspender las células en medios de cultivo a una densidad de 1×10^6 células/ml y se sembraron en placas en matraces de 25, 75 o 225 cm² (Corning, Corning, NY).

Los medios de cultivo consistían en los medios 5a de McCoy, bicarbonato de sodio al 1 % (Life technologies, Carlsbad, CA), aminoácidos no esenciales MEM al 0,4 % (Life technologies), aminoácidos esenciales MEM al 0,8 % (Life technologies), L-glutamina al 1 % (Lonza, Allendale, NJ), Hidrocortisona 0,1 µM (Life technologies), penicilina/estreptomicina al 1 % (Lonza), suero de ternera fetal al 12,5 % (Atlanta Biologics) y suero de caballo al 12,5 % (Stem Cell Technology). Los cultivos se incubaron a 33 °C y CO₂ al 5 %. La alimentación se realizó semanalmente mediante la adición de la mitad del volumen original de medios sin eliminar ningún medio durante las nueve primeras semanas de cultivo. Si los cultivos se cultivaron durante más de nueve semanas, el volumen de los medios de cultivo se redujo al volumen original, y se añadió cada semana la mitad del volumen original de medios nuevos.

Después de aproximadamente nueve semanas de cultivo, se retiró y se almacenó el medio original. Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron durante 24 horas en medios que consistían en medios 5a de McCoy, bicarbonato de sodio al 1 %, aminoácidos no esenciales MEM al 0,4 %, aminoácidos esenciales MEM al 0,8 % (Life technologies), L-glutamina al 1 % (Lonza, Allendale, NJ) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Lonza).

Tras 24 horas, se transfirió el sobrenadante a tubos de centrifugación cónicos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) e inmediatamente se centrifugaron a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C para aglomerar las células no adherentes. Se volvió a añadir el medio original que se almacenó a las células. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C para eliminar mejor las células y los residuos celulares.

El sobrenadante se recogió y se colocó en recipientes desechables de polipropileno de 250 ml estériles (Corning, Corning, NY). Al sobrenadante, se añadieron polietilenglicol libre de RNasa y proteasa, peso molecular medio de 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final de 0,4 M). Se dispuso la solución en una sala fría a 4 °C durante la noche con balanceo. La solución se transfirió a tubos de centrifugación cónicos de 50 ml y se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante y se volvió a suspender el microgránulo enriquecido en microvesículas en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrífugo Amicon ultra-15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5.000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtro se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y se centrifugaron nuevamente a 5.000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200 µl) del fondo del dispositivo de filtración. Se determinó la concentración de proteínas mediante el kit de análisis de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso aguas abajo (por ejemplo, proteínas, extracción de ARN y ADN).

Ejemplo 8: Análisis de las microvesículas

Se analizaron muestras de microvesículas mediante microscopía electrónica. Para la microscopía electrónica de transmisión (MET), se cargó cada muestra de microvesículas en rejillas de cobre de malla 150, recubiertas con formvar (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) durante 20 minutos. Se drenaron las rejillas y se hicieron flotar en gotas de glutaraldehído al 2 % durante 5 minutos, luego se lavaron en agua doblemente destilada (H₂O_{dd}), seguido de tinción en gotas de acetato de uranilo acuoso al 4 % y múltiples lavados en H₂O_{dd}. Se examinaron las rejillas a 80 kV en un microscopio electrónico Philips CM 10.

La Figura 5 muestra micrografías electrónicas de microvesículas derivadas de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana aisladas mediante el método de ultracentrifugación descrito en el Ejemplo 1 (paneles A y B) y de acuerdo con los métodos usados en la presente invención como se describe en el Ejemplo 3 (paneles C y D). La Figura 6 muestra micrografías electrónicas de microvesículas derivadas de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea porcina aisladas mediante el método de ultracentrifugación descrito en el Ejemplo 1 (paneles A y B) y de acuerdo con los métodos usados en la presente invención como se describe en el Ejemplo 3 (paneles C y D). La Figura 7 muestra micrografías electrónicas de microvesículas derivadas de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea murina aisladas mediante el método de ultracentrifugación descrito en el Ejemplo 1 (paneles A y B) y de acuerdo con los métodos usados en la presente invención como se describe en el Ejemplo 3 (paneles C y D).

Las Figuras 5 a 7 ilustran las diferencias entre las microvesículas aisladas mediante los métodos usados en la presente invención en comparación con el aislamiento mediante ultracentrifugación. Las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención tienen bordes que son más suaves, sin corrugar y de aspecto más "intacto".

La Figura 8 muestra micrográficas electrónicas de microvesículas aisladas de plasma humano de acuerdo con los métodos de la presente invención. La heterogeneidad de las formas y de los tamaños logrados con el aislamiento en PEG sugiere que se aislaron todos los tipos de microvesículas. Se observó una heterogeneidad similar en las microvesículas del plasma porcino (Figura 9) y orina humana (Figura 10) que se aislaron.

Para analizar la expresión de proteínas en muestras de microvesículas, se lisaron las células y las microvesículas en tampón RIPA (tecnología de señalización celular, Danvers, MA) y la concentración de proteína estimada mediante el kit de ensayo microBSA (Pierce, Rockford, IL). Se cargaron aproximadamente 20 microgramos de lisado en cada carril y se sondaron las membranas durante la noche (1:1000) mediante bien el anticuerpo anti-63 de conejo (SBI Biosciences, Mountain View, CA), anti-hsp70 de conejo (SBI Biosciences), STAT3 de conejo (Cell signaling technology) y/o fosfo-STAT3 de conejo (Cell signaling technology).

La presencia de los marcadores exosómicos (HSP 70 y CD63) confirmó que los métodos de la presente invención eran capaces de aislar exosomas. Además, los exosomas también contenían el factor de transcripción STAT3 y la forma fosforilada activada fosfo-STAT3. Véase la Figura 11.

Ejemplo 9: El efecto de las microvesículas en la proliferación y migración de los fibroblastos

Para estudiar la capacidad de las microvesículas para potenciar o mejorar la cicatrización de heridas, se probó la capacidad de las microvesículas para estimular la proliferación de los fibroblastos dérmicos. Se obtuvieron fibroblastos dérmicos adultos humanos normales de Life Technology (Carlsbad, CA). Se recogieron fibroblastos de pacientes con heridas crónicas (úlceras de pie por presión y úlcera de pie diabético) bajo un protocolo aprobado por el IRB (IND n.º BB IND 13201) de heridas de 2 años de duración sin evidencia de cicatrización a pesar del tratamiento convencional y de los tratamientos avanzados de cuidado de heridas. Se sembraron fibroblastos de heridas normales y crónicas en placas a 5×10^3 células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos (BD Biosciences, San José, CA). Se realizaron ensayos de proliferación celular de MTT el día 0 y el día 3. Se añadieron microvesículas el día 0. Tanto las microvesículas aisladas en PEG como las microvesículas aisladas mediante ultracentrifugación fueron aproximadamente equivalentes en el crecimiento creciente de fibroblastos de heridas normales y crónicas tras 3 días. La solución salina tamponada con fosfato (PBS) y el medio acondicionado con MSC carente de microvesículas mostraron poco crecimiento. Véase la Figura 12.

En experimentos de cultivo conjunto, se sembraron fibroblastos de adultos normales y fibroblastos de una úlcera del pie diabético en placas de veinticuatro pocillos. Se sembró cada pocillo para lograr una confluencia del 100 % (aproximadamente 1×10^5 células por pocillo). Para evitar la influencia de la proliferación celular, 2 horas antes del raspado, se substituyó el medio por un medio de cultivo nuevo sin suero que contenía mitomicina a 10 µg/ml. Luego se calificó la monocapa confluyente con una punta de pipeta estéril de 1 ml para dejar un rasguño de 0,4-0,5 mm de ancho. Después, se retiró el medio de cultivo de inmediato (junto con las células desplazadas). El medio retirado se reemplazó por medio de cultivo nuevo (FBS al 10 %) que contenía bien microvesículas (PEG o derivadas de ultracentrifugación), PBS o medio acondicionado con MSC carente de microvesículas. Se controló el área raspada recogiendo imágenes digitalizadas inmediatamente después del raspado y 3 días después del tratamiento. Las imágenes digitalizadas se capturaron con un microscopio Olympus IX81 invertido (Olympus America, Center Valley, PA, <http://www.olympusamerica.com>) y la cámara digital ORCA-AG Hamamatsu (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japón, <http://www.hamamatsu.com>). Tres días después del tratamiento, las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención mostraron la mayor migración (esencialmente cerrando la herida), seguidas de las microvesículas derivadas de ultracentrifugación. Los controles (PBS) y el medio acondicionado con MSC carente de microvesículas (agotado) mostraron poca migración. Véase la Figura 13.

La Figura 14 muestra los efectos de las microvesículas sobre la migración celular de fibroblastos derivados de una úlcera del pie diabético. De manera similar a los resultados de la Figura 13, las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención provocaron la mayor migración, seguidas de las microvesículas aisladas usando el método de ultracentrifugación descrito en el Ejemplo 1. Los controles (PBS) y el medio acondicionado con MSC carente de microvesículas (agotado) mostraron poca migración.

Ejemplo 10: Absorción de las microvesículas en las células

Se marcaron microvesículas de MSC humanas aisladas del medio acondicionado de acuerdo con los métodos usados en la presente invención con el colorante enlazador de células fosfolípidas PKH-26 (rojo) según las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los fibroblastos de piel normal se marcaron con Vybrant-Dio (tecnología Life) según las instrucciones del fabricante. Los fibroblastos de piel normal se sembraron en placas sobre portaobjetos de cámara Nunc* Lab-Tek* II recubiertos con fibronectina (Sigma-Aldrich) de 4 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) (5×10^3 células por pocillo). Las células se tiñeron con el colorante nuclear Hoechst 33342 (Life technology) según las instrucciones del fabricante. Se trataron los fibroblastos marcados con Dio con microvesículas marcadas con PKH-26 durante 24 horas. Se capturaron imágenes con un microscopio Olympus IX81 invertido y una cámara digital Hamamatsu ORCA-AG. Los fibroblastos dérmicos normales (teñidos con el colorante de membrana lipídica verde Dio) demostraron la absorción de MV de MSC humanas marcadas con PKH-26 aislado mediante precipitación en PEG en una ubicación perinuclear. Véanse las Figuras 15 y 16. En la Figura 16, las microvesículas

se ven en una ubicación perinuclear.

Ejemplo 11: Uso de las microvesículas como diagnóstico de la artritis reumatoide (referencia)

5 Se sembraron fibroblastos dérmicos normales en placas a una densidad de 1×10^5 células/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos (BD Biosciences). Los fibroblastos se privaron de suero durante la noche y se trataron con PBS (control), 10 microgramos de bien microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención a partir de plasma obtenido de un paciente que padece artritis reumatoide (precipitación con PEG de MV de plasma humano); microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención a partir de medio acondicionado con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (precipitación con PEG de MV humanas de MSC humanas); microvesículas aisladas de acuerdo a través de ultracentrifugación a partir de medio acondicionado con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (ultracentrifugación de MV humanas de MSC humanas); control de PBS; y un control de medio agotado (medio acondicionado con MSC humanas sin MV). La cantidad de fosforilación de STAT3 observada en los fibroblastos fue mayor en las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención. Véase la Figura 17.

Ejemplo 12: Uso de las microvesículas como diagnóstico del melanoma metastásico (referencia)

20 BRAF es un gen humano que produce una proteína denominada B-Raf. Se han identificado más de 30 mutaciones del gen BRAF asociadas con los cánceres humanos. Los presentes inventores han diseñado cebadores para amplificar la forma mutada de BRAF que está vinculada al melanoma metastásico. La mutación es una mutación T1799A en el exón 15 de BRAF. Esto conduce a que la valina (V) sea sustituida por glutamato (E) en el codón 600 (ahora denominado V600E). La presencia de esta mutación es necesaria para el tratamiento con el inhibidor de BRAF Vemurafenib.

25 La estirpe celular SK-Me128, obtenida de ATCC (Washington DC, Maryland) se sabe que tiene la mutación T1799A en el exón 15 de BRAF. Se obtuvieron microvesículas, aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención, del medio acondicionado mediante una incubación de 3 días en EMEM (ATCC) + suero al 10 % (Atlanta biologics, Atlanta, Georgia).

30 Las microvesículas aisladas se procesaron para el aislamiento de ADN y ARN usando el kit de ADN/ARN AUPrep de Qiagen (Hilden, Alemania). Se transcribieron inversamente aproximadamente 50 ng de ARN de células SK-MEL28 y microvesículas con iScript™ Reverse Transcription Supermix (Biorad, Hercules, CA). Se usó una alícuota de 2 µl para PCR utilizando Platinum® PCR SuperMix (Life technology) según las instrucciones del fabricante. Además, se usaron 35 80 ng de ADN de células SK-MEL28 y microvesículas para la PCR utilizando Platinum® PCR SuperMix según las instrucciones del fabricante. Los productos de la PCR se procesaron en un gel de agarosa al 3 % y se visualizaron mediante el sistema gel-doc de Biorad. Los resultados se muestran en la Figura 18.

Los cebadores usados fueron:

40 Secuencia 1:
 Directo: AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA
 Inverso: CTGATGGGACCCACTCCATC
 45 Longitud del amplicón: 70

Secuencia 2:
 Directo: GAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG
 50 Inverso: CTGATGGGACCCACTCCATC
 Longitud del amplicón: 82

Además, Se lisaron muestras de las microvesículas en tampón RIPA y se estimó la concentración de proteína mediante el kit de ensayo microBSA. Se cargaron aproximadamente 50 microgramos en cada carril y se sondaron las 55 membranas durante la noche (1:1000) con el anticuerpo anti-BRAF V600E de ratón (NewEast Biosciences, Malvern, PA). Se aplicó el anticuerpo secundario anti-ratón de cabra (Pierce) a una dilución 1:10000 durante 1 hora. La transferencia Western muestra la detección de BRAF V600E en células SKMEL28 y lisado de MV.

60 Ejemplo 13: Aislamiento de microvesículas a partir de medio acondicionado usando un cultivo de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea marcadas con GFP mediante los métodos usados en la presente invención

Se obtuvieron ratones transgénicos homocigotos con expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) mejorada bajo la dirección del promotor humano de ubiquitina C (C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J) de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Se sabe que estos ratones expresan GFP en todos los tejidos.

65 Se sacrificaron los ratones con GFP (aproximadamente de 3 a 4 semanas de vida) por asfixia con CO₂. Se cortaron

las extremidades por encima de la cadera y por debajo de la articulación del tobillo. Se recogieron las extremidades posteriores, y se extirpó la piel, el músculo y todo el tejido conjuntivo. Luego se colocaron los huesos en un plato de IX PBS estéril helado y se lavaron varias veces en PBS. Se cortaron los extremos de cada hueso con unas tijeras. Se forzó una jeringa de 10 cm³ con medio calentado (α -MEM complementado con suero bovino fetal al 20 % y penicilina/estreptomicina/glutamina al 1 %) a través del eje del hueso para extraer toda la médula ósea a una placa de 150 mm. Esto se repitió varias veces para garantizar la retirada de toda la médula. Se pipeteó la mezcla celular varias veces para disociar las células y se pasó la suspensión celular a través de un filtro celular (tamaño de 70 μ m) (BD Biosciences, San José, CA) para la retirada de grandes grupos de células o partículas óseas.

Se sembraron cultivos iniciales entre 2-3 x 10⁵ células/cm² en platos tratados con cultivo tisular (BD Biosciences, San José, CA) y se colocaron en una incubadora celular a 37 °C en aire humidificado al 95 % y CO₂ al 5 %. Después de 72-96 horas, se retiraron las células no adherentes, se enjuagaron los matraces de cultivo una vez con PBS y se añadió medio nuevo al matraz. Las células se cultivaron hasta alcanzar el 80 % de confluencia y luego se pasaron con Tripsina-EDTA (Life Technologies, Carlsbad, CA). Se dividieron las células en una proporción de 1:4.

Como alternativa, se descongelaron MSC de ratón con expresión de GFP criopreservadas a 37 °C y se cultivaron inmediatamente en α -MEM complementado con suero bovino fetal al 20 % y penicilina/estreptomicina/glutamina al 1 % a 37 °C en aire humidificado al 95 % y CO₂ al 5 %. Se expandieron de manera similar a la anterior.

Las células se cultivaron en los matraces hasta alcanzar el 100 % de confluencia (aproximadamente 1 semana). Se transfirieron los sobrenadantes a tubos de centrifugación cónicos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) e inmediatamente se centrifugaron a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C para aglomerar las células no adherentes. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos cónicos de 50 ml y se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C para eliminar mejor las células y los residuos celulares.

Los sobrenadantes se recogieron y se colocaron en recipientes desechables de polipropileno de 250 ml estériles (Corning, Corning, NY). Al sobrenadante, se añadieron polietilenglicol libre de RNasa y proteasa, peso molecular medio de 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final de 0,4 M). Se dispuso la solución en una sala fría a 4 °C durante la noche con balanceo. La solución se transfirió a tubos de centrifugación cónicos de 50 ml y se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante y se volvió a suspender el microgránulo enriquecido en microvesículas en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrífugo Amicon ultra-15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5.000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtro se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y se centrifugaron nuevamente a 5.000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200-400 μ l) del fondo del dispositivo de filtración. Se determinó la concentración de proteínas mediante el kit de análisis de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso aguas abajo (por ejemplo, proteínas, extracción de ARN y ADN).

Para determinar la absorción celular de las microvesículas, se marcaron fibroblastos de piel normal con Vybrant-Dio (tecnología Life) según las instrucciones del fabricante. Se sembraron los fibroblastos de piel normal en placas sobre portaobjetos de cámara Nunc*Lab-Tek* II recubiertas con fibronectina (Sigma-Aldrich) de 4 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc) (5 x 10³ células por pocillo). Las células se tiñeron con el colorante nuclear Hoechst 33342 (Life technology) según las instrucciones del fabricante. Se trataron fibroblastos marcados con Dil con microvesículas aisladas de MSC de ratón con expresión de GFP durante 24 horas. Se capturaron imágenes con un microscopio Olympus IX81 invertido y una cámara digital Hamamatsu ORCA-AG. Véanse las Figuras 20 y 21. Es importante destacar que estas imágenes muestran que las células tomaron las microvesículas que contenían GFP.

Ejemplo 14: Uso de las microvesículas como tratamiento para potenciar o mejorar la cicatrización de heridas

Se crearon heridas de espesor completo en la espalda de los cerdos usando un instrumento de biopsia por punción de 10 mm. Las microvesículas se aislaron del medio de cultivo acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea, bien de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1 (el método de ultracentrifugación "convencional") o mediante los métodos descritos en el Ejemplo 3. Se administraron 30 microgramos de microvesículas a las heridas mediante inyección local en el momento de la herida y en los días 1 y 2. Los controles se trataron con solución salina o se dejó que se curaran exponiéndolos al aire. Después de 5 días, se sacrificaron los animales y se examinaron las heridas.

La Figura 22 muestra la histología de las heridas 5 días después de la herida. A los 5 días, las heridas tratadas con microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención (es decir, de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3) parecían más pequeñas que las de los controles de solución salina, los controles expuestos al aire y las heridas tratadas con microvesículas preparadas mediante ultracentrifugación. Las heridas tratadas con microvesículas preparadas mediante ultracentrifugación mostraron una respuesta inflamatoria potenciada, en comparación con las tratadas con microvesículas preparadas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención y ambos controles.

En otro estudio, se crearon heridas por quemaduras de segundo grado en la espalda de los cerdos usando una varilla de latón calentada hasta 100 °C. Las microvesículas se aislaron del medio de cultivo acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea, bien de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1 (el método de ultracentrifugación "convencional") o mediante los métodos descritos en el Ejemplo 3. Se administraron 30 microgramos de microvesículas a las heridas mediante inyección local en el momento de la herida y en los días 1 y 2. Los controles se trataron con solución salina o se dejó que se curaran exponiéndolos al aire.

En el transcurso del experimento (hasta 28 días después de la lesión por quemadura), las heridas tratadas con microvesículas preparadas mediante ultracentrifugación se inflamaron significativamente más que las tratadas con microvesículas preparadas de acuerdo con los métodos de la presente invención (es decir, de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3). Véase la Figura 23. De forma similar, las heridas tratadas con microvesículas preparadas mediante ultracentrifugación estaban significativamente más inflamadas que los controles de solución salina y los controles expuestos al aire. Las heridas de quemadura tratadas con microvesículas preparadas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención no parecían significativamente más inflamadas que los controles.

La Figura 23 ilustra la diferencia en la inflamación en el día 7 después de la formación de la herida entre heridas tratadas con microvesículas preparadas mediante ultracentrifugación, microvesículas preparadas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención y un control expuesto al aire. Microscópicamente, se observó la formación de abscesos en heridas de espesor completo y quemaduras tratadas con microvesículas preparadas mediante ultracentrifugación. Se cree que la inflamación observada con las microvesículas preparadas mediante ultracentrifugación se debe a microvesículas dañadas, que pueden estimular fácilmente una cascada inflamatoria. Las microvesículas usadas en la presente invención también pueden conferir beneficios adicionales al incluir partículas adicionales.

La Figura 24 muestra una herida por quemadura porcina de segundo grado tratada con microvesículas aisladas mediante los métodos usados en la presente invención 28 días después de la lesión por quemadura. Hay una remodelación significativa del colágeno, con la apariencia de sustancia fundamental. Estos hallazgos son indicadores de una remodelación dérmica con formación de colágeno de tipo III. También hay inducción epidérmica dérmica que produce una epidermis engrosada que parece estar bien anclada a la dermis. Estos hallazgos no se observan en la formación de cicatrices y son más coincidentes con la regeneración dérmica. Una epidermis que se forma sobre una cicatriz se puede volver a lesionar fácilmente debido a la incapacidad de anclarse bien a una dermis cicatrizada.

La Figura 25 muestra una herida por quemadura porcina de segundo grado tratada con solución salina 28 días después de la lesión por quemadura. Hay una regeneración dérmica mínima con una epidermis aplanada. La falta de formación significativa de cresta rete sugiere una epidermis anclada inadecuadamente. Estos hallazgos son mucho más indicadores de la formación de cicatrices con riesgo de lesión continua.

La Figura 26 muestra una herida porcina de espesor completo tratada con microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención 28 días después de la lesión. Hay una increscencia de un nervio (ilustrado por las flechas) en la dermis en remodelación, probablemente estimulada por la aplicación de las microvesículas. El nervio crecido se acompaña de una respuesta angiogénica (áreas circulares). El nervio parece ser una estructura desarrollada, y no se debe al brote simple de axones. Se trata de un hallazgo único y nunca se ha publicado, y tampoco se observó en las heridas de control ni en las heridas tratadas con microvesículas preparadas mediante ultracentrifugación. Estas observaciones son altamente indicadores de la regeneración de tejidos complejos con la capacidad de generar elementos maduros de todas las capas germinales, incluyendo la epidermis, el estroma, la vasculatura y el tejido nervioso. Estos métodos parecen ser ampliamente aplicables al tratamiento de numerosas afecciones, incluyendo los trastornos traumáticos, inflamatorios, neoplásicos y degenerativos de tejidos derivados ectodérmicos, endodérmicos y mesodérmicos.

La Figura 27 muestra una herida porcina de espesor completo tratada con microvesículas aisladas mediante los métodos usados en la presente invención 28 días después de la lesión. Esta figura ilustra las observaciones descritas en la Figura 26 con mayor aumento. En A), el crecimiento nervioso parece estar siguiendo una trayectoria relacionada con la respuesta angiogénica. Este hallazgo es interesante, ya que se sabe que el crecimiento nervioso sigue a la angiogénesis en el desarrollo embrionario. De nuevo, estos hallazgos son indicadores de la regeneración tisular. B) muestra el nervio a mayor potencia. C) ilustra mejor la angiogénesis adyacente al crecimiento nervioso.

Se observó la formación ósea en todos los grupos de tratamiento (tratados con control y microvesícula) en el modelo de heridas porcinas de espesor completo. Véase la Figura 28. Los animales recibieron un total de 1,44 mg de microvesículas (la mitad preparadas de acuerdo con los métodos usados en la presente invención y la otra mitad mediante ultracentrifugación). Entonces, pareció haber un efecto sistémico estimulante de la formación de hueso en todas las heridas. La formación de hueso tiende a producirse más en las heridas más inflamatorias, lo que sugiere un efecto sinérgico de los mediadores inflamatorios locales y el efecto sistémico de las microvesículas.

Ejemplo 15: Uso de las microvesículas como terapia para repoblar médula ósea y regenerar estructuras complejas (referencia)

Se irradiaron letalmente ratones C57/CJ6 (GFP⁻) con dos ciclos de irradiación gamma de 400 cGy para eliminar sus progenitores de médula ósea del hospedador. Tras la irradiación, se trataron los ratones en un área de aproximadamente 2 cm² con un láser de ablación fraccional de Erbio:YAG. Después del tratamiento con láser, se adhirió una cámara de plástico a la piel, y se añadieron a la cámara células derivadas de médula ósea obtenidas de un ratón transgénico GFP⁺ singénico. Las células de médula ósea GFP⁺ incluían células de médula ósea totales recién recogidas, células de médula ósea seleccionadas de linaje negativo, células madre mesenquimales y células cultivadas completas de médula ósea (como se describe en la presente solicitud). Solo se pudo lograr el quimerismo en unos cuantos animales; detectado por las células GFP⁺ en circulación de 4 a 6 semanas después de la administración de las células. Véase la Figura 29. Sorprendentemente, muchos animales sobrevivieron sin evidencia de injerto de médula ósea de donante. En general, (en todos los grupos de células administradas) sobrevivió el 30 % de los animales que recibieron las células. Entre los diferentes grupos, las tasas de supervivencia fueron más altas para los animales que recibieron células seleccionadas de linaje negativo (45 %) y células nuevas de médula ósea (30 %). Los animales irradiados de control que no recibieron células tuvieron una tasa de mortalidad del 100 %. Las citocinas no han podido rescatar de manera similar a animales irradiados letalmente de manera similar, y no se pudo demostrar ningún injerto funcional de médula ósea de donante en estos animales supervivientes. Las microvesículas secretadas por las células administradas son probablemente responsables de la recuperación de la médula ósea del hospedador que conduce a la supervivencia de estos animales. Los presentes inventores han demostrado que la médula ósea recién extraída (que incluye células de linaje negativo) y las células madre mesenquimales producen una gran cantidad de microvesículas que podrían lograr este efecto.

En otro estudio, se irradiaron letalmente ratones C57/CJ6 (GFP⁻) con dos ciclos de irradiación gamma de 400 cGy para inhibir el crecimiento del pelo y extirparles parcialmente la médula ósea. Tras la irradiación, se afeitó el lomo de los ratones, y se dispusieron los ratones en un área de aproximadamente 2 cm² con un láser de ablación fraccional Erbio: YAG. Después del tratamiento con láser, se adhirió una cámara de plástico a la piel, y se añadieron a la cámara células derivadas de médula ósea obtenidas de un ratón transgénico GFP⁺ singénico. Las células de médula ósea GFP⁺ incluían células de médula ósea recién recogidas, células de médula ósea seleccionadas de linaje negativo, células madre mesenquimales y células cultivadas completas de médula ósea (como se describe en la presente solicitud). En ningún animal se pudo lograr el quimerismo; detectado por las células GFP⁺ en circulación de 4 a 6 semanas después de la administración de las células. Véase la Figura 30. Los animales que solo recibieron tratamiento con láser tuvieron un crecimiento de pelo corto y voluminoso de nulo a muy mínimo. Figura 30 (A). En los animales que recibieron células de médula ósea, hubo un crecimiento de cabello duradero, significativo. Figure 30 (A y B). Estos hallazgos fueron más drásticos en los ratones tratados con células seleccionadas de linaje negativo GFP⁺ y células de médula ósea GFP⁺ nuevas totales. El crecimiento del pelo se pudo detectar en 2 semanas y siguió creciendo durante varios meses. Se tomaron biopsias de piel del área de crecimiento de pelo nuevo, pero no se detectaron células GFP⁺. Tampoco se pudo detectar el injerto funcional de células de médula ósea en ningún animal mediante análisis FACS. Figura 30 (C). Como con el ejemplo de la Figura 29, no se ha demostrado que las citocinas tengan este efecto en el restablecimiento del crecimiento del pelo. Las microvesículas secretadas por las células administradas son probablemente responsables de la estimulación del crecimiento del pelo.

Ejemplo 16: Uso de las microvesículas para potenciar o estimular la angiogénesis y para potenciar o estimular la proliferación de fibroblastos

Aislamiento de microvesículas de aspirado de médula ósea: Se obtuvieron aproximadamente 25 ml de médula ósea entera nueva de Allcells, Inc. (Alameda, CA). Se dispuso cuidadosamente la médula ósea en nuevos tubos de centrifugación cónicos de 50 ml y se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante cuidadosamente (aproximadamente 15 ml) y se dispuso en nuevos tubos de centrifugación cónicos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) y se centrifugó a 2.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Se volvió a retirar el sobrenadante cuidadosamente y se dispuso en nuevos tubos de centrifugación cónicos de 50 ml a los que se les añadió medio alfa-mínimo estéril (a-MEM) (Mediatech Inc. Manassas, VA) en una proporción de 1:10 (sobrenadante de médula ósea con respecto al medio). A la solución, se añadieron polietilenglicol libre de RNasa y proteasa, peso molecular medio de 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final de 0,4 M).

Se dispuso la solución en una sala fría a 4 °C durante la noche con balanceo. La solución se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante y se volvió a suspender el microgránulo enriquecido en microvesículas en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrífugo Amicon ultra-15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5.000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtro se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y se centrifugaron nuevamente a 5.000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200-400 µl) del fondo del dispositivo de filtración.

Ensayo de angiogénesis: La angiogénesis se midió usando un ensayo de formación de tubos endoteliales (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). Se cultivaron células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) primarias servidas con Cryopre (Invitrogen Life Technologies) en un matraz de cultivo tisular de 75 cm² durante 6 días en medio 200PRF complementado con un complemento de crecimiento sérico bajo al 2 % (Invitrogen Life Technologies). Se sembraron células en placas a una densidad de 3 x 10⁴ en una

placa de cultivo tisular de 24 pocillos que contenía medio sin complemento. Seguidamente, se trataron las células HUVEC con microvesículas de médula ósea (aproximadamente 100 µg). Se usó PBS como control de vehículo. Se incubaron las células tratadas durante 6 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se usó colorante fluorescente de calceína AM a una concentración de 2 µg/ml para la visualización de la formación de los tubos. Las imágenes fluorescentes se capturaron con un microscopio IX81 Olympus invertido (Olympus America, Center Valley, PA). Las MV de la médula ósea mostraron una capacidad significativa de formación de tubos en comparación con el control de vehículo (PBS) (véase la Figura 31).

Ensayo de crecimiento: Se sembraron fibroblastos adultos normales en placas de 24 pocillos (10.000 células/pocillo) en medio de crecimiento (FBS al 5 %, glutamina al 1 %, penicilina/estreptomicina al 1 %) para los ensayos. Tras la incubación nocturna, se seleccionaron tres pocillos aleatoriamente y las células se tiñeron con reactivo NucBlue Live ReadyProbes (Invitrogen Life technologies) (Día 0). Se capturaron imágenes fluorescentes usando el sistema de formación de imágenes EVOS FL Auto Cell (Invitrogen Life technologies). Se volvieron a alimentar los fibroblastos con medio nuevo que contenía microvesículas derivadas de médula ósea (aproximadamente 100 µg) o PBS (control del vehículo) y después de tres días (Día 3), se tiñeron las células y se tomaron imágenes. Los fibroblastos tratados con microvesículas derivadas de médula ósea aumentaron aproximadamente el triple en número (en comparación con el Día 0) y a una tasa significativamente mayor que el control del vehículo (Figura 32, panel A y Figura 32, panel B).

Aunque los diferentes aspectos de la invención se han ilustrado anteriormente por referencia a ejemplos y realizaciones preferidas, se apreciará que el alcance de la invención está definido no por la descripción anterior, sino por las siguientes reivindicaciones interpretadas adecuadamente según los principios del derecho de patentes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica de microvesículas aisladas para su uso en la terapia para potenciar o mejorar la cicatrización de heridas, en donde las microvesículas aisladas se preparan con un método que comprende las etapas de:
 - (a) obtener un fluido biológico que contenga microvesículas;
 - (b) aclarar el fluido biológico para eliminar los residuos celulares;
 - (c) hacer precipitar las microvesículas añadiendo un agente precipitante que sea polietilenglicol al fluido biológico aclarado;
 - (d) recoger las microvesículas precipitadas;
 - (e) lavar las microvesículas precipitadas para eliminar el agente precipitante; y
 - (f) opcionalmente, suspender las microvesículas en una solución para el almacenamiento o uso posterior a fin de producir una preparación aislada de microvesículas,en donde el fluido biológico que contiene microvesículas se obtiene de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.
2. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para el uso de la reivindicación 1, en donde el peso molecular del polietilenglicol es de 200 Da a 10.000 Da.
3. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde las microvesículas precipitadas se recogen mediante centrifugación.
4. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para el uso de una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las microvesículas se lavan mediante filtración centrífuga, usando un dispositivo de filtración con un límite de peso molecular de 100 kDa.
5. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para el uso de una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el fluido biológico se selecciona del grupo que consiste en médula ósea, fluido derivado de células o muestras de tejido, fluido de cultivo celular y fluido derivado de células cultivadas.
6. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para el uso de una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las microvesículas aisladas varían en tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 5.000 nm.
7. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para el uso de una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las microvesículas aisladas se purifican adicionalmente usando uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en inmutofafinidad, HPLC, filtración de flujo tangencial, separación de fases, división de fases y microfluidos.
8. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para el uso de una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el fluido biológico que contiene microvesículas se obtiene de células alogénicas.
9. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para el uso de una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el fluido biológico que contiene microvesículas se obtiene de células de mamífero.
10. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para el uso de una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la herida se selecciona de una quemadura de espesor completo y una quemadura de segundo grado.
11. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para el uso de una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la herida es una quemadura de espesor completo.

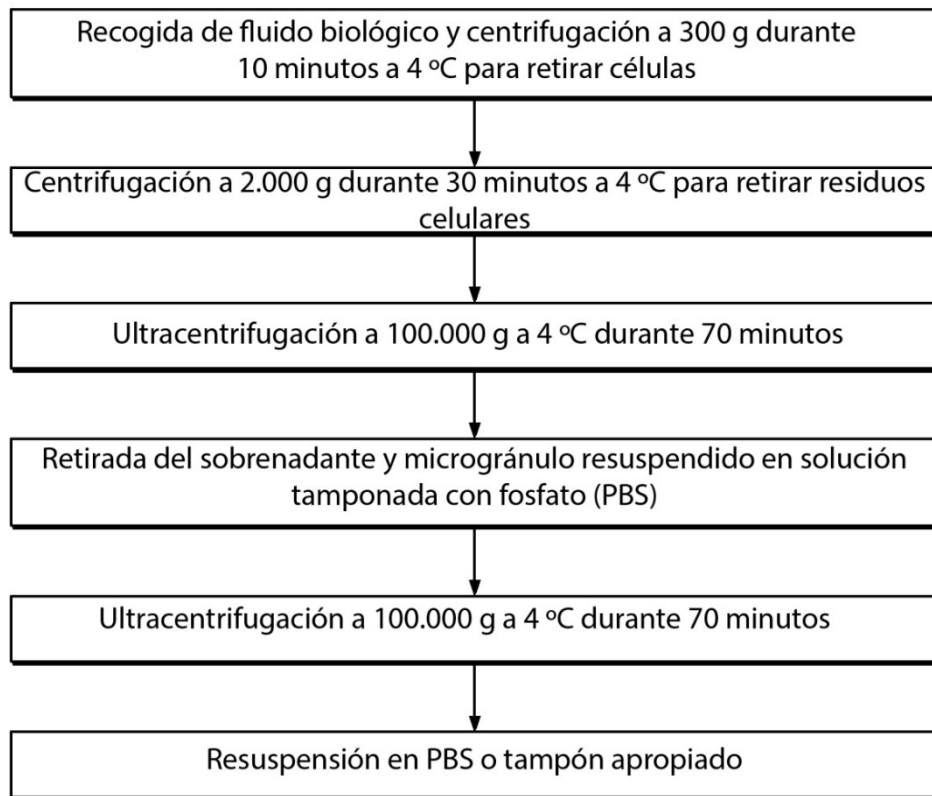


FIG. 1

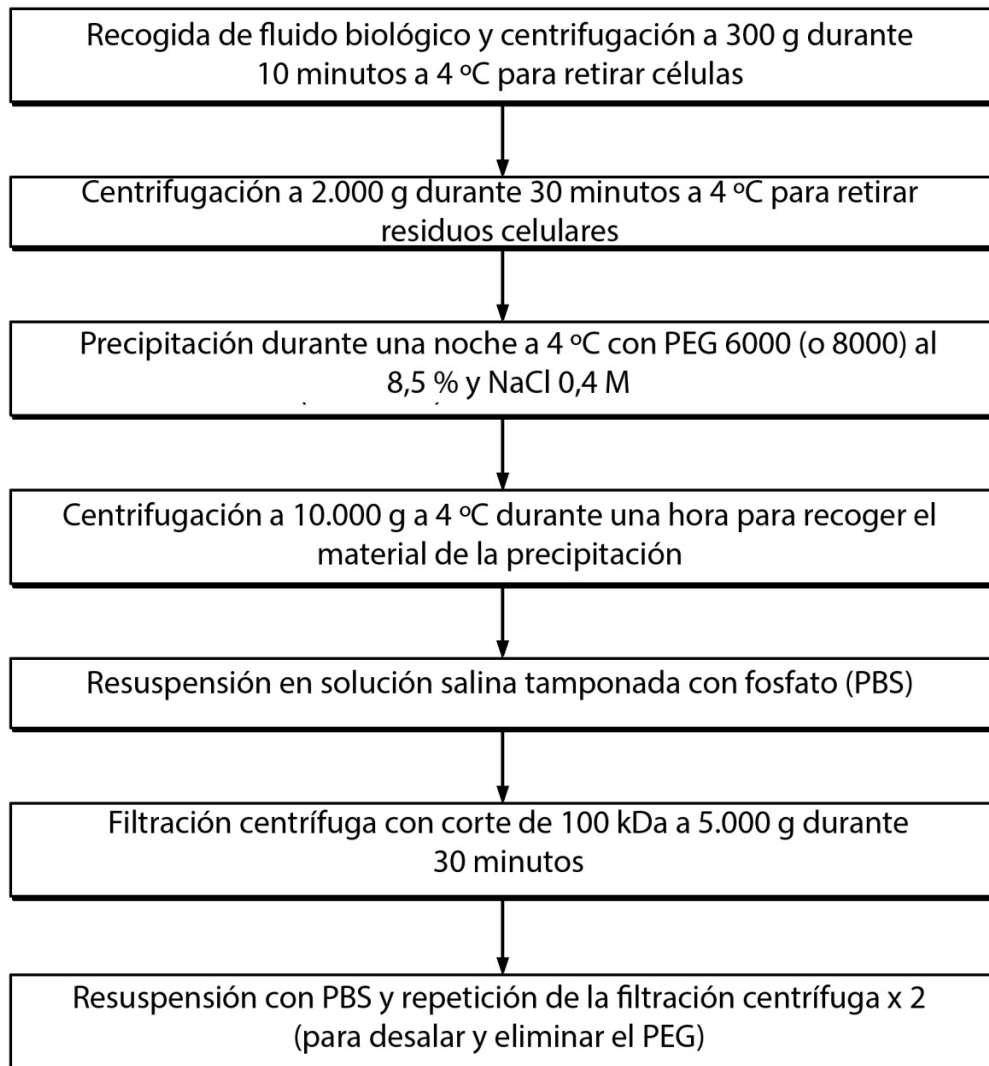


FIG. 2

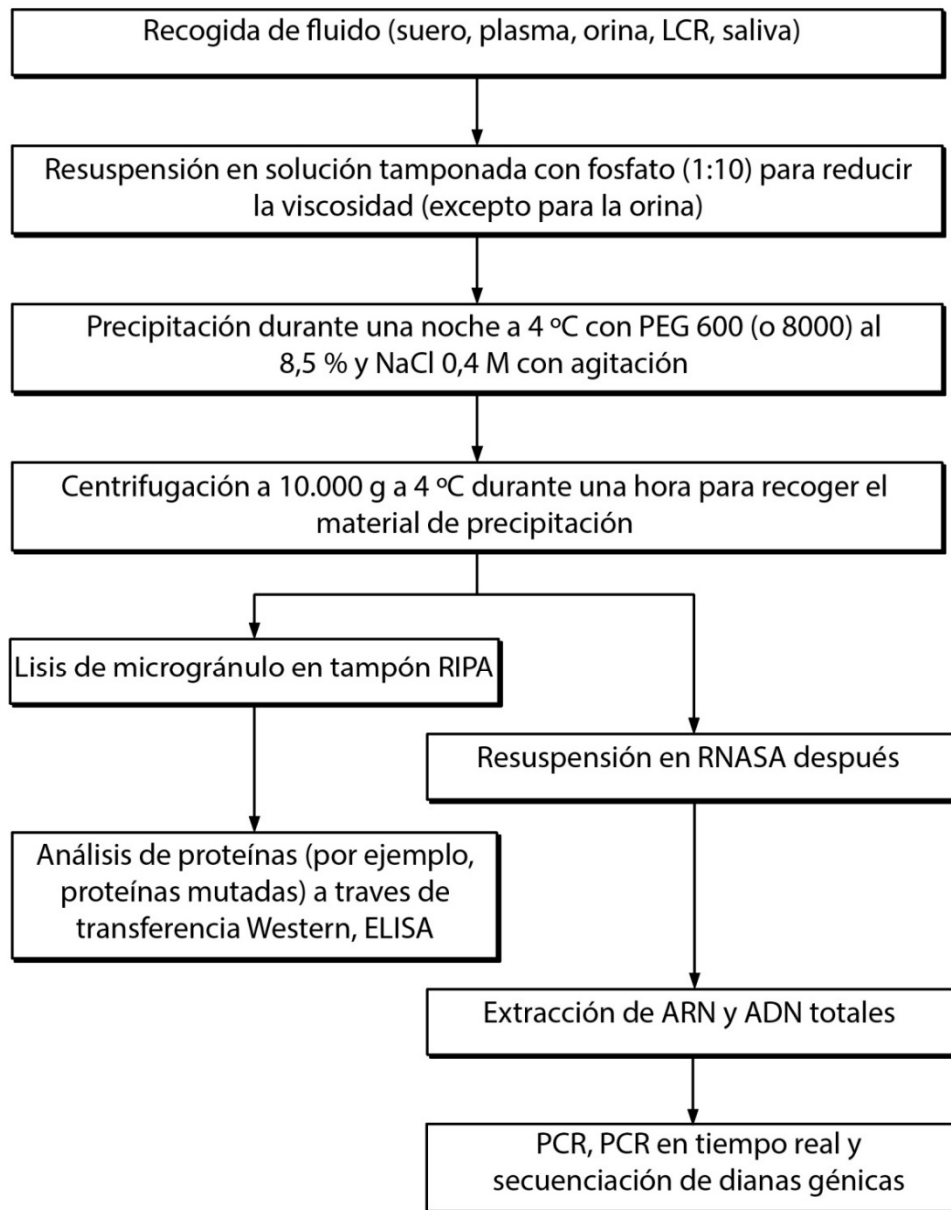


FIG. 3

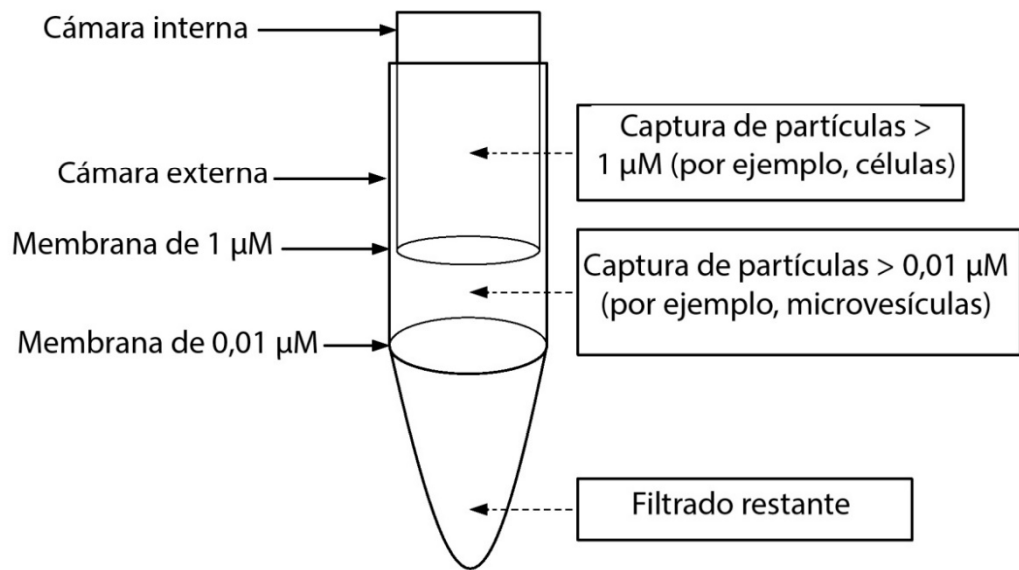
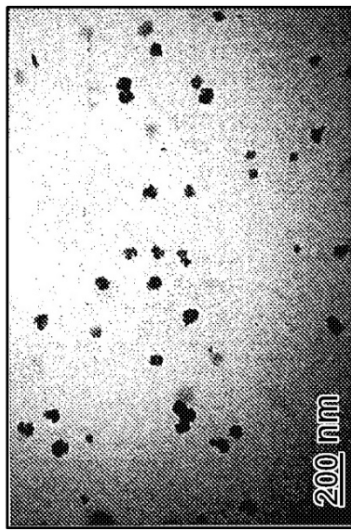
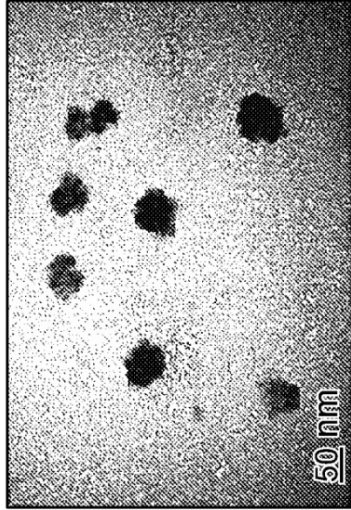


FIG. 4



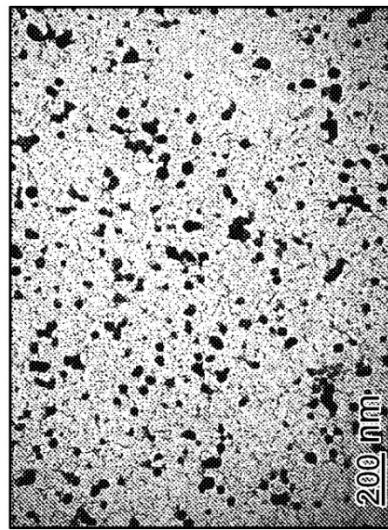
x64000

FIG. 5A



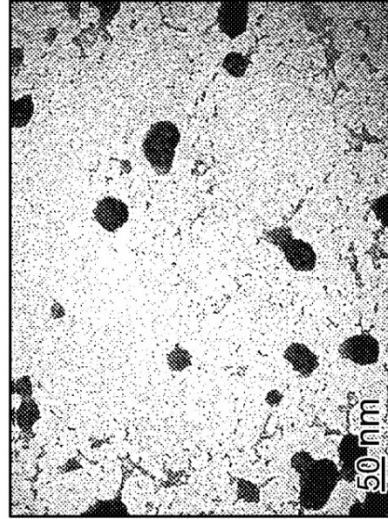
x180000

FIG. 5B



x64000

FIG. 5C



x180000

FIG. 5D

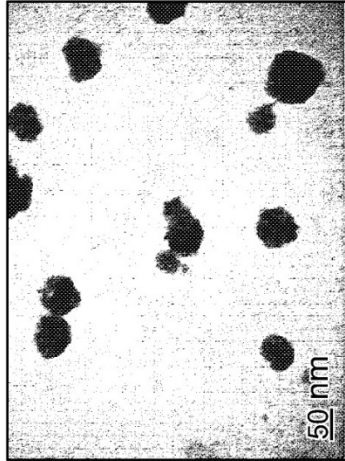


FIG. 6B

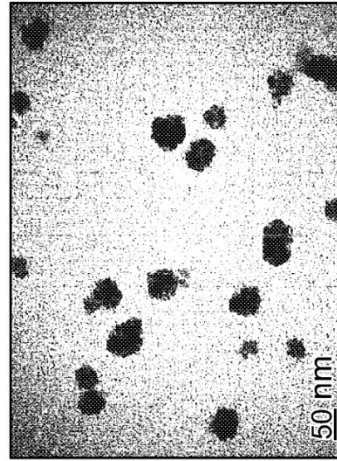


FIG. 6D

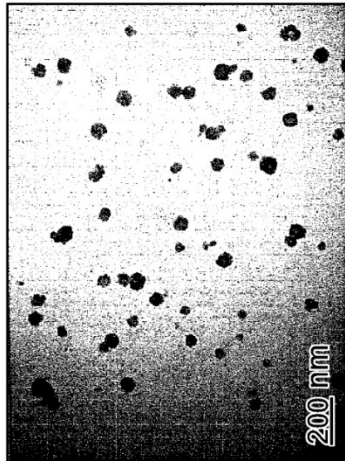


FIG. 6A

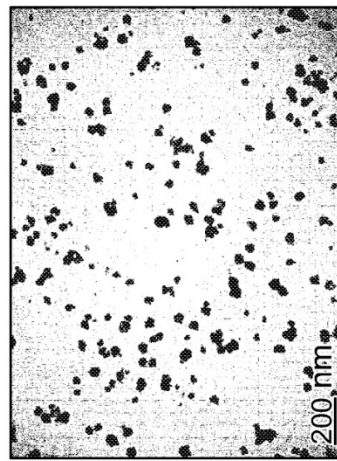


FIG. 6C

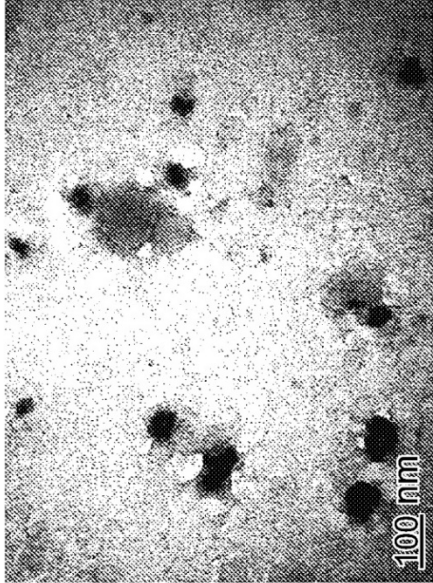


FIG. 7B

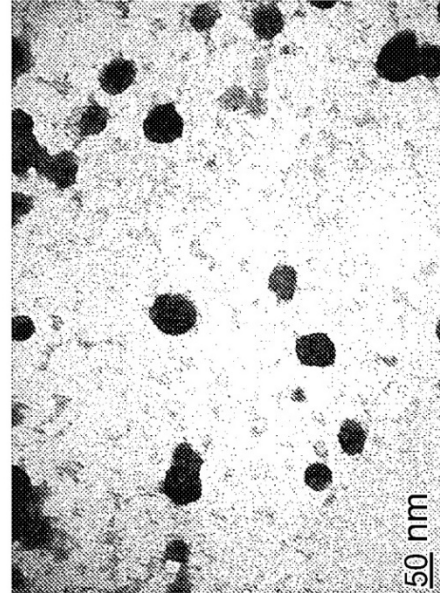


FIG. 7D

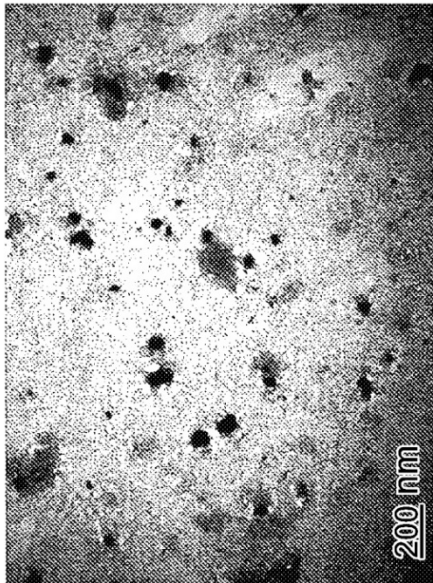


FIG. 7A

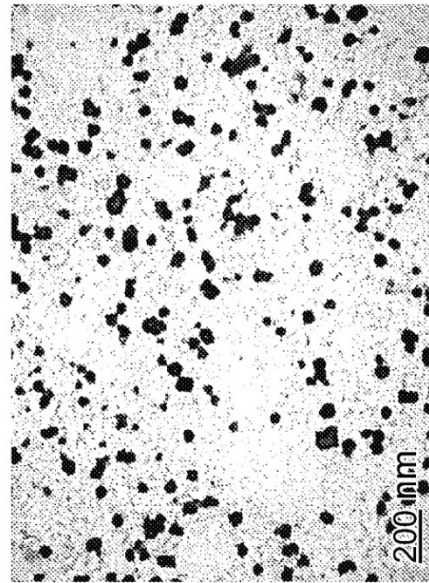


FIG. 7C

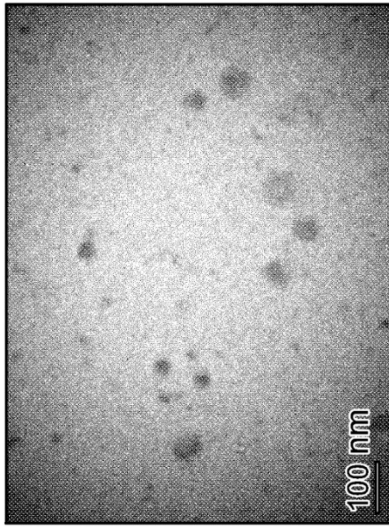


FIG. 8B

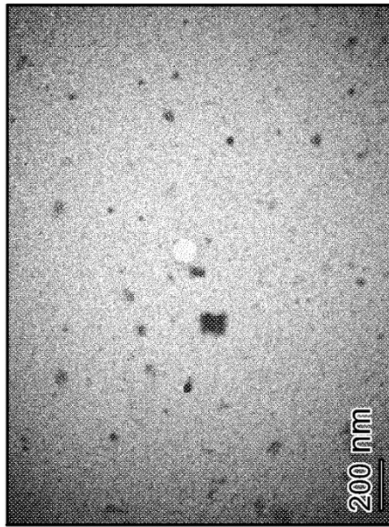


FIG. 8A

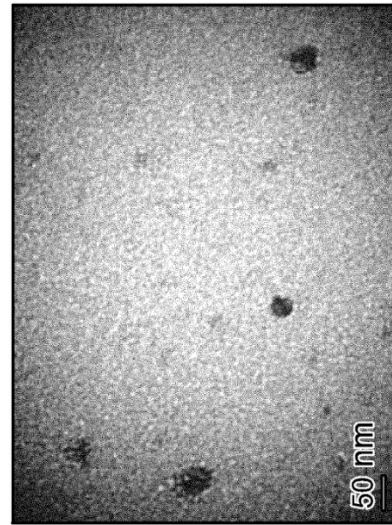


FIG. 8C

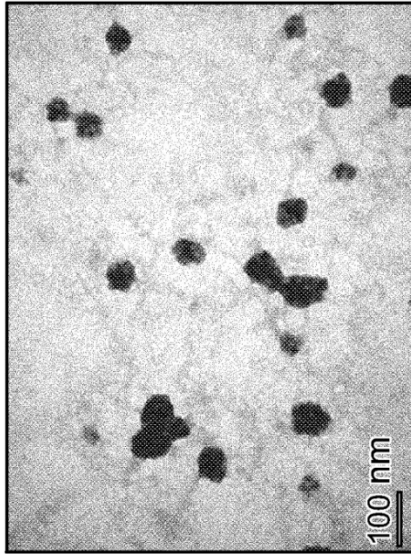


FIG. 9B

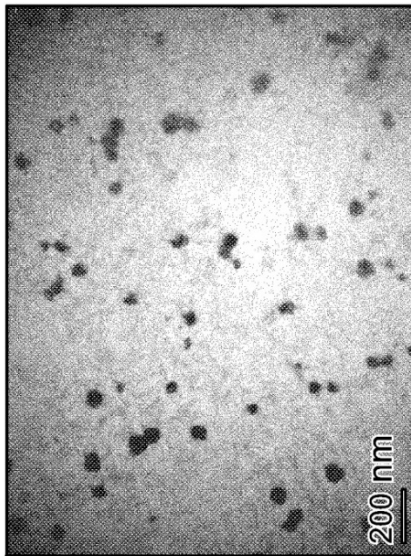


FIG. 9A

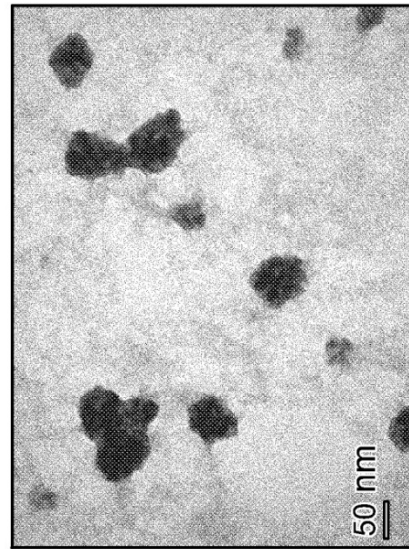


FIG. 9C

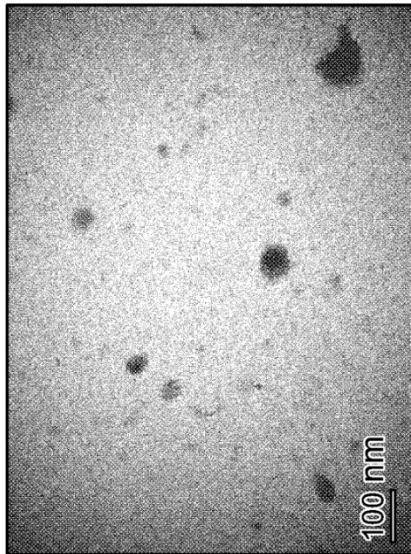


FIG. 10B

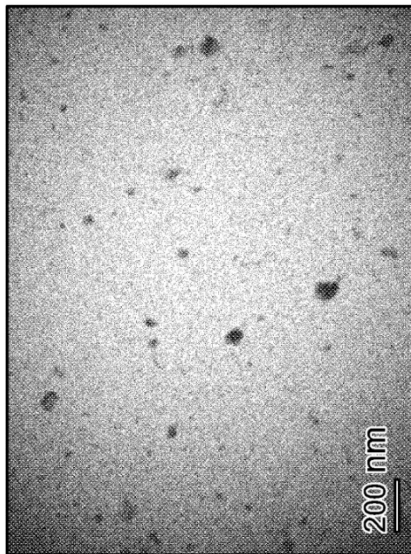


FIG. 10A

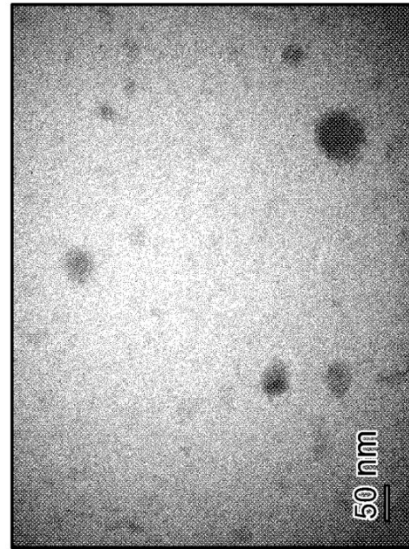


FIG. 10C

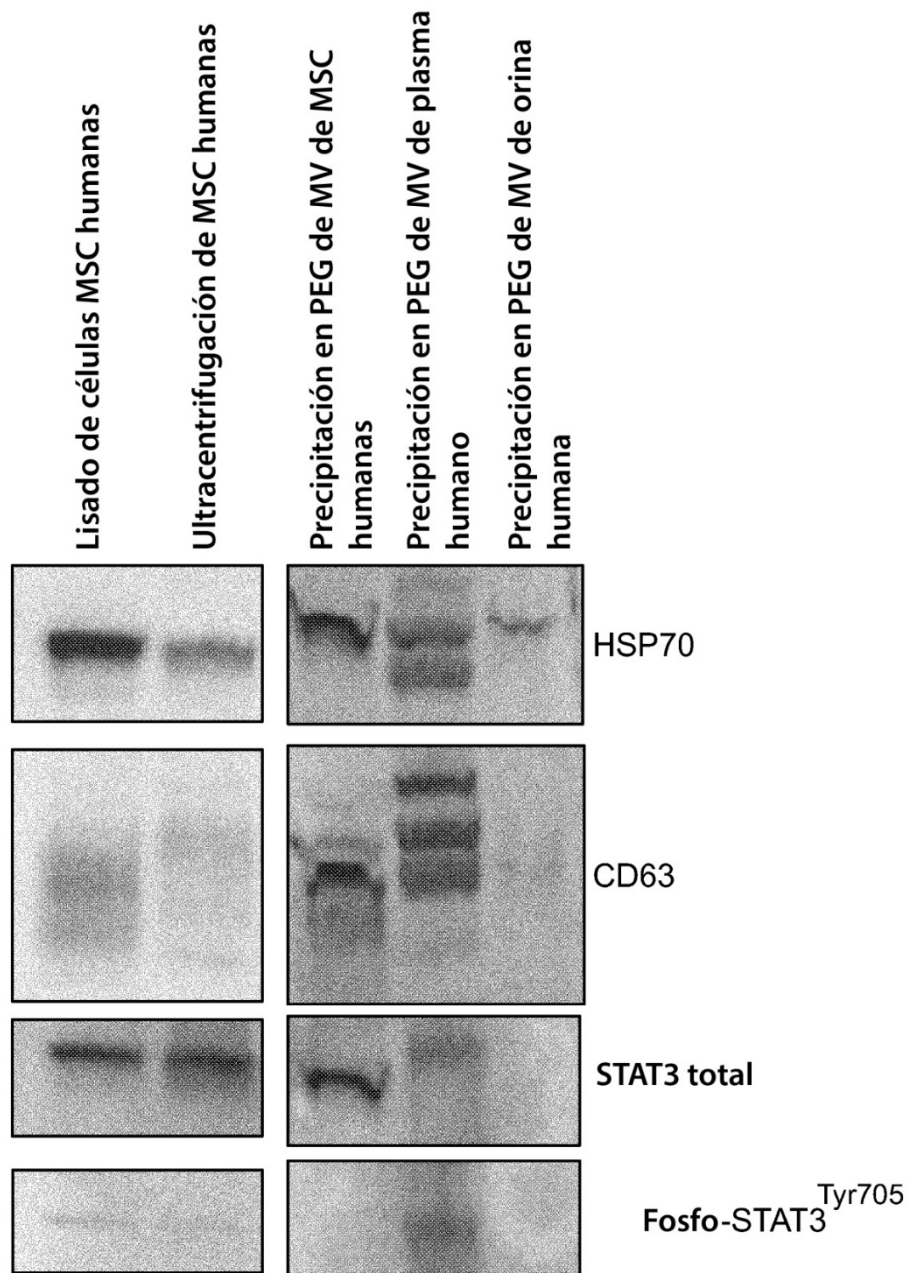


FIG. 11

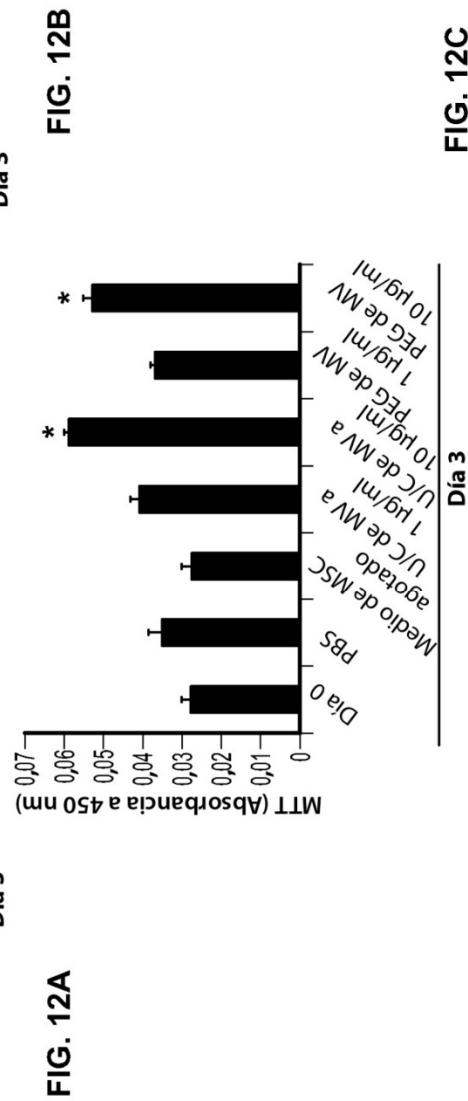
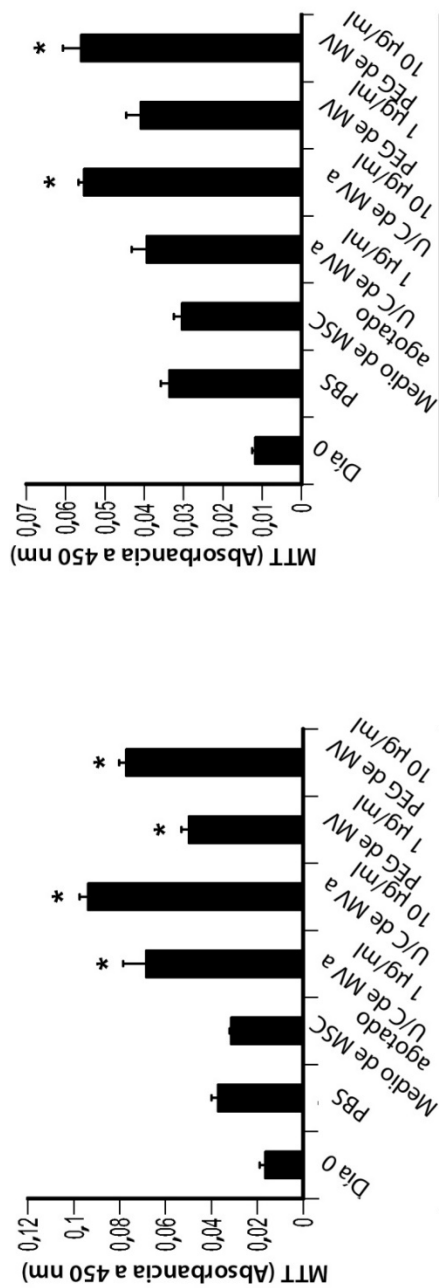
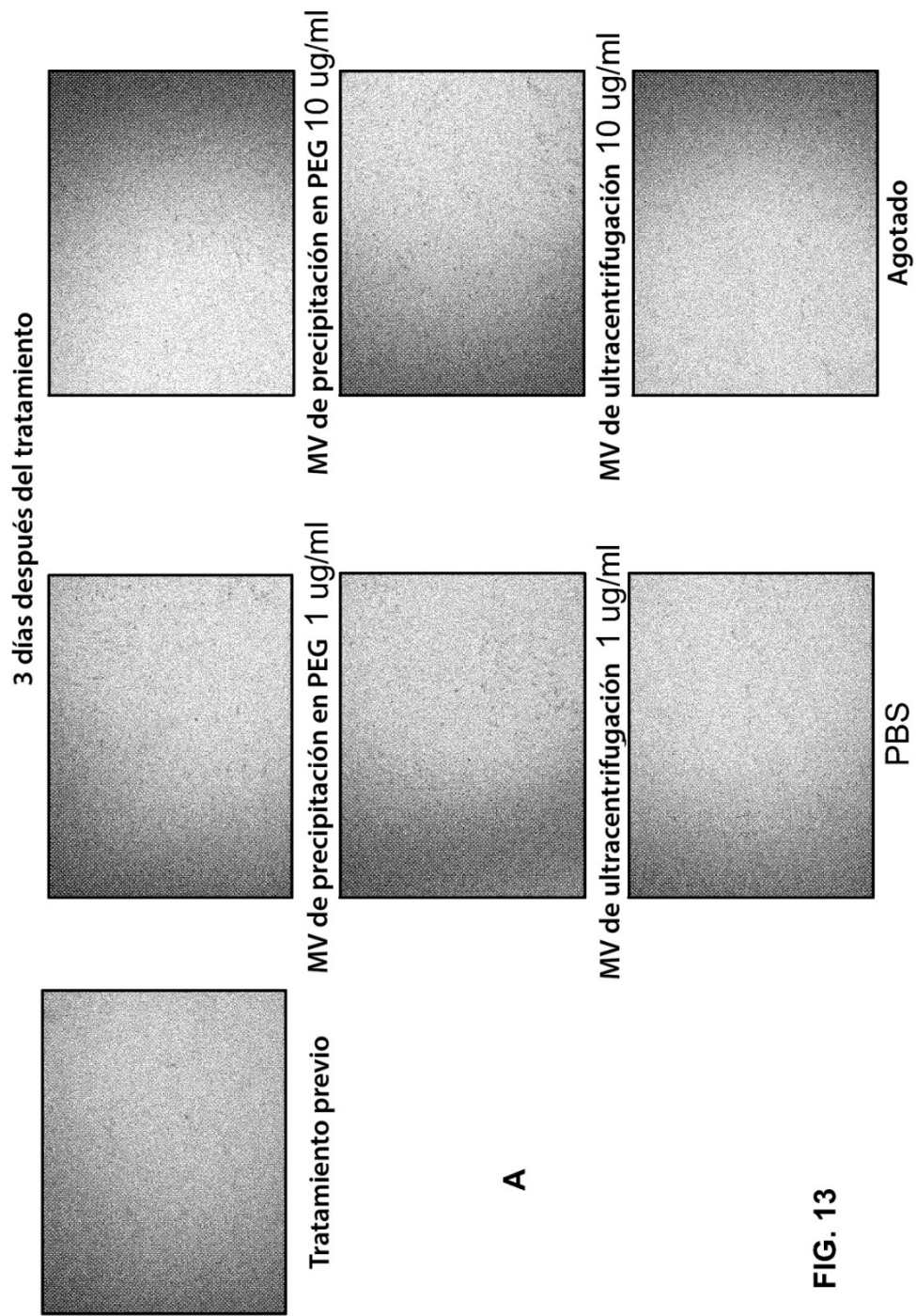


FIG. 12C



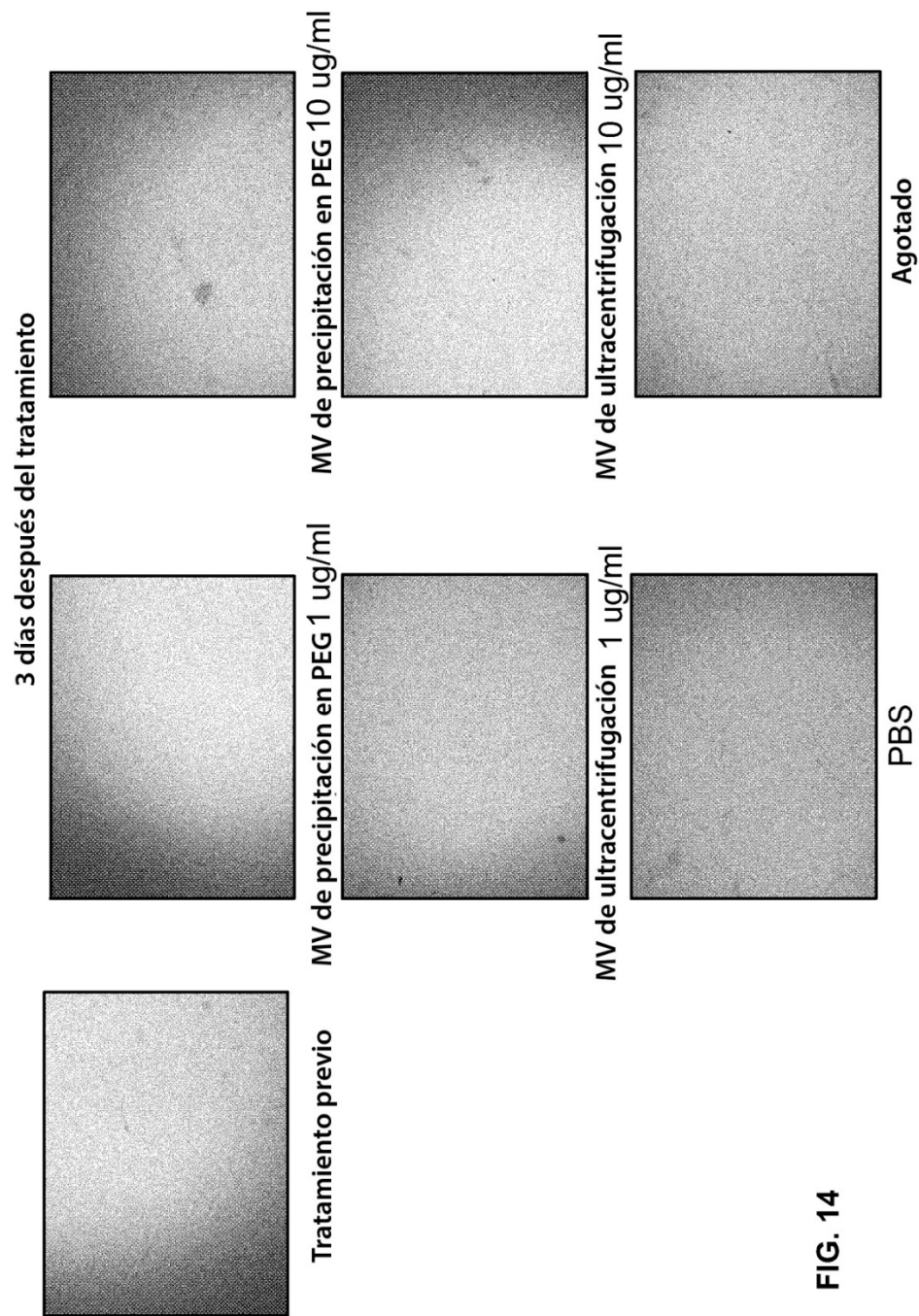


FIG. 14

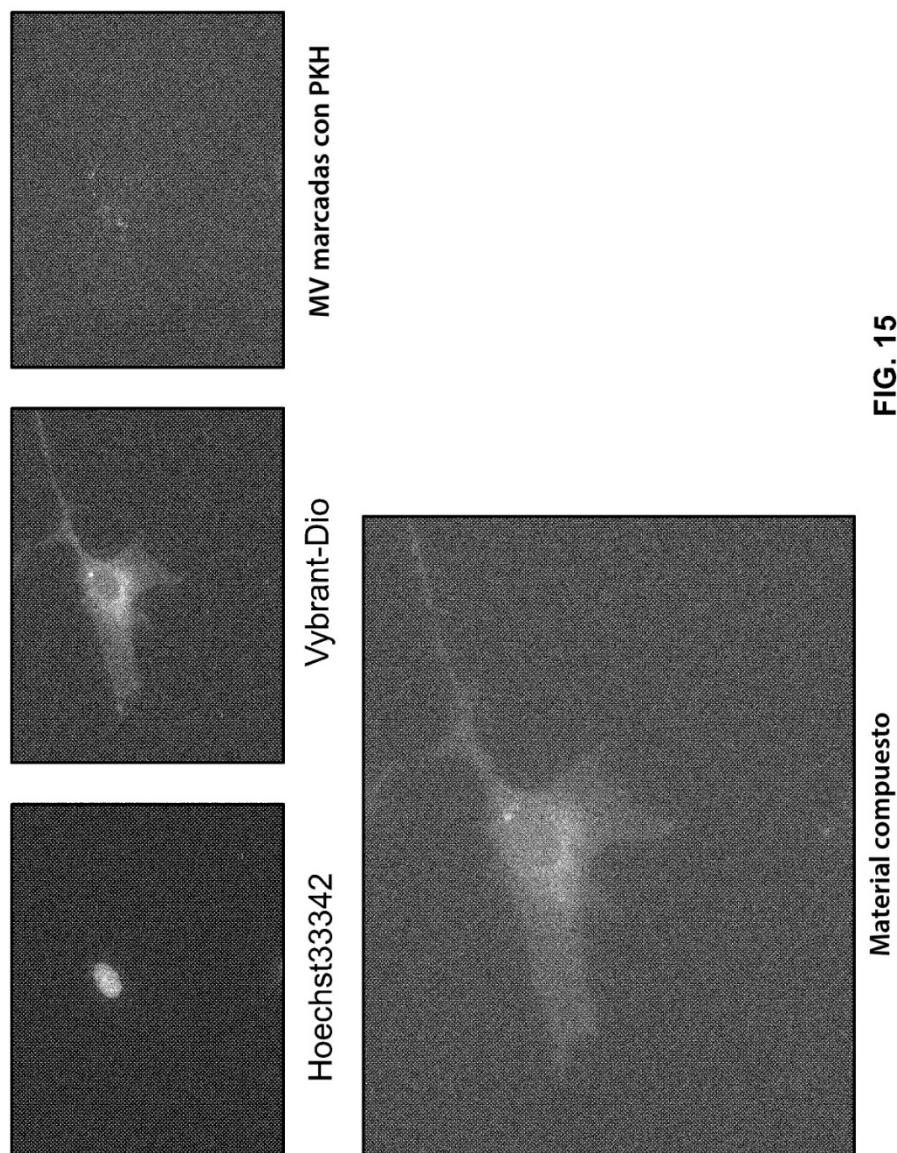
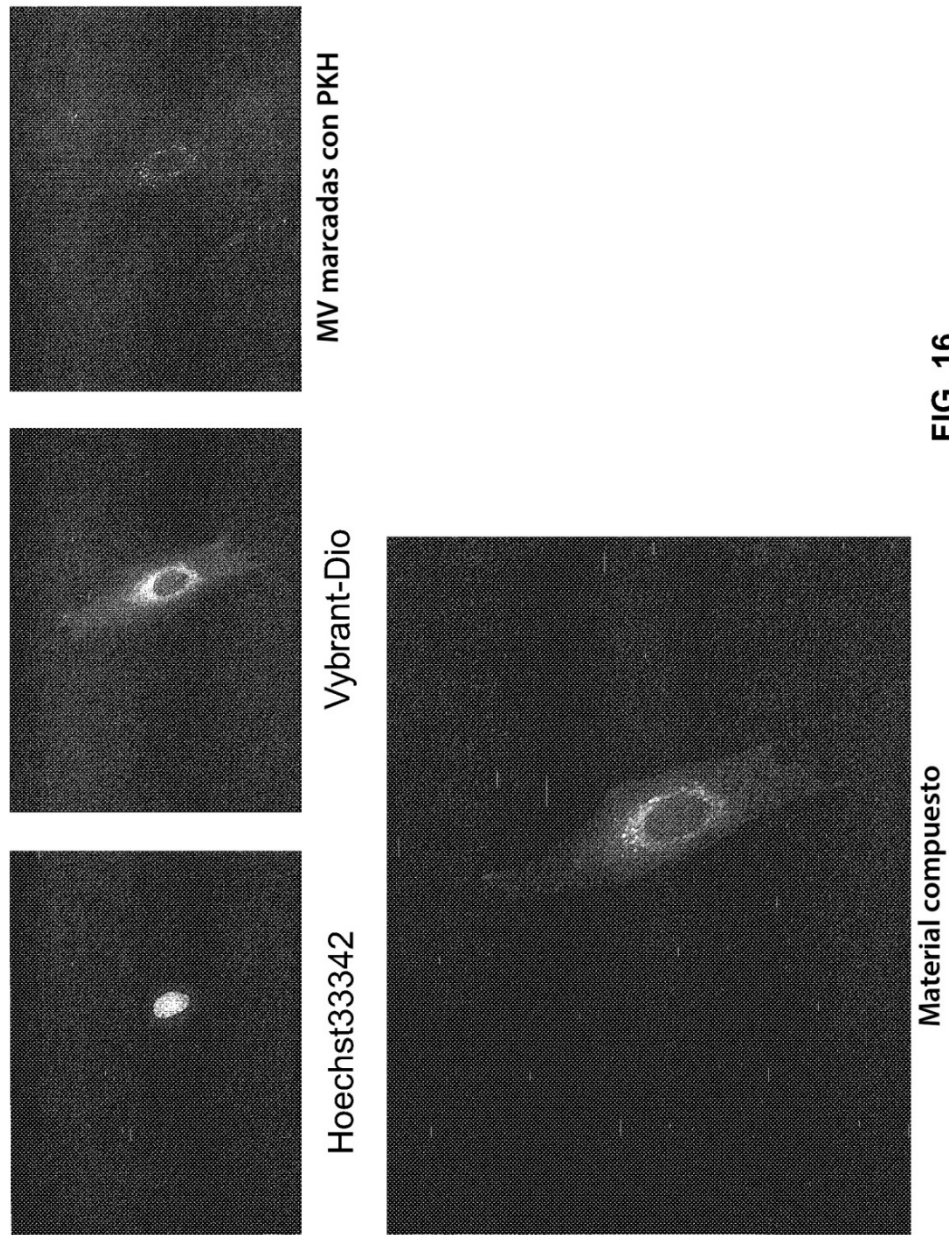


FIG. 15



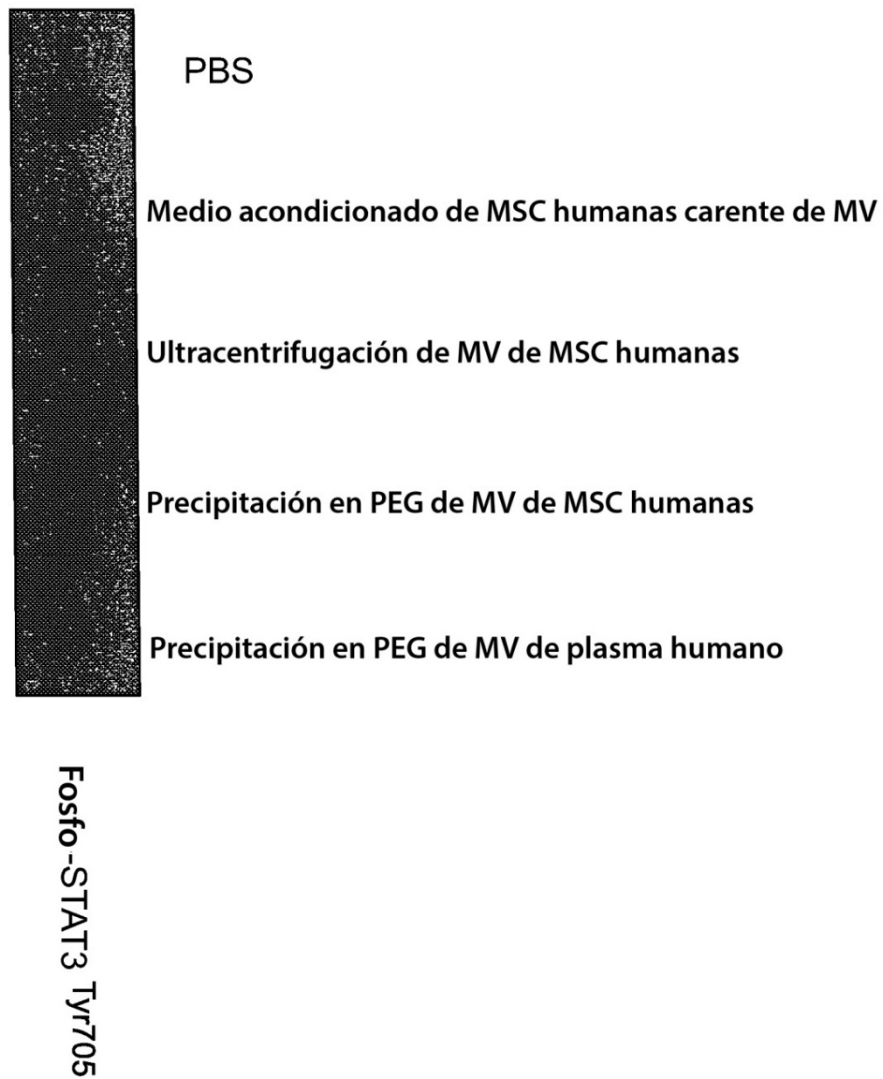


FIG. 17

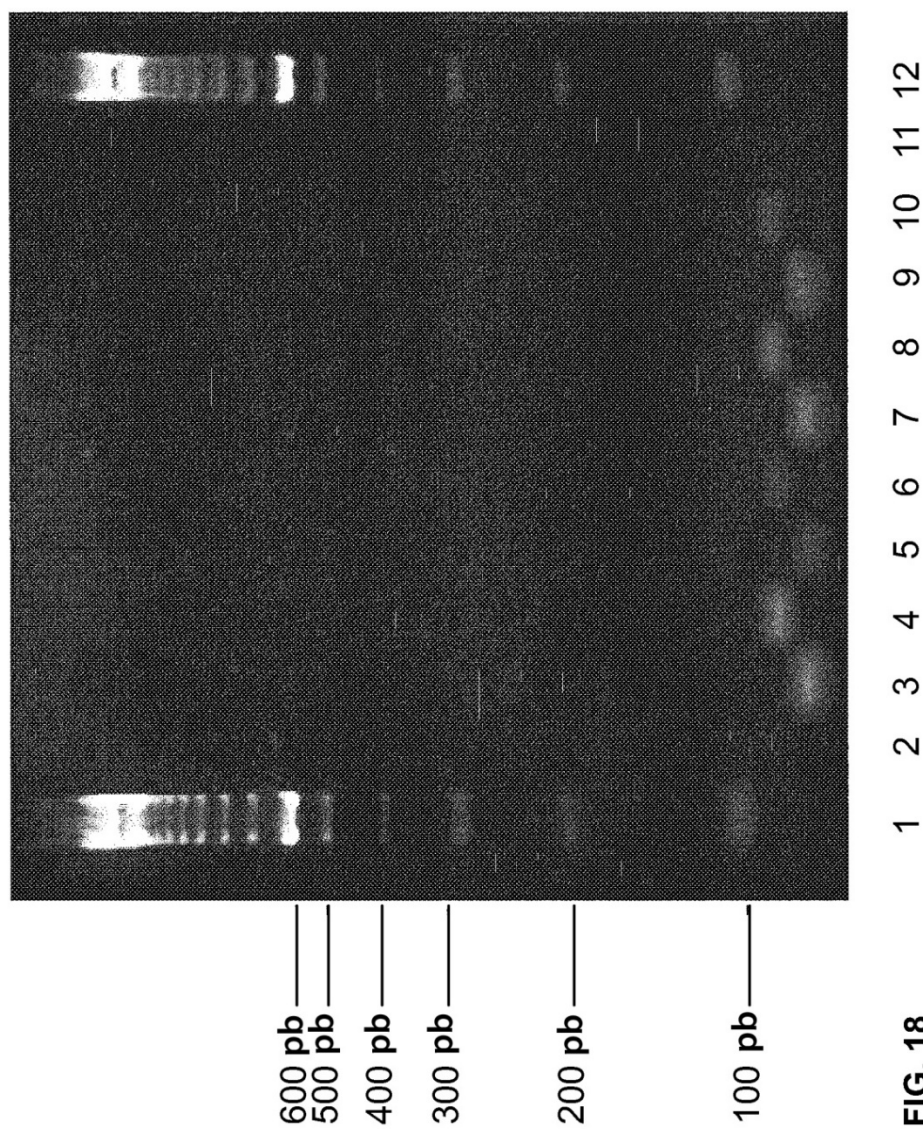
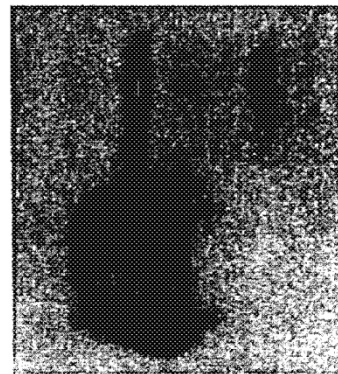


FIG. 18

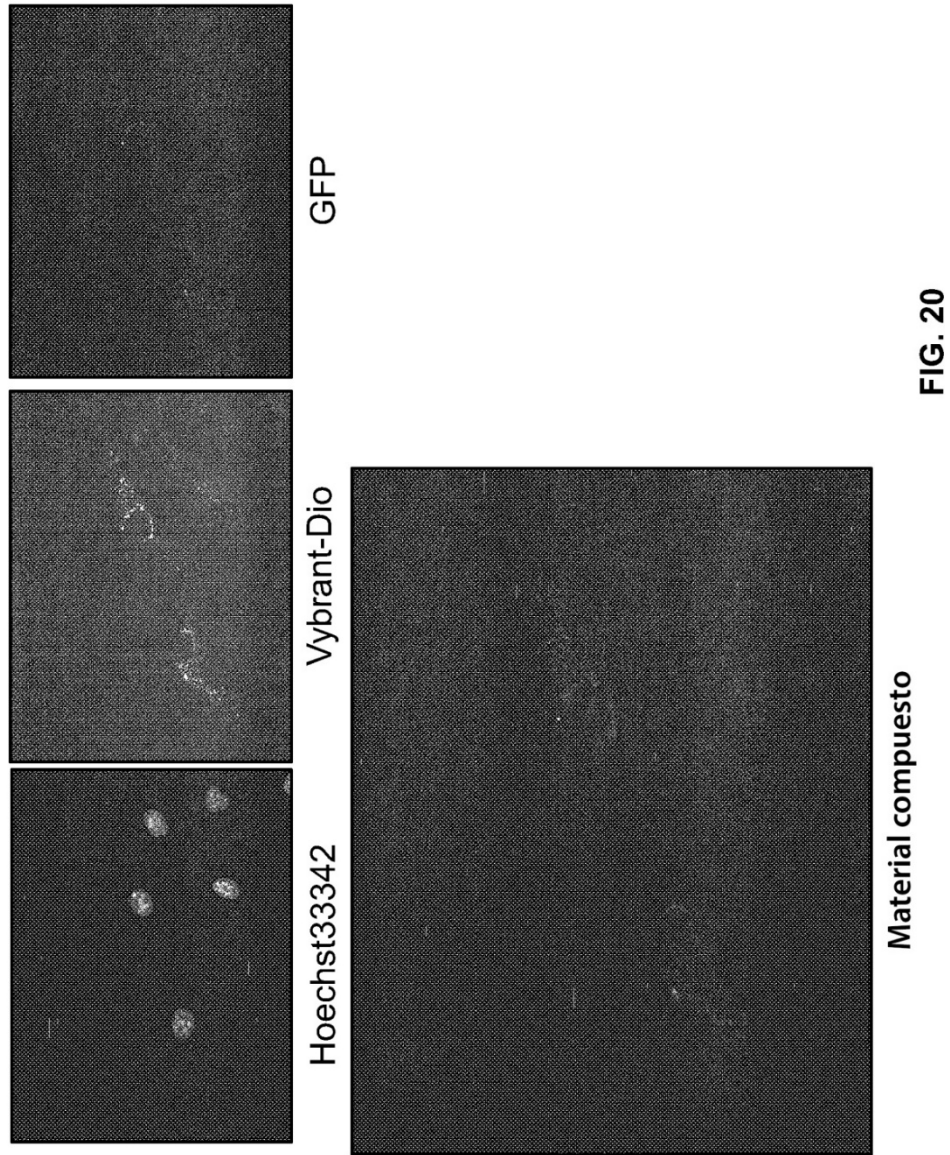


Lisado de células SK-MEL28

Lisado de MV SK-MEL28

BRAF V600E

FIG. 19



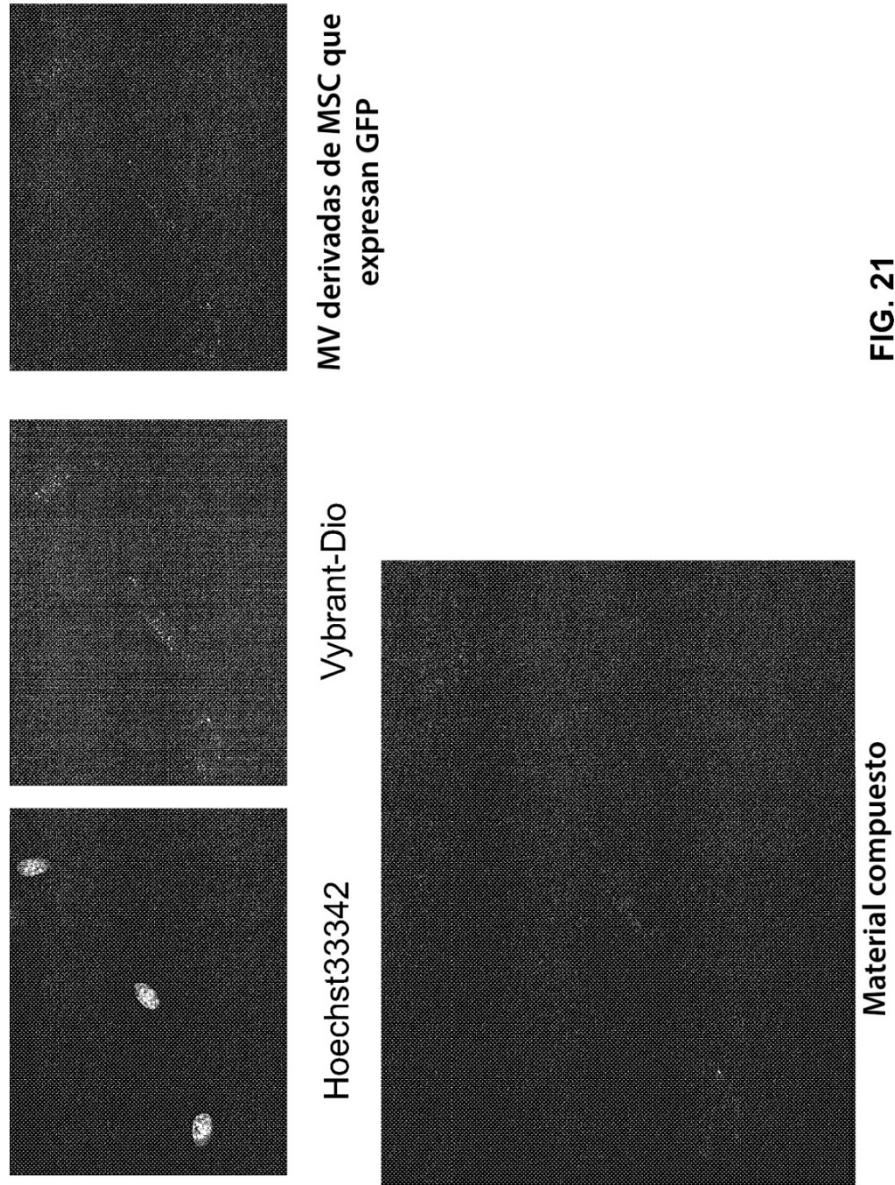


FIG. 21



FIG. 22B



FIG. 22D

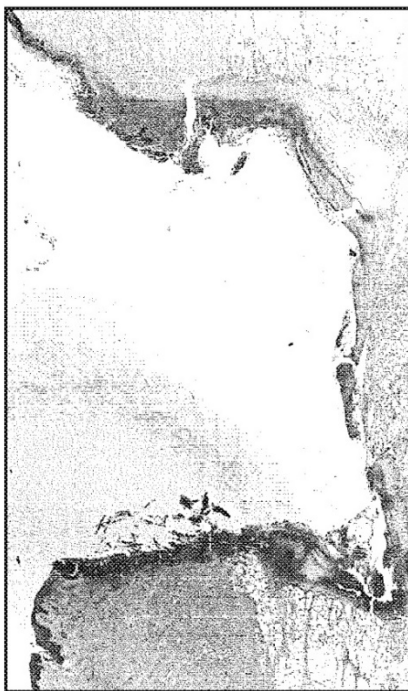


FIG. 22A



FIG. 22C

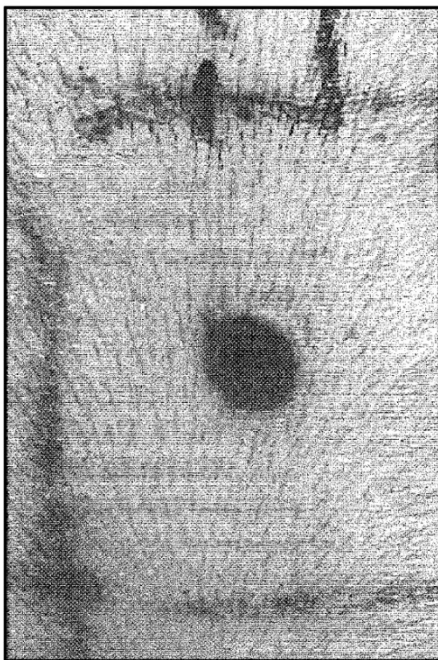


FIG. 23B

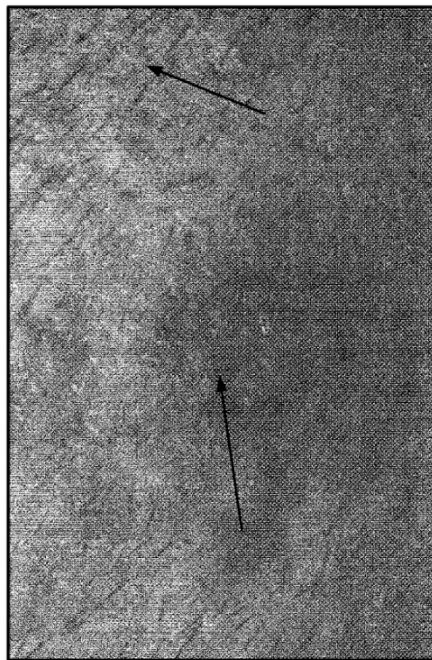


FIG. 23D

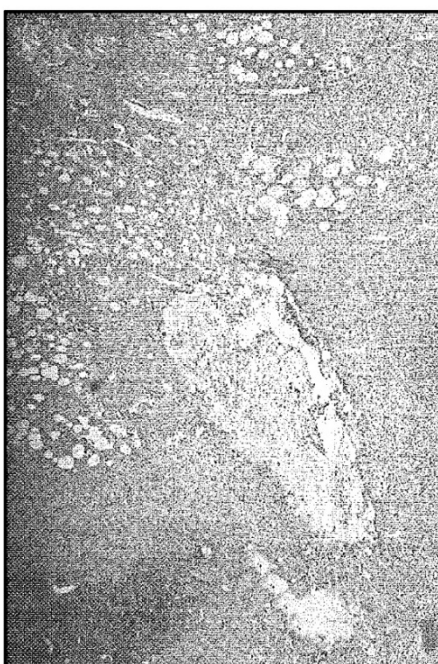


FIG. 23A

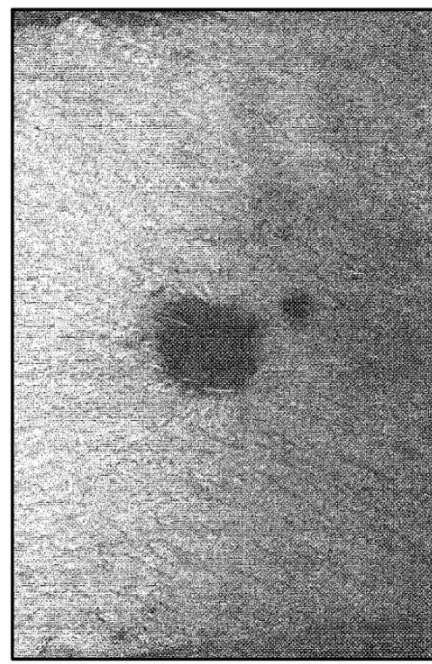


FIG. 23C

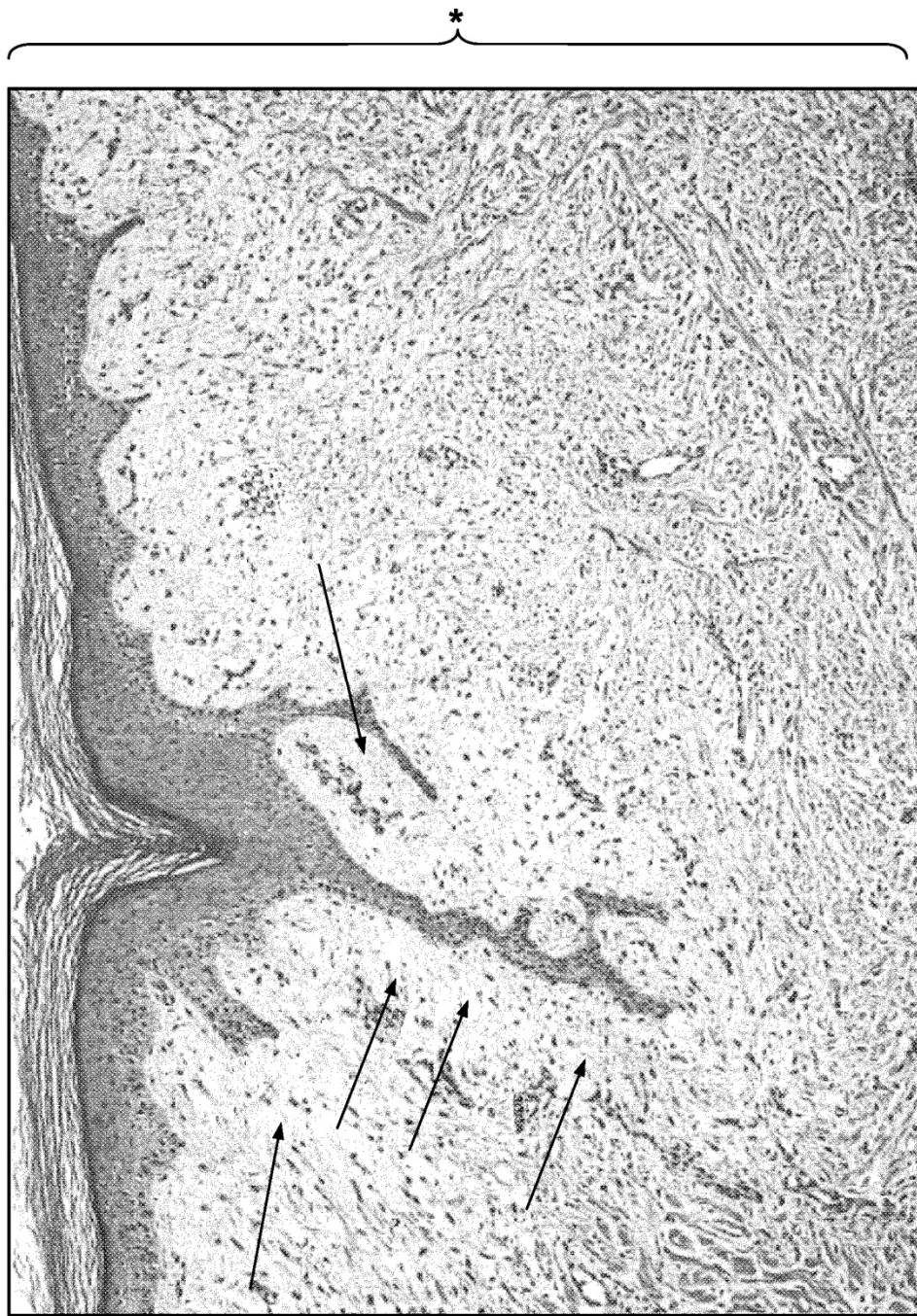


FIG. 24

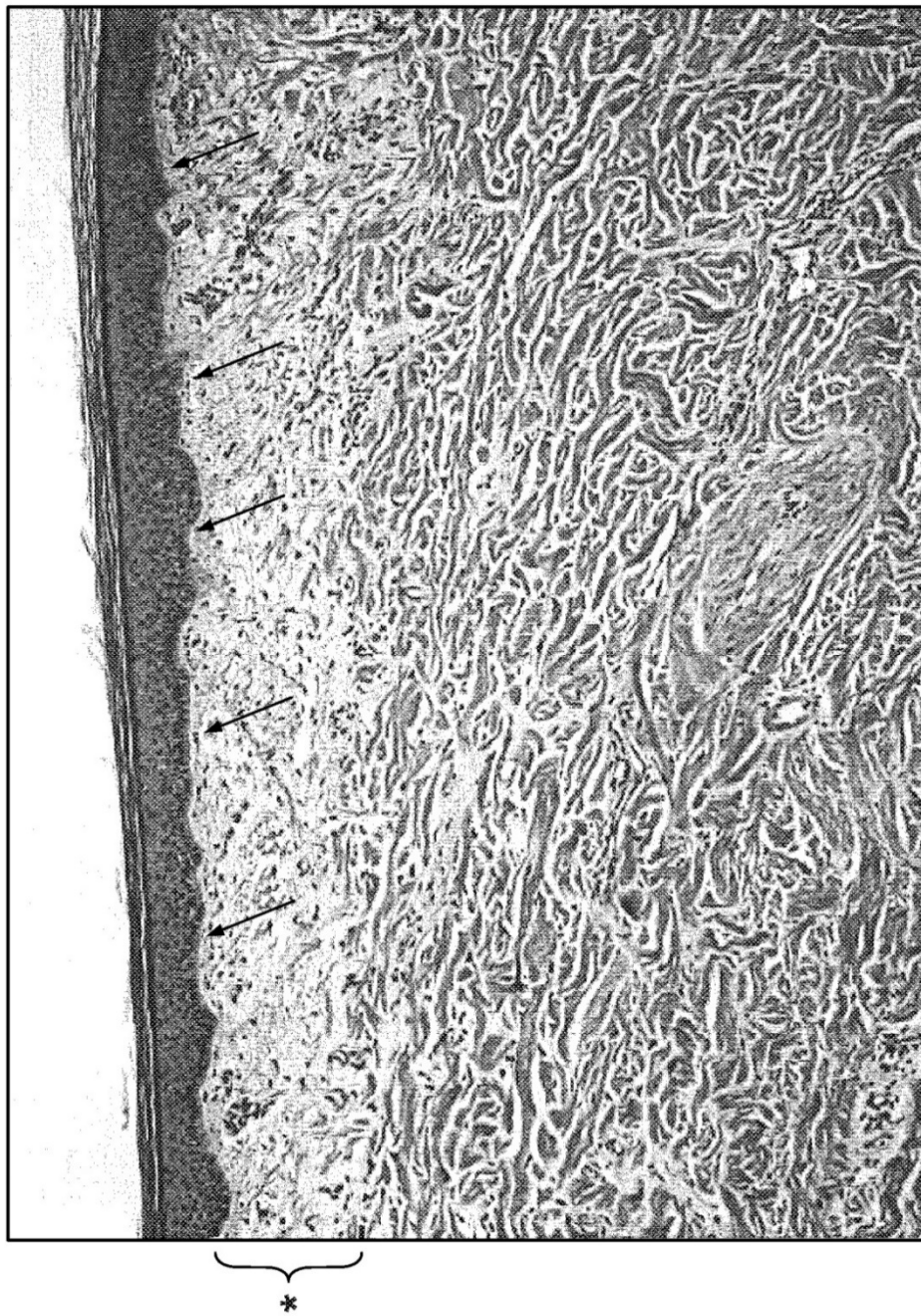


FIG. 25

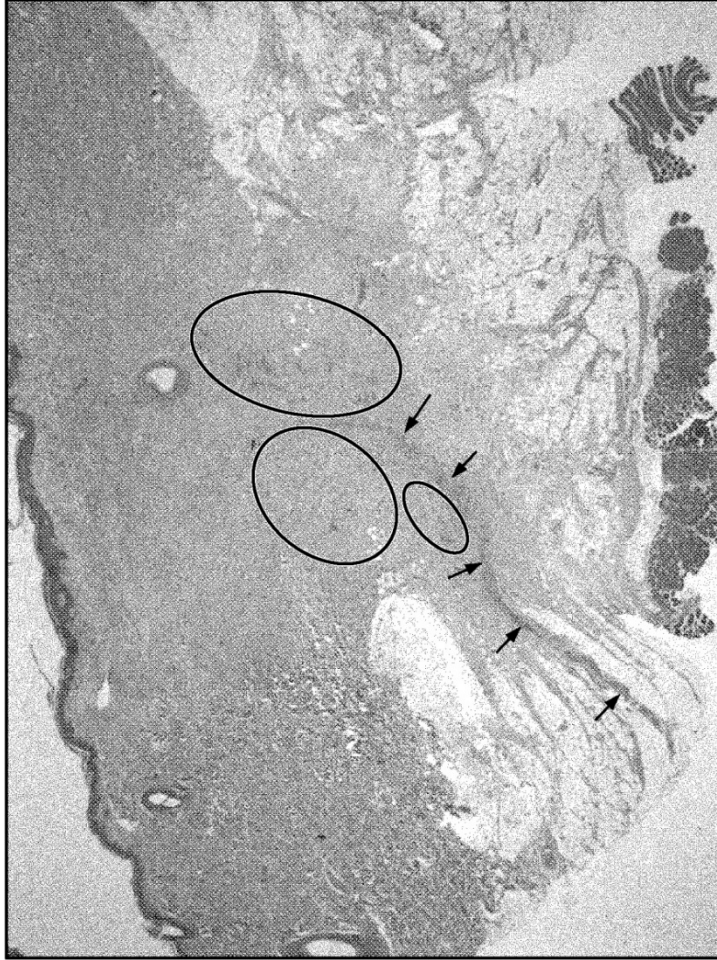


Figura 5: herida de espesor completo tratada con MV preparadas mediante los presentes métodos el día 28 (x12,5). Las flechas ilustran el crecimiento de nuevo nervio en una herida en remodelación. El crecimiento de nervio está asociado con la angiogénesis – señalado en las áreas rodeadas con un círculo. Estos hallazgos son altamente indicadores de la regeneración tisular.

FIG. 26

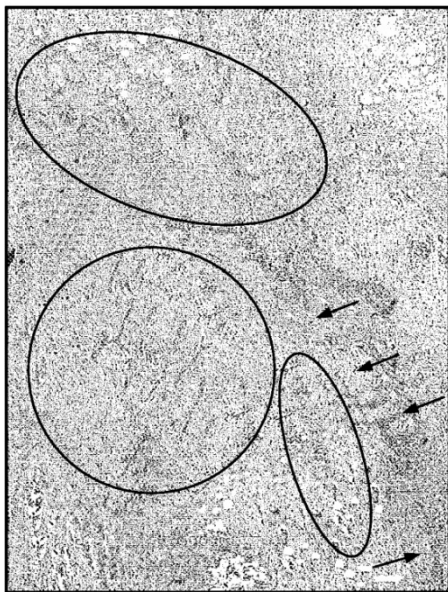


FIG. 27A

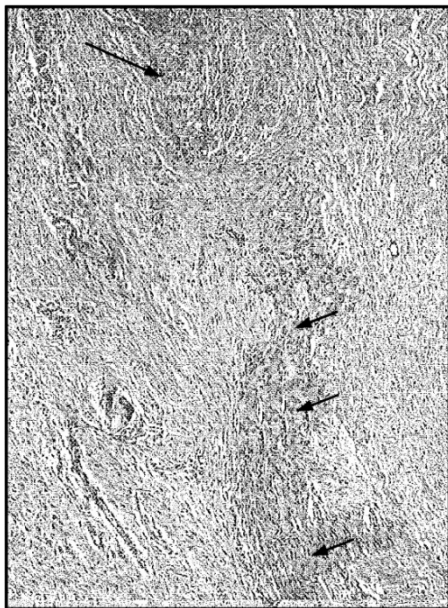


FIG. 27B

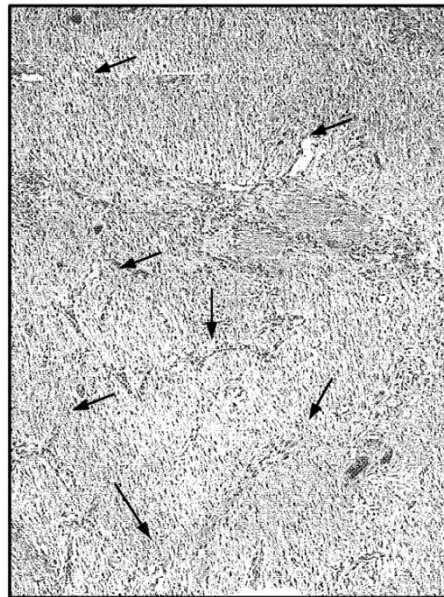


FIG. 27C

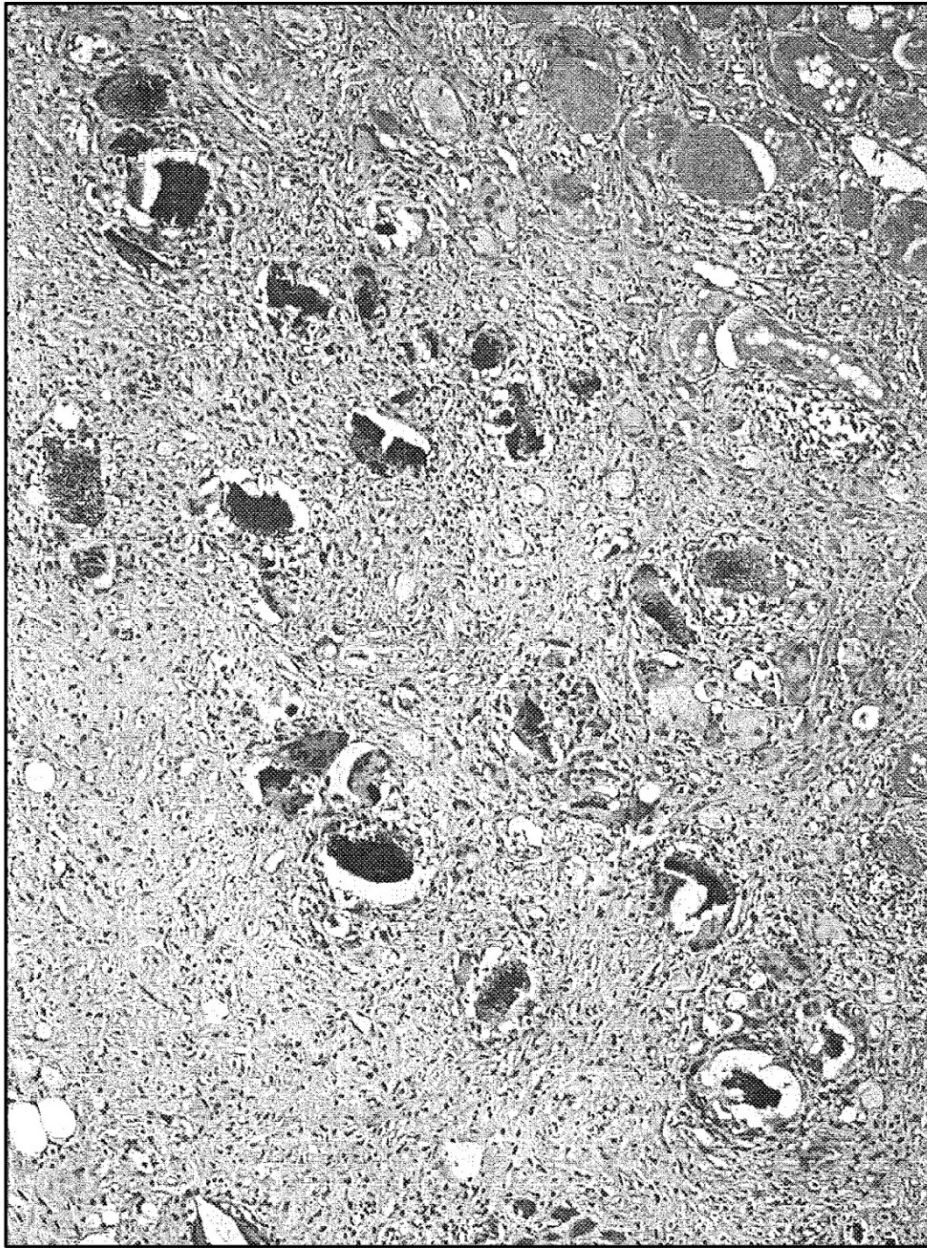


FIG. 28

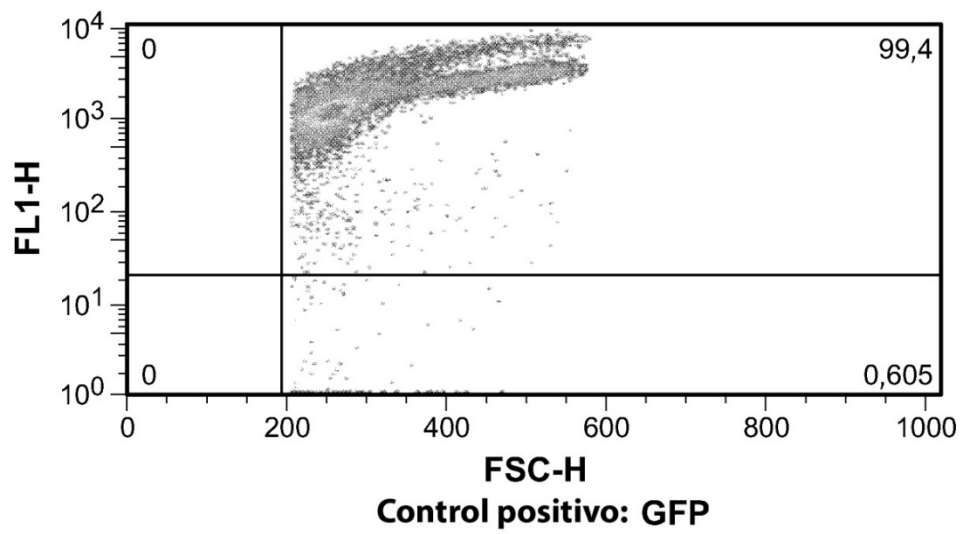


FIG. 29A

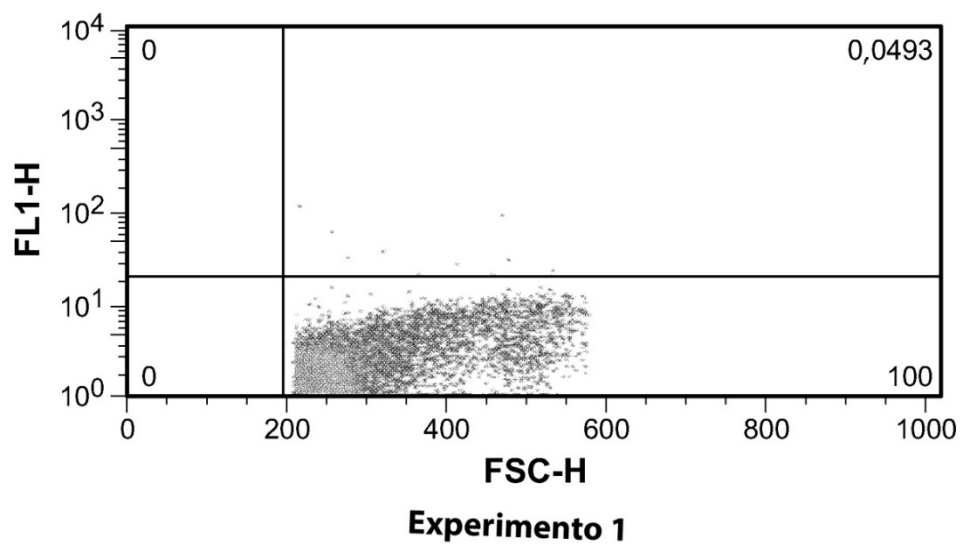


FIG. 29B



FIG. 30A

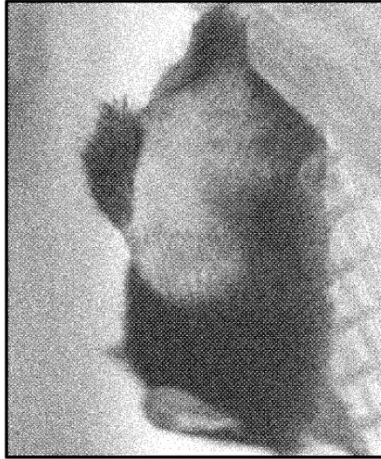


FIG. 30B

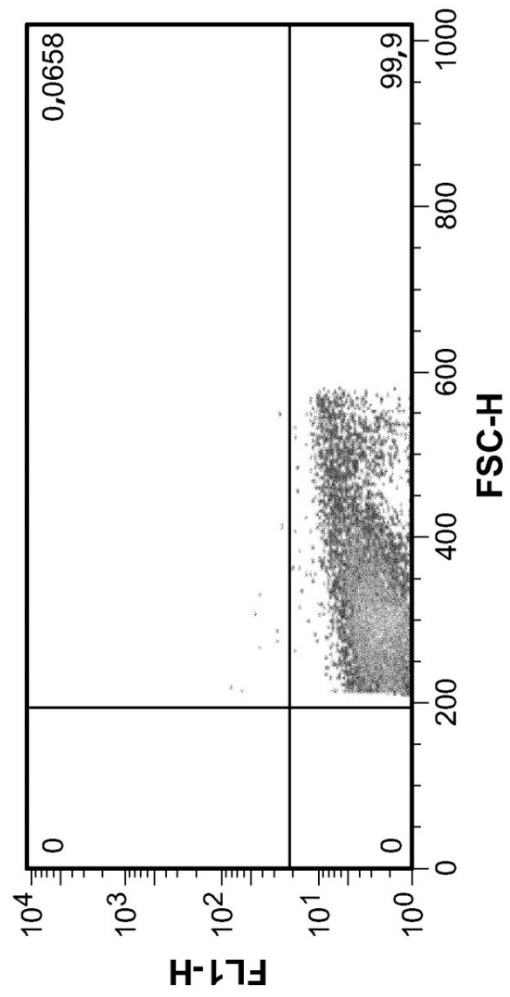


FIG. 30C

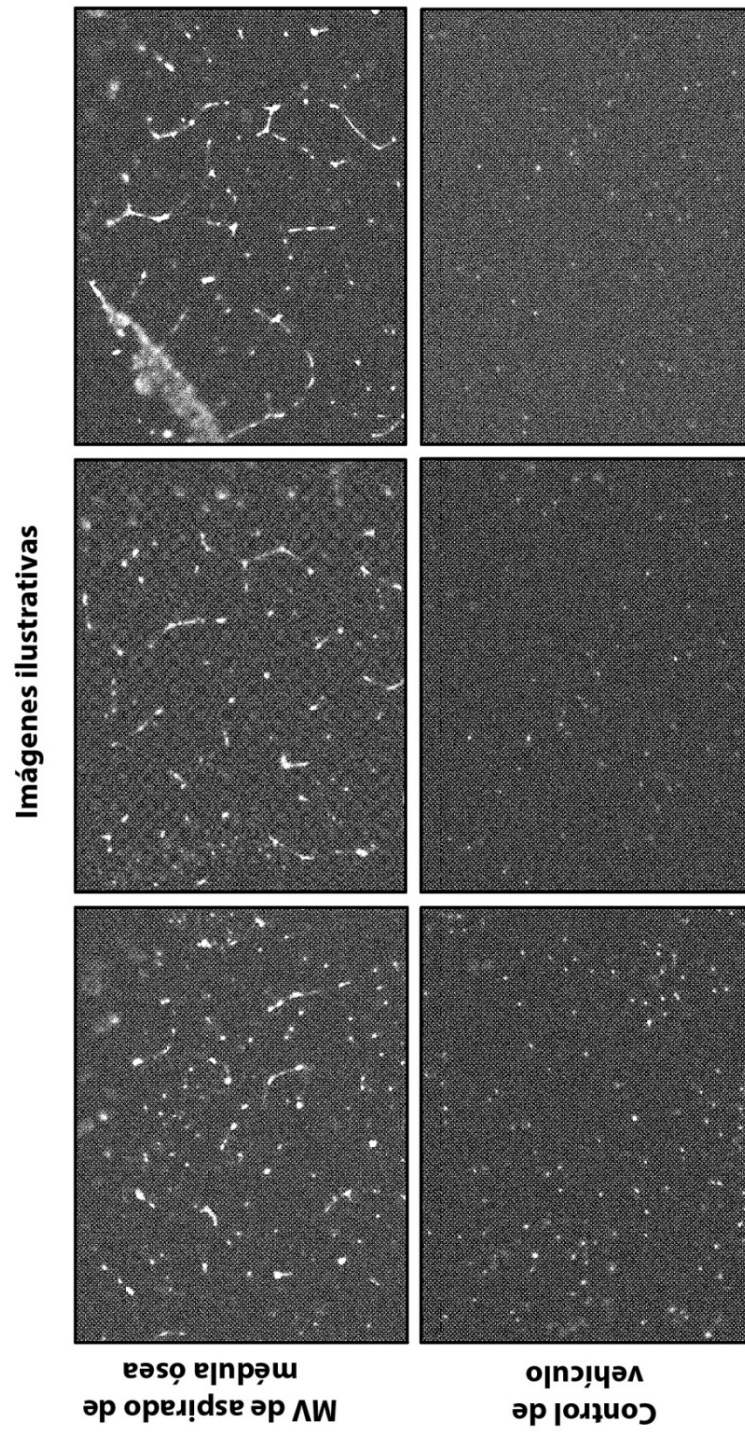


FIG. 31

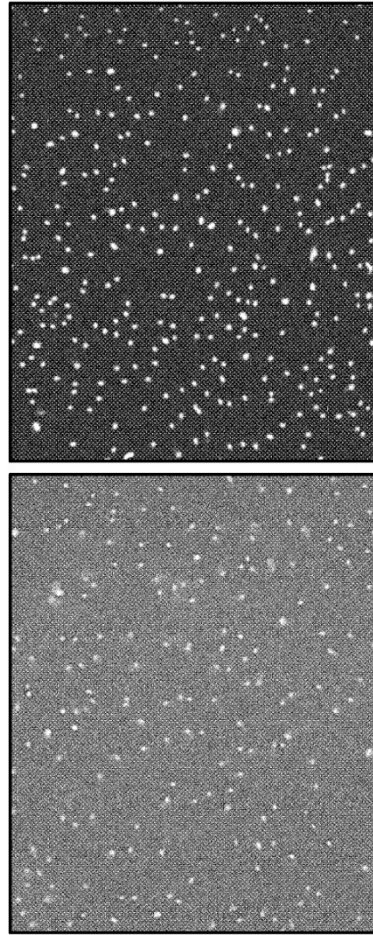


FIG. 32A

PBS

MV de médula ósea

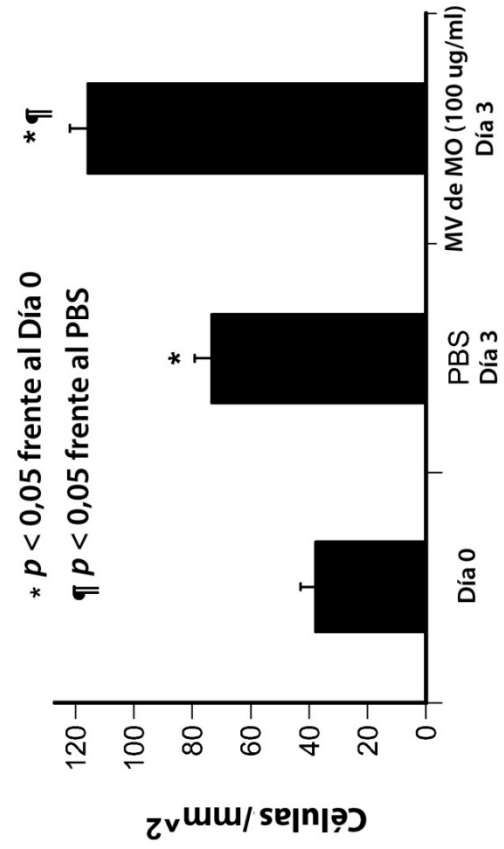


FIG. 32B