

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 543**

51 Int. Cl.:

<b>A61L 27/36</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/38</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/54</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/133</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/02</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2017** E 23198075 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025** EP 4268892

54 Título: **Nanovesículas unidas a matriz y su uso**

30 Prioridad:

**02.03.2016 US 201662302626 P**

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

**23.04.2025**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH- OF THE  
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER  
EDUCATION (100.00%)  
1st Floor Gardner Steel Conference Center, 130  
Thackeray Avenue  
Pittsburgh PA 15260, US**

72 Inventor/es:

**BADYLAK, STEPHEN FRANCIS;  
HULEIHEL, LUAI;  
HUSSEY, GEORGE, S. y  
NARANJO GUTIERREZ, JUAN DIEGO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 3 014 543 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

Nanovesículas unidas a matriz y su uso

**Campo**

5 Este se refiere al campo de los andamios biológicos, específicamente a las nanovesículas derivadas de la matriz extracelular (ECM) y su uso.

**Antecedentes**

10 Se han desarrollado andamios biológicos compuestos de matriz extracelular (MEC) como materiales de malla quirúrgica y se ha permitido su uso en un gran número de aplicaciones clínicas, incluida la reparación de hernia ventral (Alicuban et al., *Hernia*. 2014;18(5):705-712), reconstrucción musculoesquelética (Mase et al., *Orthopedics*. 2010;33(7):511), reconstrucción esofágica (Badylak et al., *Tissue Eng Part A*. 2011; 17(11-12):1643-50), reemplazo de duramadre (Bejjani et al., *J Neurosurg*. 2007;106(6):1028-1033), reparación de tendones (Longo et al., *Stem Cells Int*. 2012;2012:517165), reconstrucción mamaria (Salzber, *Ann Plast Surg*. 2006;57(1):1-5), entre otros (Badylak et al., *Acta Biomater*. 2009;5(1):1-13). El uso de estos biomateriales se asocia típicamente con el restablecimiento al menos parcial de tejido funcional apropiado para el sitio; un procedimiento denominado "remodelación constructiva". Estos materiales basados en ECM suelen ser de origen xenogénico (p. ej., porcino para su uso en hospedantes humanos) y se preparan mediante la descelularización del tejido fuente, tal como la dermis, vejiga urinaria (UBM) y submucosa del intestino delgado (SIS), entre otros. Estos andamios xenogénicos no provocan una respuesta inmunitaria adversa innata o adaptativa (Badylak et al., *Ann Biomed Eng*. 2014;42(7):1517-1527).

20 Los factores que determinan el resultado en aplicaciones clínicas son numerosos e incluyen la técnica quirúrgica, la idoneidad del bioandamio seleccionado para la afección clínica, la edad del donante de tejido alogénico o xenogénico y las comorbilidades del paciente, entre otros (Badylak et al., *Ann Biomed Eng*. 2014;42(7): 1517-1527). Quizás el principal determinante del resultado sea el método mediante el cual se procesan estos bioandamios, incluidas técnicas de descelularización, esterilización terminal y estado de hidratación (Badylak et al., *Ann Biomed Eng*. 2014;42(7): 1517-1527). La descelularización inadecuada, el uso de agentes químicos reticulantes y la falta de carga mecánica adecuada después la colocación *in vivo* han mostrado contribuir a los malos resultados (Badylak et al., *Ann Biomed Eng*. 2014;42(7):1517-1527; Crapo et al., *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-43).

30 El resultado del uso de un bioandamio particular viene dictado por la respuesta del tejido hospedante al producto final (es decir, posprocesamiento) después de la implantación. Entre los diversos componentes de la respuesta del hospedante que se han asociado con la remodelación tisular funcional y constructiva adecuada del sitio, inducida por la ECM se encuentran la angiogénesis, la inervación, el reclutamiento de células madre, la actividad antimicrobiana y la modulación de la respuesta inmunitaria innata (Londono y Badylak, *Ann Biomed Eng*. 2015;43(3):577-592). Además, existen claras diferencias entre aplicaciones homólogas y heterólogas. Por ejemplo, los bioandamios de ECM compuestos de ECM hepática soportan el fenotipo de las células endoteliales sinusoidales hepáticas, mientras que las ECM recogidas de tejido y órganos heterólogos no lo hacen (Sellaro et al., *Tissue Eng*. 2007;13(9):2301-2310). De manera similar, la ECM de pulmón promueve la diferenciación de células madre apropiadas para el sitio (Coriella et al., *Tissue Eng Part A*. 2010;16(8):2565-2580). Existe una clara "interacción" entre las células y la ECM; sin embargo, los mecanismos por los cuales la ECM señala y dirige el comportamiento celular y viceversa se desconocen en gran medida. Sigue siendo necesario identificar los componentes y mecanismos para estos efectos y aprovecharlos para que la ECM pueda manipularse biológicamente para aplicaciones específicas. Una vez que se identifican estos componentes y mecanismos, pueden manipularse para su uso en dispositivos médicos e implementarse de tal manera que afecten a la proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Deutsch D et al.: (Metabolic Bone Disease and Related Research, 3, 1981, páginas 209-214) describe nanovesículas aisladas derivadas de la matriz extracelular de hueso alveolar de rata. Las vesículas de matriz se aislaron mediante digestión con colagenasa y centrifugación diferencial.

**Sumario**

45 En el presente documento se describe que las nanovesículas están insertadas dentro de la red fibrilar de la ECM. Estas nanopartículas unidas a la matriz protegen su carga de la degradación y desnaturalización durante el procedimiento de fabricación del andamio de ECM. Anteriormente, las microvesículas se habían identificado casi exclusivamente en fluidos corporales y líquidos sobrenadantes de cultivos celulares. Por lo tanto, la presencia de nanovesículas unidas a la matriz era sorprendente. Estas nanovesículas se diferencian de otras microvesículas en que son resistentes a la digestión con detergentes y/o enzimáticas, contienen un grupo de microARN diferentes y están enriquecidas en miR-145. Las nanovesículas descritas no tienen proteínas de superficie características que se encuentran en otras microvesículas. Las nanovesículas proporcionan propiedades biológicas únicas que pueden utilizarse en bioandamios y dispositivos.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

55 Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Las referencias a los métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o métodos de diagnóstico *in vivo* en esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos.

### Breve descripción de los dibujos

5 Figuras 1A-1C. Comparación de la concentración de ácido nucleico de UBM, SIS o dermis y equivalentes disponibles comercialmente. Concentración de ácido nucleico total y ADNbc por mg en peso seco de andamio de ECM de muestras no digeridas y digeridas con proteinasa K o colagenasa de muestras de (A) UBM, (B) SIS y (C) dermis. La concentración total de ácido nucleico se evaluó por absorbancia UV a 260 nm. La concentración de ADNbc se evaluó mediante el reactivo de cuantificación de ADNbc Picogreen. La variabilidad de un aislamiento a otro se representa mediante la desviación estándar. Los datos se presentan como medias  $\pm$  d.e.,  $n = 3$  aislamientos por muestra.

10 Figuras 2A-2D. La digestión enzimática de andamios de ECM descelularizados libera pequeñas moléculas de ARN. (A) Electroforesis en gel de agarosa de RNasa A, DNasa I o ácido nucleico no tratado extraído de UBM no digerida (control) y de digestiones de proteinasa K o colagenasa. (B) Electroferograma que representa el patrón de ARN pequeños del ácido nucleico extraído de UBM digerida con colagenasa antes (panel superior) y después (panel inferior) del tratamiento con DNasa I. (C) Electroferograma que representa el patrón de ARN pequeños de muestras digeridas con colagenasa después del tratamiento con DNasa I. (D) Las moléculas de ARN pequeñas en andamios biológicos están protegidas de la degradación por nucleasas.

15 Figuras 3A-3F. Identificación de nanovesículas insertadas en la ECM. Las imágenes de TEM de UBM hidratada se tiñeron positivamente con osmio a medida que se identificaron estructuras redondeadas (A). La digestión enzimática con proteasa pepsina dio como resultado la digestión parcial ya que las MBV quedan atrapadas dentro de las fibras. La digestión completa con colagenasa o proteinasa K dio como resultado la separación completa de las MBV de las fibras de la ECM, como se evidencia en las imágenes de TEM (B). La ECM digerida con proteinasa K (100 mg) de tres productos comerciales y producidos en laboratorio (C) pone de manifiesto la presencia de MBV insertadas dentro de la ECM en todas las muestras. La carga distintiva de proteínas de las MBV se evaluó utilizando SDS-page Silverstain para productos de ECM. La proteína distintiva era diferente para cada muestra (D). El análisis de transferencia Western se realizó en dos marcadores de superficie exosomal CD-63 y CD-81. Los niveles de expresión no eran detectables en comparación con las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana y los controles de suero humano (E). La validación del tamaño de las MBV se midió mediante Nanosight. El tamaño de partículas era consistente con las MBV (F). Los datos se presentan como medias  $\pm$  d.e.,  $n = 1$ .

20 Figuras 4A-4C. Los datos de secuenciación de ARN pequeños ponen de manifiesto la presencia de miARN dentro de las nanovesículas, así como miARN comunes entre productos comerciales y productos paralelos fabricados en laboratorio (A). El análisis Ingenuity Pathway Analysis (IPA) pone de manifiesto que diferentes rutas de función celular (es decir, ciclo celular, muerte celular y crecimiento celular) están incluidas dentro de los miARN identificados asociados con (B).

25 Figuras 5A-5F. Captación de nanovesículas en C2C12 (A). Ensayos de extensión de neuritas utilizando células N1E-115 (B). Las PVSC ( $n = 3$ ) tuvieron un cambio significativo en la morfología que afectaba a su movilidad como se ve en el ensayo de raspado (C). Se utilizó un hemocitómetro para cuantificar el aumento observado en el número de células (D). Las nanovesículas aisladas de bioandamios de UBM promueven un fenotipo constructivo de macrófagos M2. (E) Se aisló médula ósea de ratones C57bl/6 y se cultivó en medios suplementados con factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) para derivar macrófagos. Los macrófagos se trataron con IFN $\gamma$  20 ng/ml y LPS 100 ng/ml para derivar macrófagos M1, IL-4 20 ng/ml para derivar macrófagos M2 y 5  $\mu$ g/ml (proteína/volumen) de exosomas aislados de una fuente de UBM. Los macrófagos se fijaron y se inmunomarcaron para el marcador pan-macrófago (F4/80) e indicadores fuertes del fenotipo M1 (iNOS) y M2 (Fizz1). Los macrófagos tratados con nanovesículas son predominantemente F4/80+ Fizz1+, lo que indica un fenotipo "tipo" M2. (F) La expresión génica en THP-1 se altera mediante la transducción de exosomas de UBM. A: Las THP-1 se transdujeron con exosomas aislados de UBM ( $n = 3$ ) y la expresión génica se evaluó 24 horas después mediante qPCR para los marcadores asociados tanto a M1 como a M2 (iNOS, TNFa, STAT1, STAT2, STAT5A, STAT5B, IRF3, IRF4, IRF5, IL1RN, CD206, TGM2, STAT3, STAT6, KLF4, PPARg). La dosis de exposición a nanovesículas para todos los experimentos anteriores fue de 50  $\mu$ g/ml (proteína/volumen).

30 Figura 6. Tabla que muestra lecturas de mir-145p en secuenciación profunda en diferentes fuentes. Mir-145-5p no se expresa altamente en exosomas de plasma, orina, medios celulares o células, excepto en los asociados con la matriz extracelular (fibroblastos). Se expresa en todos los tejidos en diferentes proporciones, así como en los exosomas aislados de andamios de matriz extracelular. Se utilizó la presencia de Let-7b-5p como control. Las referencias son Huang et al. *BMC Genomics*. 2013;14:319. doi:10.1186/1471-2164-14-319; Ben-Dov et al., *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0147249. doi:10.1371/journal.pone.0147249; Ji et al., *PLoS ONE*. 2014;9(10):e110314. doi:10.1371/journal.pone.0110314; Stevanato et al., *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0146353. doi:10.1371/journal.pone.0146353; Kuchen et al., *Immunity*. 2010;32(6):828-839. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.009.

35 Figura 7. Perfil de expresión de Mir-145 entre diferentes tejidos y líneas celulares. Mir-145 se expresa altamente en tejidos normales. Se expresa en menor grado en tumores. No se expresa en tumores de células T o B, ni en líneas

celulares específicas. Se muestra la SEQ ID NO: 1.

Figuras 8A y 8B. Diagramas esquemáticos que muestran un método de aislamiento adicional. Se proporcionan detalles adicionales de este método en el Ejemplo 7.

5 Figuras 9A y 9B. A. Aislamiento con KCl. La adición de KCl permite el aislamiento de nanovesículas unidas a matriz (MBV) de la ECM con ultracentrifugación, sin embargo, no se observan diferencias ni beneficios al aumentar la concentración de KCl. (ns = sin diferencias significativas, \* =  $p < 0.05$ ) B. TEM de MBV aisladas con la adición de KCl 0.2 M a PBS.

10 Figura 10. Cuantificación de ARN. Se cuantificó la cantidad de ARN antes y después del tratamiento con RNasa para nanovesículas unidas a matriz (MBV) aisladas mediante tres métodos diferentes. No hubo diferencia entre la cantidad de MBV cuando se usó proteinasa K (basado en enzima) y KCl (aislamiento con sal); sin embargo, hubo un mayor rendimiento cuando se usó colagenasa.

15 Figuras 11A-11B. Sal y Ultrafiltración. A. Se comparó la cantidad de MBV aisladas por ultracentrifugación (UC) con colagenasa 0.1 con las MBV aisladas con KCl tanto con UC como con ultrafiltración (UF). La ECM sedimentada después de la exposición a KCl 0.8 M se dirigió luego con colagenasa a 0.1 mg/ml, lo que muestra que todavía quedan MBV en la ECM después del tratamiento con KCl. KCl y ultrafiltración proporcionaron el mayor rendimiento de MBV, 4 veces más que otros métodos. Entre paréntesis, cantidad inicial de material ECM B. La distribución del tamaño de las partículas de MBV aisladas con KCl 0.8 M y ultrafiltración medida con Nanosight muestra partículas de 10-300 nm de tamaño.

20 Figuras 12A-12B. Efecto del KCl. A. Las MBV se aislaron resuspendiendo la ECM en agua, PBS y PBS con una concentración creciente de KCl. Se usó ultrafiltración para aislar el sedimento final. Las MBV se podían aislar con PBS y PBS con KCl; sin embargo, resuspender la ECM en agua PBS no produjo ninguna MBV. B. Las MBV se aislaron resuspendiendo la ECM en PBS, tampón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y tampón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y con KCl 0.4 M. Las MBV aisladas con PBS se suspendieron tanto en PBS como en agua con la misma cantidad de MBV, lo que demuestra que las MBV son viables y no estallan en el agua. No se pueden aislar MBV con tampón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por sí solo, sin embargo, la adición de KCl produjo MBV que muestran que es la adición de sal la responsable del aislamiento.

25 Figuras 13A-13B. Expresión génica de macrófagos derivados de la médula ósea después de 24 horas de exposición a MBV de colagenasa y KCl en 30 y 60  $\mu\text{l}$  por ml. Las MBV aisladas de la colagenasa y las MBV aisladas del KCl mostraron un patrón de expresión génica similar **A**. Sin embargo, las MBV aisladas de la colagenasa mostraron una mayor expresión de ARG e INOS **B**.

30 Figuras 14A-14D. Las MBV derivadas de bioandamios de ECM inhiben la viabilidad de las células de glioma. El efecto de la fracción soluble de la ECM o MBV sobre la viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT después de 24 horas de tratamiento. Células de glioma primario humano de grado alto (A), células de glioma primario humano de grado bajo (B), células de microglía humana (C) y células progenitoras neurales (D).

35 Figura 15. La fracción soluble de los bioandamios de ECM y las MBV derivadas de bioandamios de ECM inhiben la viabilidad de las células de cáncer de esófago. El ensayo de MTT evaluó la viabilidad de las células cancerosas.

40 Figuras 16A-16C. (A) Se sometieron 100 mg de UBM-ECM y SIS-ECM en polvo a digestión de 16 horas con solución de colagenasa 0.1 mg/ml. Los productos de degradación resultantes se sometieron luego a centrifugación progresiva para aislar las MBV. Luego se tomaron imágenes de las MBV purificadas resultantes con un aumento de 100 000 veces mediante microscopía electrónica de transmisión. (B) El contenido de ácido nucleico de las MBV aisladas se marcó utilizando Exo-Glow. Luego, las partículas marcadas se incubaron con macrófagos derivados de la médula ósea durante 4 horas y se tomaron imágenes usando microscopía de fluorescencia. Se utilizaron MBV marcadas en ausencia de células para establecer tiempos de exposición como control. (C) Un mapa térmico representativo que muestra los cambios en la expresión génica en respuesta al tratamiento. Las células se trataron con 1 ml de medio, así como con uno de los siguientes: (1)  $\text{IFN}\gamma$  20 ng/ml y LPS 100 ng/ml para promover un fenotipo  $\text{M}_{\text{IFN}\gamma+\text{LPS}}$  (tipo M1), (2) IL-4 20 ng/ml para promover un fenotipo  $\text{M}_{\text{IL-4}}$  (tipo M2), (3) 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de UBM-ECM o SIS-ECM para promover un fenotipo  $\text{M}_{\text{ECM}}$ , o (4) 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de UBM-MBV, o SIS-MBV para promover un fenotipo  $\text{M}_{\text{MBV}}$ . Se utilizaron pepsina (1 mg/ml) y colagenasa (0.1 mg/ml) como controles iniciales para la ECM y MBV, respectivamente.

50 Figura 17. Se recogieron macrófagos derivados de médula ósea de ratones C57bl/6 y se dejaron madurar a macrófagos. Luego, las células se trataron con una de las siguientes condiciones: (1)  $\text{IFN}\gamma$  20 ng/ml y LPS 100 ng/ml para promover un fenotipo  $\text{M}_{\text{IFN}\gamma+\text{LPS}}$  (tipo M1), (2) IL-4 20 ng/ml para promover un fenotipo  $\text{M}_{\text{IL-4}}$  (tipo M2), (3) 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de UBM-ECM o SIS-ECM para promover un fenotipo  $\text{M}_{\text{ECM}}$ , o (4) 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de UBM-MBV, o SIS-MBV para promover un fenotipo  $\text{M}_{\text{MBV}}$ . Se utilizaron pepsina (1 mg/ml) y colagenasa (0.1 mg/ml) como controles iniciales para la ECM y MBV, respectivamente. Luego las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 45 minutos. Utilizando anticuerpos primarios específicos de murino y anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo, se podía evaluar cualitativamente la expresión de la proteína diana. Se usó F4/80 como un marcador de panmacrófago, TNFa e iNOS se usaron como marcadores de tipo M1, y Fizz1 y Arginasa1 se usaron como marcadores de tipo M2. Los tiempos de exposición se establecieron utilizando controles de isotipo y citoquinas apropiados y se mantuvieron constantes en todo momento.

Figura 18A-18C. El tratamiento con MBV supera los efectos de la ECM en los ensayos funcionales de BMDM. Los macrófagos se expusieron durante 24 h al control de MCSF, ECM 250 mg/ml, MBV 25 mg/ml o los controles de citoquinas IFN $\gamma$ +LPS o IL-4. (A) Los líquidos sobrenadantes de macrófagos se mezclaron con sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5% durante 10 minutos, seguido de la adición de dihidrocloruro de N-1-naftiletildiamina (NED) al 0.1% en agua. Las soluciones se leyeron en un espectrofotómetro a 540 nm y se compararon con la curva de calibración de nitrito de sodio para evaluar los niveles de producción de óxido nítrico. (B) Los macrófagos tratados se incubaron con el kit de fagocitosis Vybrant de perlas de *E. coli* marcadas con FITC durante 2 horas. Las células se fijaron y tiñeron con DAPI. Utilizando microscopía de fluorescencia, las células se visualizaron y cuantificaron para determinar la intensidad media de fluorescencia de las células utilizando el software Cell Profiler. (C) Los macrófagos se trataron durante 18 horas con ECM 250 mg/ml, MBV 25 mg/ml o los controles de citoquinas IFN $\gamma$  + LPS o IL4. Todos los macrófagos tratados se lavaron con PBS y se incubaron con medio sin suero y sin antibióticos durante 5 horas. Se recogió el medio que contenía los productos secretados de los macrófagos y se utilizó en una relación 1:10 con caldo de soja triptico y  $1 \times 10^4$  UFC/ml de *S. aureus*. El crecimiento bacteriano se evaluó midiendo la absorbancia a 570 nm. (Valores: Absorbancia media  $\pm$  Desviación estándar, N=4, \*p<0.05).

Figura 19A-19E. Inhibición de miARN de macrófagos (A-C) Inhibición selectiva de miARN específicos, miR-145-5p, miR-145-3p y miR-125b-5p utilizando 50 nM de inhibidor para cada uno. La abundancia relativa de los niveles de miARN después de la inhibición se determinó mediante ensayos de qPCR de miARN TaqMan. (D) Análisis de expresión génica de células expuestas a MBV o transfectadas con inhibidor de miARN de control desordenado, inhibidor de mmu-miR-145-5p, inhibidor de mmu-miR-143-3p, inhibidor de mmu-miR-125b-5p o una combinación de los tres inhibidores se evaluó usando qPCR. Los resultados se presentan en forma de mapa de calor utilizando el software Tree-view; todos los cambios son con respecto al control de medio. El sistema de puntuación de la barra de escala se demuestra de la siguiente manera: menos de 0.1 veces de cambio (-3), 0.1-0.29 veces de cambio (-2), 0.3-0.69 (-1), 0.7-1.29 (0), 1.3-1.9 (+1), 2.0-4.9 (+2), mayor que 5.0 (+3). (E) Se expusieron BMDM durante 4 h a 50 nM de uno de los siguientes: control desordenado, inhibidor de mmu-miR-125b-5p, inhibidor de mmu-miR-143-3p, mmu-miR-145-5p o una combinación de los tres (mezcla). Luego se cambió el medio de tratamiento a medio de crecimiento normal durante 18 horas adicionales. Luego las células se fijaron con PFA al 4%. Luego, las células se incubaron con anticuerpo anti-murino para marcadores del fenotipo de tipo M1 TNF $\alpha$  e iNOS, o marcadores del fenotipo de tipo M2 Fizz1 y Arginasa1. Los tiempos de exposición se establecieron basándose en un control de isotipo negativo y controles tratados con citoquinas y se mantuvieron constantes para cada marcador analizado. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Las imágenes se tomaron con un aumento de 200X. Los resultados muestran que la inhibición de miARN es capaz de afectar a la expresión de varias proteínas detectadas, lo que implica el papel de miR-125b-5p, miR-143-3p y miR-145-5p en la formación del fenotipo M<sub>MBV</sub>.

### Descripción detallada

Identificadas por primera vez mediante microscopía electrónica en 1967 como un producto de las plaquetas (Wolf, Br. *J. Haematol.* 1967;13:269-288; Hargett et al., *Pulm Circ.* 2013; 3(2):329-40) las vesículas extracelulares (EV) son potentes vehículos de comunicación intercelular debido a su capacidad para transferir ARN, proteínas, enzimas y lípidos, afectando así a diversos procesos fisiológicos y patológicos. La producción y liberación de EV está evolutivamente conservada tanto en organismos procariontes como eucariotes, lo que subraya la importancia de los procesos mediados por vesículas en la fisiología celular (Deatherage y Cookson, *Infect Immun.* junio de 2012; 80(6): 1948-1957). Las EV son vesículas de tamaño nanométrico unidas a la matriz con diámetros que varían de 50-1000 nm y se clasifican en tres grupos principales: nanovesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos, según su tamaño, origen y modo de liberación (Nawaz et al., *Nat Rev Urol.* 2014;11(12):688-701; van der Pol et al., *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):676-705).

Las EV son secretados por una variedad de tipos diferentes de células en diversas condiciones fisiológicas y se han identificado en fluidos biológicos que incluyen saliva, orina, líquido de lavado nasal y bronquial, líquido amniótico, leche materna, plasma, suero y líquido seminal (Yanez-Mo et al., *J Extracell Vesicles.* 2015; 4:27066). Aunque se han identificado EV en fluidos corporales y líquidos sobrenadantes de cultivos celulares, las EV son capaces de anclarse a los constituyentes de la ECM mediante la presencia de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 e integrinas, tales como la integrina  $\alpha$ M y las integrinas  $\beta$ 2 (Escola et al., *J. Biol. Chem.* 1998;273 20121-20127; They et al., *J. Cell Biol.* 1999;147:599-610; They et al., *J. Immunol.* 2001;166: 7309-7318).

También se ha mostrado que las "vesículas de matriz" se anclan selectivamente a la matriz ósea, de cartílago y predeentina (Anderson, *J Cell Biol.* 1969;41:59-72; Anderson, *Curr Rheumatol Rep.* 2003;5:222-226). Más apropiadamente descritas como vesículas de calcificación, estas nanopartículas de membrana son el producto de condrocitos, osteoblastos y odontoblastos, y se ha mostrado que sirven como el sitio inicial de calcificación en todos los tejidos esqueléticos (Anderson, *Clin Orthop Relat Res.* 1995; (314):266-80). Sin embargo, aún no está claro si las vesículas de la matriz participan en la señalización intercelular similar a los exosomas y las microvesículas (Sharpiro et al., *Bone.* 2015;79:29-36). En el presente documento se describe el sorprendente hallazgo de nanovesículas estrechamente unidas dentro de la matriz intersticial del tejido blando, y específicamente dentro de la matriz de bioandamios acelulares, en concreto la matriz extracelular (ECM). Estos bioandamios se preparan mediante la eliminación de células (descelularización) de tejidos fuente tales como la vejiga urinaria, la dermis y la submucosa del intestino delgado utilizando métodos específicamente diseñados para lisar/romper las membranas celulares y posteriormente eliminar los restos celulares. Estas nanovesículas se pueden utilizar en medicina regenerativa y

estrategias de ingeniería de tejidos (De Jong et al., *Front Immunol.* 2014;5:608; Malda et al.; *Nat Rev Rheumatol.* 2016 (Epub antes de impresión); Lamichhane et al., *Tissue Eng Part B Rev.* 2015;21(1):45-54). Además de su posible uso terapéutico en la reparación de tejidos, la composición, carga y mecanismo de liberación regulada proporcionan implicaciones novedosas para su utilidad como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico para el seguimiento de procesos fisiológicos y patológicos.

En el presente documento se describe que las nanovesículas, específicamente exosomas, están insertadas dentro de, y unidas a, bioandamios de ECM producidos en laboratorio y bioandamios de ECM disponibles comercialmente. Se determinó el contenido de estas nanovesículas y se documentó que afectan de manera diferencial a determinadas células diana. Los estudios descritos documentan que las composiciones farmacéuticas que incluyen estas nanovesículas derivadas de ECM se pueden utilizar para diseñar bioandamios y dispositivos médicos. Estas composiciones farmacéuticas también se pueden usar para dirigirse al crecimiento, migración y otras propiedades biológicas de poblaciones de células diana específicas.

#### Términos

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se utilizan según el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de esta descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

**Administración:** La introducción de una composición en un sujeto por una vía elegida. La vía puede ser local o sistémica. Por ejemplo, si la vía elegida es intravenosa, la composición se administra introduciendo la composición en una vena del sujeto. Si la vía elegida es local, la composición se puede administrar introduciendo la composición en el tejido.

**Alterar:** Un cambio estadísticamente significativo en una cantidad efectiva o propiedad de una sustancia de interés, tal como una célula, polinucleótido o polipéptido. El cambio puede ser un aumento o una disminución. La alteración puede ser *in vivo* o *in vitro*. En varias realizaciones, alterar una cantidad eficaz de una sustancia es al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de aumento o disminución de la cantidad (nivel) eficaz de una sustancia, la proliferación y/o supervivencia de unas células, o la actividad de una proteína tal como una enzima.

**Adenocarcinoma:** Un tipo de tumor maligno que puede ocurrir en varias partes del cuerpo. Es una neoplasia de tejido epitelial que tiene origen glandular, características glandulares o ambas.

**Apoptosis:** Un proceso de muerte celular programada que ocurre en organismos multicelulares. La apoptosis incluye cambios celulares característicos (morfología) y muerte. Estos cambios incluyen ampollas, contracción celular, fragmentación nuclear, condensación de cromatina, fragmentación del ADN cromosómico y degradación del ARNm global.

**Biocompatible:** Cualquier material que, cuando se implanta en un sujeto mamífero, no provoca una respuesta adversa en el sujeto. Un material biocompatible, cuando se introduce en un individuo, es capaz de realizar la función prevista y no es tóxico ni perjudicial para ese individuo, ni induce el rechazo inmunológico del material en el sujeto.

**Bioandamio:** Un andamio, generalmente un soporte sólido o un gel, que es biocompatible.

**Cáncer:** Un tumor benigno o maligno que ha sufrido anaplasia característica con pérdida de diferenciación, aumento de la tasa de crecimiento, invasión del tejido circundante y es capaz de metástasis. Por ejemplo, el cáncer de tiroides es un tumor que surge en o del tejido tiroideo, y el cáncer de esófago es un tumor que surge en o del tejido esofágico. El cáncer residual es un cáncer que permanece en un sujeto después de cualquier forma de tratamiento administrado al sujeto para reducir o erradicar el cáncer. El cáncer metastásico es un tumor en uno o más sitios del cuerpo distintos del sitio de origen del cáncer original (primario) del cual deriva el cáncer metastásico. El cáncer incluye, pero no se limita a, tumores sólidos.

**ADNc (ADN complementario):** Un fragmento de ADN que carece de segmentos internos no codificantes (intrones) y secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El ADNc se sintetiza en el laboratorio mediante transcripción inversa a partir del ARN mensajero extraído de las células. El ADNc también puede contener regiones no traducidas (UTR) que son responsables del control de la traducción en la molécula de ARN correspondiente.

**Centrifugación:** El procedimiento mediante el cual se aplica una fuerza centrífuga a una mezcla, mediante el cual los componentes más densos de la mezcla se alejan del eje de la centrífuga en relación con otros componentes menos densos de la mezcla. La fuerza que se aplica a la mezcla es función de la velocidad del rotor de la centrífuga y del radio de giro. En la mayoría de las aplicaciones, la fuerza del giro dará como resultado un precipitado (un sedimento) que se acumula en el fondo del tubo de centrífuga, donde la solución restante se denomina propiamente un

"sobrenadante" o "líquido sobrenadante". En otras aplicaciones similares, se utiliza una técnica de separación basada en densidad o "centrifugación en gradiente" para aislar una especie particular de una mezcla que contiene componentes que son más y menos densos que el componente deseado.

5 Durante el movimiento circular de un rotor de centrifuga, la fuerza que se aplica es el producto del radio y la velocidad angular del giro, donde la fuerza se expresa tradicionalmente como una aceleración con respecto a "g", la aceleración estándar debida a la gravedad en la superficie de la tierra. La fuerza centrífuga que se aplica se denomina "fuerza centrífuga relativa" (RCF) y se expresa en múltiplos de "g".

10 Quimioterapia; agentes quimioterapéuticos: Tal como se utiliza en el presente documento, cualquier agente químico con utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular anormal. Tales enfermedades incluyen tumores, neoplasias y cáncer, así como enfermedades caracterizadas por un crecimiento hiperplásico tales como la psoriasis. En una realización, un agente quimioterapéutico es un agente de uso en el tratamiento de neoplasias tales como tumores sólidos. En una realización, un agente quimioterapéutico es una molécula radiactiva. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente un agente quimioterapéutico de uso (p. ej., véase Slapak y Kufe, *Principles of Cancer Therapy*, Capítulo 86 en *Principles of Internal Medicine* de Harrison, 14.<sup>a</sup> edición; Perry et al., *Chemotherapy*, Capítulo. 17 en Abeloff, *Clinical Oncology* 2.<sup>a</sup> ed., © 2000 Churchill Livingstone, Inc.; Baltzer L., Berkery R. (eds): *Oncology Pocket Guide to Chemotherapy*, 2.<sup>a</sup> ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer DS, Knobf MF, Durivage HJ (eds): *The Cancer Chemotherapy Handbook*, 4.<sup>a</sup> ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993). Los agentes quimioterapéuticos incluyen los conocidos por los expertos en la técnica, incluidos, pero no limitados a: 5-fluorouracilo (5-FU), azatioprina, ciclofosfamida, antimetabolitos (tales como fludarabina), antineoplásicos (tales como etopósido, doxorubicina, metotrexato y vincristina), carboplatino, cisplatino y los taxanos, tales como el taxol. La rapamicina también se ha utilizado como agente quimioterapéutico.

Poner en contacto: Poner en asociación física directa. Incluye tanto en forma sólida como líquida.

25 Citoquina: El término "citoquina" se utiliza como nombre genérico para un grupo diverso de proteínas y péptidos solubles que actúan como reguladores humorales en concentraciones nanomolares y picomolares y que, ya sea en condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de células y tejidos individuales. Estas proteínas también median las interacciones entre células directamente y regulan los procesos que tienen lugar en el entorno extracelular. Los ejemplos de citoquinas incluyen, pero no se limitan a, factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , interleucina (IL)-6, IL-10, IL-12, factor de crecimiento transformante e interferón- $\gamma$ .

30 Variante degenerada: Un polinucleótido que codifica un polipéptido, tal como un polipéptido PDGF, que incluye una secuencia que está degenerada como resultado del código genético. Hay 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales están especificados por más de un codón. Por lo tanto, se incluyen todas las secuencias de nucleótidos degeneradas siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos no se modifique.

35 Diferenciación: Se refiere al proceso mediante el cual células relativamente no especializadas (p. ej., células embrionarias) adquieren propiedades estructurales y/o funcionales especializadas características de las células maduras. De manera similar, "diferenciar" se refiere a este proceso. Normalmente, durante la diferenciación, la estructura celular y la capacidad funcional se alteran y aparecen proteínas y moléculas no proteicas específicas de tejido.

40 ADN (ácido desoxirribonucleico): El ADN es un polímero de cadena larga que comprende el material genético de la mayoría de los organismos vivos (algunos virus tienen genes que comprenden ácido ribonucleico (ARN)). Las unidades que se repiten en los polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales comprende una de las cuatro bases, adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T), unidas a un azúcar desoxirribosa al que se une un fosfato. Los tripletes de nucleótidos (denominados codones) codifican cada aminoácido de un polipéptido o una señal de parada. El término codón también se utiliza para las secuencias correspondientes (y complementarias) de tres nucleótidos en el ARNm en el que se transcribe la secuencia de ADN.

45 A menos que se especifique lo contrario, cualquier referencia a una molécula de ADN pretende incluir el complemento inverso de esa molécula de ADN. Excepto cuando el texto del presente documento requiera una sola cadena sencilla, las moléculas de ADN, aunque escritas para representar solo una cadena sencilla, abarcan ambas cadenas de una molécula de ADN bicatenaria. Por lo tanto, una referencia a la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína específica, o un fragmento de la misma, abarca tanto la cadena de sentido directo como su complemento inverso. Por ejemplo, es apropiado generar sondas o cebadores a partir de la secuencia del complemento inverso de las moléculas de ácido nucleico descritas.

55 Enriquecido: Un procedimiento mediante el cual un componente de interés, tal como una nanovesícula, que está en una mezcla tiene una proporción mayor de la cantidad de ese componente con respecto a la cantidad de otros componentes no deseados en esa mezcla después del procedimiento de enriquecimiento en comparación con antes del procedimiento de enriquecimiento.

Matriz extracelular (ECM): Una mezcla compleja de biomoléculas y/o biomacromoléculas estructurales y funcionales que incluyen, pero no se limitan a, proteínas estructurales, proteínas especializadas, proteoglicanos, glucosaminoglucanos y factores de crecimiento que rodean y dan soporte a las células dentro de los tejidos y, a menos

que se indique lo contrario, es acelular. Se puede considerar que las preparaciones de ECM están "descelularizadas" o son "acelulares", lo que significa que las células se han eliminado del tejido fuente mediante procedimientos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. El "material derivado de ECM", tal como una "nanovesícula derivada de ECM", "nanovesícula unida a matriz" o "nanovesícula derivada de una ECM" es una nanovesícula que se prepara a partir de una ECM natural o de una fuente in vitro en donde la ECM se produce mediante células cultivadas y comprende uno o más componentes poliméricos (constituyentes). Las nanovesículas derivadas de ECM se definen a continuación.

Expresado: La traducción de una secuencia de ácido nucleico en una proteína. Las proteínas pueden expresarse y permanecer intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de la superficie celular o ser secretadas en la matriz o el medio extracelular.

Secuencias de control de expresión: Secuencias de ácidos nucleicos que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga a la que está operativamente unida. Las secuencias de control de la expresión están unidas operativamente a una secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias de control de la expresión controlan y regulan la transcripción y, según sea apropiado, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Por lo tanto, las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción apropiados, un codón de inicio (ATG) delante de un gen que codifica una proteína, señal de corte y empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción adecuada del ARNm, y codones de parada. Se pretende que la expresión "secuencias de control" incluya, como mínimo, componentes cuya presencia pueda influir en la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión. Las secuencias de control de expresión pueden incluir un promotor.

Gel: Un estado de la materia entre líquido y sólido, y generalmente se define como una red polimérica reticulada hinchada en un medio líquido. Normalmente, un gel es una dispersión coloidal de dos fases que contiene tanto sólido como líquido, en donde la cantidad de sólido es mayor que la de la dispersión coloidal de dos fases denominada "sol". Así pues, un "gel" tiene algunas de las propiedades de un líquido (es decir, la forma es resiliente y deformable) y algunas de las propiedades de un sólido (por ejemplo, la forma es lo suficientemente discreta como para mantener tres dimensiones en una superficie bidimensional). El "tiempo de gelificación", también denominado "tiempo de gel", se refiere al tiempo que tarda una composición en dejar de fluir bajo una tensión moderada.

Glioma: Tumor que surge de las células gliales. Los gliomas incluyen ependimomas, astrocitomas, oligodendrogliomas, gliomas del tronco del encéfalo, gliomas del nervio óptico y gliomas mixtos. Los gliomas se pueden caracterizar por grado. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los gliomas en grados I-IV. Los gliomas de bajo grado (grado II de la OMS) están bien diferenciados (no anaplásicos), presentan tendencias benignas y generalmente tienen un mejor pronóstico. Sin embargo, pueden reaparecer y aumentar de grado con el tiempo, por lo que se clasifican como malignos. Los gliomas de grado alto (grados III-IV de la OMS) son indiferenciados o anaplásicos. Los gliomas de grado alto son malignos y tienen un mal pronóstico. Los gliomas son supratentoriales (por encima del tentorio, en el cerebro y se encuentran principalmente en adultos), infratentoriales (debajo del tentorio, en el cerebelo y se encuentran principalmente en niños) o pontinos (ubicados en la protuberancia del tronco del encéfalo). Los síntomas de los gliomas dependen de dónde se encuentre el tumor dentro del sistema nervioso central afectado. Los síntomas de un glioma cerebral son dolores de cabeza, vómitos, convulsiones y trastornos de los nervios craneales. Un síntoma de un glioma del nervio óptico es la pérdida de visión. Los síntomas de los gliomas de la médula espinal son dolor, debilidad o entumecimiento en las extremidades. Generalmente, los gliomas se diseminan a través del líquido cefalorraquídeo y pueden provocar "metástasis en gota" en la médula espinal.

Factor de crecimiento: Sustancia que promueve el crecimiento, supervivencia y/o diferenciación celular. Los factores de crecimiento incluyen moléculas que funcionan como estimuladores del crecimiento (mitógenos), moléculas que funcionan como inhibidores del crecimiento (p. ej., factores de crecimiento negativos), factores que estimulan la migración celular, factores que funcionan como agentes quimiotácticos o inhiben la migración celular o la invasión de células tumorales, factores que modulan funciones diferenciadas de las células, factores implicados en la apoptosis o factores que promueven la supervivencia de las células sin influir en el crecimiento y la diferenciación. Ejemplos de factores de crecimiento son un factor de crecimiento de fibroblastos (tal como FGF-2), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), y factor de crecimiento nervioso (NGF) y activa-A.

Inhibir (o tratar) una enfermedad: Inhibir el desarrollo completo de una enfermedad o afección o acelerar la curación. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de que ha comenzado a desarrollarse. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mejorar", con referencia a una enfermedad o afección patológica, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El efecto beneficioso puede ponerse de manifiesto, por ejemplo, mediante un retraso en la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad en un sujeto susceptible, una reducción de la gravedad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad, tales como dolor, un tiempo de recuperación más corto o una mejora en la salud o bienestar general del sujeto, o por otros parámetros bien conocidos en la técnica que son específicos de la enfermedad particular.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico, célula proteica o nanovesícula) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en la célula del organismo o la ECM, en la

que el componente se produce de forma natural. Los ácidos nucleicos y las proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante métodos de purificación convencionales. Las nanovesículas que se han aislado se separan de los materiales fibrosos de la ECM. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedante, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

5 Marcador: Un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con otra molécula, tal como un anticuerpo o una proteína, o que puede incluirse en una nanovesícula, o unirse a una nanovesícula, para facilitar la detección. Ejemplos específicos, no limitantes, de marcadores incluyen marcadores fluorescentes, enlaces enzimáticos e isótopos radiactivos.

10 Macrófago: Un tipo de glóbulo blanco que fagocita y degrada desechos celulares, sustancias extrañas, microbios y células cancerosas. Además de su papel en la fagocitosis, estas células desempeñan un papel importante en el desarrollo, el mantenimiento y la reparación de tejidos, y en la inmunidad tanto innata como adaptativa, ya que reclutan e influyen en otras células, incluidas las células inmunitarias como los linfocitos. Los macrófagos pueden existir en muchos fenotipos, incluidos los fenotipos a los que se hace referencia como M1 y M2. Los macrófagos que realizan funciones principalmente proinflamatorias se denominan macrófagos M1 (CD86+/CD68+), mientras que los macrófagos que disminuyen la inflamación y estimulan y regulan la reparación de tejidos se denominan macrófagos M2 (CD206+/CD68+). Los marcadores que identifican los distintos fenotipos de macrófagos varían entre especies. Cabe señalar que el fenotipo de macrófago está representado por un espectro que varía entre los extremos de M1 y M2.

20 Mamífero: Este término incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De manera similar, el término "sujeto" incluye tanto sujetos humanos como veterinarios.

Metástasis: Propagación del cáncer de un lugar a otro del cuerpo. La metástasis se produce mediante una serie compleja de etapas en las que las células cancerosas abandonan el sitio del tumor original y migran a través del torrente sanguíneo, sistema linfático, líquido cefalorraquídeo o por extensión.

25 MicroARN: Un ARN no codificante pequeño que tiene de aproximadamente 17 a aproximadamente 25 bases de nucleótidos de longitud, que regula postranscripcionalmente la expresión génica reprimiendo típicamente la traducción del ARNm objetivo. Un miARN puede funcionar como reguladores negativos, de modo que mayores cantidades de un miARN específico se correlacionen con niveles más bajos de expresión del gen diana. Hay tres formas de miARN: miARN primarios (pri-miARN), miARN prematuros (pre-miARN) y miARN maduros. Los miARN primarios (pri-miARN) se expresan como transcritos estructurados en tallo-bucle de aproximadamente unos pocos cientos de bases hasta más de 1 kb. Los transcritos de pri-miRNA son escindidos en el núcleo por una endonucleasa RNasa II llamada Drosha que escinde ambas hebras del tallo cerca de la base del tallo-bucle. Drosha escinde el dúplex de ARN con cortes escalonados, dejando un fosfato 5' y saliente de 2 nucleótidos en el extremo 3'. El producto de escisión, el miARN prematuro (pre-miARN), tiene una longitud de aproximadamente 60 a aproximadamente 110 nucleótidos con una estructura en horquilla formada en forma de plegado hacia atrás. El pre-miARN es transportado desde el núcleo al citoplasma por Ran-GTP y Exportina-5. Los pre-miARN son procesados más en el citoplasma por otra endonucleasa RNasa II llamada Dicer. Dicer reconoce el fosfato 5' y el saliente 3', y escinde el bucle en la unión tallo-bucle para formar dúplex de miARN. El dúplex de miARN se une al complejo silenciador inducido por ARN (RISC), donde la cadena de sentido contrario preferiblemente se degrada y el miARN maduro de cadena de sentido directo dirige RISC a su sitio diana. Es el miARN maduro la forma biológicamente activa del miARN y tiene una longitud de aproximadamente 17 a aproximadamente 25 nucleótidos.

45 Nanovesícula: Una vesícula extracelular que es una nanopartícula de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 nm de diámetro. Las nanovesículas son partículas unidas a membrana lipídica que transportan moléculas de señalización biológicamente activas (p. ej., microARN, proteínas), entre otras moléculas. Generalmente, la nanovesícula está limitada por una bicapa lipídica, y las moléculas biológicas están encerradas y/o pueden estar insertadas en la bicapa. Por lo tanto, una nanovesícula incluye una luz rodeada por membrana plasmática. Los diferentes tipos de vesículas se pueden distinguir según el diámetro, origen subcelular, densidad, forma, velocidad de sedimentación, composición lipídica, marcadores proteínas, contenido de ácidos nucleicos y el origen, tal como por ejemplo de la matriz extracelular o secretadas. Una nanovesícula se puede identificar por su origen, tal como una nanovesícula unida a matriz de una ECM (véase antes) y/o el contenido de miR.

50 Un "exosoma" es una vesícula membranosa que es secretada por una célula y su diámetro varía de 10 a 150 nm. Generalmente, los endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares contienen vesículas intraluminales que se forman por la gemación hacia dentro y escisión de vesículas de la membrana endosomal limitada en estas nanovesículas encerradas. Estas vesículas intraluminales luego se liberan desde la luz del cuerpo multivesicular al entorno extracelular, típicamente a un fluido corporal tal como sangre, líquido cefalorraquídeo o saliva, durante la exocitosis tras la fusión con la membrana plasmática. Un exosoma se crea intracelularmente cuando un segmento de membrana se invagina y endocitosa. Los segmentos internalizados que se rompen en vesículas más pequeñas y finalmente se expulsan de la célula contienen proteínas y moléculas de ARN tales como ARNm y miARN. Los exosomas derivados del plasma carecen en gran medida de ARN ribosómico. Los exosomas derivados de la matriz extracelular incluyen miARN específicos y componentes proteicos, y se ha demostrado que están presentes en prácticamente todos los fluidos corporales, tales como sangre, orina, saliva, semen y líquido cefalorraquídeo.

Una "nanovesícula derivada de una ECM", "nanovesícula unida a matriz" o una "nanovesícula derivada de ECM" son partículas unidas a membrana que varían en tamaño de 10 nm-1000 nm, presentes en la matriz extracelular, que contienen moléculas de señalización biológicamente activas tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, factores de crecimiento y citoquinas que influyen en el comportamiento celular. Los términos son intercambiables y se refieren a las mismas vesículas. Estas nanovesículas están insertadas dentro de la ECM y unidas a ella y no están solo adheridas a la superficie. Estas nanovesículas son resistentes a condiciones de aislamiento duras, tales como congelación, descongelación y digestión con proteasas tales como pepsina, elastasa, hialuronidasa, proteinasa K y colagenasa, y digestión con detergentes. Generalmente, estas nanovesículas están enriquecidas en miR-145 y opcionalmente miR-181, miR-143 y miR-125, entre otros. Estas nanovesículas no expresan CD63 o CD81, o expresan niveles apenas detectables de estos marcadores (CD63<sup>bajo</sup>CD81<sup>bajo</sup>). La ECM puede ser una ECM de un tejido, puede producirse a partir de células en cultivo o puede adquirirse de una fuente comercial.

Ácido nucleico: Un polímero compuesto de unidades de nucleótidos (ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, variantes estructurales relacionadas de origen natural y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos) unidas mediante enlaces fosfodiéster, variantes estructurales relacionadas de origen natural y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos. Así, el término incluye polímeros de nucleótidos en los que los nucleótidos y los enlaces entre ellos incluyen análogos sintéticos de origen no natural, tales como, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil-ribonucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y similares. Dichos polinucleótidos se pueden sintetizar, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado. El término "oligonucleótido" normalmente se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente no mayores de aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos está representada por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que "U" reemplaza a "T."

En este documento se utiliza la notación convencional para describir secuencias de nucleótidos: el extremo izquierdo de una secuencia de nucleótidos monocatenaria es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de una secuencia de nucleótidos bicatenaria se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de nucleótidos de 5' a 3' a los transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina "cadena codificante". Las secuencias en una secuencia de ácido nucleico que están situadas en 5' con respecto a la secuencia de interés se denominan "secuencias secuencia arriba"; las secuencias de una secuencia de nucleótidos que están situadas 3' con respecto a la secuencia de interés se denominan "secuencias secuencia abajo".

"Codificante" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (por ejemplo, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de la misma. Por tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm producido por ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y generalmente se proporciona en listas de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como molde para la transcripción, de un gen o ADNc pueden denominarse codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc. A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

"Ácido nucleico recombinante" se refiere a un ácido nucleico que tiene secuencias de nucleótidos que no están unidas entre sí de forma natural, tal como en un gen de tipo natural. Esto incluye vectores de ácido nucleico que comprenden un ácido nucleico amplificado o ensamblado que puede usarse para transformar una célula hospedante adecuada. En un ejemplo, un ácido nucleico recombinante es uno que tiene una secuencia que no es de origen natural o tiene una secuencia que se produce mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia que de otro modo estarían separados. Esta combinación artificial a menudo se logra mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos de ácidos nucleicos aislados, como por ejemplo mediante técnicas de ingeniería genética. Una célula hospedante que incluye el ácido nucleico recombinante se denomina "célula hospedante recombinante". Un ácido nucleico recombinante también puede desempeñar una función no codificante (tal como un promotor, origen de replicación, sitio de unión a ribosomas, etc.).

Una primera secuencia es de "sentido contrario" con respecto a una segunda secuencia si un polinucleótido cuya secuencia es la primera secuencia se hibrida específicamente con un polinucleótido cuya secuencia es la segunda secuencia. Por tanto, las dos secuencias son complementarias.

Unido operativamente: Una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente unida con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se pone en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

Vehículos farmacéuticamente aceptables: Los vehículos de uso farmacéuticamente aceptables son convencionales. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edición, 1975, describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de las proteínas de fusión descritas en el presente documento.

5 En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (p. ej., formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que se van a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes de tamponamiento del pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

15 Polímero: Moléculas compuestas de unidades monoméricas que se repiten, incluidos homopolímeros, copolímeros de bloque, copolímeros aleatorios y copolímeros de injerto. Los "polímeros" también incluyen polímeros lineales así como polímeros ramificados, incluyendo los polímeros ramificados polímeros altamente ramificados, dendríticos y en estrella. Un "iniciador de polimerización" se refiere a cualquier sustancia o estímulo que pueda iniciar la polimerización de monómeros o macrómeros mediante la generación de radicales libres. Los iniciadores de polimerización de ejemplo incluyen radiación electromagnética, calor y compuestos químicos.

20 Polipéptido: Cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de su longitud o modificación postraduccional (tal como glicosilación o fosforilación). Un "resto" se refiere a un aminoácido o mimético de aminoácido incorporado en un polipéptido mediante un enlace amida o un mimético de enlace amida, la "posición" del resto indica su lugar en la secuencia de aminoácidos. Un polipéptido tiene un extremo amino terminal (N-terminal) y un extremo carboxi terminal.

25 Una sustitución conservadora en un polipéptido es una modificación que implica la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares que no dan como resultado un cambio o pérdida de una función biológica o bioquímica del polipéptido y se denominan sustituciones "conservadoras". Es probable que estas sustituciones conservadoras tengan un impacto mínimo en la actividad de la proteína resultante. La Tabla 1 muestra aminoácidos que pueden sustituirse por un aminoácido original en una proteína y que se consideran sustituciones conservadoras.

Residuo original    Sustituciones conservadoras

Ala	ser
Arg	lys
Asn	gln; his
Asp	glu
Cys	ser
Gln	asn
Glu	asp
Gly	pro
His	asn; gln
Ile	leu; val
Leu	ile; val
Lys	arg; gln; glu
Met	leu; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu

Se pueden realizar uno o más cambios conservadores, o hasta diez cambios conservadores (tales como dos aminoácidos sustituidos, tres aminoácidos sustituidos, cuatro aminoácidos sustituidos o cinco aminoácidos sustituidos, etc.) en el polipéptido sin cambiar una función bioquímica de la proteína, tal como un factor de crecimiento o una citoquina.

5 Prevenir o tratar una enfermedad: "Prevenir" una enfermedad se refiere a inhibir el desarrollo parcial o total de una enfermedad, por ejemplo en una persona que se sabe que tiene predisposición a una enfermedad tal como un cáncer. Un ejemplo de una persona con predisposición conocida es alguien con antecedentes de cáncer de mama en la familia, o que ha estado expuesto a factores que predisponen al sujeto a una afección, tal como el melanoma. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de que ha comenzado a desarrollarse. En varias realizaciones, el tratamiento se refiere a una reducción del tamaño de un tumor, una disminución del número y/o tamaño de las metástasis o una disminución de un síntoma del tumor.

Proliferación: División de las células de tal manera que aumentan en número. El proceso de división celular se llama mitosis.

15 Promotor: Un promotor es una serie de secuencias de control de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales que pueden encontrarse hasta a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Se incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles (véase, p. ej., Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987).

20 Los ejemplos específicos, no limitantes, de promotores incluyen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, un promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, la repetición terminal larga del retrovirus; el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia). También se pueden utilizar promotores producidos mediante técnicas de ADN recombinante o sintéticas. Se puede insertar un polinucleótido en un vector de expresión que contiene una secuencia de promotor que facilita la transcripción eficaz de la secuencia genética insertada del hospedante. El vector de expresión normalmente contiene un origen de replicación, un promotor, así como secuencias de ácido nucleico específicas que permiten la selección fenotípica de las células transformadas.

25 Andamio: Una estructura, que normalmente comprende un material biocompatible, que proporciona una superficie adecuada para la adherencia y proliferación de células, y también proporciona estabilidad y soporte. Un andamio puede tener una forma o figura particular para así influir o delimitar una forma o figura tridimensional asumida por una población de células en proliferación. Tales formas o figuras incluyen, pero no se limitan a, películas (p. ej., una forma con dos dimensiones sustancialmente mayores que la tercera dimensión), cintas, cordones, láminas, discos planos, cilindros, esferas y formas amorfas. Los andamios también pueden servir como moldes inductivos que liberan moléculas bioactivas, tales como los andamios de ECM que liberan moléculas bioactivas durante el proceso de degradación.

30 Célula madre: Una célula que se autorrenueva y puede generar una célula funcional completamente diferenciada de uno o más de un tipo de célula determinado. El papel de las células madre *in vivo* es reemplazar las células que mueren o se destruyen durante la vida normal de un animal. Después de la división, la célula madre puede permanecer como célula madre, convertirse en una célula precursora o proceder a una diferenciación terminal.

40 Generalmente, las células precursoras pueden dividirse y ser pluripotentes. Después de la división, una célula precursora puede seguir siendo una célula precursora o puede proceder a la diferenciación terminal. Una "célula precursora somática" es una célula que puede generar una célula funcional completamente diferenciada de al menos un tipo de célula determinado del cuerpo de un animal, tal como un ser humano. Una célula precursora neuronal puede generar una célula neuronal completamente diferenciada, tal como, pero no limitada a, una neurona adrenérgica o colinérgica. Una célula madre hematopoyética da lugar a células de la sangre.

45 Cantidad terapéuticamente eficaz: Una cantidad de una sustancia específica, tal como una nanovesícula, suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto que se está tratando. Cuando se administra a un sujeto, generalmente se usará una dosis que alcance concentraciones en el tejido diana (por ejemplo, en el hueso) que se ha mostrado que logran un efecto deseado *in vitro*.

50 Trasplante: La colocación de un sustrato biocompatible, tal como una nanovesícula, en un sujeto que lo necesita.

55 Tumor: Un crecimiento anormal de células, que puede ser benigno o maligno. Un tumor de tipo maligno generalmente se caracteriza por el crecimiento celular anormal o descontrolado. Otras características a menudo asociadas con la malignidad incluyen metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, liberación de citoquinas u otros productos secretores a niveles anormales y supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, tales como ganglios linfáticos, etc. "Enfermedad metastásica" se refiere a células de cáncer que han abandonado el sitio original del tumor y migran a otras partes del cuerpo, por ejemplo, a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático.

La cantidad de tumor en un individuo es la "carga tumoral" que se puede medir como el número, volumen o peso del tumor. Un tumor que invade el tejido circundante y/o puede metastatizar se denomina "maligno". Ejemplos de tumores hematológicos incluyen leucemias, incluidas leucemias agudas (tales como leucemia aguda 11q23 positiva, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

Ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, tumor maligno linfoide, cáncer de páncreas, cáncer de mama (incluyendo carcinoma de mama basal, carcinoma ductal y carcinoma de mama lobulillar), cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores del SNC (tales como glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). En un ejemplo no limitante, un tumor es un glioma.

Ultrafiltración: Un tipo de filtración por membrana en el que las fuerzas (tales como presión o gradientes de concentración) conducen a una separación a través de una membrana semipermeable. Las membranas de ultrafiltración normalmente se caracterizan por el corte de exclusión de peso molecular (MWCO) de la membrana. Los sólidos suspendidos y los solutos de mayor peso molecular son retenidos en el retenido, mientras que el agua y los solutos de menor peso molecular pasan a través de la membrana en el permeado. Se pueden utilizar diferentes tipos de módulos para procedimientos de ultrafiltración. Ejemplos de tales módulos son elementos tubulares que utilizan membranas poliméricas moldeadas en el interior de tubos de plástico o papel; diseños de fibras huecas que contienen múltiples fibras huecas; módulos enrollados en espiral en los que láminas de membrana planas están separadas por un material espaciador de malla delgada que se enrolla alrededor de un tubo perforado central y se encaja en una carcasa de recipiente a presión de acero tubular; y conjuntos de placa y marco que utilizan una membrana colocada sobre una placa plana separada por un material similar a una malla a través del cual pasa el filtrado.

Vector: Molécula de ácido nucleico que puede introducirse en una célula hospedante, produciendo así una célula hospedante transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permitan replicarse en una célula hospedante, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Los vectores pueden ser vectores virales, tales como vectores adenovirales, retrovirales o lentivirales. Los vectores pueden ser vectores no virales, como los plásmidos Sleeping Beauty o los plásmidos Prince Charming.

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, "A o B" pretende incluir "A", "B" y "A y B" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se indique lo contrario, "aproximadamente" indica dentro del 5 por ciento. Debe entenderse además que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los pesos moleculares o valores de masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan para la descripción. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de esta descripción, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye".

En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las explicaciones de los términos. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

50 Nanovesículas derivadas de una matriz extracelular (ECM)

En el presente documento se describe que las nanovesículas están insertadas en la matriz extracelular. Estas nanovesículas se pueden aislar y son biológicamente activas. Por lo tanto, estas nanovesículas se pueden utilizar con fines terapéuticos, ya sea solas o con otra ECM. Estas nanovesículas se pueden utilizar en andamios biológicos, ya sea solas o con otra ECM. Estas nanovesículas también son de utilidad *in vitro*, tal como para alterar la proliferación, diferenciación y/o migración de células.

Una matriz extracelular es una mezcla compleja de biomoléculas y/o biomacromoléculas estructurales y funcionales que incluyen, pero no se limitan a, proteínas estructurales, proteínas especializadas, proteoglicanos, glucosaminoglucanos y factores de crecimiento que rodean y sostienen las células dentro de los tejidos de mamíferos y, a menos que se indique lo contrario, es acelular. Generalmente, las nanovesículas unidas a matriz descritas están

insertadas en cualquier tipo de matriz extracelular (MEC) y pueden aislarse de esta ubicación. Por lo tanto, las nanovesículas unidas a la matriz descritas no están presentes de manera que se puedan desprender en la superficie de la ECM.

5 Se describen matrices extracelulares, por ejemplo y sin limitación, en las patentes de EE. UU. n.º 4,902,508; 4,956,178; 5,281,422; 5,352,463; 5,372,821; 5,554,389; 5,573,784; 5,645,860; 5,771,969; 5,753,267; 5,762,966; 5,866,414; 6,099,567; 6,485,723; 6,576,265; 6,579,538; 6,696,270; 6,783,776; 6,793,939; 6,849,273; 6,852,339; 6,861,074; 6,887,495; 6,890,562; 6,890,563; 6,890,564; y 6,893,666.

10 Sin embargo, una ECM se puede producir a partir de cualquier tejido o de cualquier fuente *in vitro* en donde la ECM es producida por células cultivadas y comprende uno o más componentes poliméricos (constituyentes) de la ECM nativa. Se puede considerar que las preparaciones de ECM están "descelularizadas" o son "acelulares", lo que significa que las células se han eliminado del tejido o cultivo de origen.

15 En algunas realizaciones, la ECM se aísla de un animal vertebrado, por ejemplo, de un animal vertebrado mamífero que incluye, pero no se limitan a, seres humanos, monos, cerdos, vacas, ovejas, etc. La ECM puede derivar de cualquier órgano o tejido, incluyendo sin limitación, vejiga urinaria, intestino, hígado, corazón, esófago, bazo, estómago y dermis. En ejemplos específicos no limitantes, la matriz extracelular se aísla de tejido esofágico, vejiga urinaria, submucosa del intestino delgado, dermis, cordón umbilical, pericardio, tejido cardíaco o músculo esquelético. La ECM puede comprender cualquier porción o tejido obtenido de un órgano, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, submucosa, membrana basal epitelial, túnica propia, etc. En una realización no limitante, la ECM se aísla de la vejiga urinaria. En algunas realizaciones, la ECM es de tejido tumoral.

20 La ECM puede incluir o no la membrana basal. En otra realización no limitante, la ECM incluye al menos una porción de la membrana basal. El material de ECM puede retener o no algunos de los elementos celulares que componían el tejido original, tales como células endoteliales capilares o fibrocitos. En algunas realizaciones, la ECM contiene tanto una superficie de membrana basal como una superficie que no es de membrana basal.

25 En una realización no limitante, la ECM se recoge de vejigas urinarias porcinas (también conocida como matriz de vejiga urinaria o UBM). Brevemente, la ECM se prepara extrayendo el tejido de la vejiga urinaria de un mamífero, tal como un cerdo, y recortando los tejidos conectivos externos residuales, incluido el tejido adiposo. Toda la orina residual se elimina mediante lavados repetidos con agua del grifo. El tejido se deslaminando empapando primero el tejido en una solución desepitelizante, por ejemplo, y sin limitación, solución salina hipertónica (p. ej., solución salina 1.0 N), durante periodos de tiempo que varían de diez minutos a cuatro horas. La exposición a una solución salina hipertónica separa las células epiteliales de la membrana basal subyacente. Opcionalmente, se puede añadir un agente quelante de calcio a la solución salina. El tejido que queda después del procedimiento de deslaminación inicial incluye la membrana basal epitelial y las capas de tejido abluminales a la membrana basal epitelial. La membrana basal epitelial, relativamente frágil, invariablemente se daña y se separa mediante cualquier abrasión mecánica en la superficie luminal. A continuación, este tejido se somete a un tratamiento adicional para eliminar la mayoría de los tejidos abluminales pero mantener la membrana basal epitelial y la túnica propia. La serosa externa, adventicia, túnica muscularis mucosae, túnica submucosa y la mayor parte de la muscularis mucosae se separan del tejido desepitelizado restante mediante abrasión mecánica o por una combinación de tratamiento enzimático (p. ej., usando tripsina o collagenasa) seguido de hidratación y abrasión. La separación mecánica de estos tejidos se logra mediante la separación de tejidos mesentéricos con, por ejemplo, y sin limitación, pinzas Adson-Brown y tijeras Metzenbaum y limpiando la túnica muscular y la túnica submucosa usando un movimiento de limpieza longitudinal con un mango de bisturí u otro objeto rígido envuelto en gasa humedecida. También se contemplan procedimientos robóticos automatizados que implican cuchillas de corte, láseres y otros métodos de separación de tejidos. Una vez separados estos tejidos, la ECM resultante consiste principalmente en membrana basal epitelial y una túnica propia subyacente.

45 En otra realización, la ECM se prepara raspando tejido de vejiga porcina para separar las capas externas que incluyen tanto la túnica serosa como la túnica muscular usando un movimiento de limpieza longitudinal con un mango de bisturí y gasa humedecida. Después de la eversión del segmento de tejido, la porción luminal de la túnica mucosa se deslaminada del tejido subyacente utilizando el mismo movimiento de limpieza. Se tiene cuidado para evitar la perforación de la submucosa. Después de separar estos tejidos, la ECM resultante consiste principalmente en la túnica submucosa (véase la Fig. 2 de la patente de EE. UU. n.º 9,277,999).

50 La ECM también se puede preparar en forma de polvo. Dicho polvo se puede preparar según el método de Gilbert et al., *Biomaterials* 26 (2005) 1431-1435. Por ejemplo, las láminas de UBM se pueden liofilizar y luego cortar en láminas pequeñas para sumergirlas en nitrógeno líquido. El material congelado instantáneamente después se puede triturar para que las partículas sean lo suficientemente pequeñas como para ponerlas en un molino de cuchillas rotatorias, donde se pulveriza la ECM. De manera similar, mediante precipitación de NaCl dentro del tejido de ECM, el material se fracturará en partículas de tamaño uniforme, que pueden congelarse instantáneamente, liofilizarse y pulverizarse.

55 En una realización no limitante, la ECM se deriva de la submucosa del intestino delgado o SIS. Las preparaciones disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, SURGISIS™, SURGISIS-ES™, STRATASIS™, y STRATASIS-ES™ (Cook Urological Inc.; Indianápolis, Indiana) y GRAFTPATCH™ (Organogenesis Inc.; Canton Mass.). En otra realización no limitante, la ECM deriva de la dermis. Las preparaciones disponibles comercialmente incluyen,

pero no se limitan a, PELVICOL™ (vendido como PERMACOL™ en Europa; Bard, Covington, Ga.), REPLIFORM™ (Microvasive; Boston, Mass.) y ALLODERM™ (LifeCell; Branchburg, N.J.). En otra realización, la ECM deriva de la vejiga urinaria. Las preparaciones disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, UBM (ACell Corporation; Jessup, Md.).

5 Las nanovesículas pueden obtenerse (ser liberadas de) una matriz extracelular utilizando los métodos que se describen a continuación. En algunas realizaciones, la ECM se digiere con una enzima, tal como pepsina, colagenasa, elastasa, hialuronidasa o proteinasa K, y se aíslan las nanovesículas. En otras realizaciones, las nanovesículas se liberan y separan de la ECM cambiando el pH con soluciones tales como glicina HCL, ácido cítrico, hidróxido de amonio, uso de agentes quelantes tales como, pero no limitados a, EDTA, EGTA, por fuerza iónica y o efectos caotrópicos con el uso de sales tales como, pero no limitadas a, cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio, cloruro de magnesio, yoduro de sodio, tiocianato de sodio, o exponiendo la ECM a condiciones desnaturalizantes como guanidina HCl o urea.

10 En algunas realizaciones, las nanovesículas no se encuentran en su entorno natural y, por lo tanto, tienen propiedades que difieren de las nanovesículas naturales. En ejemplos particulares, las nanovesículas se preparan después de la digestión de una ECM con una enzima, tal como pepsina, elastasa, hialuronidasa, proteinasa K, soluciones salinas o colagenasa. La ECM puede congelarse-descongelarse o someterse a degradación mecánica.

15 En algunas realizaciones, la expresión de CD63 y/o CD81 no se puede detectar en las nanovesículas. Por lo tanto, las nanovesículas no expresan CD63 y/o CD81. En un ejemplo específico, CD63 y CD81 no se pueden detectar en las nanovesículas. En otras realizaciones, las nanovesículas expresan niveles apenas detectables de CD63 y CD81, tales como los detectables por transferencia Western. Estas nanovesículas son CD63<sup>bajo</sup>CD81<sup>bajo</sup>. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente nanovesículas que son CD63<sup>bajo</sup>CD81<sup>bajo</sup>, utilizando, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a CD63 y CD81. Se puede establecer un nivel bajo de estos marcadores usando procedimientos tales como la separación de células activadas por fluorescencia (FACS) y anticuerpos marcados con fluorescencia para determinar un umbral para cantidades altas y bajas de CD63 y CD81. Las nanovesículas descritas difieren de las nanovesículas que pueden unirse transitoriamente a la superficie de la ECM debido a la presencia de nanovesículas en fluidos biológicos. En algunas realizaciones, la superficie exterior de las nanovesículas se ha sometido a un procedimiento de descelularización, que puede incluir el uso de enzimas y/o detergentes.

20 En determinadas realizaciones, las nanovesículas comprenden uno o más miARN. En ejemplos específicos no limitantes, las nanovesículas comprenden miR-145 y miR-181. MiR-145 y miR-181 son conocidos en la técnica. La secuencia de ácido nucleico de miR-145 se proporciona en el número de acceso de MiRbase MI0000461. Una secuencia de ácido nucleico de miR-145 es

```
CACCUUGUCCUCACGGUCCAGLUUUCUCCAGGAUCCCUUAGAUGCUAAGAUGGGGA
UUCUGGAAAUACUGUUCUUGAGGUCAUGGLU (SEQ ID NO: 1).
```

Se proporciona una secuencia de ácido nucleico de miR-181 con el número de acceso de miRbase MI0000269.

Una secuencia de ácido nucleico de miR-181 es:

```
AGAAGGGCUAUCAGGCCAGCCUUCAGAGGACUCCAAGGAACAUUCAACGCUGUCGG
UGAGUUUGGGAUUUGAAAAACCACUGACCGUUGACUGUACCUUGGGGUCCUUA
35 (SEQ ID NO: 2).
```

Las nanovesículas descritas en el presente documento pueden formularse en composiciones para administración farmacéutica y usarse en bioandamios y dispositivos, como se analiza a continuación. Las nanovesículas son útiles en varios métodos, que también se describen a continuación.

Aislamiento de nanovesículas de la ECM.

40 En el presente documento se describen métodos para aislar nanovesículas de una ECM. En algunas realizaciones, estos métodos incluyen digerir la ECM con una enzima para producir ECM digerida. En realizaciones específicas, la ECM se digiere con pepsina, elastasa, hialuronidasa, colagenasa y/o proteinasa K. En otras realizaciones, la ECM se trata con un detergente. En realizaciones adicionales, el método no incluye el uso de enzimas. En ejemplos específicos no limitantes, los métodos utilizan agentes caotrópicos o fuerza iónica para aislar nanovesículas tales como sales, tales como cloruro de potasio. En realizaciones adicionales, la ECM se puede manipular para aumentar el contenido de nanovesículas antes del aislamiento de nanovesículas.

45 En algunas realizaciones, la ECM se digiere con una enzima. La ECM se puede digerir con la enzima durante aproximadamente 12 a aproximadamente 48 horas, tal como de aproximadamente 12 a aproximadamente 36 horas. La ECM se puede digerir con la enzima durante aproximadamente 12, aproximadamente 24, aproximadamente 36 o aproximadamente 48 horas. En un ejemplo específico no limitante, la ECM se digiere con la enzima a temperatura ambiente. Sin embargo, la digestión puede ocurrir a aproximadamente 4°C, o a cualquier temperatura entre aproximadamente 4°C y 25°C. Generalmente, la ECM se digiere con la enzima durante cualquier periodo de tiempo y a

cualquier temperatura, suficiente para separar las fibrillas de colágeno. El proceso de digestión puede variar según la fuente del tejido. Opcionalmente, la ECM se procesa mediante congelación y descongelación, ya sea antes o después de la digestión con la enzima. La ECM se puede tratar con detergentes, incluidos detergentes iónicos y/o no iónicos.

5 Luego la ECM digerida se procesa, por ejemplo mediante centrifugación, para aislar un líquido sobrenadante exento de fibrillas. En algunas realizaciones, la ECM digerida se centrifuga, por ejemplo, durante una primera etapa de aproximadamente 300 a aproximadamente 1000 g. Por tanto, la ECM digerida se puede centrifugar a de aproximadamente 400 g a aproximadamente 750 g, tal como a aproximadamente 400 g, aproximadamente 450 g, aproximadamente 500 g o aproximadamente 600 g. Esta centrifugación puede ocurrir durante aproximadamente 10 a aproximadamente 15 minutos, tal como durante aproximadamente 10 a aproximadamente 12 minutos, tal como durante aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 14 o aproximadamente 15 minutos. Se recoge el líquido sobrenadante que incluye la ECM digerida.

15 En algunas realizaciones, la ECM digerida también se puede centrifugar durante una segunda etapa de aproximadamente 2000 g a aproximadamente 3000 g. Por tanto, la ECM digerida se puede centrifugar de aproximadamente 2500 g a aproximadamente 3000 g, tal como a aproximadamente 2000 g, 2500 g, 2750 g o 3000 g. Esta centrifugación puede ocurrir durante aproximadamente 20 a aproximadamente 30 minutos, tal como durante aproximadamente 20 a aproximadamente 25 minutos, tal como durante aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29 o aproximadamente 30 minutos. Se recoge el líquido sobrenadante que incluye la ECM digerida.

20 En realizaciones adicionales, la ECM digerida se puede centrifugar durante una tercera etapa de aproximadamente 10 000 a aproximadamente 15 000 g. Por tanto, la ECM digerida se puede centrifugar de aproximadamente 10 000 g a aproximadamente 12 500 g, tal como a aproximadamente 10 000 g, 11 000 g o 12 000 g. Esta centrifugación puede ocurrir durante aproximadamente 25 a aproximadamente 40 minutos, tal como durante aproximadamente 25 a aproximadamente 30 minutos, por ejemplo durante aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34, aproximadamente 35, aproximadamente 36, aproximadamente 37, aproximadamente 38, aproximadamente 39 o aproximadamente 40 minutos. Se recoge el líquido sobrenadante que incluye la ECM digerida.

30 Se pueden utilizar independientemente una, dos o las tres etapas de centrifugación. En algunas realizaciones, se utilizan las tres etapas de centrifugación. Las etapas de centrifugación se pueden repetir, tal como 2, 3, 4 o 5 veces. En una realización, las tres etapas de centrifugación se repiten tres veces.

35 En algunas realizaciones, la ECM digerida se centrifuga a aproximadamente 500 g durante aproximadamente 10 minutos, se centrifuga a aproximadamente 2500 g durante aproximadamente 20 minutos y/o se centrifuga a aproximadamente 10 000 g durante aproximadamente 30 minutos. Esta(s) etapa(s), tal como las tres etapas se repiten 2, 3, 4 o 5 veces, tal como tres veces. Así, en un ejemplo no limitante, la ECM digerida se centrifuga a aproximadamente 500 g durante aproximadamente 10 minutos, se centrifuga a aproximadamente 2500 g durante aproximadamente 20 minutos y se centrifuga a aproximadamente 10 000 g durante aproximadamente 30 minutos. Estas tres etapas se repiten tres veces. De este modo se produce un líquido sobrenadante exento de fibrillas.

40 Luego el líquido sobrenadante exento de fibrillas se centrifuga para aislar las nanovesículas. En algunas realizaciones, el líquido sobrenadante exento de fibrillas se centrifuga de aproximadamente 100 000 g a aproximadamente 150 000 g. Por lo tanto, el líquido sobrenadante exento de fibrillas se centrifuga de aproximadamente 100 000 g a aproximadamente 125 000 g, tal como a aproximadamente 100 000 g, aproximadamente 105 000 g, aproximadamente 110 000 g, aproximadamente 115 000 g o aproximadamente 120 000 g. Esta centrifugación puede ocurrir durante aproximadamente 60 a aproximadamente 90 minutos, tal como de aproximadamente 70 a aproximadamente 80 minutos, por ejemplo durante aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85 o aproximadamente 90 minutos. En un ejemplo no limitante, el líquido sobrenadante exento de fibra se centrifuga a aproximadamente 100 000 g durante aproximadamente 70 minutos. Se recoge el material sólido que son las nanovesículas. Luego, estas nanovesículas se pueden resuspender en cualquier vehículo de interés, tal como, pero no limitado a, un tampón.

50 En realizaciones adicionales, la ECM no se digiere con una enzima. En estos métodos, la ECM se suspende en una solución salina isotónica, tal como solución salina tamponada con fosfato. Luego se añade sal a la suspensión de modo que la concentración final de la sal sea mayor que aproximadamente 0.1 M. La concentración puede ser, por ejemplo, hasta aproximadamente 3 M, por ejemplo, de aproximadamente 0.1 M de sal a aproximadamente 3 M, o de aproximadamente 0.1 M a aproximadamente 2 M. La sal puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 0.7 M, 0.6 M, 0.7 M, 0.8 M., 0.9 M, 1.0 M, 1.1 M, 1.2 M, 1.3. M, 1.4 M, 1.5 M, 1.6 M, 1.7 M, 1.8 M, 1.9 M o 2 M. En algunos ejemplos no limitantes, la sal es cloruro de potasio, cloruro de sodio o cloruro de magnesio. En otras realizaciones, la sal es cloruro de sodio, cloruro de magnesio, yoduro de sodio, tiocianato de sodio, una sal de sodio, una sal de litio, una sal de cesio o una sal de calcio.

En algunas realizaciones, la ECM se suspende en la solución salina durante aproximadamente 10 minutos a

- aproximadamente 2 horas, tal como de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 1 hora. La ECM se puede suspender en la solución salina durante aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 o 120 minutos. La ECM se puede suspender en la solución salina a temperaturas de 4°C a aproximadamente 50°C, tales como, pero no limitadas a, de aproximadamente 4°C a aproximadamente 25°C o de aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C. En un ejemplo específico no limitante, la ECM se suspende en la solución salina a aproximadamente 4°C. En otros ejemplos específicos no limitantes, la ECM se suspende en la solución salina a aproximadamente 25°C (temperatura ambiente). En otros ejemplos no limitantes, la ECM se suspende en la solución salina a aproximadamente 37°C.
- En algunas realizaciones, el método incluye incubar una matriz extracelular a una concentración de sal superior a aproximadamente 0.4 M; centrifugar la matriz extracelular digerida para separar los restos de fibrillas de colágeno y aislar el líquido sobrenadante; centrifugar el líquido sobrenadante para aislar los materiales sólidos; y suspender los materiales sólidos en un vehículo, aislando así las nanovesículas de la matriz extracelular.
- Después de la incubación en la solución salina, la ECM se centrifuga para separar las fibrillas de colágeno. En algunas realizaciones, la ECM digerida también se puede centrifugar a aproximadamente 2000 g a aproximadamente 5000 g. Por tanto, la ECM digerida se puede centrifugar de aproximadamente 2500 g a aproximadamente 4500 g, tal como a aproximadamente 2500 g, aproximadamente 3000 g, 3500, aproximadamente 4000 g o aproximadamente 4500 g. En un ejemplo específico no limitante, la centrifugación es a aproximadamente 3500 g. Esta centrifugación puede ocurrir durante aproximadamente 20 a aproximadamente 40 minutos, tal como durante aproximadamente 25 a aproximadamente 35 minutos, tal como durante aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34 o aproximadamente 35 minutos. Luego se recoge el líquido sobrenadante.
- En realizaciones adicionales, el líquido sobrenadante luego se puede centrifugar durante una tercera etapa de aproximadamente 100 000 a aproximadamente 150 000 g. Por tanto, la ECM digerida se puede centrifugar de aproximadamente 100 000 g a aproximadamente 125 000 g, tal como a aproximadamente 100 000 g, 110 000 g o 120 000 g. Esta centrifugación puede ocurrir durante de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2.5 horas, tal como durante de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 3 horas, por ejemplo durante aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 90 minutos o aproximadamente 120 minutos (2 horas). Los materiales sólidos se recogen y se suspenden en una solución, tal como una solución salina tamponada, aislando así las nanovesículas.
- En otras realizaciones más, la ECM se suspende en una solución salina tamponada isotónica, tal como, pero no limitada a, solución salina tamponada con fosfato. Se puede utilizar centrifugación u otros métodos para eliminar partículas grandes (véase más abajo). Luego se utiliza la ultrafiltración para aislar nanovesículas unidas a la matriz de la ECM, partículas entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 10 000 nm, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1000 nm, tal como entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 300 nm.
- En ejemplos específicos no limitantes, la solución salina tamponada isotónica tiene una concentración de sal total de aproximadamente 0.164 mM y un pH de aproximadamente 7.2 a aproximadamente 7.4. En algunas realizaciones, la solución salina tamponada isotónica incluye KCl 0.002 M a KCL aproximadamente 0.164 M, tal como KCl aproximadamente 0.0027 M (la concentración de KCL en solución salina tamponada con fosfato). A continuación, esta suspensión se procesa por ultracentrifugación.
- Después de la incubación en la solución salina tamponada isotónica, la ECM se centrifuga para separar las fibrillas de colágeno. En algunas realizaciones, la ECM digerida también se puede centrifugar de aproximadamente 2000 g a aproximadamente 5000 g. Por tanto, la ECM digerida se puede centrifugar de aproximadamente 2500 g a aproximadamente 4500 g, tal como a aproximadamente 2500 g, aproximadamente 3000 g, 3500, aproximadamente 4000 g o aproximadamente 4500 g. En un ejemplo específico no limitante, la centrifugación es a aproximadamente 3500 g. Esta centrifugación puede ocurrir durante aproximadamente 20 a aproximadamente 40 minutos, tal como durante aproximadamente 25 a aproximadamente 35 minutos, tal como durante aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34 o aproximadamente 35 minutos.
- Se pueden usar y combinar microfiltración y centrifugación para separar materiales de peso molecular grande de la suspensión. En una realización, los materiales moleculares de tamaño grande, tal como más de 200 nm, se separan usando microfiltración. En otra realización, los materiales de tamaño grande se separan usando centrifugación. En una tercera realización, se utilizan tanto la microfiltración como la ultracentrifugación para separar materiales de peso molecular grande. Los materiales de peso molecular grande se separan de la ECM suspendida, tal como materiales mayores de aproximadamente 10 000 nm, mayores de aproximadamente 1000 nm, mayores de aproximadamente 500 nm o mayores de aproximadamente 300 nm. El efluente para microfiltración o el líquido sobrenadante luego se somete a ultrafiltración. Por lo tanto, se recoge y utiliza el efluente, que incluye partículas de menos de aproximadamente 10 000 nm, menos de aproximadamente 1000 nm, menos de aproximadamente 500 nm o menos

de aproximadamente 300 nm. Luego, este efluente se somete a ultrafiltración con una membrana con corte de exclusión de peso molecular (MWCO) de 3000 a 100 000. En el ejemplo se utilizó MWCO de 100 000.

#### Métodos de uso

- 5 Las nanovesículas, tales como exosomas, se dirigen hacia las células diana específicas, dependiendo de las propiedades físicas de sus membranas. Por lo tanto, se pueden utilizar nanovesículas para suministrar su contenido. Además, las nanovesículas unidas a matriz se pueden utilizar para inducir la proliferación, diferenciación y migración celular de las células. También se pueden utilizar para mantener una célula en un estado indiferenciado. El efecto de las nanovesículas descritas puede ser local, regional o sistémico. Por lo tanto, estas nanovesículas son de utilidad tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 10 Las nanovesículas, tales como exosomas, están enriquecidas en ARNm, miARN y proteínas específicas (Bobrie, et al., 2011). Esta carga está protegida de la degradación por proteasas y RNasas mientras la vesícula está en el espacio intersticial y retiene la bioactividad una vez absorbida por una célula receptora. De esta manera, facilitan la transferencia de señalización interactiva y actividades enzimáticas que de otro modo estarían restringidas a células individuales basadas en la expresión genética (Lee, et al., 2011).
- 15 Las nanovesículas derivadas de ECM se pueden usar para transferir su contenido, incluido pero no limitado a, ARN y ADN, a las células receptoras. Estas moléculas pueden ser endógenas o pueden introducirse mediante técnicas moleculares en la nanovesícula derivada de ECM.
- 20 En determinadas realizaciones, las nanovesículas derivadas de ECM se pueden cargar con agentes terapéuticos tales como moléculas de ácido nucleico o proteínas. Estos pueden incluir ácidos nucleicos exógenos, tales como un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una proteína. También se puede incorporar un vector de expresión en las nanovesículas derivadas de ECM. Para lograr la incorporación de moléculas de ácido nucleico de interés, los métodos de uso incluyen, pero no se limitan a (véase la solicitud de patente publicada de EE. UU. n.º 2015/0216899:
- 25 (a) Electroporación. Mediante este método, se hacen una serie de agujeros en las nanovesículas sometiéndolas brevemente a una descarga con un campo eléctrico de 100-200 V/cm. El ADN/ARN puede entrar a través de los agujeros hechos por el campo eléctrico.
- 30 (b) Lipofección. El método comúnmente se llama transfección y se puede utilizar para transformar nanovesículas con ADN/ARN por medio de vesículas muy pequeñas que contienen las construcciones genéticas deseadas. Las vesículas se fusionan con la membrana (de forma similar a cómo se fusionan dos manchas de aceite en la parte superior de un caldo) y el contenido de las vesículas y las células se combinan. Hay una serie de kits de transfección en el mercado, listos para usar, p. ej. Kit de transfección de ARNip DELIVERX™ (n.º de catálogo DX0002) de Panomics, reactivo de transfección FUGENE® HD (n.º de catálogo 04709691001) de Roche y LIPOFECTAMINE™ 2000 (n.º de cat. 11668-027) de Invitrogen.
- 35 (c) Transformación usando choque térmico. El enfriamiento de las nanovesículas en presencia de cationes divalentes tales como Ca<sup>2+</sup> (en CaCl<sub>2</sub>) hace que sus membranas se vuelvan permeables a los plásmidos o fragmentos de ARN o ADN. Las nanovesículas se incuban con el ADN y luego se someten brevemente a choque térmico (42°C durante 30 a 120 segundos), lo que hace que el ADN entre en la nanovesícula. Este método puede funcionar bien para ADN de plásmidos circulares condensados y puede funcionar para componentes de nanovesículas lipídicas o exosomales.
- 40 En algunas realizaciones, las nanovesículas derivadas de ECM (nanovesículas unidas a matriz) aisladas se pueden cargar con agentes terapéuticos añadidos externamente, tales como ácidos nucleicos o moléculas de proteínas. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, tales como ARNip, miARN o ARNm. En ciertos aspectos, los exosomas aislados pueden comprender miARN. El miARN puede ser, por ejemplo, cantidades adicionales de miR-145 y/o miR-181. Las nanovesículas derivadas de ECM pueden cargarse con proteínas, factores de crecimiento o moléculas pequeñas.
- 45 En algunas realizaciones, las nanovesículas pueden modificarse genéticamente para contener ARN/ADN o modificarse para contener un gen de interés y pueden aislarse y transferirse a las células receptoras para afectar a su función biológica o supervivencia. En consecuencia, las nanovesículas pueden suministrar su contenido al citoplasma de las células diana, lo que a su vez conduce a la traducción del ARNm en proteínas específicas en la célula diana. Además, las nanovesículas son capaces de transportar y transferir pequeños ARN codificantes y no codificantes, tales como microARN y ARNip, que pueden regular la traducción de un gen específico.
- 50 En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica un polipéptido. Los polipéptidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, un factor de crecimiento, una enzima, una citoquina o una hormona. Los factores de crecimiento adecuados incluyen hormona de crecimiento humana, N-metionil-hormona de crecimiento humana y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteicas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; prostaglandinas, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) tales como FGF-α y FGF-β; prolactina; lactógeno placentario, un factor de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mülleriana; péptido asociado a

gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factores de crecimiento similares a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF); y granulocitos-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, kit-ligando, FLT-3 o MDA- 7. Ejemplos de hormonas incluyen, pero no se limitan a, hormona del crecimiento, prolactina, lactógeno placentario, hormona luteinizante, hormona estimulante del foliculo, gonadotropina coriónica, hormona estimulante de tiroides, leptina, adrenocorticotropina, angiotensina I, angiotensina II, beta-endorfina, hormona estimulante de los melanocitos beta, colecistoquinina, endotelina I, galanina, péptido inhibidor gástrico, glucagón, insulina, lipotropinas, neurofisinas, somatostatina, calcitonina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, péptido relacionado con el gen de la  $\beta$ -calcitonina, hipercalcemia de factor maligno, proteína relacionada con la hormona paratiroidea, proteína relacionada con la hormona paratiroidea, péptido similar al glucagón, pancreastatina, péptido pancreático, péptido YY, PHM, secretina, péptido intestinal vasoactivo, oxitocina, vasopresina, vasotocina, encefalinamida, metorfinamida, hormona estimulante de los melanocitos alfa, factor natriurético auricular, amilina, componente P amiloide, hormona liberadora de corticotropina, factor liberador de hormona del crecimiento, hormona liberadora de hormona luteinizante, neuropéptido Y, sustancia K, sustancia P y hormona liberadora de tiotropina. Las enzimas adecuadas incluyen ACP desaturasa, una ACP hidroxilasa, una ADP-glucosa piroforilasa, una ATPasa, una alcohol deshidrogenasa, una amilasa, una amiloglucosidasa, una catalasa, una celulasa, una ciclooxigenasa, una descarboxilasa, una dextrinasa, una esterasa, una ADN polimerasa, una ARN polimerasa, una hialuronano sintasa, una galactosidasa, una glucanasa, una glucosa oxidasa, una GTPasa, una helicasa, una hemicelulasa, una hialuronidasa, una integrasa, una invertasa, una isomerasa, una quinasa, una lactasa, una lipasa, una lipoxigenasa, una liasa, una lisozima, una pectinesterasa, una peroxidasa, una fosfatasa, una fosfolipasa, una fosforilasa, una poligalacturonasa, una proteinasa, una peptidasa, una pulanasa, una recombinasa, una transcriptasa inversa, una topoisomerasa, una xilanasas o una gen indicador.

En algunas realizaciones, las nanovesículas derivadas de ECM se pueden incluir en una composición farmacéutica, tal como incluyendo un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se pueden administrar a un sujeto mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen por vía intravenosa, nasal, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosal, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada bañando las células diana directamente, a través de un catéter, a través de un lavado, directamente en una cámara cardíaca, inyectadas directamente en el órgano o porción de órgano o sitio enfermo de interés, o por otro método o cualquier combinación de estos métodos. La administración tópica puede ser particularmente ventajosa para el tratamiento de la piel, tal como cáncer, para prevenir la alopecia inducida por quimioterapia u otros trastornos hiperproliferativos dérmicos. Alternativamente, la administración puede ser mediante inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa.

Las referencias a métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o el método de diagnóstico *in vivo* en esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones y medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos.

Para usos *in vivo*, las composiciones se pueden administrar como composiciones farmacéuticamente aceptables que incluyen vehículos, tampones u otros excipientes fisiológicamente aceptables. En algunas realizaciones, la composición se formula en forma líquida. En otras realizaciones, la composición se formula en forma de gel o polvo. En otras realizaciones, la composición se formula como una niebla, tal como en un nebulizador. En otras realizaciones, la composición se puede formular como un gel o una cápsula de liberación prolongada. Para el tratamiento de afecciones de los pulmones, se puede utilizar la administración en aerosol. El volumen de un aerosol está generalmente entre aproximadamente 0.01 ml y aproximadamente 0.5 ml.

Los métodos descritos pueden incluir administrar una composición a un sujeto que contiene aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 13.5, 14.0, 14.5, 15.0, 15.5, 16.0, 16.5, 17.0, 17.5, 18.0, 18.5, 19.0, 19.5, 20.0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 410, 420, 425, 430, 440, 445, 450, 460, 470, 475, 480, 490, 500, 510, 520, 525, 530, 540, 550, 560, 570, 575, 580, 590, 600, 610, 620, 625, 630, 640, 650, 660, 670, 675, 680, 690, 700, 710, 720, 725, 730, 740, 750, 760, 770, 775, 780, 790, 800, 810, 820, 825, 830, 840, 850, 860, 870, 875, 880, 890, 900, 910, 920, 925, 930, 940, 950, 960, 970, 975, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900,

## ES 3 014 543 T3

2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10 000 nanogramos (ng), microgramos (mcg), miligramos (mg) de nanovesículas, o cualquier intervalo derivable de las mismas. Los valores numéricos anteriores también pueden ser la dosis que se administra al paciente en función del peso del paciente, expresada como ng/kg, µg/kg, mg/kg o g/kg, y cualquier intervalo derivable de esos valores.

Alternativamente, la composición puede tener una concentración de nanovesículas que es de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 13.5, 14.0, 14.5, 15.0, 15.5, 16.0, 16.5, 17.0, 17.5, 18.0, 18.5, 19.0, 19.5, 20.0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 410, 420, 425, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 475, 480, 490, 500, 510, 520, 525, 530, 540, 550, 560, 570, 575, 580, 590, 600, 610, 620, 625, 630, 640, 650, 660, 670, 675, 680, 690, 700, 710, 720, 725, 730, 740, 750, 760, 770, 775, 780, 790, 800, 810, 820, 825, 830, 840, 850, 860, 870, 875, 880, 890, 900, 910, 920, 925, 930, 940, 950, 960, 970, 975, 980, 990, 1000 ng/ml, µg/ml, mg/ml o g/ml, o cualquier intervalo derivable de las mismas. La dosis puede variarse, dependiendo de la afección a tratar. En algunas realizaciones, la afección es una hernia, un músculo desgarrado o dañado, un tendón desgarrado o dañado o un accidente cerebrovascular.

La composición se puede administrar al sujeto (o el sujeto la puede tomar) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más veces, o cualquier intervalo derivable de las mismas, y pueden administrarse cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, o 1, 2, 3, 4, 5 semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, o cualquier intervalo derivable de los mismos. La composición se puede administrar una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día o seis veces al día (o cualquier intervalo derivable de los mismos) y/o según sea necesario para el paciente. Alternativamente, la composición se puede administrar al sujeto, o se la puede administrar, cada 2, 4, 6, 8, 12 o 24 horas (o cualquier intervalo derivable de los mismos). En algunas realizaciones, al sujeto se le administra la composición durante un cierto período de tiempo o con un cierto número de dosis después de experimentar síntomas.

La cantidad de dosificación real de una composición administrada a un sujeto puede determinarse mediante factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente y la vía de administración. El médico responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de ingrediente(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis apropiada(s) para el sujeto individual. En algunas realizaciones, la afección es una hernia, un músculo desgarrado o dañado, un tendón desgarrado o dañado o un accidente cerebrovascular.

Las composiciones que incluyen nanovesículas derivadas de ECM, para uso en los métodos descritos, están contenidas adecuadamente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo no es tóxico, es biocompatible y se selecciona de manera que no afecte negativamente a la actividad biológica de la nanovesícula. La nanovesícula derivada de ECM se puede formular en preparaciones para administración local (es decir, en una ubicación específica del cuerpo, tal como músculo esquelético u otro tejido) o administración sistémica, en formas sólida, semisólida, gel, líquida o gaseosa, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, depósitos, inhaladores e inyecciones que permitan la administración oral, parenteral o quirúrgica. La administración local de las composiciones es apropiada, por ejemplo mediante el recubrimiento de dispositivos médicos (véase más abajo). Se pueden añadir ingredientes activos adicionales a estas composiciones, tales como, pero no limitados a, agentes quimioterapéuticos (véase más abajo). Las nanovesículas derivadas de ECM también se pueden unir a una superficie, tal como, pero no limitada a, una malla de polipropileno o cualquier material biocompatible.

Los vehículos adecuados para la administración parenteral mediante inyectable, infusión o irrigación y administración tópica incluyen agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer normal o lactato, solución de dextrosa, solución de Hank o propanodiol. Además, se pueden emplear aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite biocompatible, incluidos monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables. El vehículo y el agente pueden combinarse como un líquido, suspensión, gel polimerizable o no polimerizable, pasta o bálsamo.

El vehículo también puede comprender un vehículo de administración para mantener (es decir, extender, retrasar o regular) la administración del(de los) agente(s) o para mejorar la administración, absorción, estabilidad o farmacocinética del(de los) agente(s) terapéutico(s). En algunas realizaciones, la composición de uso incluye un tampón, un hidrogel, un conservante y/o un agente estabilizante, sin limitación. Estos agentes pueden proporcionar una semivida más larga de las nanovesículas derivadas de ECM en la composición. La composición también puede

incluir cualquier agente terapéutico adicional de interés, tal como, pero no limitado a, un compuesto químico, una molécula de ácido nucleico, un polipéptido, un factor de crecimiento, una citoquina o una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un microARN o una proteína.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. La composición puede ser una composición inyectable, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. La composición también puede ser una forma sólida adecuada para solución, o suspensión, en líquido. La composición puede ser un gel. Estas preparaciones también pueden emulsionarse.

10 Una composición típica incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición puede contener menos, igual o más de 10 mg, 25 mg, 50 mg o hasta aproximadamente 100 mg de albúmina sérica humana por mililitro de solución salina tamponada con fosfato. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluidas sales, conservantes, tampones y similares.

15 Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Los vehículos intravenosos incluyen restablecedores de fluidos y nutrientes. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según parámetros bien conocidos.

20 Las formulaciones, tales como para administración oral, pueden incluir excipientes típicos tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Las composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos.

25 En una determinada realización, la composición puede ser una composición autóloga u obtenida del mismo paciente que se va a tratar. En particular, la matriz extracelular de un sujeto, tal como un ser humano, se puede recoger y usar para el aislamiento de nanovesículas derivadas de ECM. La composición puede entonces administrarse en una composición farmacéutica al mismo donante (autólogo). En otra realización, la composición puede ser alogénica, de modo que el organismo donante que proporciona la ECM para el aislamiento de las nanovesículas derivadas de ECM y el organismo receptor que se va a tratar son la misma especie pero individuos diferentes (alogénico). En una  
30 realización alternativa, la composición puede ser xenogénica. Por lo tanto, las nanovesículas se derivan de una ECM de una especie diferente, antes de su administración al sujeto. Para este fin, la ECM se toma de un donante, por ejemplo un animal tal como un cerdo, y se aíslan nanovesículas de la ECM. Luego, las nanovesículas derivadas de la ECM se administran en una composición farmacéutica a un sujeto de una especie diferente. En un ejemplo no limitante, el sujeto es un ser humano.

35 También hay usos *in vitro* y *ex vivo* de las composiciones descritas. Se pueden añadir nanovesículas derivadas de ECM para alterar la proliferación, migración y/o diferenciación celular. En algunas realizaciones, se induce la proliferación, migración y/o diferenciación celular. En otras realizaciones, se inhibe la proliferación, migración y/o diferenciación celular. Las nanovesículas se pueden utilizar con o sin matriz extracelular. En algunas realizaciones, la célula puede ser una célula madre, tal como, pero no limitada a, una célula madre perivascular. En otras realizaciones,  
40 la célula puede ser un macrófago o un monocito.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para alterar la proliferación, migración y/o diferenciación celular en una matriz extracelular de interés. En determinadas realizaciones, los métodos incluyen introducir nanovesículas aisladas derivadas de una segunda matriz extracelular en la matriz extracelular de interés. La adición de nanovesículas derivadas de ECM altera la proliferación, migración y/o diferenciación celular de las células cultivadas en la ECM. En  
45 algunas realizaciones, la célula puede ser una célula madre, tal como, pero no limitada a, una célula madre perivascular. En otras realizaciones, la célula puede ser un macrófago o un monocito.

La matriz extracelular de interés y las nanovesículas derivadas de ECM pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas. La matriz extracelular de interés y las nanovesículas derivadas de ECM pueden ser del mismo tejido o de diferente tejido. La matriz extracelular de interés y las nanovesículas derivadas de ECM pueden ser de la misma o  
50 diferente especie. En ejemplos específicos no limitantes, la matriz extracelular de interés y/o las nanovesículas derivadas de ECM son humanas o porcinas.

La célula puede ser cualquier célula de interés. En algunas realizaciones, la célula es una célula madre o una célula progenitora. En otras realizaciones, la célula es un macrófago, mioblasto, una célula madre perivascular o una célula de neuroblastoma. A continuación se describe el uso de las nanovesículas derivadas de ECM en andamios y dispositivos.

55 Métodos para tratar tumores

En el presente documento se describen métodos para reducir la proliferación de células tumorales, ya sea *in vivo* o *in vitro*. También se describen en el presente documento métodos para aumentar la apoptosis de células tumorales, ya

5 sea *in vivo* o *in vitro*. Además, en el presente documento se describen métodos para disminuir la migración de células tumorales, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Estos métodos incluyen poner en contacto las células tumorales con una cantidad eficaz de las nanovesículas derivadas de ECM descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, las células tumorales son células de glioma. En otras realizaciones, las nanovesículas derivadas de ECM provienen de vejiga urinaria. En realizaciones adicionales, las células tumorales son células de glioma y las nanovesículas derivadas de ECM se aíslan de ECM de vejiga urinaria. En realizaciones adicionales, las células tumorales son células de adenocarcinoma de esófago. En otras realizaciones, las nanovesículas derivadas de ECM se aíslan de ECM esofágica. En realizaciones adicionales, las células tumorales son de adenocarcinoma de esófago y las nanovesículas derivadas de ECM se aíslan de ECM esofágica. También se pueden producir nanovesículas derivadas de ECM a partir de tejido tumoral. La ECM puede ser humana o de un sujeto veterinario.

Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para cualquier tipo de glioma o célula de glioma. El glioma puede ser un ependimoma, astrocitoma, oligodendroglioma, glioma del tronco encefálico, glioma del nervio óptico o un glioma mixto. El glioma puede ser de grado I, II, III o IV de la OMS. El glioma puede ser un glioma de bajo grado o un glioma de alto grado (grado III-IV de la OMS). El glioma puede ser supratentorial, infratentorial o pontino.

15 También se proporcionan métodos para tratar un tumor en un sujeto. En algunas realizaciones, los métodos incluyen tratar un tumor existente en un sujeto. En realizaciones adicionales, en el presente documento se describen métodos para prevenir la conversión de una lesión benigna en maligna, o prevenir metástasis en un sujeto. En algunos ejemplos no limitantes, los métodos reducen un síntoma del tumor en el sujeto. En ejemplos adicionales no limitantes, el tumor es un tumor sólido. En algunas realizaciones, las células tumorales son células de glioma. En otras realizaciones, las nanovesículas derivadas de ECM se aíslan de ECM de vejiga urinaria. En realizaciones adicionales, las células tumorales son células de glioma y las nanovesículas derivadas de ECM se aíslan de ECM de vejiga urinaria. En realizaciones adicionales, las células tumorales son células de adenocarcinoma de esófago. En otras realizaciones, las nanovesículas derivadas de ECM se aíslan de ECM esofágica. En realizaciones adicionales, las células tumorales son de adenocarcinoma de esófago y las nanovesículas derivadas de ECM se aíslan de ECM esofágica.

25 Generalmente, los métodos incluyen seleccionar un sujeto que tiene un tumor, tal como un tumor benigno o maligno, y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento incluyen seleccionar un sujeto que necesita tratamiento, tal como un sujeto con un glioma, y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de las nanovesículas derivadas de ECM. También se pueden administrar agentes adicionales al sujeto de interés, tales como, pero no limitados a, agentes quimioterapéuticos. También se pueden administrar tratamientos adicionales al sujeto, tales como, pero no limitados a, resección quirúrgica del tumor.

35 El tumor puede ser benigno o maligno. El tumor puede ser un tumor sólido o un tumor linfoproliferativo. El tumor puede ser cualquier tumor de interés, incluido, pero no limitado a, glioma. En otras realizaciones, el tumor es un linfoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer de colon. Ejemplos adicionales son tumores de piel, tumores de mama, tumores cerebrales, carcinomas de cuello uterino, carcinomas testiculares, tumores de cabeza y cuello, tumores del tracto gastrointestinal, tumores del sistema genitourinario, tumores del sistema ginecológico, tumores de mama, tumores del sistema endocrino, tumores de piel, un sarcoma de tejido blando y hueso, un mesotelioma, un melanoma, una neoplasia del sistema nervioso central o una leucemia. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor de cabeza y cuello, tal como tumores de la cavidad nasal, senos paranasales, nasofaringe, cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, glándulas salivales y paragangliomas. En otras realizaciones, el tumor es un tumor de pulmón, tal como un cáncer de pulmón no microcítico o un cáncer de pulmón microcítico. En realizaciones adicionales, el tumor puede ser un tumor del tracto gastrointestinal, tal como cáncer de esófago, estómago, páncreas, hígado, árbol biliar, intestino delgado, colon, recto y región anal. En otras realizaciones más, el tumor puede ser un tumor del sistema genitourinario, tal como cáncer de riñón, uretra, vejiga, próstata, uretra, pene y testículo. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor ginecológico, tal como cáncer del cuello uterino, vagina, vulva, cuerpo uterino, enfermedades trofoblásticas gestacionales, ovario, trompas de Falopio, peritoneal o mama. En otras realizaciones, el tumor es un tumor del sistema endocrino, tal como un tumor de tiroides, tumor de paratiroides, tumor de la corteza suprarrenal, tumor endocrino pancreático, tumor carcinoide y síndrome carcinoide. El tumor puede ser un sarcoma de tejido blando y hueso, un mesotelioma, un cáncer de piel, un melanoma, que comprende melanomas cutáneos y melanomas intraoculares, una neoplasia del sistema nervioso central, un cáncer infantil, que comprende retinoblastoma, tumor de Wilm, neurofibromatosis, neuroblastoma, familia de tumores del sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma. El tumor puede ser un linfoma, que comprende linfomas no Hodgkin, linfomas cutáneos de células T, linfoma primario del sistema nervioso central y enfermedad de Hodgkin. El tumor puede ser una leucemia, tal como leucemia aguda, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica. El tumor puede ser neoplasias de células plasmáticas, un cáncer de localización primaria desconocida, una carcinomatosis peritoneal, un sarcoma de Kaposi, linfomas asociados al SIDA, linfoma primario del sistema nervioso central asociado al SIDA, enfermedad de Hodgkin asociada al SIDA y cánceres anogenitales asociados al SIDA, un cáncer metastásico al hígado, cáncer metastásico al hueso, derrames pleurales y pericárdicos malignos y ascitis maligna. En ejemplos específicos no limitantes, el tumor es melanoma o cáncer de colon.

60 El tratamiento del tumor generalmente se inicia después del diagnóstico del tumor o después del inicio de una afección precursora (tal como displasia o desarrollo de un tumor benigno). El tratamiento puede iniciarse en las primeras etapas del cáncer, por ejemplo, puede iniciarse antes de que un sujeto manifieste síntomas de una afección, tal como durante un diagnóstico de fase I o en el momento en que se diagnostica la displasia. Sin embargo, el tratamiento se puede

iniciar durante cualquier fase de la enfermedad, tal como, pero no limitado a, los cánceres en fase I, fase II, fase III y fase IV. En algunos ejemplos, se administra tratamiento a estos sujetos con un tumor benigno que puede convertirse en un tumor maligno o incluso metastásico.

5 La presencia de un tumor puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica y normalmente incluyen evaluación citológica y morfológica. El tumor puede ser un tumor establecido.

10 El tratamiento iniciado después del desarrollo de una afección, tal como cáncer maligno, puede dar como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de una de las afecciones, o la eliminación completa de los síntomas, o la reducción de la metástasis, el volumen del tumor o el número de tumores. En algún ejemplo, el tumor se vuelve indetectable después del tratamiento. En un aspecto de la descripción, se retrasa, previene o disminuye la formación de tumores, tales como metástasis. En otro aspecto, se reduce el tamaño del tumor primario. En un aspecto adicional, se reduce un síntoma del tumor. En otro aspecto más, se reduce el volumen del tumor.

15 En algunos ejemplos, los métodos son para el tratamiento de un sujeto con un tumor. Se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de las nanovesículas derivadas de ECM descritas en el presente documento. En ejemplos específicos no limitantes, las nanovesículas derivadas de ECM se aíslan de una vejiga urinaria. En otros ejemplos no limitantes, las nanovesículas derivadas de ECM se aíslan de un esófago. En algunas realizaciones, la administración reduce la proliferación de células tumorales, aumenta la apoptosis de las células tumorales y/o disminuye la migración de las células tumorales. La administración puede ser directamente al tumor. En ejemplos específicos no limitantes, el tumor es un glioma.

20 El tratamiento previo al desarrollo de la afección, tal como el tratamiento al detectar la displasia o una afección precursora temprana (benigna), se denomina en el presente documento tratamiento de un sujeto que está "en riesgo" de desarrollar la afección. En algunas realizaciones, la administración de una composición, tal como nanovesículas derivadas de ECM, o una composición farmacéutica que comprende las nanovesículas derivadas de ECM, se puede realizar durante o después de la aparición de las afecciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el sujeto no tiene esófago de Barrett. En otras realizaciones, el sujeto tiene esófago de Barrett.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir nanovesículas derivadas de ECM y, opcionalmente, uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales. Estas composiciones son útiles para combatir un tumor. Estas composiciones pueden formularse en una variedad de formas para la administración a un sujeto para afectar a la proliferación de células en el tumor, o para retrasar, prevenir, reducir el riesgo de desarrollar, o tratar, o reducir la incidencia de metástasis, de cualquier tumor de interés. Las composiciones descritas en el presente documento también se pueden formular para su aplicación de manera que prevengan la metástasis de una lesión inicial. En algunas realizaciones, las composiciones se formulan para administración local, tal como administración intratumoral. Se proporcionan así composiciones farmacéuticas tanto para uso local como para uso sistémico, formuladas para uso en medicina humana o veterinaria. En algunas realizaciones, la composición se puede administrar mediante inyección o catéter.

35 Si bien los métodos y composiciones descritos se usarán típicamente para tratar sujetos humanos, también se pueden usar para tratar enfermedades similares o idénticas en otros vertebrados, tales como otros primates, perros, gatos, caballos y vacas. Un médico puede determinar mejor el formato de administración adecuado para cada sujeto individualmente. Varios vehículos farmacéuticamente aceptables y su formulación se describen en tratados de formulación convencionales, p. ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences* por E. W. Martin. Véase también Wang, Y. J. y Hanson, M. A., *Journal of Parenteral Science and Technology*, Informe técnico n.º 10, supp. 42:2S, 1988. La forma farmacéutica de la composición farmacéutica estará determinada por el modo de administración elegido. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano y las nanovesículas derivadas de ECM son de tejido humano.

40 En algunas realizaciones, cuando se administra localmente a células de un zona afectada o un tejido de interés, tal como un tumor, la composición descrita reduce la proliferación de células tumorales, aumenta la apoptosis de las células tumorales y/o reduce la migración de las células tumorales. Las nanovesículas derivadas de ECM se pueden administrar por cualquier vía, incluida la administración parenteral, por ejemplo, inyección o infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal o intraarticular, o mediante administración sublingual, oral, tópica, intranasal o transmucosa, o por inhalación pulmonar. Un médico puede seleccionar la vía de administración adecuada en función de la manifestación del tumor.

45 Cuando las nanovesículas derivadas de ECM se proporcionan como composiciones parenterales, p. ej. para inyección o infusión, generalmente se suspenden en un vehículo acuoso, por ejemplo, en una solución tampón isotónica a un pH de aproximadamente 3.0 a aproximadamente 8.0, preferiblemente a un pH de aproximadamente 3.5 a aproximadamente 7.4, tal como de aproximadamente 7.2 a aproximadamente 7.4. Los tampones útiles incluyen tampones de citrato de sodio-ácido cítrico y fosfato de sodio-ácido fosfórico y acetato de sodio-ácido acético.

50 Se puede utilizar una forma de preparación de liberación lenta desde depósito o "de depósito" de modo que se administran cantidades terapéuticamente eficaces de la preparación al torrente sanguíneo a lo largo de muchas horas o días después de la inyección o administración.

Los ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida incluyen materiales poliméricos adecuados (tales como, por ejemplo, matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados, p. ej., películas o

microcápsulas), materiales hidrófobos adecuados (tales como, por ejemplo, una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, y derivados poco solubles (tales como, por ejemplo, una sal poco soluble). Las formulaciones de liberación sostenida se pueden administrar por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como polvos, pomadas, geles, gotas o parches transdérmicos), vía bucal o como un aerosol oral o nasal, dependiendo de la ubicación del tumor. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de partículas que comprenden un polímero biodegradable y/o un polímero gelificante y/o bioadhesivo de polisacárido, un polímero anfifílico, un agente que modifica las propiedades de interfase de las partículas y una sustancia farmacológicamente activa. Estas composiciones presentan ciertas características de biocompatibilidad que permiten una liberación controlada de la sustancia activa. Véase la patente de EE. UU. n.º 5,700,486.

Los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables útiles en los métodos descritos son convencionales. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que son vehículos fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, otras soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares. Como excipientes se pueden incluir, por ejemplo, proteínas, tales como por ejemplo albúmina sérica humana o preparaciones de plasma. Si se desea, la composición farmacéutica a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes de tamponamiento del pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitán. Los métodos reales para preparar tales formas farmacéuticas son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en la técnica.

La cantidad de compuesto(s) activo(s) administrado(s) dependerá del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección y la forma de administración, y es mejor dejarla a criterio del médico que prescribe. Dentro de estos límites, la formulación que se va a administrar contendrá una cantidad de componente(s) activo(s) en cantidades eficaces para lograr el efecto deseado en el sujeto que se está tratando. Se prevén múltiples tratamientos, tales como a lo largo de intervalos de tiempo definidos, tales como diario, quincenal, semanal, bimestral o mensual, de manera que se consiga una administración crónica. La administración puede comenzar siempre que se desee la supresión o prevención de una enfermedad, por ejemplo, a una determinada edad de un sujeto, o antes de una exposición ambiental.

La dosis exacta la determina fácilmente un experto en la técnica basándose en la potencia de la fracción específica, la edad, peso, sexo y condición fisiológica del sujeto. Las concentraciones adecuadas incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente 1 ng/ml - 100 g/ml.

Se pueden administrar agentes adicionales, tales como una citoquina, una quimioquina o un agente quimioterapéutico. Estos pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas descritas. Se puede administrar una citoquina, tal como una interleucina (IL) o un interferón, tal como interferón (IFN)  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ , IL-1, IL-6 e IL-10. En un ejemplo, para la prevención y el tratamiento de tumores, se puede administrar al sujeto tratamiento quirúrgico. En un ejemplo, esta administración es secuencial. En otros ejemplos, esta administración es simultánea.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos son agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales u hormonas y sus antagonistas. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen mostazas nitrogenadas (tales como mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, mostaza de uracilo o clorambucilo), alquilsulfonatos (tales como busulfano), nitrosoureas (tales como carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina o dacarbazina). Los ejemplos de antimetabolitos incluyen análogos del ácido fólico (tales como metotrexato), análogos de pirimidina (tales como 5-FU o citarabina) y análogos de purina, tales como mercaptopurina o tioguanina. Los ejemplos de productos naturales incluyen alcaloides de la vinca (tales como vinblastina, vincristina o vindesina), epipodofilotoxinas (tales como etopósido o tenipósido), antibióticos (tales como dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina o mitomicina C) y enzimas (tales como L-asparaginasa). Los ejemplos de agentes diversos incluyen complejos de coordinación de platino (tales como cis-diamina-dicloroplatino II, también conocido como cisplatino), ureas sustituidas (tales como hidroxourea), derivados de metilhidrazina (tales como procarbazona) y supresores adrenocorticales (tales como mitotano y aminoglucetimidato). Los ejemplos de hormonas y antagonistas incluyen adrenocorticosteroides (tales como prednisona), progestinas (tales como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol), estrógenos (tales como dietilestilbestrol y etinilestradiol), antiestrógenos (tales como tamoxifeno) y andrógenos (tales como propionato de testosterona y fluoximesterona). Los ejemplos de los medicamentos de quimioterapia utilizados más habitualmente incluyen adriamicina, Alkeran, Ara-C, BiCNU, busulfano, CCNU, carboplatino, cisplatino, Cytosan, daunorubicina, DTIC, 5-FU, fludarabina, Hydrea, idarubicina, ifosfamida, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza nitrogenada, taxol (u otros taxanos, tales como docetaxel), Velban, vincristina, VP-16, mientras que algunos fármacos más nuevos incluyen gemcitabina (Gemzar), Herceptin, irinotecán (Camptosar, CPT-11), Leustatin, Navelbine, Rituxan STI-571, taxotere, topotecán (Hycamtin), Xeloda (Capecitabina), Zevelin y calcitriol. Los ejemplos no limitantes de inmunomoduladores que pueden usarse incluyen AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.), bropirimina (Upjohn), interferón gamma (Genentech), GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos; Genetics Institute), IL-2. (Cetus o Hoffman-LaRoche), inmunoglobulina humana (Cutter Biological), IMREG (de Imreg de Nueva Orleans, Luisiana), SK&F 106528 y TNF (factor de necrosis tumoral; Genentech).

Métodos para aumentar los macrófagos M2

Se ha mostrado que los macrófagos son reguladores críticos de la curación normal después de una lesión y en el

desarrollo normal del tejido. Las nanovesículas descritas pueden recapitular los efectos de la ECM completa en el fenotipo de los macrófagos, lo que lleva a un aumento de macrófagos tipo M2, reguladores o pro-remodeladores. Por lo tanto, cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento se puede utilizar para modificar el fenotipo de macrófagos, tal como para inducir macrófagos M2 reguladores.

5 En algunas realizaciones, se describen métodos para inducir macrófagos M2 en un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye las nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento, induciendo así macrófagos M2 en el sujeto. En realizaciones adicionales, se describen métodos para disminuir los macrófagos M1 (proinflamatorios) en un sujeto. Los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye las nanovesículas derivadas de  
10 ECM, como se describe en el presente documento, inhibiendo así los macrófagos M1 en el sujeto. El sujeto puede ser cualquier sujeto de interés, tal como un sujeto con inflamación o una herida. En algunos ejemplos no limitantes, el sujeto tiene un trastorno inflamatorio, tal como, pero no limitado a, colitis ulcerosa o artritis reumatoide. En otros ejemplos no limitantes, el sujeto es un receptor de un trasplante de órgano, un sujeto con enfermedad de injerto contra huésped, un sujeto con infarto de miocardio o un sujeto con una herida, tal como, pero no limitado a, un sujeto con una herida quirúrgica o una herida traumática no quirúrgica. Por lo tanto, se describe un método para acelerar la curación de heridas en un individuo que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye las nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento. La administración puede ser local, tal como por ejemplo en el sitio de la herida o del injerto.

20 Se proporcionan métodos para promover la curación de heridas anastomóticas y otras heridas causadas por procedimientos quirúrgicos en individuos. Estos métodos incluyen la administración de una cantidad eficaz de una composición que incluye las nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento, a un individuo antes, después y/o durante una cirugía anastomótica u otra cirugía. La anastomosis es la conexión de dos estructuras tubulares, por ejemplo, cuando se extirpa una sección media del intestino y las porciones restantes se unen para reconstituir el tracto intestinal. A diferencia de la curación cutánea, el proceso de curación de las heridas anastomóticas generalmente queda oculto a la vista. Además, la cicatrización de heridas, al menos en el tracto gastrointestinal, se produce rápidamente en ausencia de complicaciones; sin embargo, las complicaciones a menudo requieren corrección mediante cirugía adicional. Thornton, F. y Barbul, A., *Surg. Clin. North Am.* 77:549 573 (1997).

30 También se proporcionan métodos para estimular la curación de heridas que incluyen heridas quirúrgicas, heridas por extirpación, heridas profundas que implican daño de la dermis y la epidermis, heridas de tejido ocular, heridas de tejido dental, heridas de la cavidad bucal, úlceras diabéticas, úlceras dérmicas, úlceras cubitales, úlceras arteriales, úlceras por estasis venosa y quemaduras resultantes de la exposición al calor o a productos químicos. También se proporcionan métodos para heridas que resultan de isquemia y lesión isquémica, tales como úlceras venosas crónicas en las piernas causadas por un deterioro y/o insuficiencia del retorno del sistema circulatorio venoso. Se puede usar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye las nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento, para promover el restablecimiento dérmico posterior a la pérdida dérmica. Además, se puede usar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye las nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento, para aumentar la resistencia a la tracción de la epidermis y el espesor epidérmico. Por tanto, los métodos descritos son útiles para estimular la curación de diferentes tipos de heridas en sujetos normales y sujetos que tienen problemas de curación de heridas.

40 También se proporcionan en el presente documento métodos para aumentar la adherencia de los injertos de piel al lecho de la herida y para estimular la reepitelización desde el lecho de la herida. Los tipos de injertos incluyen, pero no se limitan a: injerto de piel autólogo, piel artificial, aloinjertos, injerto autodérmico, injertos autoepidérmicos, injertos avaculares, injerto de Blair-Brown, injerto óseo, injerto brefoplástico, injerto de cutis, injerto retardado, injerto dérmico, injerto epidérmico, injerto de fascia, injerto de espesor completo, injerto heterólogo, xenoinjerto, injerto homólogo, injerto hiperplásico, injerto laminar, injerto de malla, injerto de mucosa, injerto de Ollier-Thiersch, injerto de omental, injerto de parche, injerto de pedículo, injerto penetrante, injerto de piel dividido, injerto dividido grueso. Los métodos incluyen administrar al sujeto con el injerto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye las nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento, aumentando así la adherencia y aceptación del injerto.

50 También se proporcionan métodos para tratar ampollas y quemaduras debidas a abrasión o lesión química. Estos métodos incluyen el tratamiento de la piel o de los órganos internos. Estos métodos incluyen el tratamiento de lesiones ováricas, por ejemplo, debidas al tratamiento con productos quimioterapéuticos o al tratamiento con ciclofosfamida; cistitis inducida por radiación o quimioterapia; o lesión intestinal inducida por quimioterapia en dosis altas. Los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye las nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento, para promover la curación de las ampollas o quemaduras.

60 Para el tratamiento de la piel, se puede administrar localmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye las nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento, en el área afectada de la piel, tal como en forma de una pomada. En una realización, la pomada es un agente externo semisólido completamente homogéneo con una firmeza apropiada para una fácil aplicación sobre la piel. Dicha pomada puede incluir grasas, aceites grasos, lanolina, vaselina, parafina, cera, pomadas duras, resinas, plásticos,

glicoles, alcoholes superiores, glicerol, agua o emulsionantes y un agente de suspensión. Usando estos ingredientes como base, se puede mezclar uniformemente un compuesto señuelo. Dependiendo de la base, la mezcla puede ser en forma de una pomada oleaginosa, una pomada emulsionada o una pomada hidrosoluble, las pomadas oleaginosas utilizan bases tales como aceites y grasas vegetales y animales, cera, VASELINE® y parafina líquida. Las pomadas emulsionadas se componen de una sustancia oleaginosa y agua, emulsionada con un emulsionante. Pueden tener forma de aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O). La forma de aceite en agua (O/W) puede ser una pomada hidrófila. La forma de agua en aceite (W/O) inicialmente carece de una fase acuosa y puede incluir Vaseline hidrófila y lanolina purificada, o puede contener una pomada de absorción de agua (que incluye una fase acuosa) y lanolina hidratada. Una pomada soluble en agua puede contener una base de Macrogol completamente soluble en agua como su ingrediente principal.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen una vaselina, tal como VASELINE®, en donde la vaselina contiene 5% de alcohol estearílico, o vaselina sola, o vaselina que contiene parafina líquida. Dichos vehículos permiten prescribir composiciones farmacéuticas en formas apropiadas para el consumo, tales como comprimidos, píldoras, agentes recubiertos de azúcar, cápsulas, preparaciones líquidas, geles, pomadas, jarabes, lechadas y suspensiones. Cuando se administra localmente en células de una zona afectada o un tejido de interés, la composición que incluye las nanovesículas derivadas de ECM se puede administrar en una composición que contiene un polímero hidrófilo sintético o natural como vehículo. Ejemplos de tales polímeros incluyen hidroxipropilcelulosa y polietilenglicol. Se puede mezclar una composición que incluye las nanovesículas derivadas de ECM con un polímero hidrófilo en un disolvente apropiado. Luego, el disolvente se elimina mediante métodos como el secado al aire, y al resto se le da la forma deseada (por ejemplo, una lámina) y se aplica en el sitio objetivo. Las formulaciones que contienen dichos polímeros hidrófilos se conservan bien porque tienen un bajo contenido de agua. En el momento de su uso absorben agua convirtiéndose en geles que además se almacenan bien. En el caso de las láminas, la firmeza se puede ajustar mezclando un alcohol polihídrico con un polímero hidrófilo similar a los anteriores, tales como celulosa, almidón y sus derivados, o compuestos poliméricos sintéticos. Se pueden utilizar láminas hidrófilas así formadas. También se puede incorporar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye las nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento, en vendajes y apósitos para heridas.

#### Andamios y dispositivos

También se describen dispositivos que incluyen nanovesículas derivadas de una matriz extracelular, tal como una matriz extracelular de mamífero, por ejemplo una matriz extracelular humana o porcina. Cualquiera de las nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento, puede aplicarse como recubrimiento o incrustarse en componentes de un dispositivo. El dispositivo puede ser, sin limitación, una malla quirúrgica, una prótesis endovascular, un marcapasos, un catéter, válvula cardíaca, biosensor, dispositivo de administración de fármacos o un implante ortopédico. El dispositivo se puede utilizar para reparar un tendón o músculo dañado o desgarrado. El andamio o dispositivo puede ser para el tratamiento de un trastorno de la articulación temporomandibular, véase por ejemplo, véase la patente de EE. UU. n.º 9,277,999.

En el presente documento se describen bioandamios que incluyen nanovesículas derivadas de una matriz extracelular, tal como una matriz extracelular de mamífero, por ejemplo una matriz extracelular humana o porcina. Cualquiera de las nanovesículas derivadas de ECM, como se describe en el presente documento, puede incluirse en un bioandamio, que es un andamio biológicamente compatible. Estos bioandamios se pueden incorporar a un dispositivo.

Los componentes poliméricos utilizados para fabricar los dispositivos descritos en el presente documento son preferiblemente biocompatibles. Por "biocompatible" se entiende que una composición polimérica y sus productos normales de degradación *in vivo* son citocompatibles y son sustancialmente no tóxicos ni carcinógenos en un paciente dentro de tolerancias útiles, prácticas y/o aceptables. Por "citocompatible" se entiende que el polímero puede sostener una población de células y/o la composición polimérica, dispositivo y productos de degradación de la misma no son citotóxicos y/o carcinógenos para las células de tipo natural (normales, no cancerosas) dentro de tolerancias útiles, prácticas y/o aceptables. Por ejemplo, cuando el polímero se pone en un cultivo de células epiteliales humanas no afecta negativamente a la viabilidad, crecimiento, adhesión y número de células. En una realización no limitante, las composiciones y/o dispositivos son "biocompatibles" en la medida en que sean aceptables para su uso en un paciente humano de acuerdo con los estándares regulatorios aplicables en una jurisdicción determinada. En otro ejemplo, el polímero biocompatible, cuando se implanta en un paciente, no causa una reacción adversa sustancial o un daño sustancial a las células y tejidos del cuerpo, por ejemplo, la composición o dispositivo polimérico no causa necrosis o una infección que dé como resultado daño a tejidos por el andamio implantado.

Los andamios y dispositivos se pueden utilizar para una gran cantidad de aplicaciones médicas que incluyen, pero no se limitan a, curación de heridas, remodelación y regeneración de tejidos. Por ejemplo, y sin limitación, el andamio se puede utilizar para la curación de heridas.

En algunas realizaciones, el dispositivo o bioandamio puede incluir una matriz extracelular. En ejemplos específicos no limitantes, la matriz extracelular proviene de células esofágicas, células de vejiga urinaria, una submucosa del intestino delgado o una dermis.

En una determinada realización, la ECM puede ser autóloga, de modo que la ECM y las nanovesículas derivadas de

ECM sean del mismo sujeto. En particular, se puede recoger y usar una ECM de un sujeto, tal como un ser humano, para el aislamiento de nanovesículas. Estas nanovesículas derivadas de ECM se pueden utilizar con ECM del mismo sujeto. Por lo tanto, se produce un bioandamio o dispositivo que contiene la ECM y las nanovesículas derivadas de ECM del mismo sujeto.

5 En otra realización, la ECM puede ser alogénica, de modo que la ECM y las nanovesículas derivadas de ECM sean de diferentes sujetos de la misma especie. En particular, se puede recoger y usar una ECM de un sujeto, tal como un ser humano, para el aislamiento de nanovesículas. Estas nanovesículas derivadas de ECM se pueden utilizar con ECM de un sujeto diferente. De este modo, se produce un bioandamio o dispositivo que contiene la ECM y las nanovesículas derivadas de ECM de diferentes sujetos, pero de la misma especie.

10 En otra realización, la ECM puede ser xenogénica, de modo que la ECM y las nanovesículas derivadas de ECM son de diferentes especies. En un ejemplo no limitante, se puede recoger y usar una ECM de un sujeto, tal como un ser humano, para el aislamiento de nanovesículas. Estas nanovesículas derivadas de ECM se pueden utilizar con ECM de una especie diferente, tal como un cerdo. En otro ejemplo no limitante, se puede recoger y usar una ECM de un sujeto, tal como un cerdo, para el aislamiento de nanovesículas. Estas nanovesículas derivadas de ECM se pueden utilizar con ECM de una especie diferente, tal como un ser humano. Por lo tanto, se produce un bioandamio o dispositivo que contiene la ECM y las nanovesículas derivadas de ECM de las diferentes especies.

15 En una realización adicional, la ECM y las nanovesículas derivadas de ECM provienen de la misma fuente de tejido. En otra realización, la ECM y las nanovesículas derivadas de ECM provienen de diferentes fuentes de tejido. Así, en algunos ejemplos no limitantes, tanto la ECM como las nanovesículas derivadas de ECM pueden producirse a partir de tejido esofágico, vejiga urinaria, submucosa del intestino delgado, dermis, cordón umbilical, pericardio, tejido cardíaco o músculo esquelético, o células en cultivo de estos tejidos. En otros ejemplos no limitantes, las nanovesículas derivadas de ECM se producen a partir de tejido esofágico, vejiga urinaria, submucosa del intestino delgado, dermis, cordón umbilical, pericardio, tejido cardíaco o células de músculo esquelético, y la ECM no proviene de esta fuente de tejido. En otros ejemplos no limitantes, la ECM se produce a partir de tejido esofágico, vejiga urinaria, submucosa del intestino delgado, dermis, cordón umbilical, pericardio, tejido cardíaco o músculo esquelético, y las nanovesículas derivadas de la ECM no provienen de esta fuente de tejido.

20 En una realización no limitante, además de las nanovesículas derivadas de ECM, el andamio (o dispositivo) incluye otros agentes, tales como agentes bioactivos. Estos agentes bioactivos se pueden usar para facilitar la curación de tejidos, remodelación de tejidos y/o angiogénesis. En otra realización no limitante, el armazón (o dispositivo) incluye agentes bioactivos adicionales para prevenir bacterias y otros patógenos, reclutar tipos de células seleccionadas, tales como células madre, o inducir la diferenciación de células. En otra realización más no limitante, el andamio comprende poros para permitir que una herida drene o que las células pasen a través y depositen tejido conectivo.

25 Como se señaló anteriormente, un andamio o dispositivo puede incluir una ECM, además de las nanovesículas derivadas de ECM. En otra realización no limitante, se añaden combinaciones de células y agentes bioactivos al andamio o dispositivo que incluye las nanovesículas derivadas de ECM antes o durante la implantación en un sitio en un paciente. Las nanovesículas descritas se pueden aplicar o incorporar en cualquiera de estos andamios.

30 Un armazón puede incluir cualquier componente polimérico sintético, componente polimérico biológico adecuados o combinaciones de los mismos. "Polímero(s) biológico(s)" son polímeros que pueden obtenerse de fuentes biológicas, tales como, sin limitación, tejido de mamíferos o vertebrados y matriz extracelular. Los polímeros biológicos se pueden modificar mediante etapas de procesamiento adicionales. El(los) polímero(s), en general, incluye(n), por ejemplo y sin limitación, monopolímero(s), copolímero(s), mezcla(s) polimérica(s), polímero(s) de bloques, copolímero(s) de bloques, polímero(s) reticulado(s), polímero(s) no reticulado(s), polímero(s) lineales, ramificados, forma de peine, de estrella y/o dendrítico, en donde el(los) polímero(s) se puede(n) formar en cualquier forma útil, por ejemplo y sin limitación, un hidrogel, una malla porosa, una fibra, malla tejida, o malla no tejida, tal como, por ejemplo y sin limitación, una malla no tejida formada por electrodeposición.

35 En algunas realizaciones, los componentes poliméricos adecuados para el andamio pueden ser un polímero que sea biodegradable y biocompatible. Por "biodegradable" se entiende que un polímero, una vez implantado y puesto en contacto con fluidos y/o tejidos corporales, se degradará parcial o completamente mediante procesos químicos, bioquímicos y/o enzimáticos. Ejemplos no limitantes de tales reacciones químicas incluyen reacciones ácido/base, reacciones de hidrólisis y escisión enzimática. En ciertas realizaciones no limitantes, los polímeros biodegradables pueden comprender homopolímeros, copolímeros y/o mezclas poliméricas que comprenden, sin limitación, uno o más de los siguientes monómeros: glicolida, lactida, caprolactona, dioxanona y carbonato de trimetileno. Los ejemplos no limitantes de polímeros biodegradables incluyen elastómeros de poli(éster uretano)-urea (PEUU) y elastómeros de poli(éter éster uretano)-urea (PEEUU). En otras realizaciones no limitantes, el(los) polímero(s) comprende(n) restos químicos lábiles, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen ésteres, anhídridos, polianhídridos o amidas, que pueden ser útiles, por ejemplo y sin limitación, para controlar la velocidad de degradación del andamio y/o la velocidad de liberación de agentes terapéuticos del andamio. Alternativamente, el(los) polímero(s) puede(n) contener péptidos o biomacromoléculas como unidades estructurales que son susceptibles de reacciones químicas una vez colocados in situ. En un ejemplo no limitante, el polímero es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos alanina-alanina-lisina, que confiere labilidad enzimática al polímero. En otra realización no limitante, la composición polimérica

puede comprender un componente biomacromolecular derivado de una ECM. Por ejemplo, la composición polimérica puede comprender la biomacromolécula colágeno de modo que la colagenasa, que está presente en el sitio, puede degradar el colágeno.

5 Los componentes poliméricos pueden seleccionarse de modo que se degraden en el sitio en una escala de tiempo que es similar a la velocidad esperada de curación de la herida o tejido. Ejemplos no limitantes de velocidades de degradación en el sitio incluyen entre una semana y un año o incrementos entre, por ejemplo, entre dos semanas y 10 meses, y entre un mes y seis meses.

10 Las propiedades mecánicas de un andamio biodegradable se pueden optimizar para funcionar bajo la tensión y estrés normales sobre el tejido nativo en el sitio de implantación. En ciertas realizaciones no limitantes, las propiedades mecánicas del andamio se optimizan de manera similar o idéntica a las del tejido blando nativo, tal como la fascia, tejido conectivo, hueso, cartílago, vaso sanguíneo, músculo, tendón, grasa, etc.

Las propiedades mecánicas del andamio también pueden optimizarse para que sean adecuadas para la manipulación quirúrgica. En una realización no limitante, el andamio es flexible y se puede suturar al sitio. En otra, el andamio es plegable y se puede suministrar en el sitio mediante métodos laparoscópicos mínimamente invasivos.

15 Las propiedades físicas y/o mecánicas del andamio biodegradable se pueden optimizar según el uso previsto. Las variables que se pueden optimizar incluyen, sin limitación, el grado de reticulación física, química o fotooxidativa en una red que comprende componentes poliméricos, la proporción de componentes poliméricos dentro de la red, la distribución del peso molecular de los componentes poliméricos, y el método de procesamiento de los polímeros. Los polímeros típicamente son semicristalinos y sus propiedades físicas y/o morfología dependen de una gran cantidad  
20 de factores, incluida la composición de monómeros, polidispersidad, peso molecular promedio, reticulación y condiciones de fusión/cristalización. Por ejemplo, se sabe que las condiciones de flujo y/o cizallamiento durante el enfriamiento de una masa fundida de polímero afectan a la formación de estructuras cristalinas en la composición. En una realización no limitante, el andamio comprende un componente polimérico que proporciona resistencia y durabilidad al andamio, pero es elastomérico de modo que las propiedades mecánicas del andamio son similares al  
25 tejido nativo que rodea la herida o el sitio que necesita regeneración de tejido.

Como se describe en el presente documento, según ciertas realizaciones no limitantes, uno o más de los componentes poliméricos del andamio biodegradable es elastomérico. En un ejemplo no limitante, el andamio tiene propiedades físicas similares a las del cartílago. En ciertas realizaciones no limitantes, el andamio biodegradable comprende componentes poliméricos altamente distensibles. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen aquellos que tienen  
30 un alargamiento de rotura que varía de aproximadamente 100% a aproximadamente 900%, incluido cualquier incremento entre ellos, por ejemplo entre 200% y 800%, o entre 325% y 600%. En otras realizaciones no limitantes, el alargamiento de rotura del polímero está entre 50% y 100%, incluido cualquier incremento intermedio. Además, suele ser útil seleccionar polímeros con resistencias a la tracción de 10 kPa a 30 MPa, incluyendo incrementos entre estas, tales como de 5 MPa a 25 MPa, y entre 8 MPa y 20 MPa. En ciertas realizaciones no limitantes, el módulo inicial está  
35 entre 10 kPa y 100 MPa e incrementos entre estos, tales como entre 10 MPa y 90 MPa, y entre 20 MPa y 70 MPa.

La descripción se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

#### Materiales y métodos

40 Sustancias químicas y reactivos. La pepsina de mucosa de estómago porcino se obtuvo de MP Biomedical (Solon, OH). La colagenasa, de clostridium histolítico se obtuvo de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). La solución de proteinasa K, el kit de ensayo de ADNbc Quant-iT PicoGreen y la RNasa A se obtuvieron de Thermo Scientific (Waltham, MA). La DNasa exenta de RNasa se obtuvo de Qiagen (Valencia, CA).

#### Producción de bioandamios de ECM.

45 ECM dérmica. La ECM dérmica se preparó como se describió anteriormente. Brevemente, se recogió piel de espesor total de cerdos de peso de mercado (~110 kg) (Tissue Source, Inc., Lafayette, IN) y se separó la grasa subcutánea y la epidermis mediante deslaminación mecánica seguida de tratamiento con tripsina al 0.25 % (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) durante 6 h, etanol al 70% durante 10 h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 15 min, Triton X-100 al 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en EDTA al 0.26%/Tris al 0.69% durante 6 h con un cambio de solución durante 16 h adicionales, ácido  
50 peracético al 0.1%/etanol al 4% (Rochester Midland, Rochester, NY) durante 2 h. Se realizaron lavados con agua entre cada cambio químico alternando lavados con agua y solución salina tamponada con fosfato (PBS) después de la etapa final. Todas las exposiciones químicas se realizaron con agitación en un agitador orbital a 300 rpm. Luego se liofilizó la ECM dérmica y se molió en forma de partículas usando un molino Wiley con un tamiz de n.º de malla 40.

55 Matriz de vejiga urinaria (UBM). La UBM se preparó como se describió anteriormente (Wolf et al., *Biomaterials*, octubre de 2012; 33(29):7028-38). Se adquirieron vejigas urinarias porcinas de animales de peso mercado de Tissue Source,

LLC. (Lafayette, Indiana). Brevemente, se separaron mecánicamente la túnica serosa, túnica muscular externa, túnica submucosa y túnica muscularis mucosae. Las células uroteliales luminales de la túnica mucosa se disociaron de la membrana basal mediante lavado con agua desionizada (DI). El tejido restante consistía en membrana basal y lámina propia subyacente de la túnica mucosa, y se descelularizó mediante agitación en ácido peracético al 0.1% con etanol al 4% durante 2 horas a 300 rpm. Luego, el tejido se enjuagó exhaustivamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y agua estéril. Luego se liofilizó la UBM y se molió a una forma en partículas usando un molino Wiley con un tamiz de n.º de malla 60.

Submucosa del intestino delgado (SIS). La preparación del bioandamio de SIS se ha descrito previamente. Brevemente, se extrajo yeyuno de cerdos de 6 meses de edad con peso de mercado (109-112 kg (240-260 libras)) y se dividió longitudinalmente. Las capas superficiales de la túnica mucosa se separaron mecánicamente. Asimismo, se separaron mecánicamente la túnica serosa y la túnica muscular externa, dejando la túnica submucosa y las porciones basilares de la túnica mucosa. La descelularización y desinfección del tejido se completaron mediante agitación en ácido peracético al 0.1% con etanol al 4% durante 2 horas a 300 rpm. Luego, el tejido se enjuagó exhaustivamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y agua estéril. Luego se liofilizó el SIS y se molió a una forma de partículas usando un molino Wiley con un tamiz de n.º de malla 60.

*BARD XENMATRIX™* (dermis porcina), *ACELL® MATRISTEM®* (UBM porcina) y *COOK® BIOTECH, BIODESIGN®* (SIS porcino) fueron proporcionados por los fabricantes de los respectivos dispositivos.

Digestión enzimática de muestras de ECM. Las muestras de ECM se liofilizaron hasta sequedad, se cortaron manualmente en trozos pequeños y se molieron hasta un polvo usando un molino Wiley con un tamiz de n.º de malla 60. La digestión enzimática se realizó digiriendo 5 mg/ml en peso seco de cada muestra con proteinasa K 0.1 mg/ml en tampón (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 200 mM) durante 24 h a temperatura ambiente; colagenasa 0.1 mg/ml en tampón (Tris 50 mM pH 8, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 200 mM) durante 24 h a temperatura ambiente; o pepsina 1 mg/ml en tampón (HCl 0.01 M) durante 24 h a temperatura ambiente. Antes de la extracción del ácido nucleico, las muestras solubilizadas con pepsina se neutralizaron a un pH de 8.0 con NaOH. Se prepararon muestras no digeridas (control) mediante resuspensión de 5 mg/ml en peso seco de cada muestra en tampón salino (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 200 mM) o tampón ácido (HCl 0.01 M), sin tratamiento enzimático.

Extracción y perfilado de ácidos nucleicos. El ácido nucleico se extrajo de muestras de ECM en polvo mediante la adición de un volumen igual de fenol:cloroformo, pH 8. Las muestras se agitaron brevemente con agitador vorticial, se centrifugaron a 12 000 x g durante 10 minutos y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. El ácido nucleico se hizo precipitar mediante la adición de 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 3 volúmenes de etanol al 100%, se mezclaron por inversión y se centrifugaron durante 20 minutos a 20 000 x g, 4°C. Los sedimentos de ácido nucleico se lavaron una vez con etanol al 75% y se resuspendieron en agua exenta de nucleasas. La longitud de pares de bases del ácido nucleico recuperado se analizó utilizando el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies), o mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (peso/vol) y tinción con bromuro de etidio. La cuantificación del ácido nucleico total se realizó mediante absorbancia UV a 260 nm utilizando el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 1000. La cuantificación del ADNbc se realizó utilizando el kit de ensayo de ADNbc Quant-iT PicoGreen de acuerdo con el protocolo recomendado por los fabricantes.

Aislamiento de ARN. El ARN celular así como el "ARN libre" de la ECM (atrapado dentro de los bioandamios de la ECM como consecuencia del proceso de descelularización) se aislaron utilizando el kit miRNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN de las nanovesículas se aisló mediante el kit SeraMir (SBI, Mountain View, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Antes del aislamiento del ARN de las nanovesículas, las muestras se trataron con 2 unidades (10 µg/ml) de RNasa (ABI, Foster City, CA) a 37 grados durante 30 minutos para degradar cualquier ARN contaminante tal como el ARN remanente ("ARN libre") del proceso de descelularización. La reacción se terminó añadiendo inhibidor de RNasa (ABI, Foster City, CA). La cantidad de ARN se determinó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop, Wilmington, DE) y su calidad se determinó mediante Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Aislamiento de nanovesículas. El digerido se sometió a centrifugaciones sucesivas a 500 g (10 min), 2500 g (20 min) y 10 000 g (30 min), para eliminar los restos de fibrillas de colágeno. Cada una de las etapas de centrifugación anteriores se realizó tres veces. Luego, el líquido sobrenadante sin fibra se centrifugó a 100 000 g (ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K) a 4°C durante 70 minutos. Los sedimentos de 100 000 g se lavaron y suspendieron en 500 µl de PBS. El procedimiento anterior se realizó con enzima digerida sin ECM para que sirviera como control.

Imágenes de nanovesículas. Se llevó a cabo la generación de imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) en vesículas de ECM cargadas en rejillas recubiertas de carbono y fijadas en paraformaldehído al 4%. Se tomaron imágenes de las rejillas a 80 kV con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1210 con una cámara digital AMT de alta resolución. El tamaño de las MV se determinó a partir de imágenes representativas utilizando el software JEOL TEM.

Electroforesis en gel y transferencia Western. La concentración de proteína de las nanovesículas se determinó utilizando el kit de ensayo de cuantificación de proteínas del ácido bicinónico de Pierce (Pierce Chemical, Rockford, IL) y se resuspendieron en tampón de laminillas (R&D Systems, Minneapolis, MN) que contenía β-mercaptoetanol al 5%

(Sigma, St. Louis, MO). Luego se cargaron concentraciones iguales de las proteínas en pocillos de SDS-PAGE con gradiente del 5%-15% (Bio-Rad, Hercules, CA). Los geles se analizaron usando un conjunto de módulo de electroforesis Mini-Protean (Bio-Rad) a 150 mV en tampón de análisis (base Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1%) en agua bidestilada, seguido de una transferencia semiseca a membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (Millipore, Bedford, MA) durante 45 min a 280 mA en tampón de transferencia (Tris 25 mM, pH 7.5, glicina 192 mM, 20% de metanol y 0.025% de dodecilsulfato de sodio). Luego, las membranas se bloquearon durante 45 minutos con tampón de bloqueo exento de proteínas Pierce (Pierce Chemical, Rockford, IL) y se incubaron durante la noche con los siguientes anticuerpos primarios: CD63 y CD81 (SBI, Mountain View, CA). Las membranas se lavaron tres veces durante 15 minutos cada una antes y después de incubarlas con el anticuerpo secundario apropiado. Las membranas lavadas se expusieron a un sustrato quimioluminiscente (Bio-Rad) y luego se visualizaron utilizando un instrumento táctil ChemiDoc (Bio-Rad).

Determinación del tamaño de las nanovesículas. Las nanovesículas se diluyeron en PBS exenta de partículas y se determinó su tamaño mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) como se ha descrito (Webber, J. y Clayton, A. How pure are your vesicles?). Brevemente, las mediciones de NTA se realizaron utilizando un instrumento NanoSight LM10 (NanoSight NTA 2.3 Nanoparticle Tracking and Analysis Release Version Build 0025). La distribución del tamaño de las nanovesículas se analizó midiendo la velocidad del movimiento browniano con un sistema NanoSight LM10 (NanoSight, Wiltshire, Reino Unido) equipado con software de captura de video rápido y seguimiento de partículas. Las nanovesículas se diluyeron en PBS exenta de partículas y se inyectaron en un cubículo de muestra NanoSight. Se determinó la distribución de tamaño media  $\pm$  error estándar (EE).

Secuenciación de ARN. Se prepararon pequeñas bibliotecas de ARN utilizando el kit Ion Total RNA Seq v 2 y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, después de la selección del tamaño de ARN basada en perlas en el intervalo de 10-200 nt, se creó ADNc mediante hibridación y ligado de adaptadores de secuenciación indexados seguido de transcripción inversa y PCR. Se seleccionó nuevamente el tamaño de la biblioteca amplificada utilizando un método basado en perlas y se analizó en un bioanálizador para verificar que la distribución de tamaños de la biblioteca fuera la esperada. Se utilizó el sistema Ion One Touch 2 para realizar una PCR en emulsión automatizada de las bibliotecas preparadas y enriquecimiento de las partículas Ion Sphere™ con molde (ISP). La secuenciación se realizó en un Ion Proton utilizando un único chip de secuenciación P1. Se eliminaron los filtros de calidad para que se comunicaran todos los datos de la secuencia. Se analizó en las secuencias el control de calidad (FASTQC) y se alinearon con el genoma humano (HG19) utilizando Torrent Suite. Los archivos de salida (.bam) se cargaron, se asignaron a miRBase V.20 y se analizaron adicionalmente utilizando CLC Genomic (Qiagen, Valencia, CA)). Las lecturas se normalizaron a lecturas por millón de lecturas (RPM).

Ingenuity Pathway Analysis. Los miARN identificados mediante secuenciación de ARN se analizaron mediante Ingenuity Pathway Analysis (IPA) para determinar una firma de la ruta de señalización de miARN.

qPCR. Se utilizaron ensayos de expresión de genes Sybr Green (ABI, Foster City, CA) para determinar los niveles de expresión relativos de iNOS, TNFa, STAT1, STAT2, STAT5A, STAT5B, IRF3, IRF4, IRF5, IL1RN, CD206, TGM2, STAT3, STAT6, KLF4, PPARg. Los resultados se analizaron mediante el método de  $\Delta\Delta C_t$  utilizando control de  $\beta$ -glucuronidasa ( $\beta$ -GUS) para normalizar los resultados. La tasa de cambio se calculó utilizando el control de nanovesículas como valor inicial.

Cultivo de células. Las células madre perivasculares (PVSC) se aislaron como se describió anteriormente (Timothy et al., *Biomaterials*. 2013 septiembre; 34(28): 6729-6737). Las células aisladas se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM, Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 20% (FBS, Thermo Fisher), penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml (Sigma Aldrich) a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%.

Se obtuvieron células de mioblastos musculares C2C12 de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y se cultivaron siguiendo las pautas de la ATCC, en DMEM (Invitrogen) suplementado con FBS al 10% y penicilina/estreptomycin al 1% (Sigma Aldrich).

Los monocitos humanos THP-1 se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron en RPMI, FBS al 10%, penicilina/estreptomycin al 1% y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.05 mM en una atmósfera humidificada a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Se sembraron dos millones de células THP-1 por pocillo con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) 320 nM durante 24 horas para inducir la diferenciación en macrófagos. Los macrófagos adherentes se lavaron en PBS y se pusieron en medio nuevo, seguido de una incubación de 72 horas en medio nuevo hasta reposo. Se ha mostrado que los macrófagos THP1 diferenciados con PMA y reposados presentan una actividad casi indistinguible de los macrófagos de sangre periférica humana (Diagneault et al., *PLoS One* 13 de enero de 2010;5(1):e8668). Los macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) murina se aislaron y caracterizaron como se describió anteriormente (Sicari et al., *Biomaterials*, octubre de 2014;35 (30):8605-12). Brevemente, se recogió médula ósea de ratones C57bl/6 de 6 a 8 semanas de edad. Utilizando una técnica aséptica, se retiró la piel desde la extremidad posterior proximal hasta el pie, se desarticulaban el tarso y la babilla y se aisló la tibia. De manera similar, se desarticuló la articulación coxofemoral para aislar el fémur. Los huesos se mantendrán en hielo y se enjuagarán en un plato estéril que contenga medio completo de macrófagos que consiste en DMEM, suero bovino fetal (FBS) al 10%, líquido sobrenadante de L929 al 10%, betamercaptoetanol al 0.1%, aminoácidos no esenciales 10 mM y tampón Hepes 10 mM. Luego se cortaron transversalmente los extremos de cada hueso y se lavó la cavidad de la médula con medio completo usando una

5      aguja de calibre 30. Las células recogidas se lavaron y se sembraron en placas con 106 células/ml y se dejó que se diferenciaron en macrófagos durante 7 días con cambios completos de medio cada 48 h. Se cultivaron células N1E-115, una línea celular de neuroblastoma de ratón, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% inactivado por calor. Se sembraron un millón de células en una placa de 6 pocillos antes de la adición de nanovesículas.

10      Marcado de fluorescencia de nanovesículas. Las nanovesículas se marcaron con Exo-glow (SBI, Mountain View, CA) de acuerdo con las instrucciones de fabricación. Brevemente, se marcaron 500 µl de nanovesículas resuspendidas con Exo-glow y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se añadieron 100 µl de ExoQuick-TC para detener la reacción y las muestras se pusieron sobre hielo durante 30 minutos. Luego las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 14 000. Se separó el líquido sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 500 µl de PBS 1x. Luego, las células *in vitro* se expusieron a nanovesículas marcadas durante cuatro horas y se tomaron imágenes mediante el microscopio Axio Observer Z1.

15      Ensayo de rayado *in vitro*. Las células se cultivaron como se describe anteriormente en placas de seis pocillos. Cuando el cultivo fue confluyente (24 h después de la siembra), se añadieron nanovesículas al medio de cultivo. Se usó una punta de pipeta p-200 para marcar dos líneas verticales a través de la capa de células confluentes simulando una "herida". Las imágenes se adquirieron cada 20 minutos con el microscopio Axio Observer Z1.

20      Ensayo de migración. La capacidad de las nanovesículas para afectar a la función celular se evaluó mediante el ensayo de migración celular CytoSelect de 8 mm (Cell Biolabs, San Diego, CA) en células madre perivasculares (PVSC). Las PVSC se privaron de alimento y se trataron con nanovesículas durante 14-17 h en medios sin factores de crecimiento añadidos que contenían FCS inactivado por calor al 0.5%. Las células privadas de alimento se recogieron con tripsina, se resuspendieron en medio exento de suero a una concentración de 4105 células/ml y se preincubaron durante 1 h en una incubadora a 37°C con 95% de aire humidificado = 5% de CO<sub>2</sub>. El inserto de cámara con membrana de 96 pocillos se puso en la bandeja de alimentación y se añadieron 100 µl de suspensión celular a cada pocillo de la cámara con membrana, para una concentración final de 40 000 células por pocillo. La placa se cubrió y se incubó durante 4 h a 37°C bajo una atmósfera humidificada en 95% de aire=5% de CO<sub>2</sub>. Se añadieron ciento cincuenta microlitros de solución de desprendimiento de células a cada pocillo de una bandeja de recolección limpia. La cámara con membrana de 96 pocillos se separó de la bandeja de alimentación, las células que quedaban en la parte superior de la cámara con membrana se retiraron mediante aspiración y la cámara con membrana se puso en la bandeja de recolección que contenía la solución de desprendimiento de células y se incubó en una incubadora de cultivo celular durante 1 h, enjuagando las células del fondo de las membranas en los pocillos de la bandeja de recolección. Se preparó solución de lisis celular-colorante CyQuant GR diluyendo el colorante en tampón de lisis (1:75), se retiró la cámara con membrana de la bandeja de recolección y se añadieron 50 µl de solución de lisis celular-colorante a cada pocillo de la bandeja de recolección. La bandeja se incubó a temperatura ambiente durante 20 min con el fin de lisar las células y teñir los ácidos nucleicos. Luego se transfirieron ciento cincuenta microlitros del contenido de cada pocillo a una placa adecuada para la medición de la fluorescencia. La fluorescencia se midió con un lector de placas SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 480-520 nm. Cada condición experimental se ensayó por triplicado y se determinó el número promedio de células migradas para cada condición. Se utilizaron dos pruebas t de datos emparejados para detectar diferencias significativas entre las células tratadas con nanovesículas y las de control. Los valores de  $p < * 0.05$  se consideraron significativos

40      Inmunomarcado de macrófagos. Se ha mostrado que los productos de degradación de la ECM afectan al fenotipo de los macrófagos. Se realizó inmunomarcado de macrófagos para evaluar si las microvesículas insertadas en ECM tienen un efecto similar sobre el fenotipo de los macrófagos. Se aislaron macrófagos primarios derivados de médula ósea (BMDM) de ratón y se utilizaron dos marcadores (iNOS y Fizz-1) que son fuertes indicadores de los fenotipos proinflamatorio "tipo M1" y antiinflamatorio "tipo M2" (respectivamente). Los anticuerpos primarios utilizados para la tinción inmunofluorescente fueron: (1) anti-F4/80 monoclonal (Abcam, Cambridge, MA) en una dilución 1:200 para un marcador panmacrófago, (2) anti-iNOS policlonal (Abcam, Cambridge, MA) a una dilución 1:100 para un marcador M1, y (3) anti-Fizz1 policlonal (Peprotech, Rocky Hill, Nueva Jersey) para un marcador M2. Las células se incubaron en una solución de bloqueo que consistía en PBS, Triton-X al 0.1%, Tween-20 al 0.1%, suero de cabra al 4% y albúmina sérica bovina al 2% para evitar la unión no específica durante 1 hora a temperatura ambiente. Se separó la solución de bloqueo y las células se incubaron en anticuerpos primarios durante 16 h a 4°C. Después de lavar en PBS, las células se incubaron en anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo (anti-rata de burro-Alexa Fluor 488 o anti-conejo de burro 488, Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar nuevamente con PBS, los núcleos se contratiñeron con 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) antes de la obtención de imágenes. Se tomaron imágenes de tres campos 20x para cada pocillo utilizando un microscopio de células vivas. Los tiempos de exposición a la luz para los macrófagos tratados con ECM se normalizaron basándose en los establecidos para macrófagos tratados con citoquinas, que sirvieron como control. Las imágenes se cuantificaron utilizando un canal CellProfiler para obtener porcentajes positivos de F4/80, iNOS y Fizz-1.

## Ejemplo 2

Quantificación de ácidos nucleicos en materiales de bioandamios de ECM.

60      El descubrimiento de las nanovesículas de ECM fue un resultado inesperado de estudios para evaluar en los

bioandamios la presencia de formas alternativas de ácido nucleico como un remanente del proceso de descclularización. Aunque la cuantificación del ADN bicatenario (ADNbc) se utiliza comúnmente como métrica para evaluar la eficiencia de la descclularización, en estos análisis se descclula la cuantificación de otras formas de ácido nucleico, tales como el ARN o el ADN monocatenario (ADNmc). Para determinar si estaban presentes formas alternativas de ácido nucleico en los bioandamios de ECM, se extrajo ácido nucleico de materiales de andamios de ECM triturados (acelulares) utilizando el método de fenol:cloroformo. La cuantificación del ADNbc se realizó mediante el ensayo PicoGreen y la cuantificación del ácido nucleico total se realizó mediante absorbancia UV a 260 nm, que detecta todas las formas de ácido nucleico presentes, incluido el ARN. Los resultados mostraron que la cantidad de ADNbc representaba solo una fracción del ácido nucleico total presente en los materiales de andamios de ECM descclularizados (Figura 1). Sorprendentemente, se observó que si estos armazones de ECM se digerían primero enzimáticamente con varias proteasas antes de la extracción del ácido nucleico, la cantidad de ácido nucleico total aumentaba significativamente en comparación con las muestras no digeridas (control). Es importante destacar que este aumento en el ácido nucleico total no se debía a un aumento del ADNbc, lo que implica que formas alternativas de ácido nucleico estaban de alguna manera encapsuladas y protegidas por la ECM. Este patrón se observó para todas las formas de materiales de andamios de ECM ensayadas, que incluían equivalentes producidos en laboratorio y disponibles comercialmente de matriz de vejiga urinaria (UBM) y ACELL® MATRISTEM™ (Figura 1A); submucosa del intestino delgado (SIS) y SIS fabricada por COOK BIOTECH® (Figura 1B); dermis y Bard® XENMATRIZ™ (Figura 1C). Además, las concentraciones de ácido nucleico entre los andamios producidos en laboratorio y sus equivalentes disponibles comercialmente eran similares, lo que demuestra que estos resultados no eran un artefacto de los protocolos estándar de descclularización del laboratorio de los autores de la invención.

### Ejemplo 3

La digestión enzimática de andamios biológicos libera moléculas pequeñas de ARN

Para determinar si el ARN estaba presente en los andamios de ECM, las extracciones de ácido nucleico se expusieron a nucleasas DNasa I o RNasa A, y los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 2A). Los resultados muestran que el tratamiento con DNasa I eliminó todo el material de ácido nucleico excepto una banda manchada que variaba entre ~25-200 pb. Recíprocamente, el tratamiento con RNasa A eliminó esta pequeña fracción de ácido nucleico, lo que indica que estas moléculas de ácido nucleico de longitud corta eran, de hecho, moléculas pequeñas de ARN. Además, en comparación con las muestras de control no digeridas, estas moléculas pequeñas de ARN solo se podían extraer de manera eficiente después de que los andamios de ECM se degradaran enzimáticamente (Figura 2A), un resultado que era paralelo al aumento del ácido nucleico total observado en la Figura 1. Las preparaciones de ácido nucleico se analizaron adicionalmente utilizando el bioanalizador Agilent 2100 (Figura 2B). Los resultados muestran que, en comparación con las muestras no expuestas a la nucleasa (Figura 2B, panel superior), el tratamiento con DNasa I eliminó todo el material de ácido nucleico excepto las moléculas pequeñas de ARN dentro del intervalo de 25-200 pb (panel inferior), confirmando así la presencia de moléculas pequeñas de ARN en los andamios de ECM. Aunque los resultados mostrados en las Figuras 2A y 2B se obtuvieron utilizando andamios de UBM producidos en laboratorio, estas moléculas pequeñas de ARN se identificaron posteriormente en todos los andamios biológicos analizados (Figura 2C). Es interesante que el tratamiento previo de los andamios de ECM digeridos enzimáticamente con nucleasa RNasa A, antes de la extracción del ácido nucleico, no logró eliminar las moléculas pequeñas de ARN (Figuras 2D). La incapacidad de la RNasa A para eliminar las moléculas pequeñas de ARN de las formas de ECM digeridas enzimáticamente indicaba que el ARN estaba siendo protegido de la degradación por nucleasas, posiblemente por su incorporación en nanovesículas, que protegen la carga de ARN de la actividad de las nucleasas (Koga et al., *J Gastrointest Oncol.* 2011; 2(4): 215-222).

### Ejemplo 4

Identificación de nanovesículas insertadas en ECM.

La primera evidencia de nanovesículas insertadas dentro de ECM se obtuvo usando microscopía electrónica de transmisión (TEM) en una lámina de UBM fijada con tetraóxido de osmio. Se identificaron estructuras redondeadas que se teñían positivamente para osmio, lo que indica la presencia de membranas lipídicas (Figura 3A). A esta observación le siguió la demostración de que estas nanovesículas podían separarse de la matriz sólo después de la digestión enzimática del material del andamio de ECM. La digestión enzimática con pepsina proteasa (Figura 3B, panel izquierdo), que sólo digiere parcialmente el andamio de ECM, puso de manifiesto que estas nanovesículas están literalmente entretejidas en la red de colágeno de la propia matriz. Sin embargo, después de la digestión completa del andamio de ECM con colagenasa o proteinasa K (Figura 3B, paneles derechos), estas nanovesículas podrían separarse completamente de la red de fibras. La estructura, composición y tamaño de estas vesículas son compatibles con lo que se esperaría de nanovesículas y exosomas. Utilizando una estrategia de digestión enzimática acoplada con ultracentrifugación, estas nanovesículas se aislaron y purificaron de todas las formas ensayadas de materiales de andamio de ECM, incluidos los productos disponibles comercialmente (Figura 3C). Estos resultados representan la primera identificación de nanovesículas insertadas dentro de la matriz extracelular.

Luego se evaluó la carga de proteínas de las nanovesículas entre los diferentes productos mediante SDS PAGE y Silverstain. Se descubrió que el patrón de bandas entre los diferentes productos comerciales y los productos del propio laboratorio paralelos era distintivamente diferente. Es interesante que los productos del propio laboratorio, tanto UBM

como SIS, presentaban patrones de bandas similares (Figura 3D).

CD63 y CD81 se encuentran entre los marcadores de superficie de validación para exosomas más utilizados. Al utilizar el análisis de transferencia Western (Figura 3E), no se detectaron bandas positivas en todas las muestras para CD63 o CD81. El control positivo, los exosomas de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea humana, eran positivos para ambos marcadores, mientras que los exosomas de sueros humanos combinados eran positivos sólo para CD63. Esto indica que las nanovesículas y los exosomas insertados dentro de la ECM tienen características diferentes a las de los exosomas circulantes.

Se realizó un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) para determinar el tamaño medio de las nanovesículas para cada muestra. Se encontró que todas las muestras eran consistentes con el tamaño de las nanovesículas, que variaba de 107 nm-216 nm (Figura 3F).

#### Ejemplo 5

##### NGS descubre una firma única de miARN en carga de nanovesículas

Las nanovesículas de ECM aisladas de los diferentes productos comerciales y las paralelas del propio laboratorio se trataron con RNasa durante 30 minutos para degradar cualquier ARN remanente del procedimiento de descelularización ("ARN libre") antes de la etapa de aislamiento del ARN. Esta etapa se realizó para garantizar que los datos de secuenciación de ARN representen únicamente ARN dentro de las nanovesículas. Es interesante que las nanovesículas podían proteger su carga de ARN y no se encontraron cambios notables en la concentración de ARN. Se realizó la secuenciación de ARN para determinar el perfil de ARN pequeño distintivo en cada muestra. Los datos de secuenciación se sometieron a un control de calidad utilizando fastQC antes de su alineación con el genoma humano (HG19). Luego, las muestras se normalizaron para análisis posteriores y se mapearon frente a miRBase (versión 21). Se identificaron 33-240 miARN por muestra y se confirma que los miARN están presentes en abundancia en las nanovesículas insertadas en ECM (Figura 4A). Mientras que la muestra de dermis del propio laboratorio mostró la menor cantidad de miARN diferentes (33), la UBM del propio laboratorio tuvo la mayor cantidad (240). En particular, hubo más de 50% de miARN comunes entre los productos comerciales y los del propio laboratorio, y casi 80% de solapamiento entre ACELL® MATRISTEM® y UBM (Figura 4A). Se utilizó el Ingenuity Pathway Analysis (IPA) para identificar rutas, funciones celulares y fisiológicas. Sorprendentemente, se descubrió que todas las muestras estaban significativamente implicadas en el desarrollo celular, el crecimiento y proliferación celular, la muerte y supervivencia celular, el movimiento celular y el ciclo celular (Figura 4B). Además, se descubrió que los miARN identificados desempeñan un papel en el desarrollo y la función del tejido conectivo (excepto la UBM del propio laboratorio), el desarrollo del organismo (excepto la dermis del propio laboratorio y de COOK® Biotech) y desarrollo de órganos (excepto para BARD XENMATRIX™) (Figura 4C). Se descubrió que los miARN de todas las muestras también estaban implicados en lesiones y anomalías del organismo. Además, la UBM del propio laboratorio era la única muestra asociada con trastornos esqueléticos y musculares. Estos resultados pueden explicar parcialmente la señalización mediante la cual la ECM logra sus efectos secuencia abajo.

#### Ejemplo 6

##### La exposición a nanovesículas insertadas en ECM puede alterar el comportamiento celular

Las nanovesículas aisladas de UBM se marcaron según la química del naranja de acridina. En la Figura 5A, la fluorescencia roja representa ARN mientras que la verde el ADN. Se demostró el marcado exitoso del contenido de nanovesículas, así como la carga de nanovesículas absorbida por células de mioblastos musculares C2C12. Este experimento es una prueba de concepto de que el contenido de las nanovesículas aisladas puede integrarse con las células diana.

Se encontró que las células de neuroblastoma (N1E-115) tenían extensión de neuritas 5 días después del tratamiento con productos de degradación de UBM-ECM. Ese efecto se imitó utilizando únicamente nanovesículas que se aislaron de UBM digerida con colagenasa. Sorprendentemente, dentro de los 3 días posteriores a la exposición a las nanovesículas de UBM, las células N1E-115 mostraron extensión de neuritas, mientras que no se evidenciaron cambios en el grupo de control (Figura 5B).

Luego se determinó si la exposición de las células madre perivasculares (PVSC) a nanovesículas puede afectar a su capacidad para repoblar una zona rayada en un cultivo confluyente. Como se muestra en la Figura 5C, las PVSC expuestas a nanovesículas recuperaron más rápidamente la confluencia total sobre una zona herida en el ensayo de rayado 24 horas después de la exposición. Además, se observó un aumento en el recuento de células 96 horas después de la exposición a las nanovesículas en comparación con el control (Figura 5D).

Se evaluó el efecto de las nanovesículas insertadas en ECM sobre la polarización de los macrófagos. Se había mostrado que los productos de degradación de la ECM (tales como UBM y SIS) pueden promover un fenotipo "tipo" M2 (Sicari et al., *Biomaterials*, octubre de 2014;35(30):8605-12). Los BMDM se expusieron a nanovesículas aisladas de UBM durante 24 horas. La exposición a nanovesículas promovió una activación de macrófagos "tipo M2" similar al control de exposición IL-4. El fenotipo de macrófago M2 se confirmó mediante tinción de inmunofluorescencia de Fizz-1. En particular, no se observaron cambios en el marcador de M1 iNOS.

Utilizando qPCR, se examinó la expresión génica de los marcadores asociados a M1 y M2 después de la exposición a nanovesículas en células THP-1 durante 24 horas. Se observaron cambios significativos en los marcadores M1. Si bien se observó un aumento en los niveles de expresión de los genes de TNF- $\alpha$ , STAT5A/B e IRF5, los niveles de expresión de STAT1/2 disminuyeron. En el panel de marcadores asociados a M2, TGM2 e IRF4 mostraron un aumento después de la exposición a las nanovesículas, pero solo IRF4 resultó ser estadísticamente significativo.

Ejemplo 7

Métodos de aislamiento adicionales

El protocolo mostrado en las Figs. 8A y 8B permite el aislamiento de los exosomas dentro de un tejido. Un trozo de tejido (que puede ser pretratado, liofilizado, congelado, tomado de una biopsia, necropsia u otra fuente) primero se digiere enzimáticamente y luego se somete a centrifugación diferencial con el fin de separar las células, restos de células y otros contaminantes que pueden no ser deseados en la muestra final. Después de estas etapas de centrifugación, el líquido sobrenadante se pone encima de un gradiente que incluye una barrera de densidad que puede estar hecha de iodixanol, sacarosa u otros medios de gradiente de densidad. La concentración de este medio se puede variar según el tejido y perfil de exosomas que se van a aislar. Luego se ultracentrifuga el gradiente, se recoge la fracción en la barrera de densidad y se ultracentrifuga una vez más para lavar el medio del gradiente de densidad y otros restos no deseados. El sedimento final conservado son los exosomas aislados del trozo de tejido inicial.

Los exosomas recogidos del tejido se pueden usar en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Estos métodos también son útiles para perfiles, tratamiento de células y la caracterización adicional de los exosomas presentes en muestras de tejido.

Ejemplo 8

Uso de nanovesículas de ECM para reclutar células, promover el crecimiento celular y promover la diferenciación celular

Estudios anteriores han mostrado que los materiales de bioandamios de ECM (acelulares) pueden facilitar la reparación y regeneración constructiva y funcional del músculo esquelético (Mase et al., *Orthopedics*. 2010;33(7):511; Sicari et al., *Tissue Eng Part A*. 2012; 18(19-20): 1941-1948). Las nanovesículas de ECM pueden recapitular la respuesta de remodelación muscular funcional observada con andamios de ECM intactos. Se utiliza un modelo murino de pérdida muscular volumétrica. Se ha mostrado que la colocación de un andamio de ECM en el sitio de la lesión muscular produce una desviación significativa de la respuesta predeterminada de depósito de tejido cicatricial hacia un resultado de remodelación constructiva (Sicari et al., *Tissue Eng Part A*. 2012; 18(19-20): 1941-1948). Las nanovesículas de ECM facilitan muchos de los efectos atribuidos a los andamios biológicos intactos, incluido el reclutamiento y diferenciación de células madre/progenitoras endógenas, angiogénesis regional, inervación y modulación de la respuesta inmunitaria innata.

a. Modelo murino de pérdida muscular volumétrica: En estos estudios se utiliza el modelo de ratón  $\alpha$ SMA-GFP (C57BL6) que expresa GFP bajo el control del promotor  $\alpha$ SMA. Este modelo de ratón transgénico (Yokota et al., *Stem Cells*. 2006;24(1):13-22; Kalajzic et al., *Bone*. 2008;43(3):501-510), permite el seguimiento del destino de las células progenitoras infiltrantes durante la regeneración del músculo esquelético. Se crea un defecto de tamaño crítico en el músculo cuádriceps del ratón. Brevemente, se hace una incisión de 0.5-1.0 cm que va paralela al eje proximal-distal del muslo, directamente sobre el músculo cuádriceps. Se utiliza una punción de biopsia estéril para extraer una sección del músculo de aproximadamente 3 mm<sup>2</sup> (aproximadamente 70% de defecto). El defecto se reemplaza con uno de los siguientes artículos de ensayo: 1) hidrogel de ECM, 2) nanovesículas de ECM suspendidas en PBS estéril o 3) control de vehículo de PBS. Los defectos no reparados sirven como grupo de control. El artículo de ensayo de hidrogel de ECM se coloca en capas dentro del defecto, se cubre con una lámina de la misma ECM y se pondrán suturas de polipropileno no degradables para identificar claramente el sitio de lesión y/o implantación en el momento de recoger el tejido. Las nanovesículas de ECM y los tratamientos de control de PBS se administran mediante inyección directa en los bordes del sitio de la lesión. Los experimentos de cuantificación de nanovesículas y respuesta a la dosis se utilizan como guía para determinar las concentraciones apropiadas que se utilizarán para el estudio *in vivo*. Los animales que reciben tratamiento con nanovesículas de ECM se dividen aleatoriamente en dos grupos separados: el grupo 1 recibe una única inyección en el momento de la lesión y el grupo 2 recibe inyecciones adicionales los días 4 y 7 después de la lesión. Los ratones se sacrifican en puntos de tiempo designados que incluyen puntos de tiempo tempranos (3, 6, 12 y 24 horas) y tardíos (4, 7, 14 y 28 días) después de la cirugía. En cada momento, el sitio del defecto se explanta con una pequeña porción del tejido nativo circundante. Los tamaños de las muestras se determinan mediante análisis de potencia para lograr una significancia de  $<0.05$  y se realiza un análisis estadístico.

Análisis histomorfológico. Las muestras explantadas se fijan en formalina y se tiñen con hematoxilina y eosina. Las secciones histológicas se evalúan utilizando criterios cuantitativos previamente validados para aspectos de la respuesta inflamatoria y de remodelación tisular (Valentin et al., *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(12):2673-86). Los criterios incluyen la densidad de la infiltración celular, fenotipo de las células infiltrantes, vascularización, organización del tejido conectivo, la encapsulación y presencia de células musculares dentro del sitio de implantación. Los sitios de sutura se evitan en la evaluación morfológica.

Determinación del fenotipo de macrófagos mediante inmunomarcado. El inmunomarcado se realiza en secciones de

los sitios de implante como se describió anteriormente (Brown et al., *Acta Biomater.* 2012;8:978, 2012). Cada muestra de explante se expone a anticuerpos contra un marcador pan-macrófago (CD68), un marcador de fenotipo de macrófago M1 (CCR7) y un marcador de fenotipo de macrófago M2 (Fizz1). Las muestras inmunomarcadas se examinan y se obtienen imágenes utilizando un microscopio Nikon e600 equipado con un sistema de imágenes multispectrales Nuance. Las imágenes de fluorescencia se someten a un desmezclado espectral y a una nueva coloración para la eliminación de la autofluorescencia y el análisis cuantitativo. Las imágenes se evalúan en un modo con ocultación para determinar la relación entre el número de células M2 (Fizz1+) y células M1 (CCR7+).

Evaluación funcional. La funcionalidad del tejido remodelado se evalúa mediante estudios de contracción muscular *in vitro*. Se usa un sistema de baño de órganos *in vitro* para estudiar la fuerza contráctil generada por tiras aisladas del músculo cuádriceps tanto del músculo remodelado como del músculo sin lesión en respuesta a la estimulación del campo eléctrico. Se determina y registra el voltaje y la longitud del tejido óptimos para producir la máxima respuesta de contracción. La inervación funcional del tejido regenerado también se evalúa utilizando alfa-bungarotoxina marcada e inmunomarcado para beta-tubulina 3 para identificar fibras nerviosas y placas terminales motoras funcionales. La combinación de contracción muscular y marcado neuronal facilita la evaluación de la fuerza y función muscular.

Migración de células perivasculares. La infiltración de células progenitoras perivasculares en el sitio de la lesión se evalúa mediante la detección de la señal de GFP colocalizada con tinción positiva para CD146 y NG2. La contribución de las células perivasculares a la remodelación tisular de los defectos del músculo esquelético a lo largo del tiempo se evalúa histológicamente utilizando marcadores para músculo esquelético (MyoD, actina del músculo esquelético, miosina y calsequestrina), nervios (beta-tubulina 3, neurofilamento, GFAP) y vasos sanguíneos (CD31, factor von Willebrand). La colocalización de estos marcadores con el marcador GFP se utiliza para identificar la diferenciación de estas células en estructuras clave de la remodelación del tejido del músculo esquelético. Además, se utilizan inmunomarcadores para células perivasculares, es decir, CD146, NG2 y CD133, para confirmar la presencia de células perivasculares indiferenciadas dentro del tejido remodelado. Las secciones de músculo también se tiñen inmunohistoquímicamente para detectar múltiples marcadores de proliferación celular (p. ej., Ki67, PCNA) con el fin de evaluar morfológicamente el cambio en la regeneración de la proliferación a la diferenciación.

La adición de nanovesículas de ECM aisladas de bioandamios promueve una respuesta inmunomoduladora hacia un fenotipo de macrófago tipo M2 constructivo y una mayor diferenciación de las células perivasculares migratorias en nuevas fibras musculares acompañada de una mayor inervación. Sin embargo, aunque se logra una mejora, no se produce una restauración completa de todas las funciones musculares.

Por lo tanto, las nanovesículas insertadas en ECM representan una clase única de exosomas con propiedades biológicas y funciones distintas de los exosomas circulantes, y median muchas de las propiedades inductivas de los andamios de ECM asociados con la remodelación constructiva, funcional.

#### Ejemplo 9

Las nanovesículas derivadas de ECM se pueden aislar resuspendiendo la ECM en PBS con la adición de sal (KCl).

Se resuspendieron 100 mg de ECM liofilizada de vejiga urinaria (UBM) en PBS, se hidrataron durante 30 min a 37°C y luego se añadió KCl en diferentes concentraciones a la suspensión de UBM-PBS. La suspensión con KCl se incubó durante 1 h a 4°C. La muestra se centrifugó durante 30 minutos a 4500 G, para eliminar los componentes de la ECM, se recogió el líquido sobrenadante, se pasó a través de un filtro de 0.2 µm y se transfirió a un tubo de ultracentrífuga, donde se ultracentrifugó a 100 000 G durante 2 horas para sedimentar y obtener las MBV.

La cantidad de nanovesículas derivadas de ECM, también denominadas vesículas unidas a membrana (MBV) en los Ejemplos 9-14) se comparó determinando la cantidad de ARN después del tratamiento con RNasa. La muestra final se trató con RNasa A a una concentración de 0.5 µg/ul durante 20 minutos a 37°C, luego se aisló y cuantificó el ARN de la muestra. Dado que se sabe que las vesículas extracelulares, como las MBV, protegen el ARN de la degradación por las RNasas, la cantidad de ARN obtenido se relaciona con la cantidad de MBV, ya que cualquier ARN desprotegido habría sido degradado por la RNasa y no habría sido cuantificable.

Mediante este método se determinó que la adición de KCl a PBS incrementaba la cantidad de ARN resistente a RNasa, lo que representa la cantidad de MBV, sin embargo la concentración adicional de KCl por encima de 0.4 M no aumentó la cantidad de MBV que se pudieron aislar (Fig. 9A). La microscopía electrónica de transmisión muestra la morfología y el tamaño característicos de las MBV aisladas utilizando KCl (Fig. 9B).

#### Ejemplo 10

El aislamiento con sal de las MBV produce un número comparable de MBV al aislamiento con enzimas

Para comparar la cantidad de MBV obtenidas con los diferentes métodos, las MBV se aislaron utilizando dos métodos basados en enzimas (colagenasa y proteinasa K) y aislamiento con sal con KCl. Luego, las MBV se cuantificaron basado en la cantidad de ARN antes y después del tratamiento con RNasa.

No se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de ARN antes y después del tratamiento con RNasa, lo

que sugiere que la cantidad de ARN fuera de las vesículas es mínima para la proteinasa K y el KCl. Hubo una mayor diferencia antes y después del tratamiento con RNasa de las MBV aisladas con colagenasa. Esto sugiere una fuente externa de ARN. Es posible que, dado que la colagenasa se purifica a partir de bacterias, pueda incluir ARN remanente adicional de la colagenasa. Poder de eliminar el uso de enzimas evita la introducción de elementos extraños no deseados en la preparación, tales como los que pueden incluirse con las preparaciones enzimáticas.

No hubo diferencias en la cantidad de MBV aisladas después del tratamiento con proteinasa K durante 18 y 24 horas, lo que sugiere que se alcanzó la cantidad máxima de MBV obtenibles mediante este método. La misma cantidad se obtuvo de MBV aisladas con KCl, mostrando que estos métodos tienen eficiencias similares. La colagenasa en una concentración de 1 mg/ml durante 24 horas produce una mayor cantidad de MBV que tanto la proteinasa K como el uso de sal (KCl) (Fig. 10).

#### Ejemplo 11

La mayor pureza de las MBV aisladas con KCl permite el uso de métodos eficientes para aislar vesículas extracelulares como la ultrafiltración.

La ultracentrifugación es el método más utilizado habitualmente para aislar vesículas extracelulares, ya que proporciona un equilibrio adecuado entre rendimiento y pureza. Los métodos tales como la ultrafiltración que se utilizan para la concentración de proteínas proporcionan un mayor rendimiento, a expensas de la pureza, ya que aíslan conjuntamente proteínas presentes en las muestras. La ultrafiltración, a pesar de su mayor rendimiento, no es factible para el aislamiento de MBV basado en enzimas, ya que las enzimas generan pequeños fragmentos de la digestión de los componentes de la ECM que la ultrafiltración no podría separar de las MBV. Además, debido a que la ultrafiltración es un método que concentra proteínas, concentraría la enzima utilizada para la digestión de la ECM en la preparación final de MBV. El uso de sal para la disociación de MBV no genera ningún fragmento de la matriz y mantiene la ECM en suspensión. Luego, la ECM se puede eliminar con una etapa de centrifugación normal mientras las MBV se mantienen en el líquido sobrenadante. Este líquido sobrenadante con las MBV se puede ultrafiltrar para aislar las MBV.

La cantidad de MBV aisladas por ultracentrifugación (UC) con colagenasa 0.1 mg/ml se comparó con las MBV aisladas con KCl tanto con UC como con ultrafiltración (UF). Para determinar si el KCl podía disociar todos las MBV presentes en la ECM, la ECM sedimentada después de la exposición a KCl 0.8 M se digirió con colagenasa a 0.1 mg/ml, lo que muestra que todavía quedan MBV en la ECM después del tratamiento con KCl. El uso de KCl y ultrafiltración produjo la mayor cantidad de MBV de todos los métodos comparados, mostrando un rendimiento cuatro veces mayor (Fig. 11A). Estas MBV obtenidas con ultrafiltración se analizaron luego con el uso de NANOSIGHT® para validar que la ultrafiltración preservaba las vesículas (Fig. 11B).

#### Ejemplo 12

El uso de ultrafiltración permite aislar las MBV con el uso de PBS

La solución salina tamponada con fosfato está compuesta de  $\text{PO}_4^{3-}$  0.01 mM, NaCl 0.137 M y KCl 0.0027. La combinación de NaCl y KCl da una concentración total de sal de 0.139 M. A pesar de ser baja, dado que la ultrafiltración permite aislar un mayor rendimiento de MBV, las MBV se pueden aislar solo con el uso de PBS (Figura 4A). Para demostrar que se trata de un efecto de la sal dentro de PBS y no de la resuspensión de la ECM, se resuspendió una muestra en agua, no produciéndose MBV.

El uso de agua para la resuspensión también podría llevar a plantearse la cuestión de si poner la ECM en un medio hipotónico, tal como agua, podría provocar la rotura de las MBV, siendo esta la causa de que no haya MBV en la preparación de agua descrita anteriormente. Para responder a esta pregunta, las MBV aisladas con PBS se sometieron a un intercambio de medio en la columna de ultrafiltración para que las MBV aisladas con PBS se resuspendieran en agua. Las MBV todavía eran detectables en la mezcla como se muestra en la Fig. 4B. Además, para demostrar de manera más definitiva que las MBV se aislaron mediante el uso de sal, la ECM se resuspendió en tampón de fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) con y sin KCl. No se pudo aislar ninguna MBV solo con el tampón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Sin embargo, cuando se añadió KCl, se obtuvieron MBV (Figura 4B).

#### Ejemplo 13

Las MBV aisladas con sal tienen una actividad biológica comparable a las MBV aisladas con enzima

Para ensayar si las MBV disociadas y aisladas de la ECM con el uso de sal tenían las mismas propiedades biológicas que las MBV aisladas con el uso de enzimas, se expusieron macrófagos derivados de médula ósea murina a MBV aisladas mediante ambos métodos durante 24 horas. Se usó el mismo volumen de MBV para MBV aisladas con enzimas y aisladas con sal (30  $\mu\text{l}$  por ml de medio de BMDM) y también se ensayó una gran cantidad de MBV aisladas con sal (60  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ). Después de la exposición de 24 horas, se recogió ARN de las células, se realizó la RT-PCR y se usó PCR cuantitativa para analizar la expresión génica de CD206, PDK4, STAT1, TNFa, KLF4, ARG1, INOS). Los resultados muestran que, con la exposición al mismo volumen y tiempo, las MBV aisladas mediante el uso de enzimas de colagenasa y sal tienen efectos similares en la expresión génica; sin embargo, las MBV aisladas con sal provocaron una menor expresión de INOS y ARG1 que las MBV aisladas con colagenasa y el control de colagenasa. (Figura 5B).

Esto podría deberse a los fragmentos de ECM que se generan mediante digestión enzimática y que se aíslan conjuntamente con métodos basados en enzimas. Dado que se usó colagenasa como enzima para el aislamiento de estas MBV, los BMDM también se trataron con una muestra que se obtuvo usando la misma cantidad de colagenasa utilizada para aislar las MBV, realizado mediante el mismo protocolo de aislamiento, pero sin la adición de ECM (control de colagenasa). Como muestran los resultados, la enzima colagenasa remanente también puede afectar a la expresión génica de las células.

Ejemplo 14

Efecto de las MBV en las células tumorales

Las Figs. 14 y 15 proporcionan resultados que muestran el efecto de las nanovesículas unidas a matriz en las células tumorales. Se muestra en el efecto en dos tipos de ejemplo de tumores, el glioma y el cáncer de esófago.

Ejemplo 15

Las nanovesículas unidas a matriz recapitulan los efectos de la matriz extracelular sobre el fenotipo de macrófagos

Se demostró que las nanovesículas derivadas de ECM descritas recientemente, también llamadas vesículas unidas a matriz (MBV), son capaces de recapitular los efectos de activación de macrófagos de un bioandamio de ECM del que derivan. La inhibición de miARN específicos, miARN125b-5p, 143-3p y 145-5p, dio como resultado un perfil de expresión génica y una expresión de proteínas opuestos en comparación con sus homólogos tratados con MBV, lo que implica su papel potencial en la promoción de un fenotipo regulador de macrófagos. Por lo tanto, las MBV y su carga de miARN desempeñan un papel importante en la respuesta de los macrófagos a los bioandamios de ECM y en el proceso de remodelación constructiva en su conjunto.

Las partículas de UBM-ECM o SIS-ECM se digirieron enzimáticamente durante 16 horas a temperatura ambiente con solución de colagenasa al 0.1%. Las ECM resultantes se sometieron a centrifugación a fuerzas g crecientes para extraer las MBV. Las MBV se visualizaron con un aumento de 100 000X usando microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 16A). La absorción celular de las MBV se determinó marcando las MBV con naranja de acridina. Las MBV marcadas eran visibles dentro de los BMDM 2 horas después de su adición al medio de cultivo (Figura 16B). El efecto de las MBV en la activación de macrófagos se evaluó mediante análisis de qPCR de más de 25 marcadores de activación de macrófagos comúnmente utilizados, incluidos marcadores de superficie, citoquinas, factores de transcripción y marcadores metabólicos. El perfil de expresión génica de los macrófagos tratados con MBV fue casi idéntico al perfil de expresión génica de los macrófagos tratados con ECM (Figura 16C). Se observó poco o ningún efecto sobre la expresión génica después de exponer los macrófagos a pepsina o colagenasa, lo que indica que estas enzimas, que se utilizan para digerir la ECM antes de la extracción de las MBV, no son responsables de la activación de los macrófagos. La exposición de BMDM a IFN $\gamma$ +LPS (M<sub>IFN $\gamma$ +LPS</sub>) o IL-4 (M<sub>IL-4</sub>) condujo a cambios distintivos en la expresión génica con perfiles que contrastan.

Como se muestra en la Figura 17, se llevó a cabo el inmunomarcado para evaluar la expresión de proteínas de BMDM. De manera similar a los resultados de expresión génica, los grupos tratados con MBV tenían un perfil de expresión de proteínas casi idéntico al de los grupos tratados con ECM. Sin embargo, en contraste con los datos de expresión génica, tanto los grupos de ECM como sus correspondientes grupos de MBV tenían perfiles de expresión de proteínas similares al grupo tratado con IL-4 en lugar del grupo tratado con IFN $\gamma$ +LPS. El tratamiento de macrófagos con SIS-ECM y UBM-ECM y sus MBV correspondientes dio como resultado la expresión positiva de Fizz-1 y Arg-1 (marcadores asociados con el fenotipo M<sub>IL-4</sub>). La expresión de iNOS se detectó sólo ligeramente en el grupo de SIS-MBV. El TNF- $\alpha$  fue detectable sólo en el grupo de UBM-MBV. Tanto el TNF- $\alpha$  como iNOS son marcadores asociados con el fenotipo M<sub>IFN $\gamma$ +LPS</sub>. No se observó expresión de estas proteínas en los grupos de control. Más de 99% de las células expresaron F4/80, lo que confirma su estado de diferenciación en macrófagos.

Como se muestra en la Figura 18, los productos secretados de macrófagos tratados con MBV-SIS disminuyeron significativamente el crecimiento de *S. aureus* en comparación con el control de caldo de soja tréptico (p=0.033). Los medios condicionados de macrófagos tratados con cada uno de los inhibidores de miR-125, miR-143 y miR-145, o su combinación (Mezcla) no disminuyeron el crecimiento de *S. aureus*. Por el contrario, los productos secretados de los macrófagos tratados con el control desordenado (Desord.) disminuyeron significativamente el crecimiento de *S. aureus* en comparación con el control de caldo de soja tréptico (p=0.018).

Los macrófagos *naïve* y tratados con IL-4 no produjeron óxido nítrico. Los macrófagos tratados con IFN- $\gamma$ /LPS produjeron un aumento significativo del óxido nítrico. Las MBV derivadas de UBM fueron el único grupo de tratamiento que aumentó significativamente la producción de óxido nítrico, lo que sugiere que las MBV de UBM tienen potencialmente un efecto sobre las respuestas proinflamatorias de los macrófagos o la actividad antimicrobiana. Ningún tratamiento con miR produjo un aumento en la actividad del óxido nítrico.

Todos los macrófagos mostraron un nivel basal de fagocitosis medido por la absorción de partículas de FITC-E. Coli. El tratamiento con IFN- $\gamma$ /LPS dio como resultado un aumento significativo de la actividad fagocítica. El tratamiento con ECM y MBV derivadas de ECM dio como resultado aumentos significativos en la absorción fagocítica. Los datos indicaron que las MBV podrían ser más potentes para inducir la fagocitosis o volverse más activas cuando se liberan

de los andamios de ECM. No hubo diferencias significativas en la fagocitosis entre los macrófagos tratados con UBM o SIS. Sin embargo, las MBV de UBM produjeron un aumento significativo en la fagocitosis de los macrófagos en comparación con los macrófagos tratados con SIS-MBV.

5 Las UBM-MBV y SIS-MBV se trataron con RNasa durante 30 minutos para degradar cualquier ARN remanente que pudiera haberse acumulado durante el procedimiento de descelularización de la ECM o el procedimiento de aislamiento de las MBV. Luego se detuvo la reacción de la RNasa y se aisló el ARN de las MBV. Se construyeron bibliotecas pequeñas de ADNc a partir del ARN extraído de las MBV. Las bibliotecas se leyeron con la plataforma Ion Proton. Los datos de secuenciación se recortaron basado en el tamaño y la puntuación de Phred antes de alinearlos con el genoma humano. Más de 34% de las lecturas de ARN pequeños se equipararon a secuencias conocidas dentro del genoma humano. Las lecturas se anotaron en miRBase (versión 21). Las secuencias de miARN que se identificaron con mayor frecuencia en UBM-MBV y SIS-MBV se muestran en la siguiente tabla:

	UBM_MBV	SIS_MBV
mir-145	3266.20782	36.2228968
mir-143	906.527531	11.8118142
mir-23b	89.920071	0.78745428
mir-27b	75.2664298	1.57490856
mir-23a	74.8223801	0
let-7b	72.8241563	9.0557242
mir-125a	72.1580817	1.57490856

15 Los miARN resaltados se seleccionaron para el análisis posterior porque están implicados en la activación de los macrófagos. (Chaudhuri et al., *J Immunol*, 2011. 187(10): pág. 5062-8; Banerjee et al., *J Biol Chem*, 2013. 288(49): pág. 35428-36; Zang et al., *Int J Mol Med*, 2013. 31(4): pág. 797-802). Para investigar el mecanismo por el cual las MBV activan los macrófagos, se inhibieron miR-145-5p, miR-143-3p y miR-125b-5p en los BMDM. La qPCR demostró una inhibición exitosa de los miARN (Figura 19A). Los niveles de expresión de miR-145 se redujeron en más de 70%, los niveles de expresión de miR-143 se redujeron en 65% y los niveles de expresión de miR-125b se redujeron en más de 95%.

20 Se ha demostrado que los macrófagos son reguladores críticos de la curación normal después de una lesión y del desarrollo normal del tejido. En el presente documento se describe que las MBV pueden recapitular en gran medida los efectos de la ECM completa sobre el fenotipo de los macrófagos. Por lo tanto, las MBV, al igual que la ECM, pueden usarse para modificar el fenotipo de macrófagos, tal como para inducir macrófagos reguladores.

25 En vista de las muchas realizaciones posibles a las que se pueden aplicar los principios de la invención descrita, se debe reconocer que las realizaciones ilustradas son sólo ejemplos preferidos de la invención y no deben considerarse limitativas del alcance de la invención. Más bien, el alcance de la invención está definido por las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende nanovesículas aisladas derivadas de una matriz extracelular y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las nanovesículas no expresan CD63 o CD81, o son CD63<sup>bajo</sup>CD81<sup>bajo</sup>, para su uso en el tratamiento de la inflamación en un sujeto.
- 5 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto tiene artritis reumatoide, colitis ulcerosa, un trasplante de órgano, enfermedad de injerto contra huésped o infarto de miocardio.
3. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto tiene artritis reumatoide.
4. Una composición que comprende nanovesículas aisladas derivadas de una matriz extracelular y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las nanovesículas no expresan CD63 o CD81, o son CD63<sup>bajo</sup>CD81<sup>bajo</sup>, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide en un sujeto.
- 10 5. Una composición que comprende nanovesículas aisladas derivadas de una matriz extracelular y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las nanovesículas no expresan CD63 o CD81, o son CD63<sup>bajo</sup>CD81<sup>bajo</sup>, para su uso en el tratamiento de una herida en un sujeto.
6. Una composición que comprende nanovesículas aisladas derivadas de una matriz extracelular y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las nanovesículas no expresan CD63 o CD81, o son CD63<sup>bajo</sup>CD81<sup>bajo</sup>, para su uso en el tratamiento de una hernia, un músculo desgarrado o dañado, o un tendón desgarrado o dañado en un sujeto.
- 15 7. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición se administra por vía sistémica.
8. Composición para su uso según la reivindicación 5, en la que la herida es una herida profunda que implica daño de la dermis y la epidermis, una herida quirúrgica, una herida traumática no quirúrgica, una herida anastomótica, una herida por escisión, una herida en el tejido ocular, una herida en el tejido dental, una herida en la cavidad oral, una úlcera diabética, una úlcera dérmica, una úlcera de cúbito, una úlcera arterial, una úlcera por estasis venosa, una quemadura resultante de la exposición al calor o a productos químicos, una herida química o una úlcera venosa crónica de la pierna.
- 20 9. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que las nanovesículas tienen un diámetro de entre aproximadamente 10 nm y 300 nm.
10. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la matriz extracelular es una matriz extracelular de mamífero, en la que opcionalmente la matriz extracelular de mamífero es una matriz extracelular porcina.
- 30 11. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la matriz extracelular proviene de tejido esofágico, vejiga urinaria, submucosa del intestino delgado, dermis, cordón umbilical, pericardio, tejido cardíaco, tejido tumoral o músculo esquelético.
12. Composición para su uso según la reivindicación 11, en la que la matriz extracelular proviene del tejido esofágico o de la vejiga urinaria.
- 35 13. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que las nanovesículas unidas a la membrana lipídica comprenden miR-145 y/o miR-181.
14. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además un agente terapéutico exógeno.
- 40 15. Composición para su uso según la reivindicación 14, en la que el agente terapéutico es un compuesto químico, una molécula de ácido nucleico, un polipéptido, un factor de crecimiento, una citocina, una molécula pequeña, un microARN o una proteína.

FIG. 1A

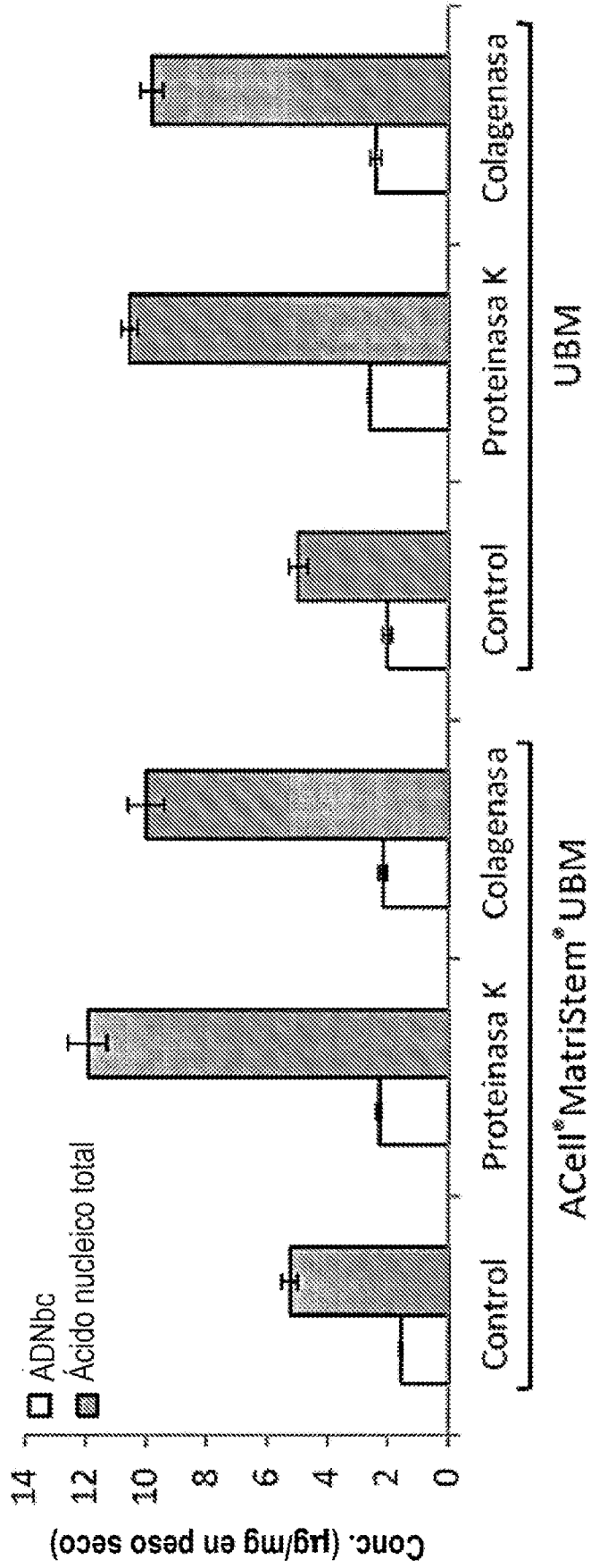


FIG. 1B

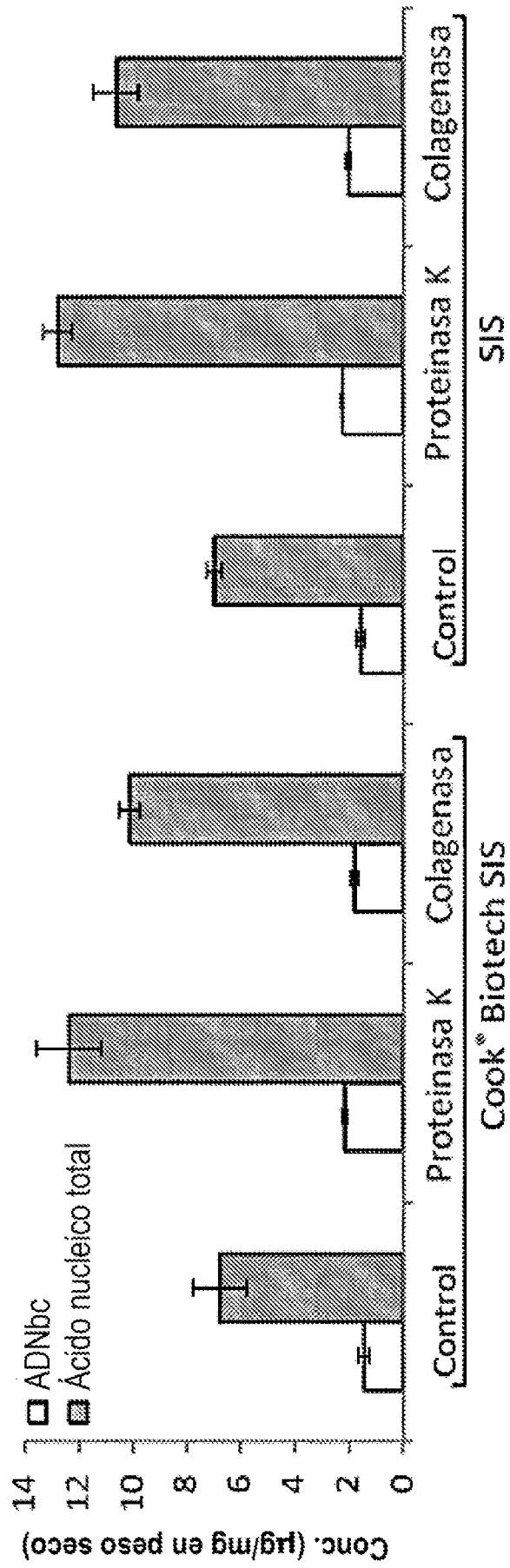
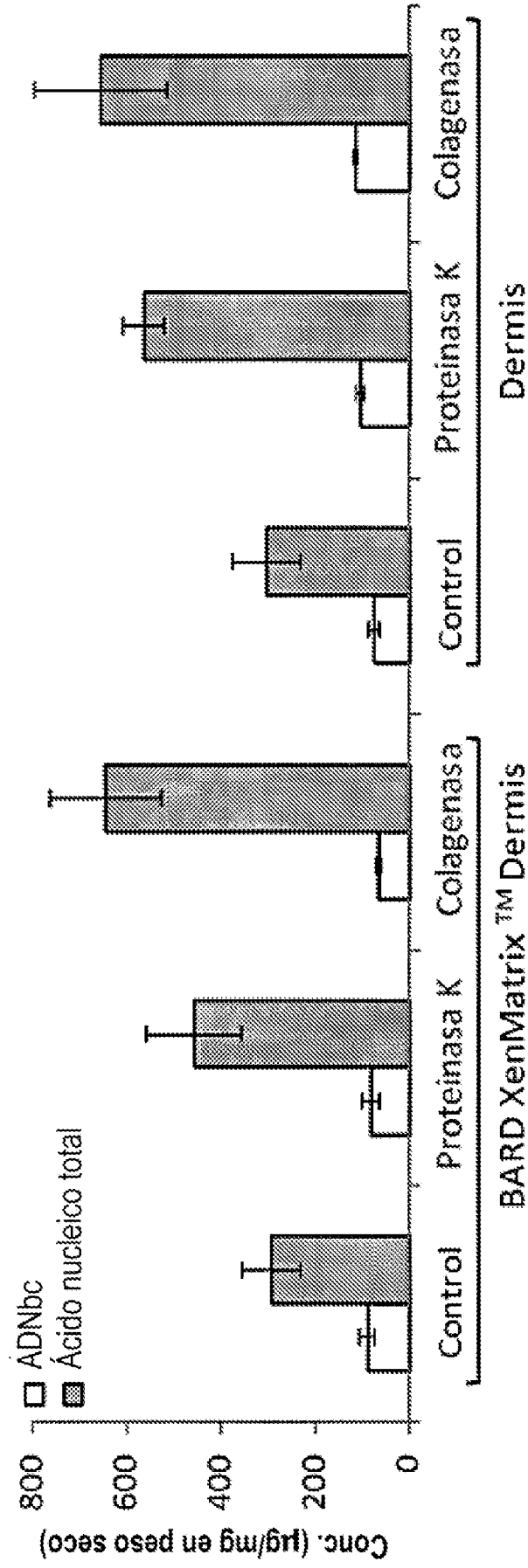
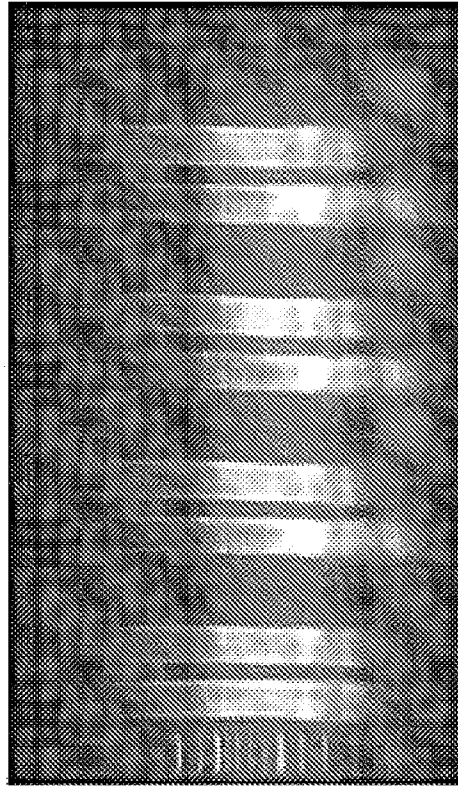


FIG. 1C



**FIG. 2A**

Control		Pepsina		Prot. K		Colagenasa	
Rnasa A	Dnasa I	control	Rnasa A	control	Rnasa A	control	Dnasa I
control	Rnasa A	control	Rnasa A	control	Rnasa A	control	Dnasa I



Electroforesis en gel de agarosa

**FIG. 2B**

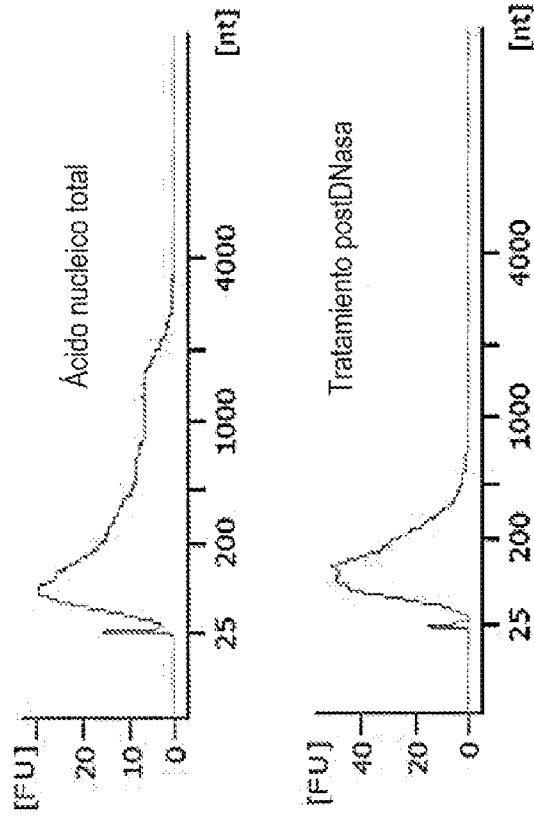


FIG. 2C

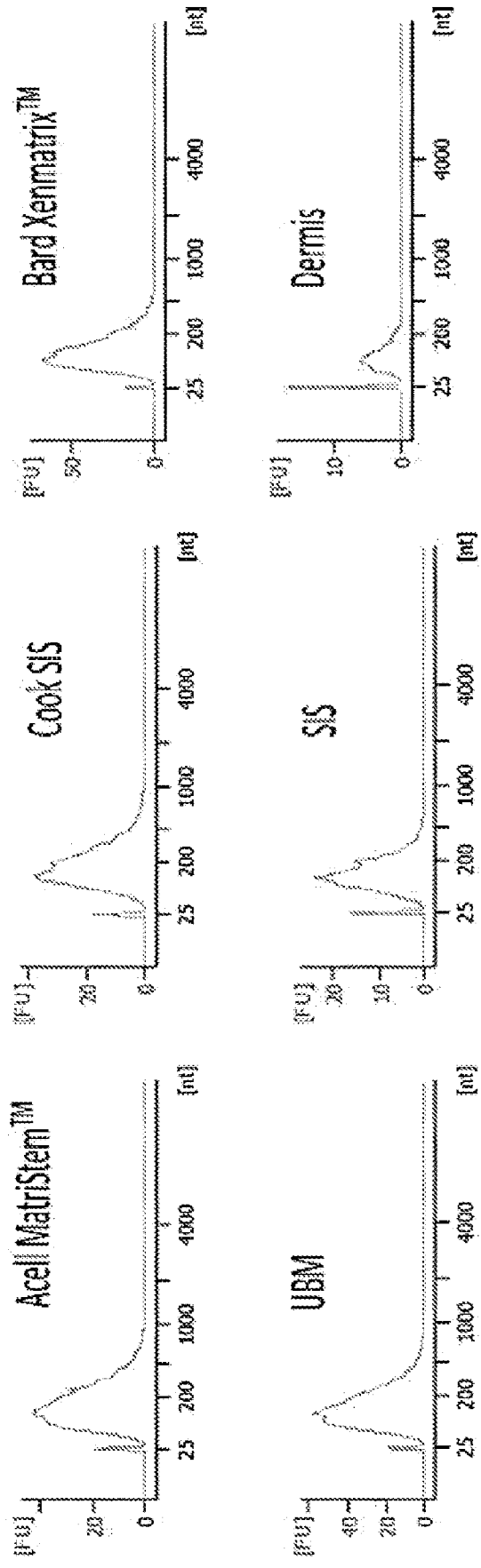
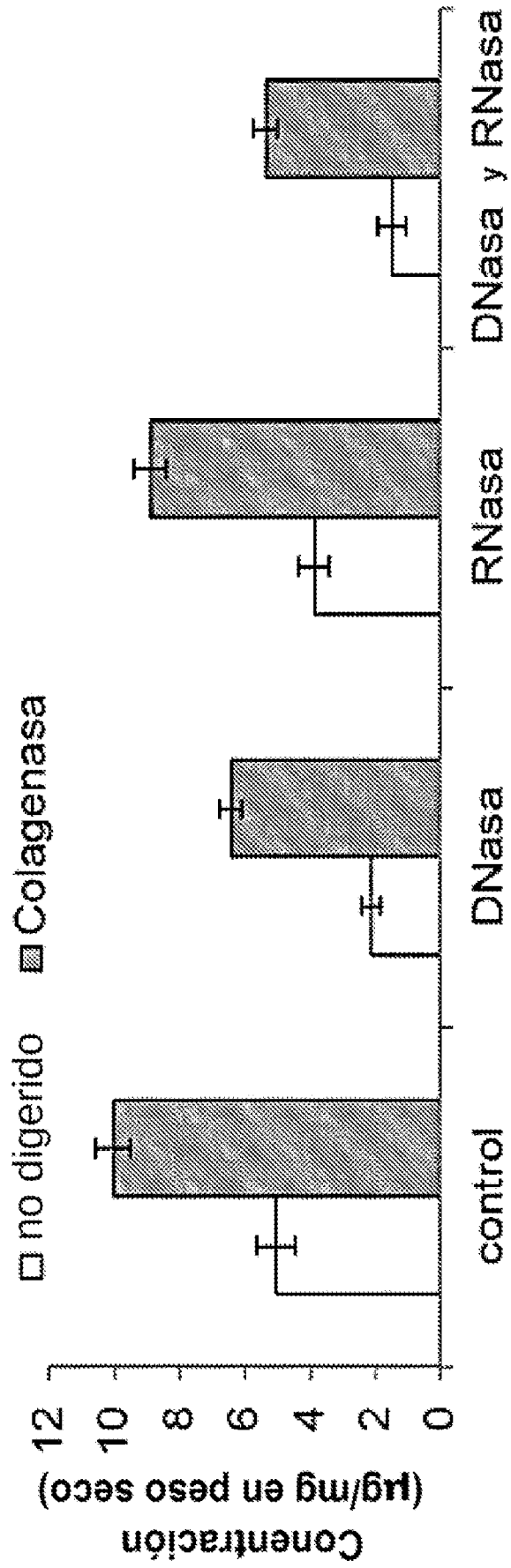
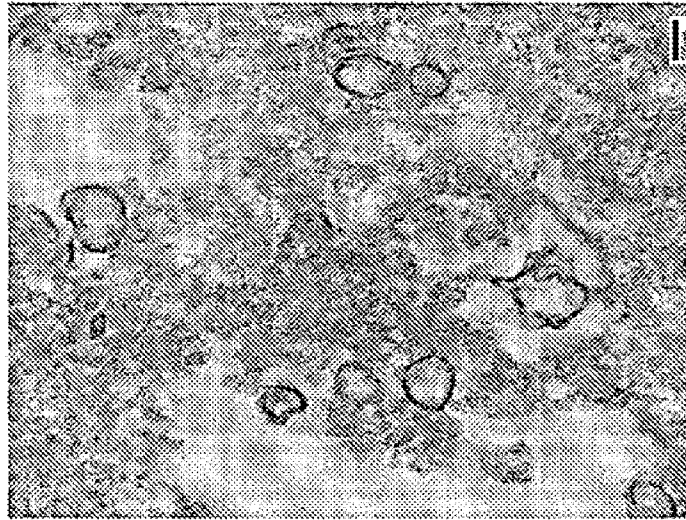


FIG. 2D



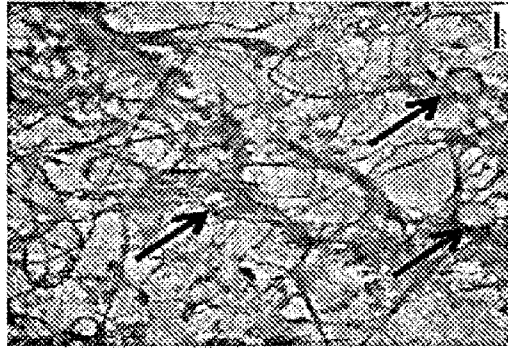
**FIG. 3A**

Lámina hidratada de  
matriz de vejiga urinaria (UBM)

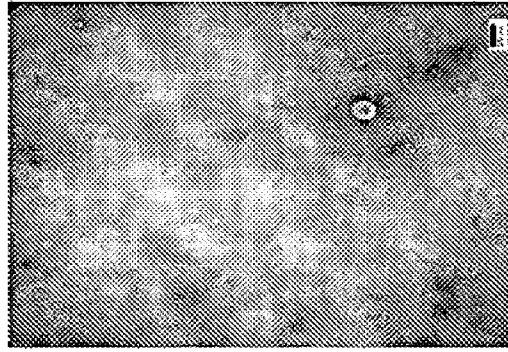


**FIG. 3B**

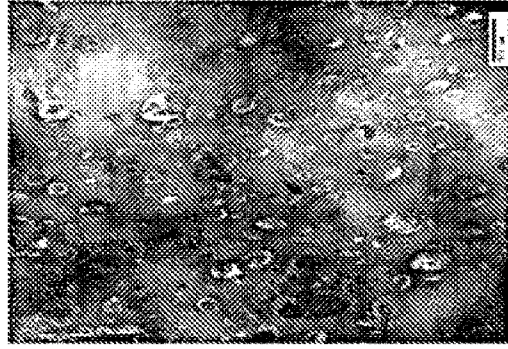
Digerido de pepsina



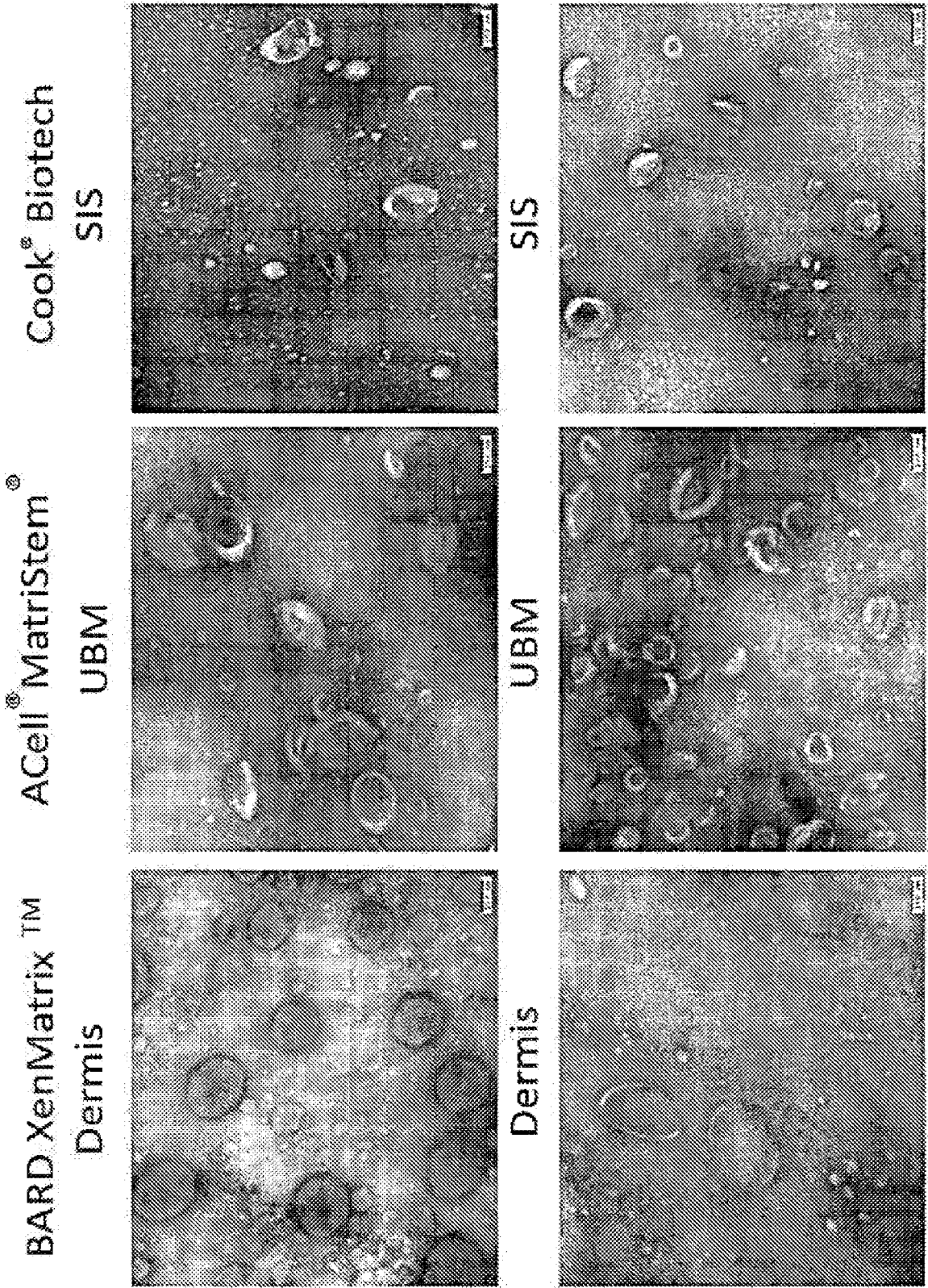
Digerido de colagenasa



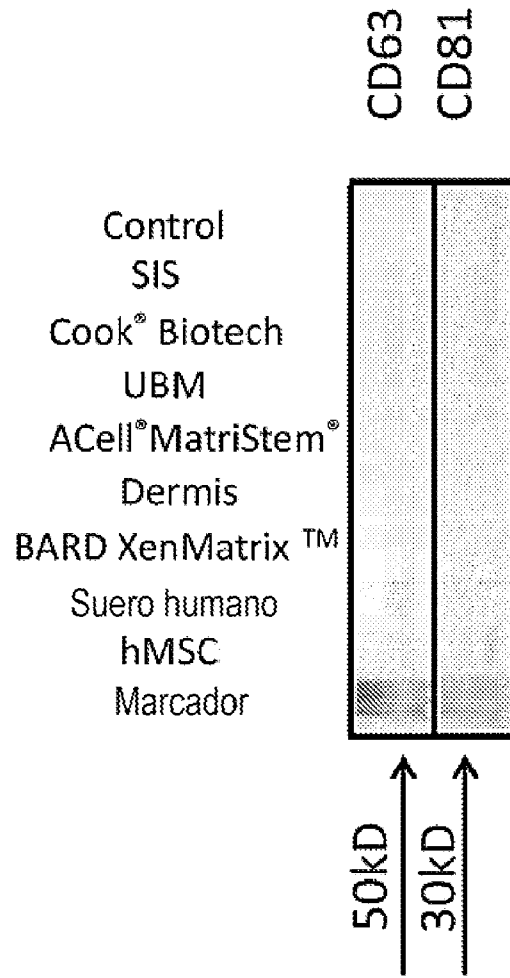
Digerido de proteinasa K



**FIG. 3C**



**FIG. 3E**



**FIG. 3D**

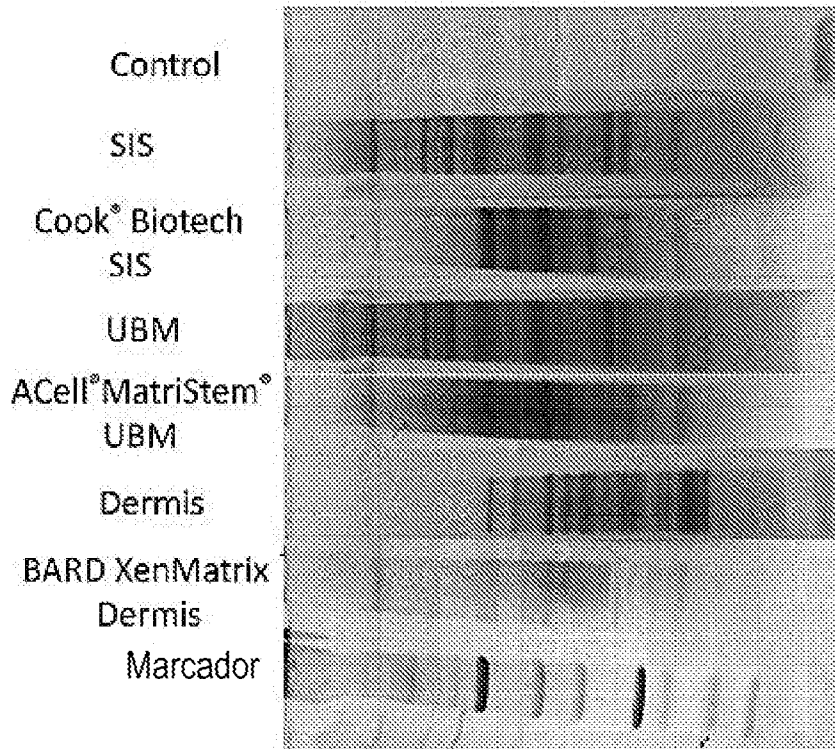
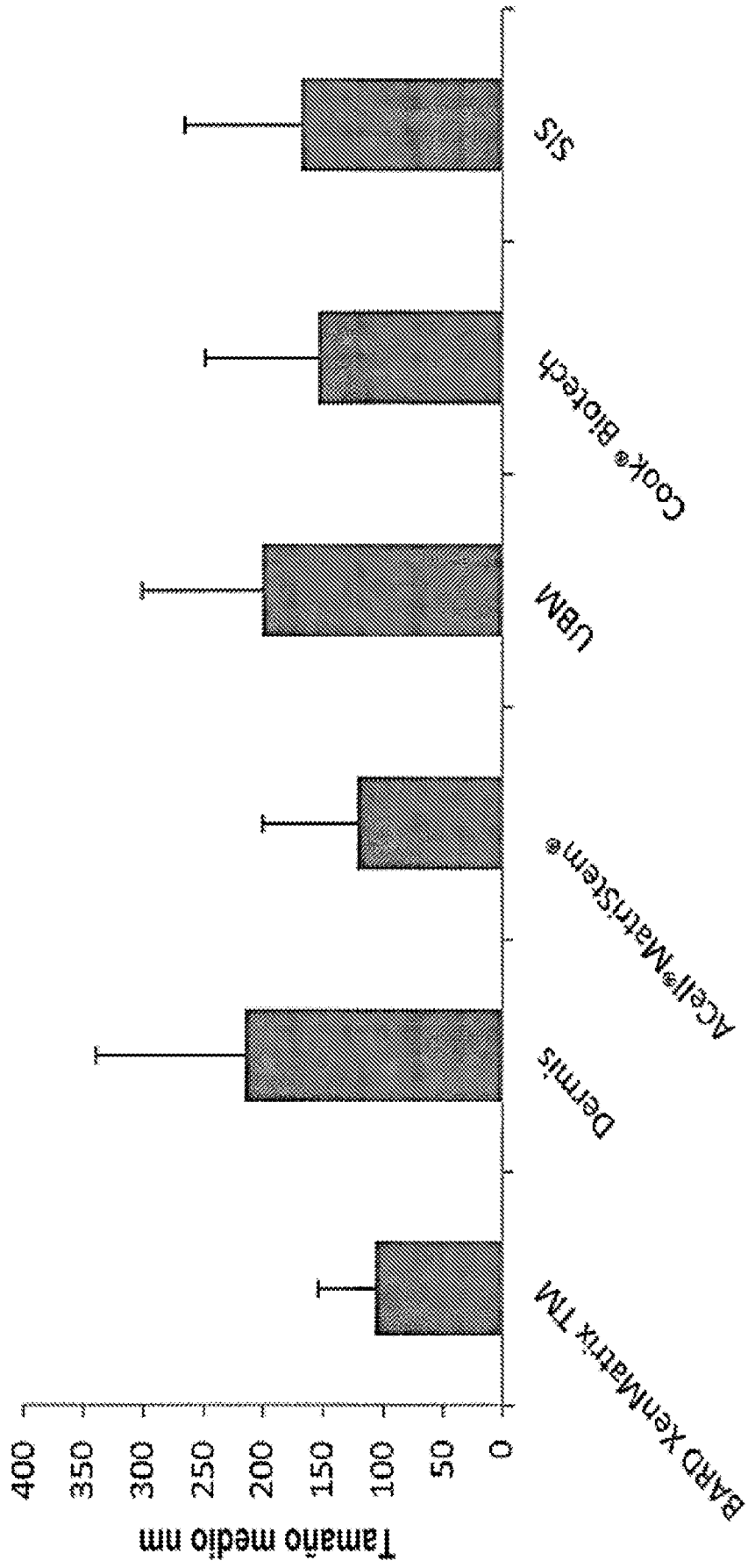


FIG. 3F



**FIG. 4A**

Producto / Descripción	BARD XENMATRIX™	Dermis	ACELL® MATRISTEM®	UBM	COOK® Biotech	SIS
Recuento mi-ARN	46	33	223	240	62	53
% de miARN comunes	56.52174%		77.5%		58.06452%	

**FIG. 4B**

Producto / Funciones moleculares y celulares	BARD XENMATRIX™	Dermis	ACELL® MATRISTEM®	UBM	COOK® Biotech	SIS
Desarrollo celular	26	18	50	74	30	30
Crecimiento y proliferación celular	27	19	48	73	30	29
Muerte y supervivencia celular	21	14	36	64	22	23
Movimiento celular	17	12	32	58	22	20
Ciclo celular	10	7	19	37	11	10

**FIG. 4C**

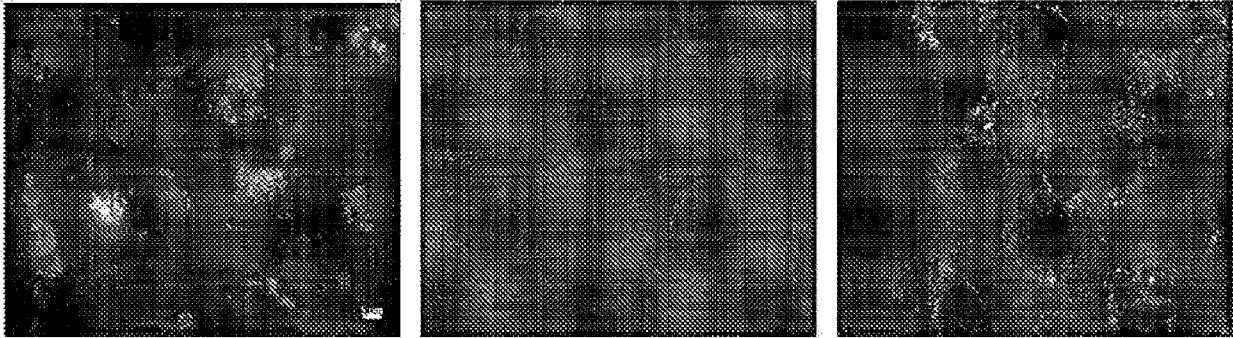
Producto / Función y desarrollo de sistema fisiológico	BARD XENMATRIX™	Dermis	ACELL® MATRISTEM®	UBM	COOK® Biotech	SIS
Función y desarrollo de tejido conjuntivo	7	6	12	0	7	4
Desarrollo de organismo	12	0	17	33	0	14
Desarrollo de órganos	0	9	13	32	11	11

MV de UBM  
(sin células)

**FIG. 5A**

Control

MV de UBM



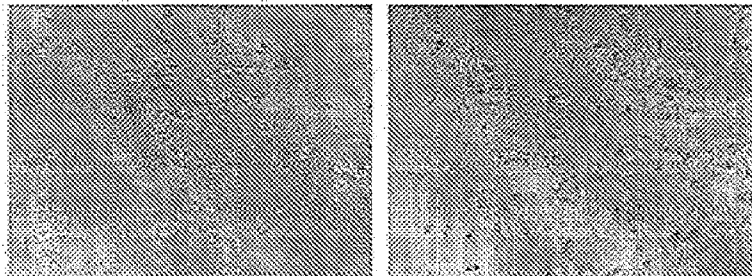
**FIG. 5B**

Extensión de neuritas en células N1E-115

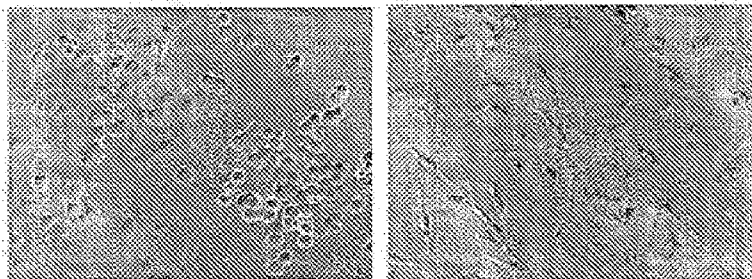
Control  
(72h)

MV de UBM  
(72h)

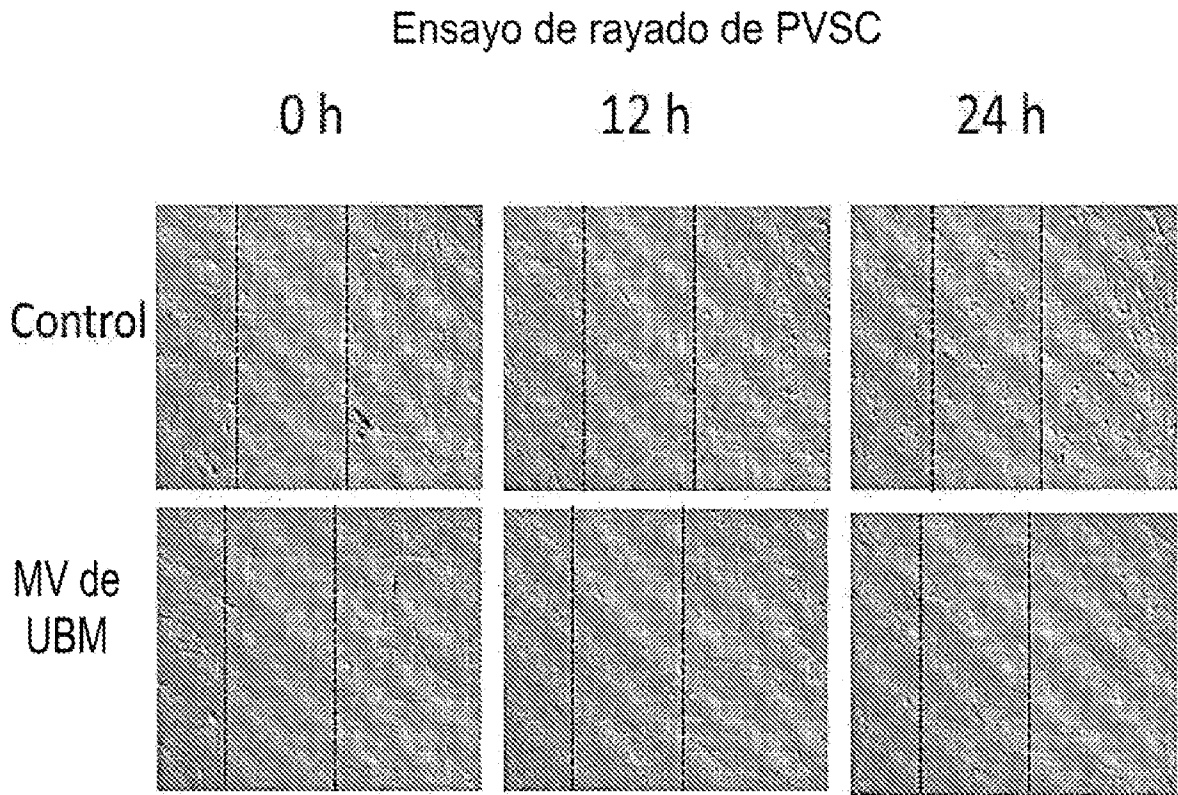
20X



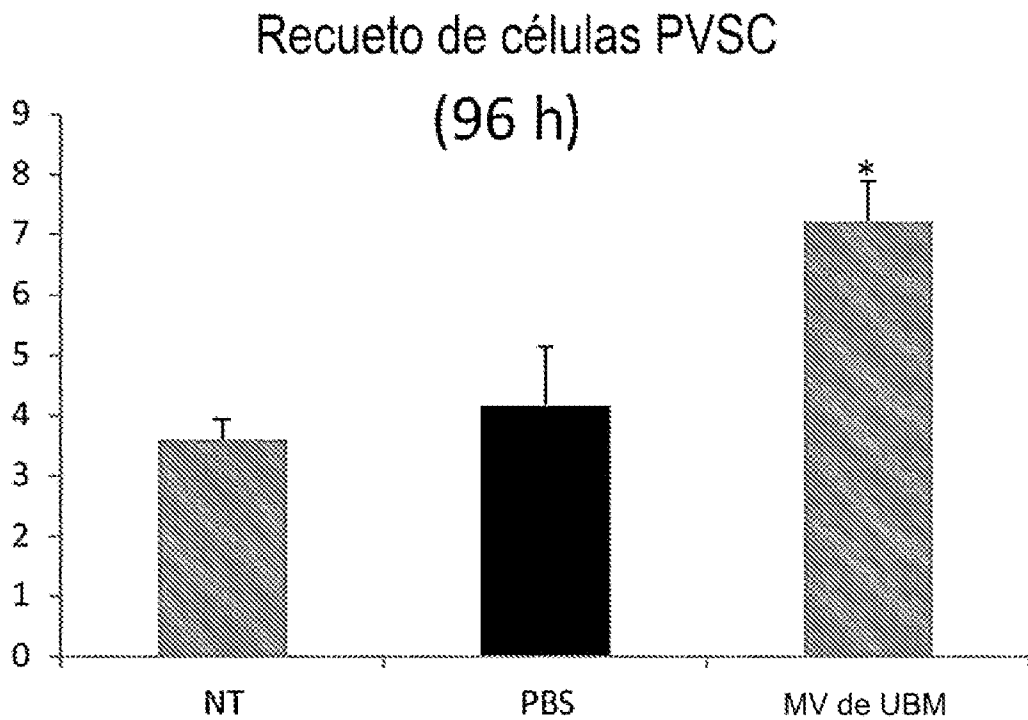
40X

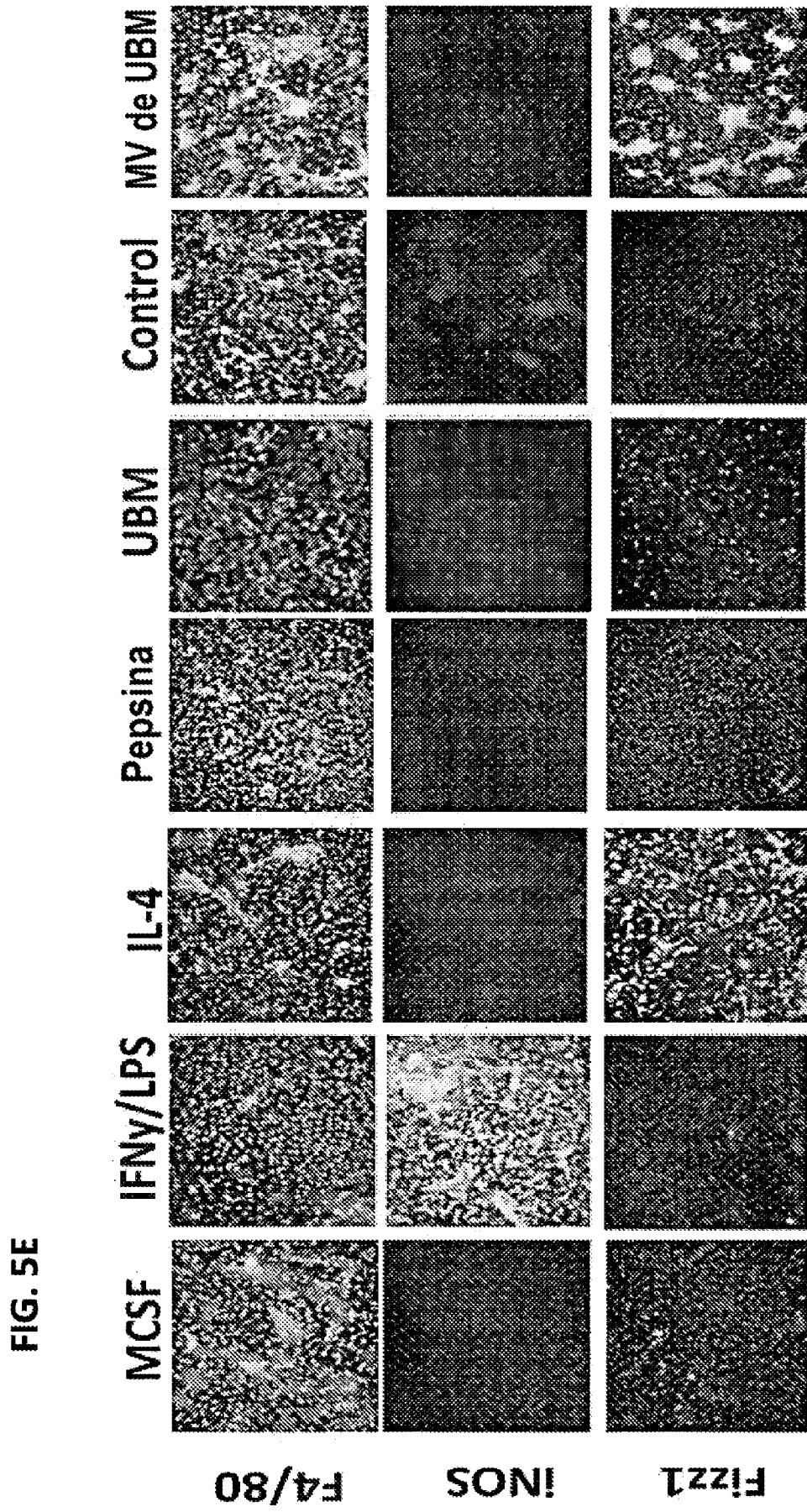


**FIG. 5C**



**FIG. 5D**





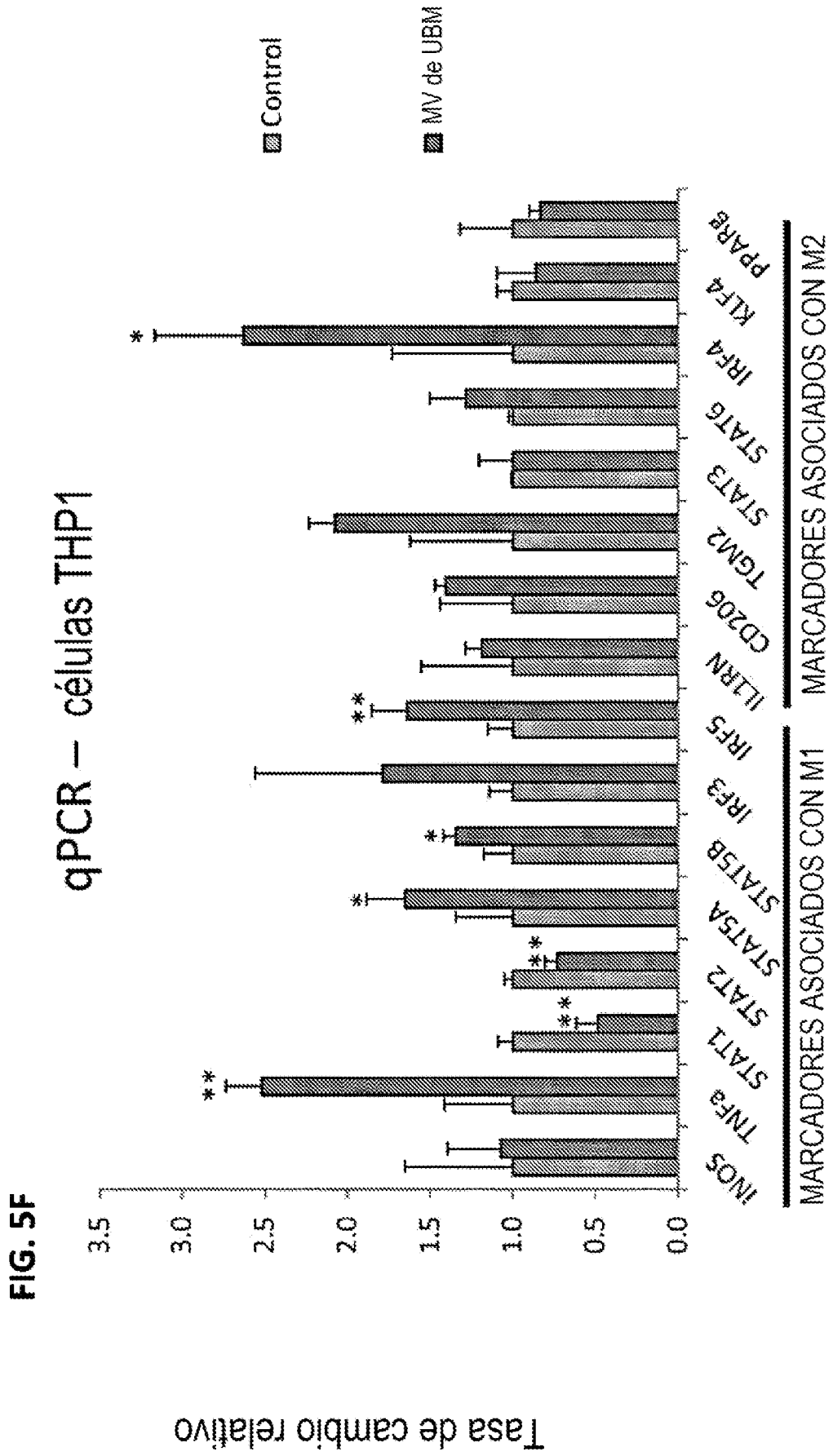


FIG. 6

Referencia	Fuente de miARN	mir-145-5p (RPM)	let-7b-5p presente
Huang et al., 2013	Exosomas de plasma	19	Si
Berdov et al., 2016	Exosomas de orina	28	Si
Ji et al., 2014	Exosomas de medios celulares	0	Si
	Células	0	Si
Stevanato et al., 2016	Exosomas de medios celulares	0	Si
	Células	0	Si
<b>Kuchen et al., 2010</b>	Células	3	Si
	Macrófagos	474	Si
	Células madre embrionarias	73	Si
	Fibroblastos	1218	Si
	Tejido (Pomedio)	163	Si
	Corazón	13.2	Si
	Cerebro	25.7	Si
	Pulmón	184.1	Si
	Hígado	7.7	Si
	Riñón	75.2	Si
	Páncreas	133.8	Si
	Piel	150.9	Si
	Músculo	14.9	Si
	Glándulas S.	47.7	Si
	Testículos	300.9	Si
	Ovarios	834.7	Si
Datos lab.	Exosomas de UBM comercial	21390	Si
	Exosomas de dermis comercial	173	Si
	Exosomas de SIS comercial	765	Si
	Exosomas de dermis hecha en lab.	52	Si
	Exosomas de SIS hecho en lab.	366	Si
	Exosomas de UBM hecha en lab.	32966	Si

**FIG. 7**

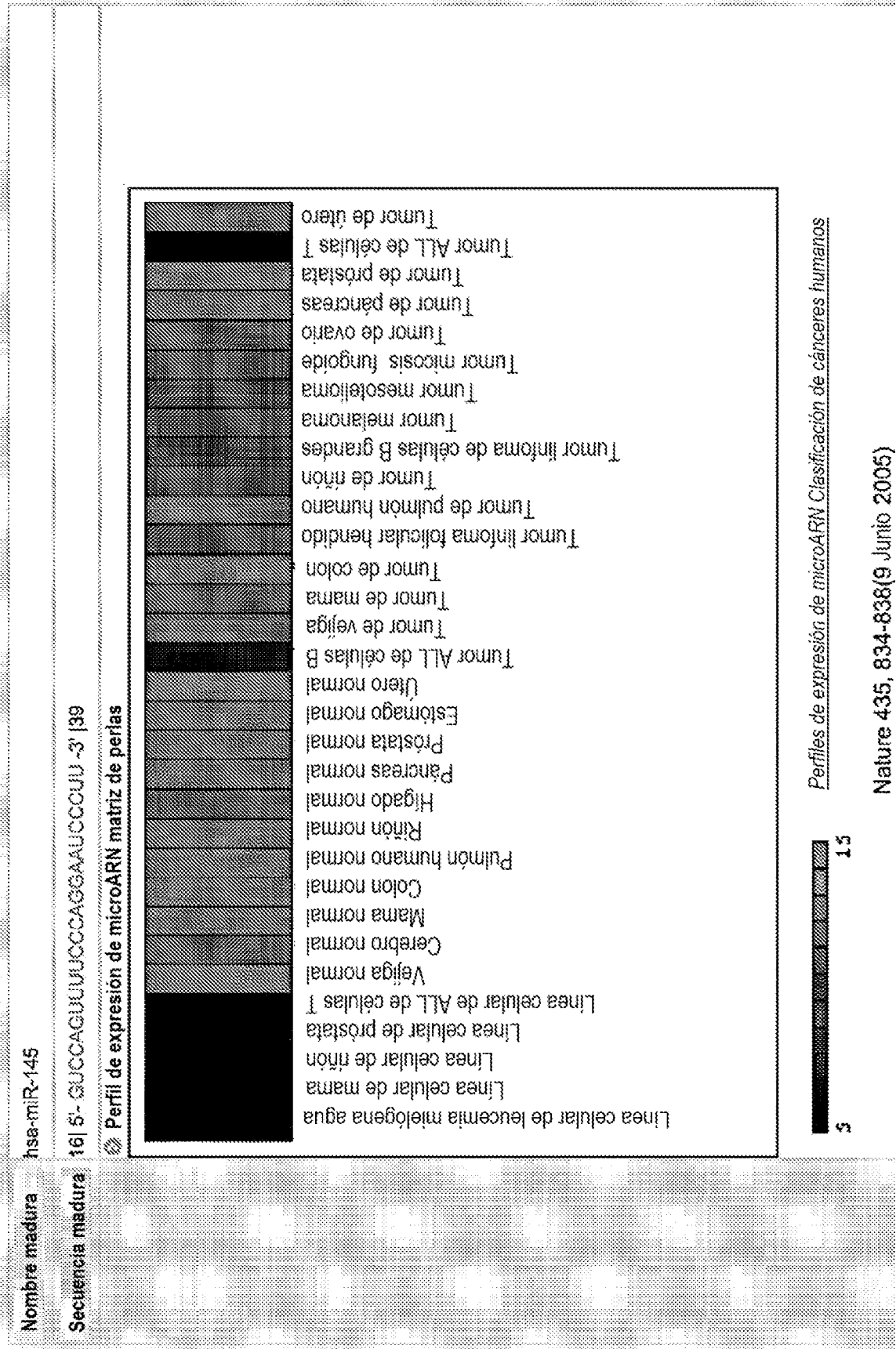


FIG. 8A

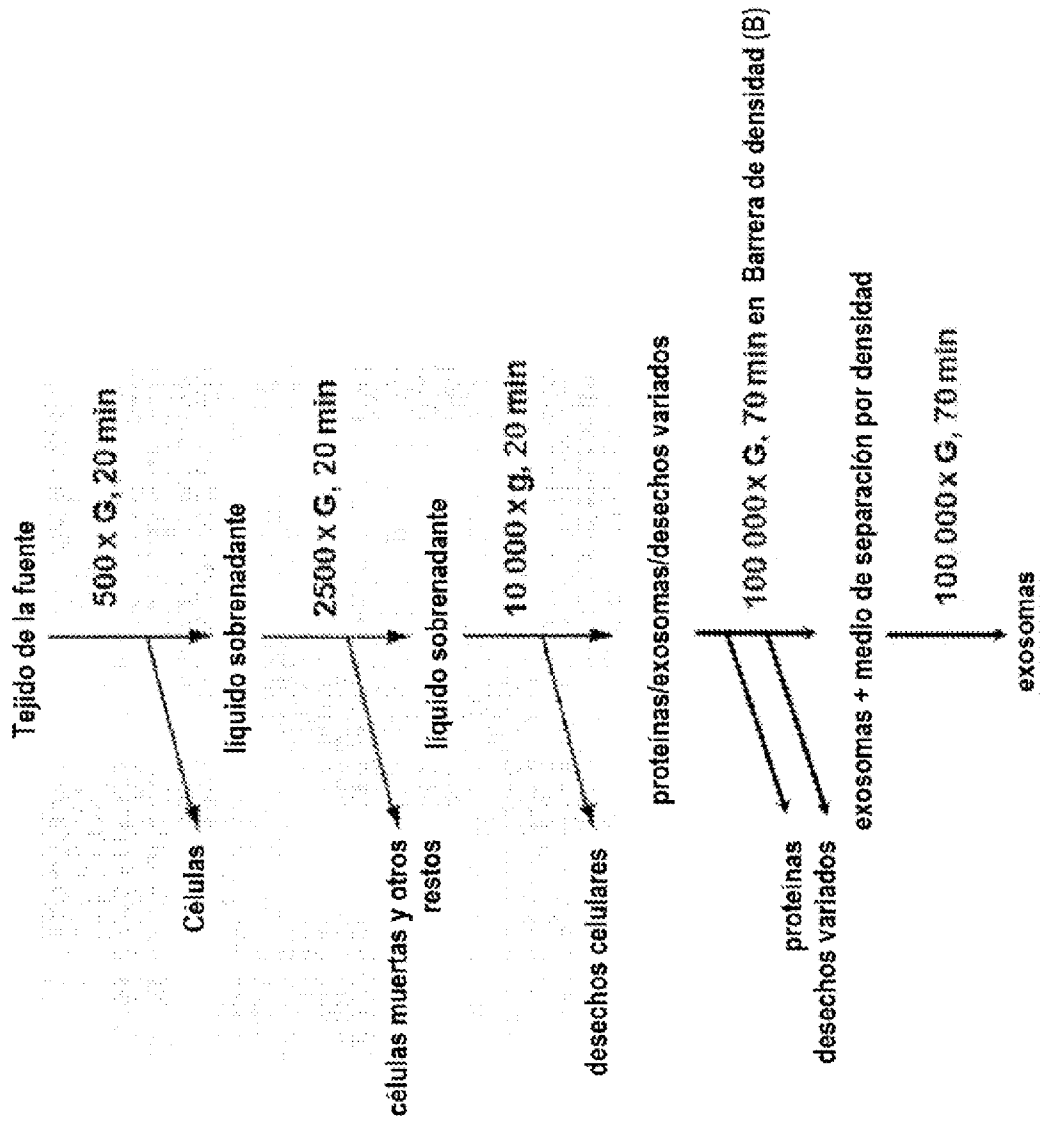
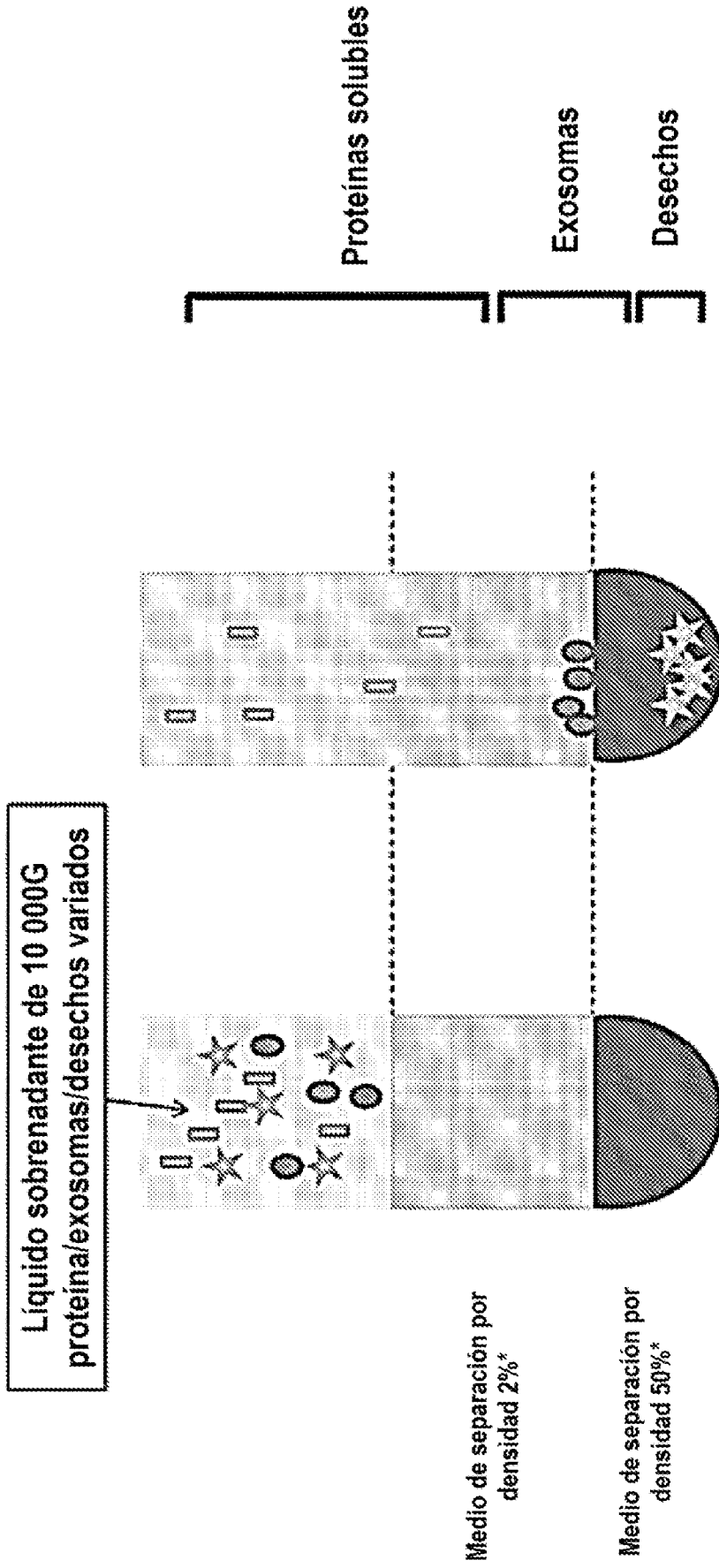


FIG. 8B



\*se puede ajustar dependiendo de la densidad deseada de los exosomas

FIG. 9A

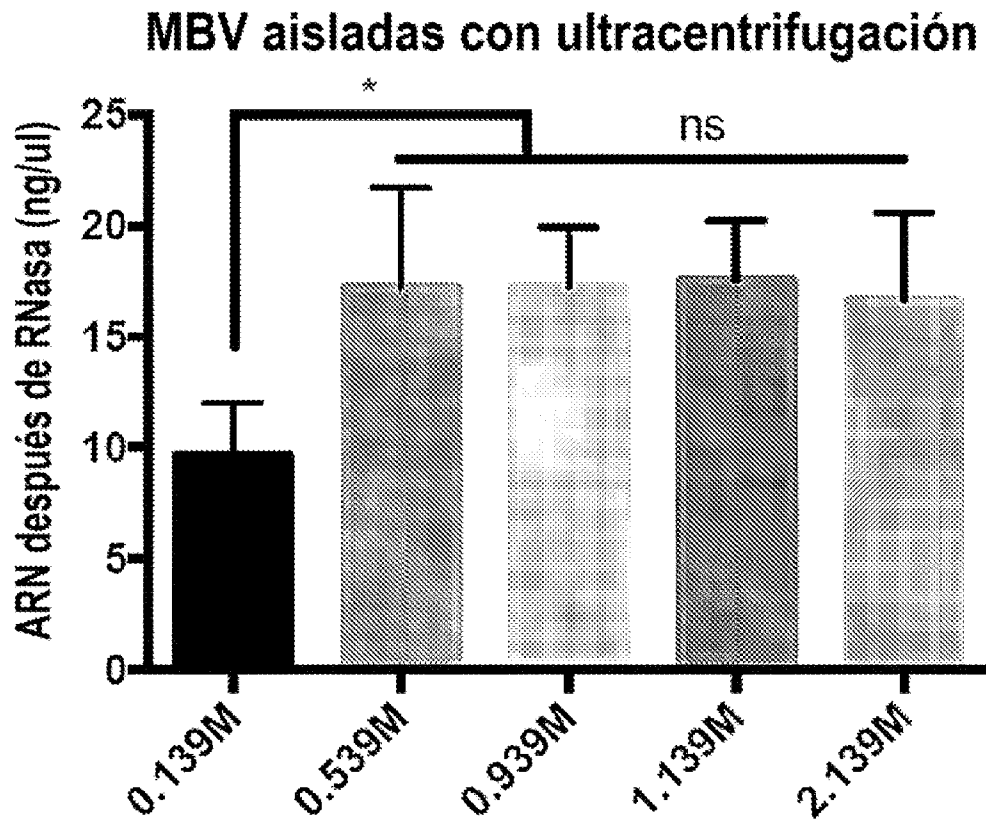
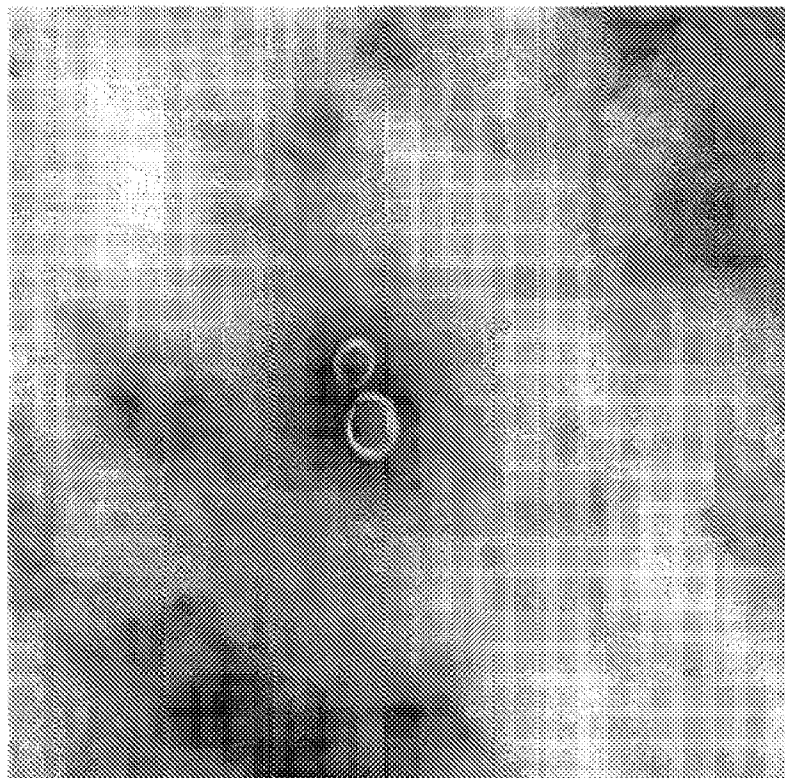


FIG. 9B



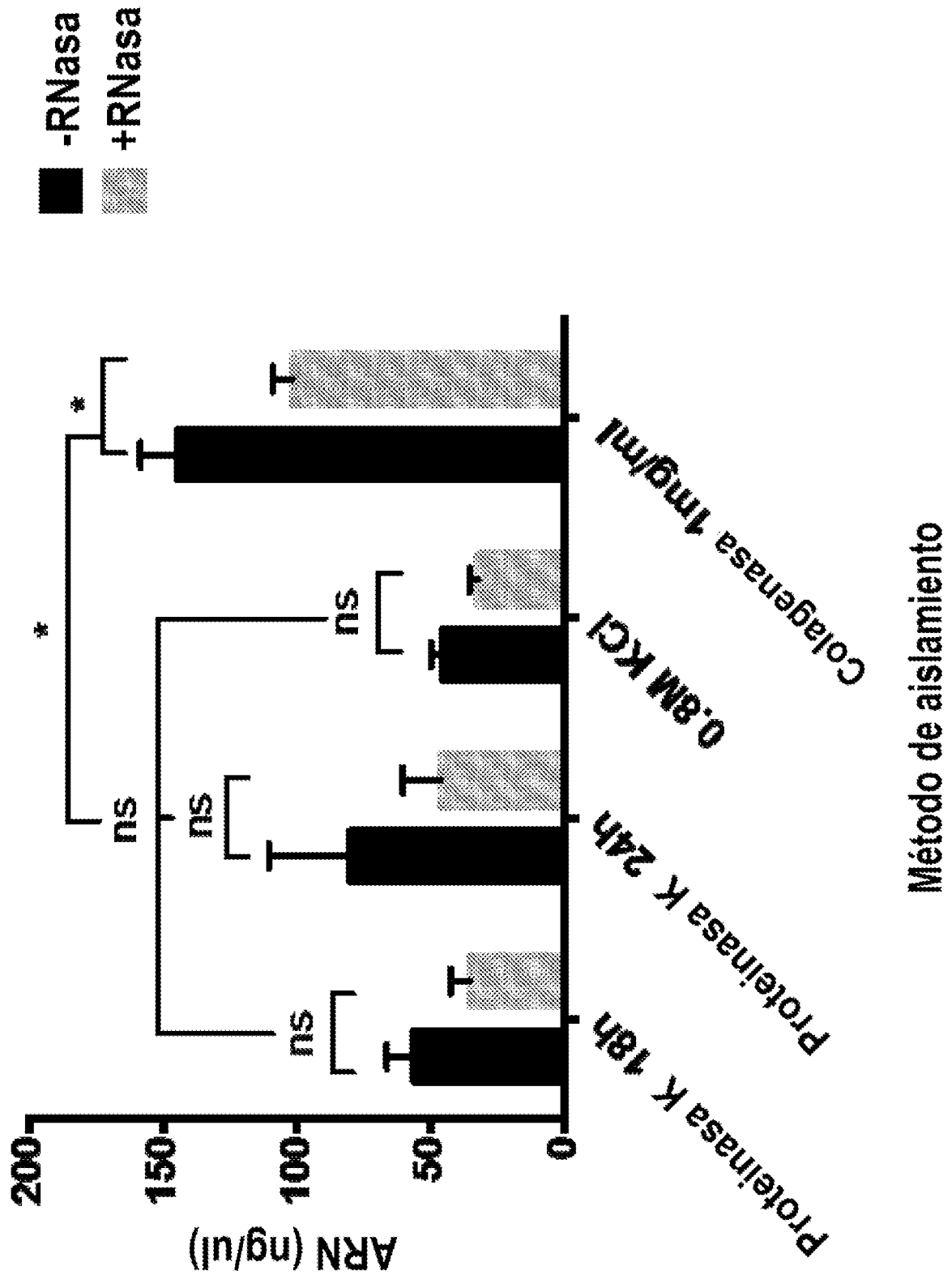
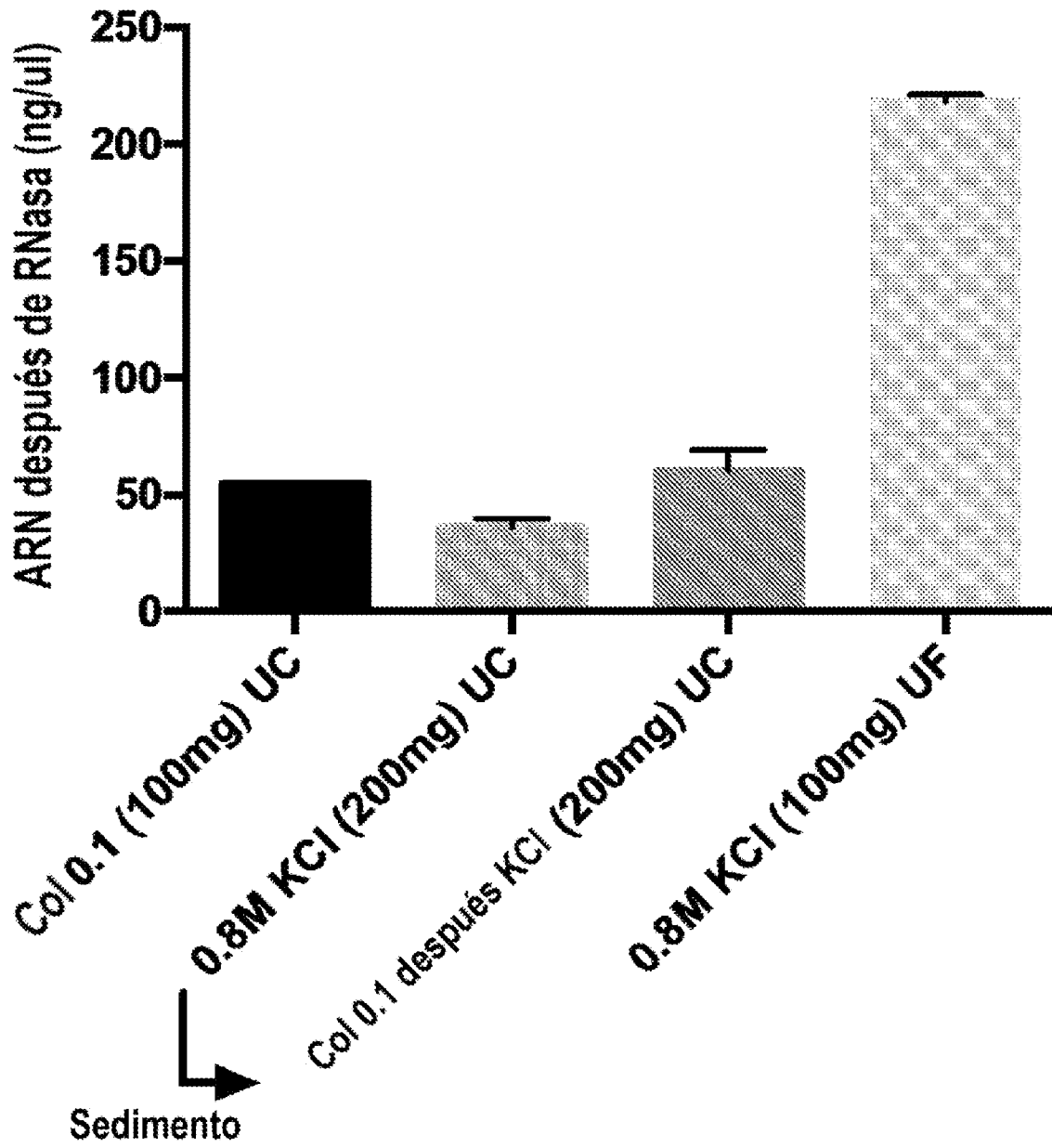
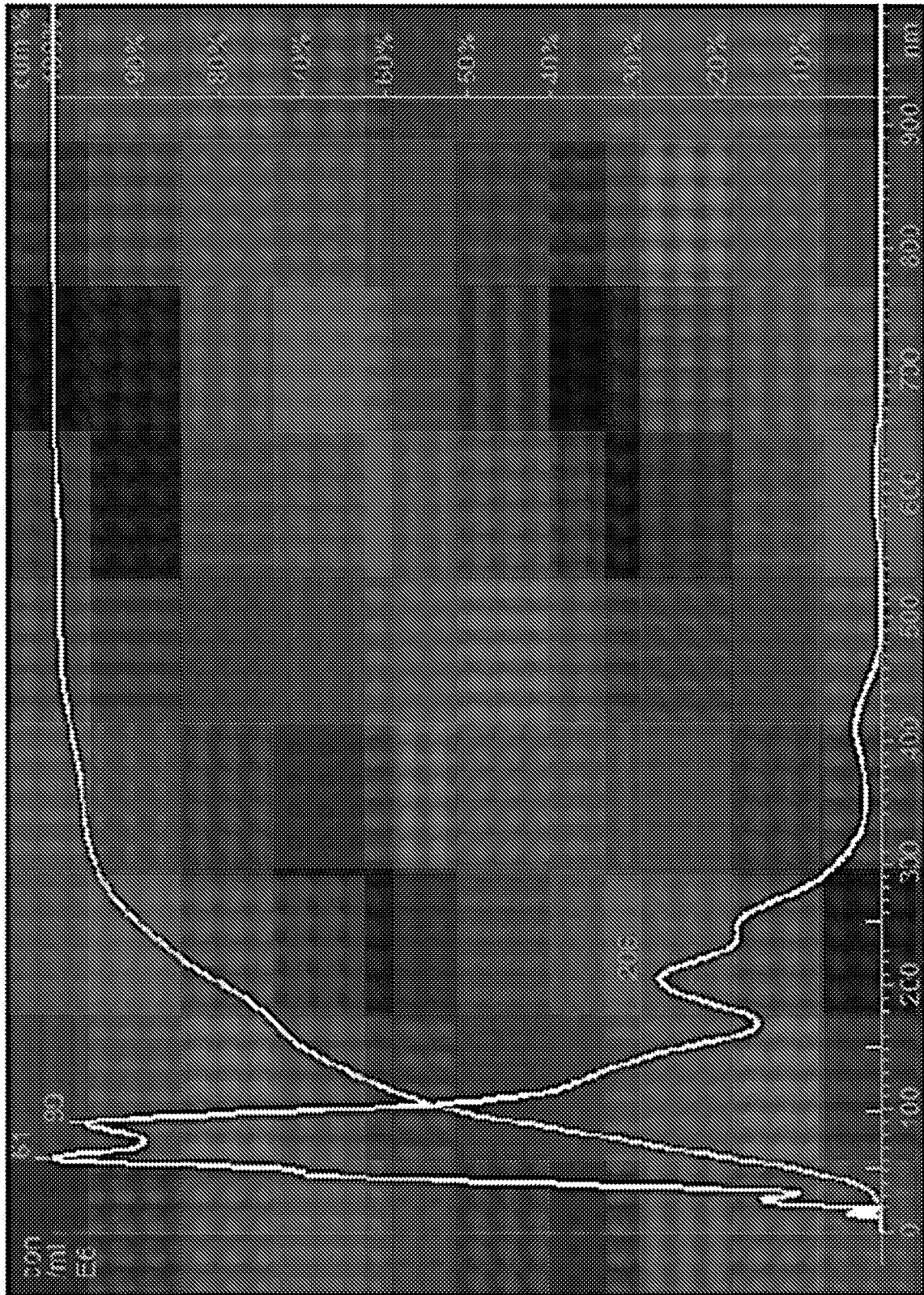


FIG. 10

**FIG. 11A**





Tamaño de partículas / Concentración

FIG. 11B

**FIG. 12A**

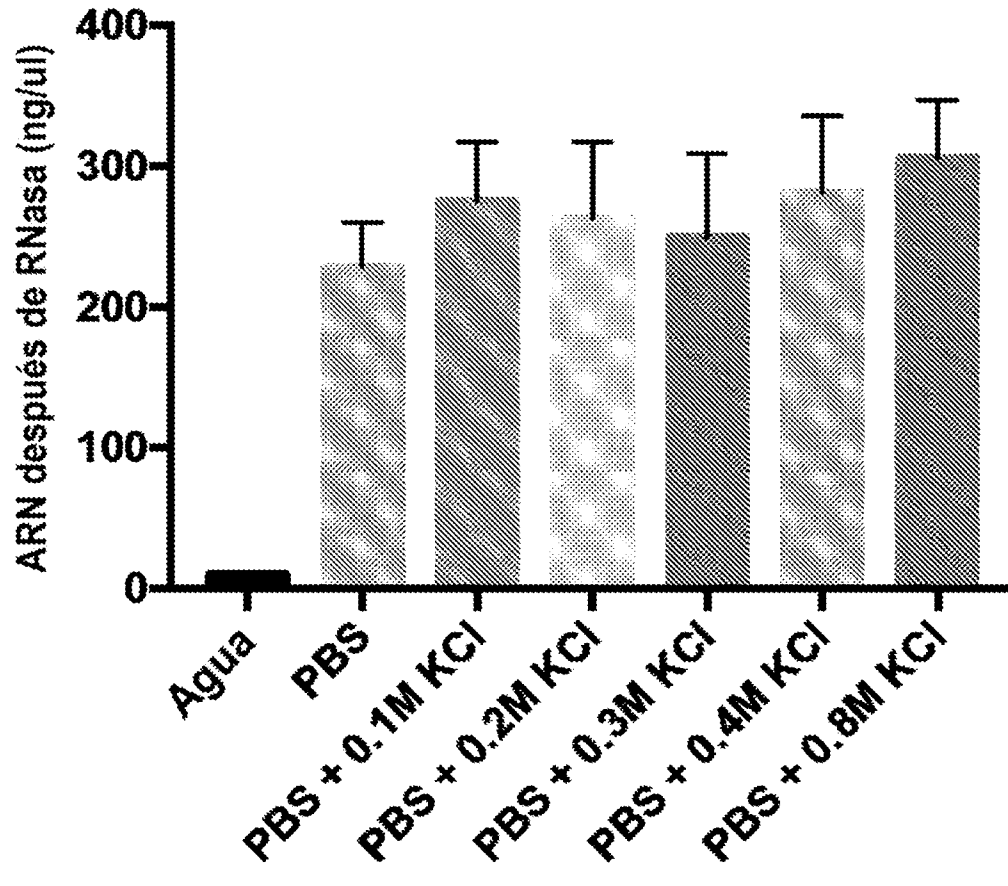


FIG. 12B

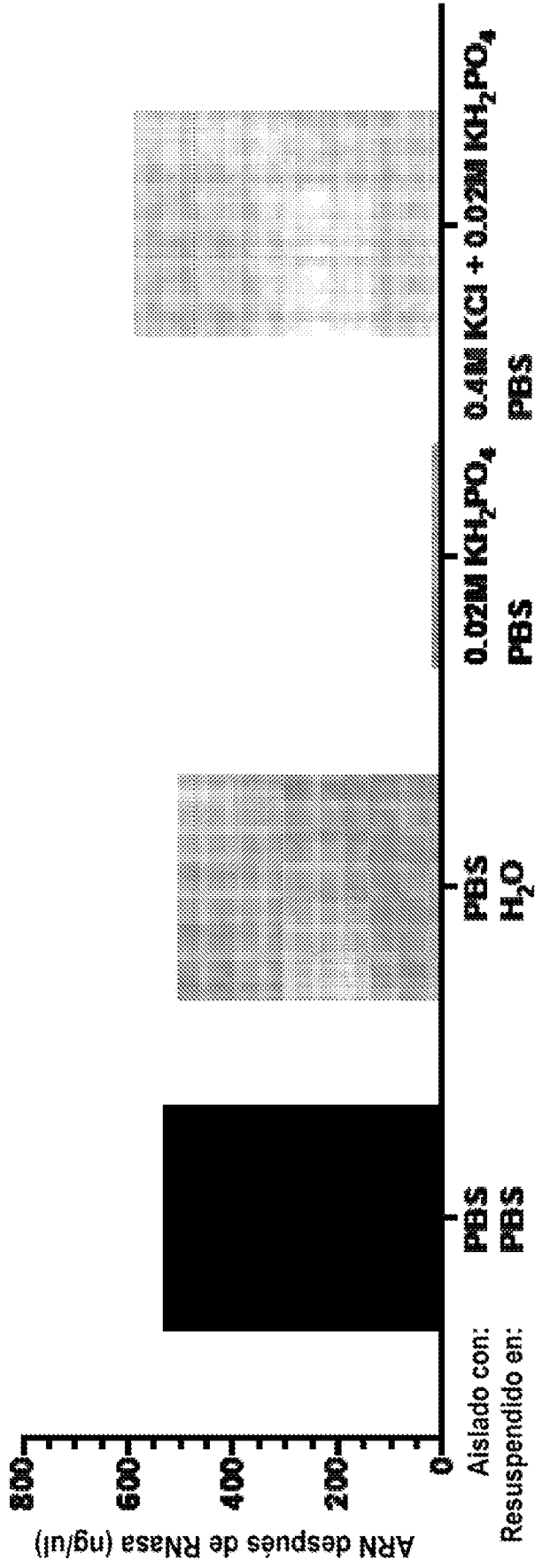
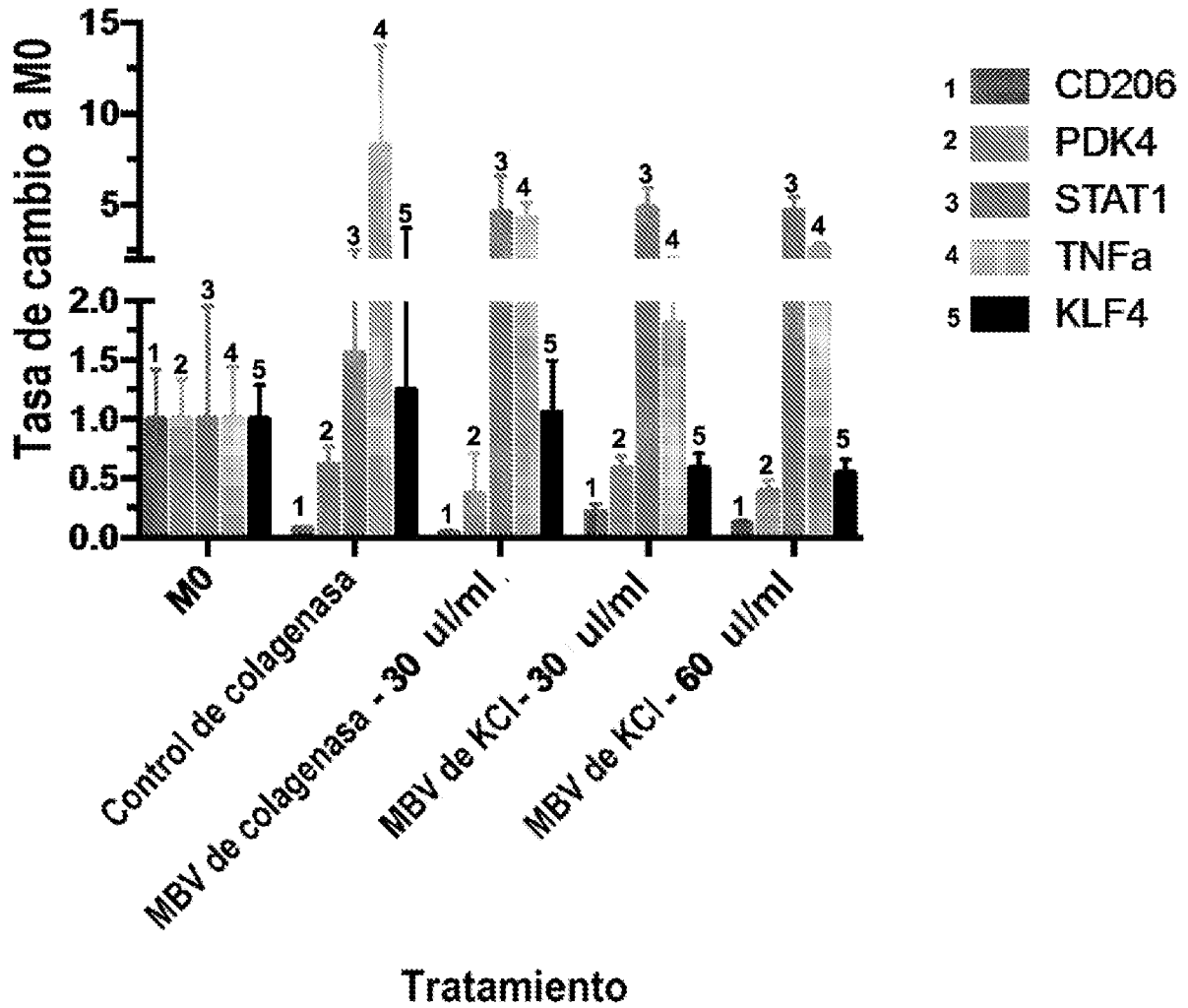


FIG. 13A



**FIG. 13B**

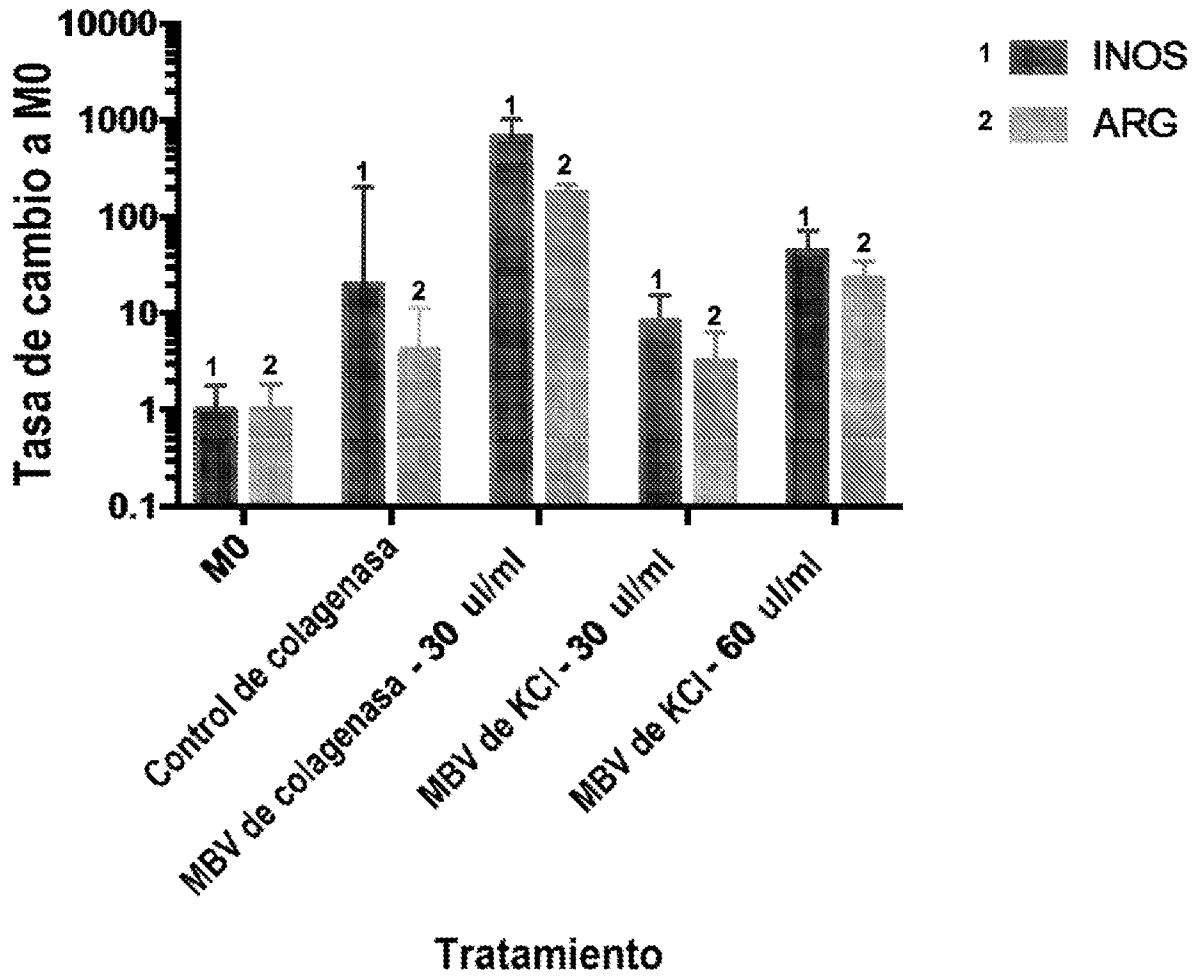


FIG. 14A

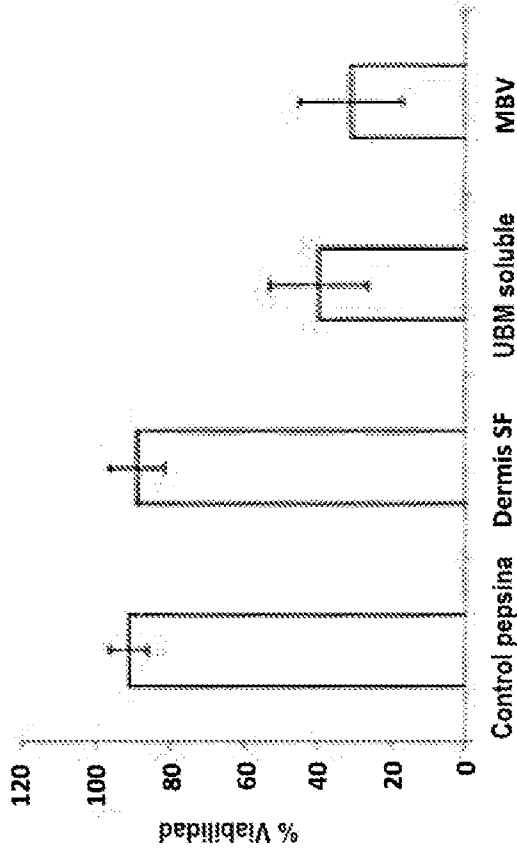


FIG. 14B

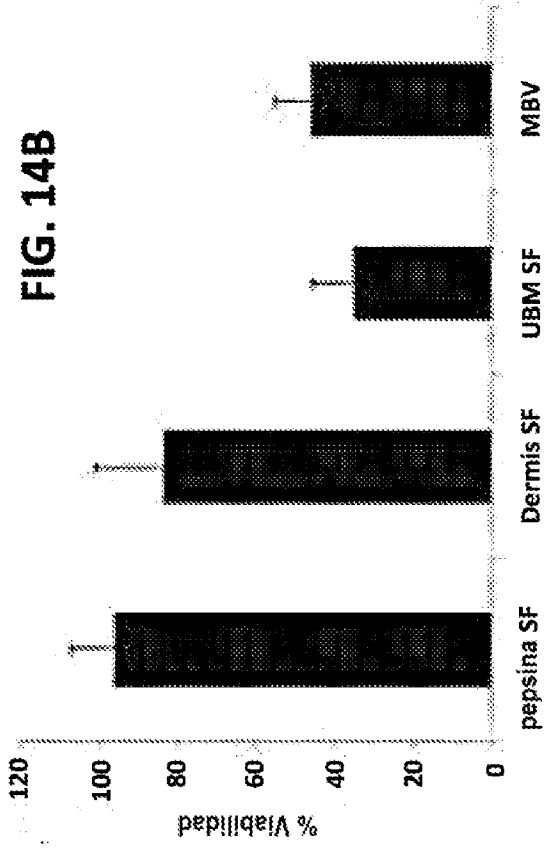


FIG. 14C

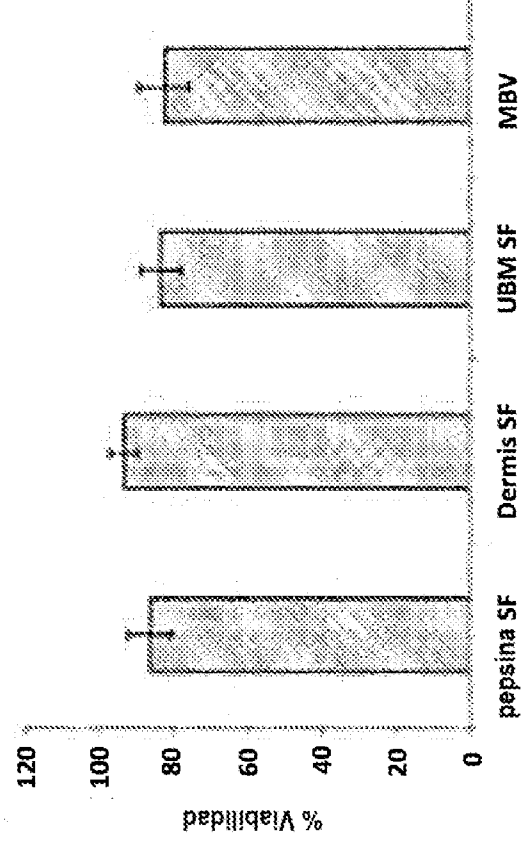
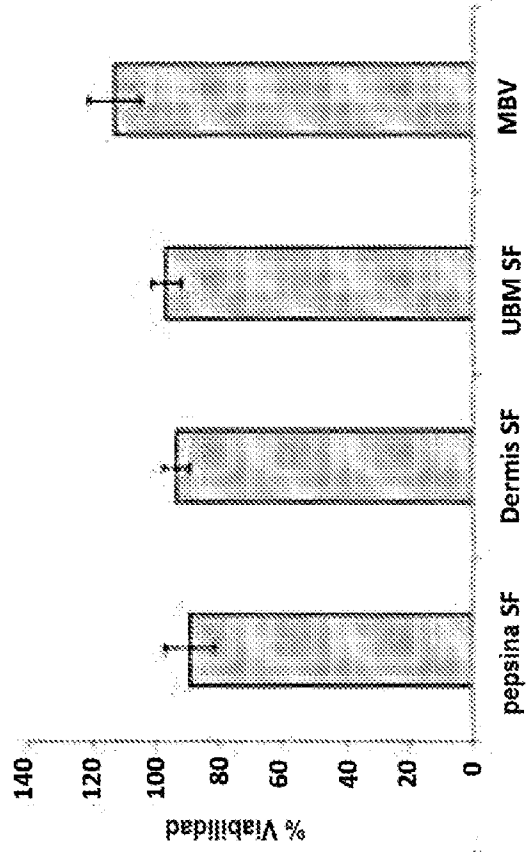
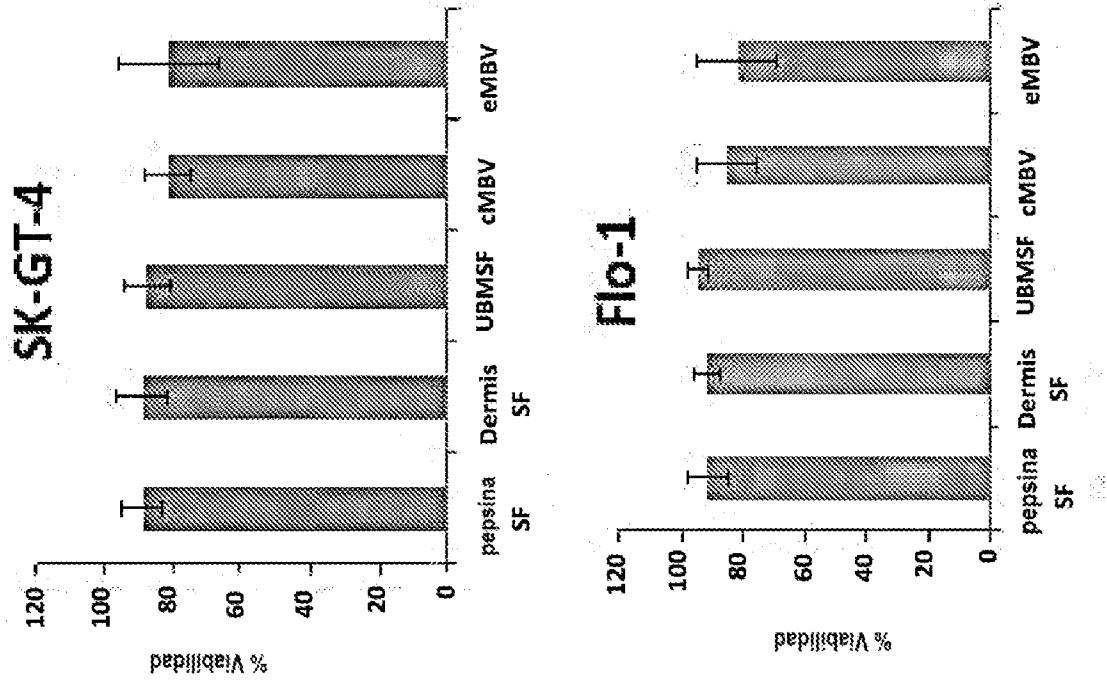
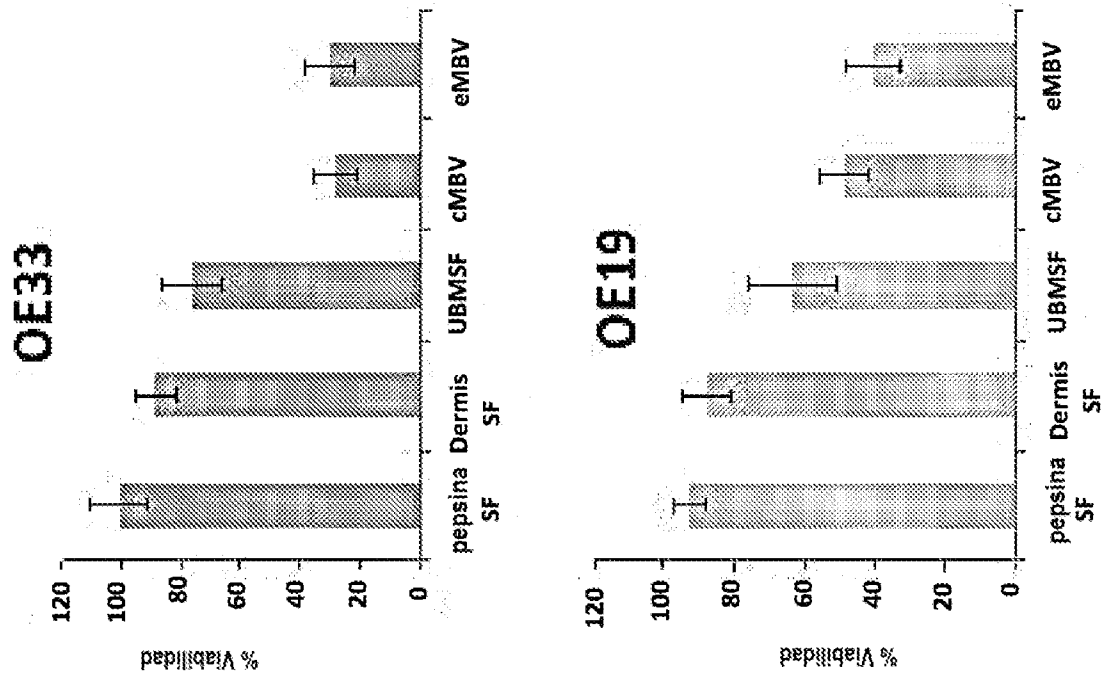


FIG. 14D

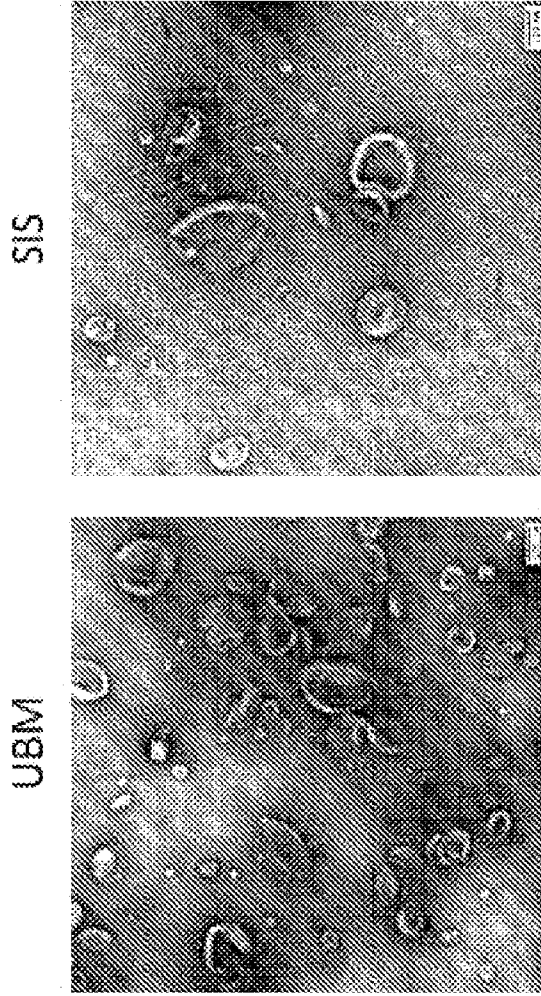




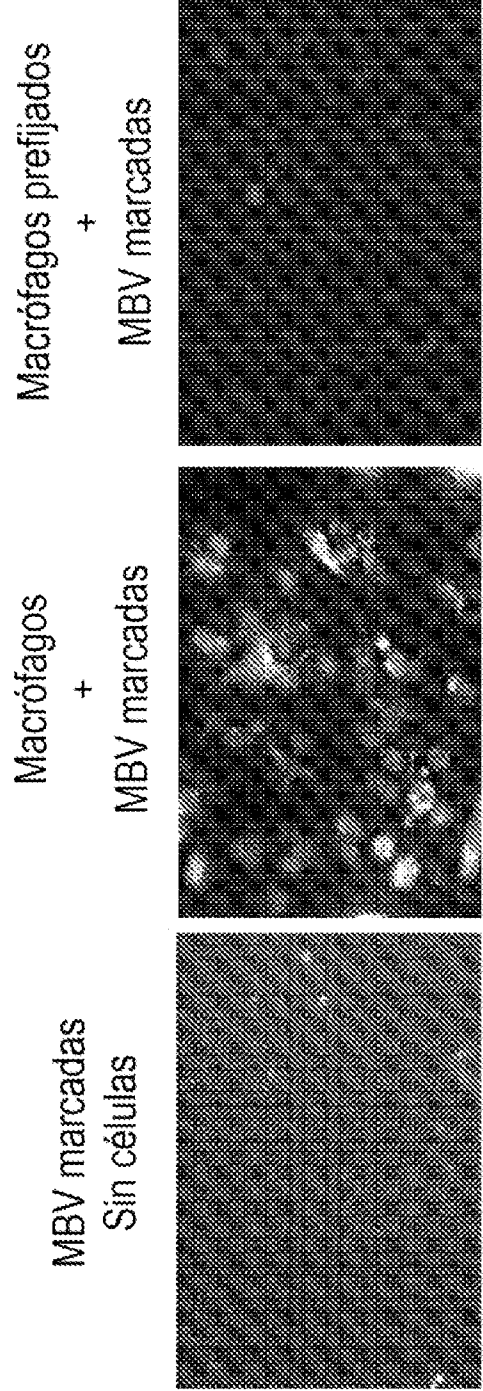
SF = fracción soluble  
 cMBV = MBV de colagenasa  
 eMBV = MBV de elastasa

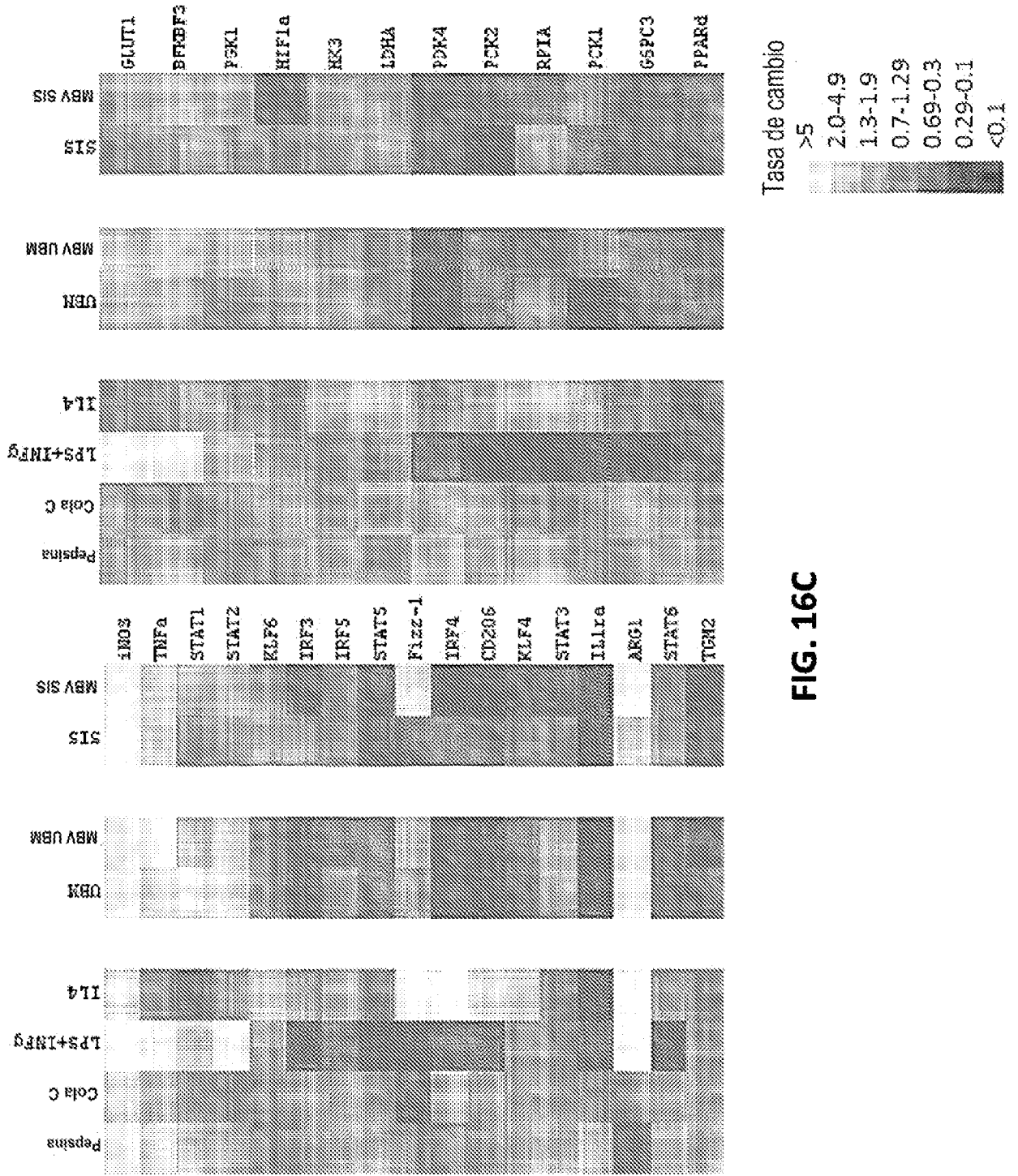
FIG. 15

**FIG. 16A**



**FIG. 16B**





**FIG. 16C**

**FIG. 17**

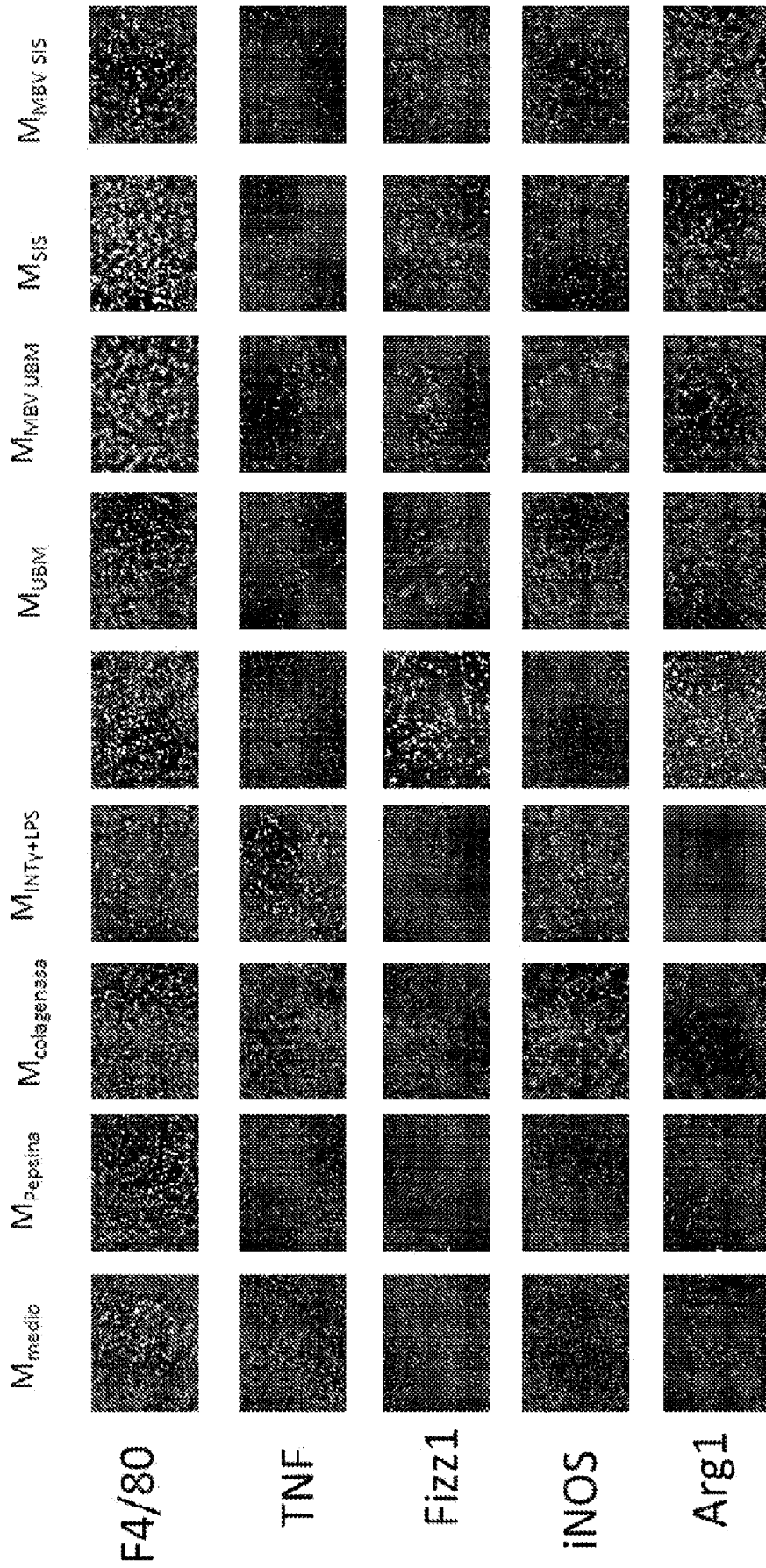


FIG. 18A

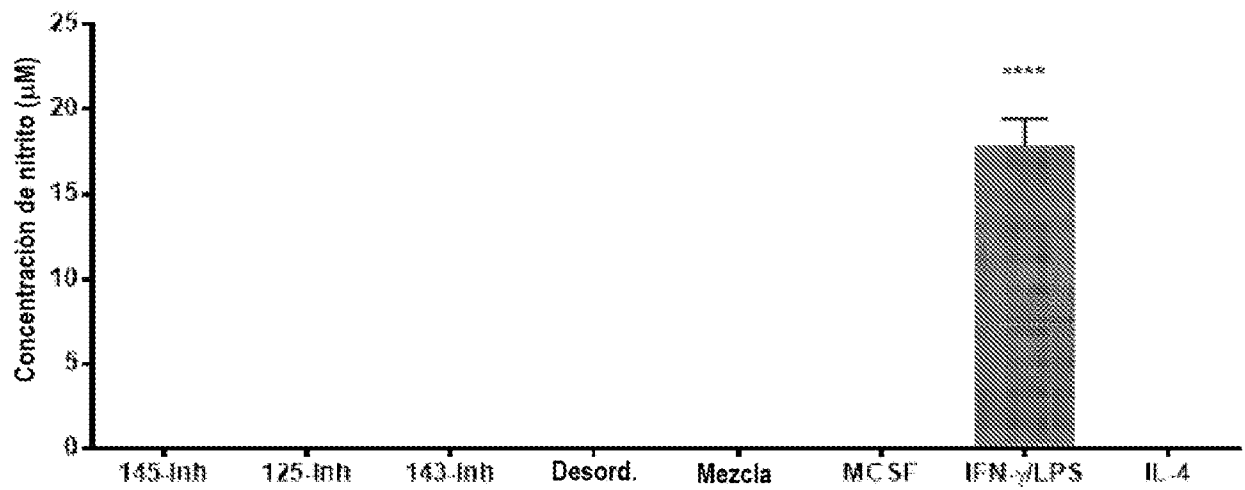
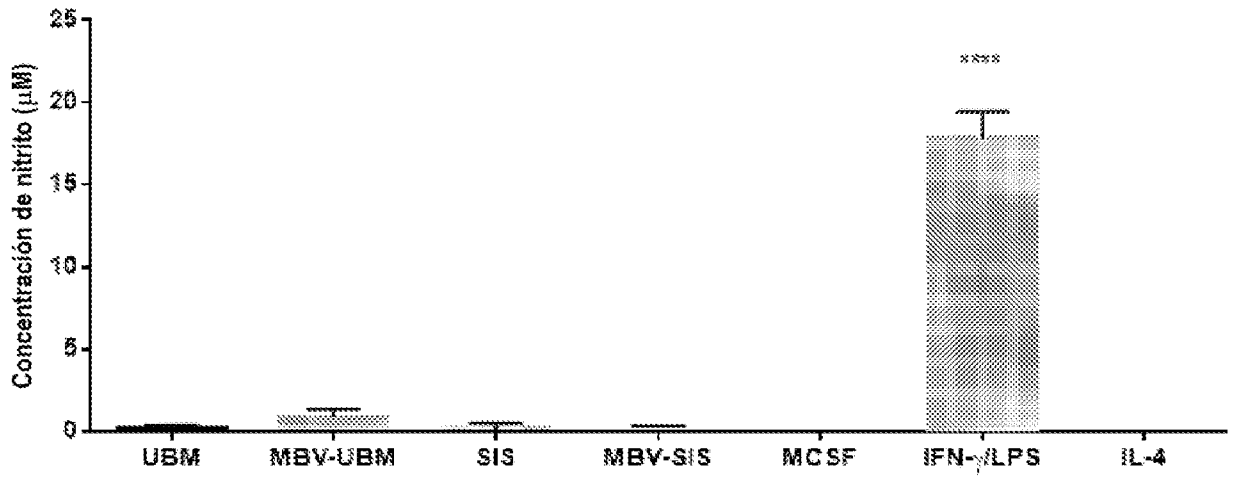
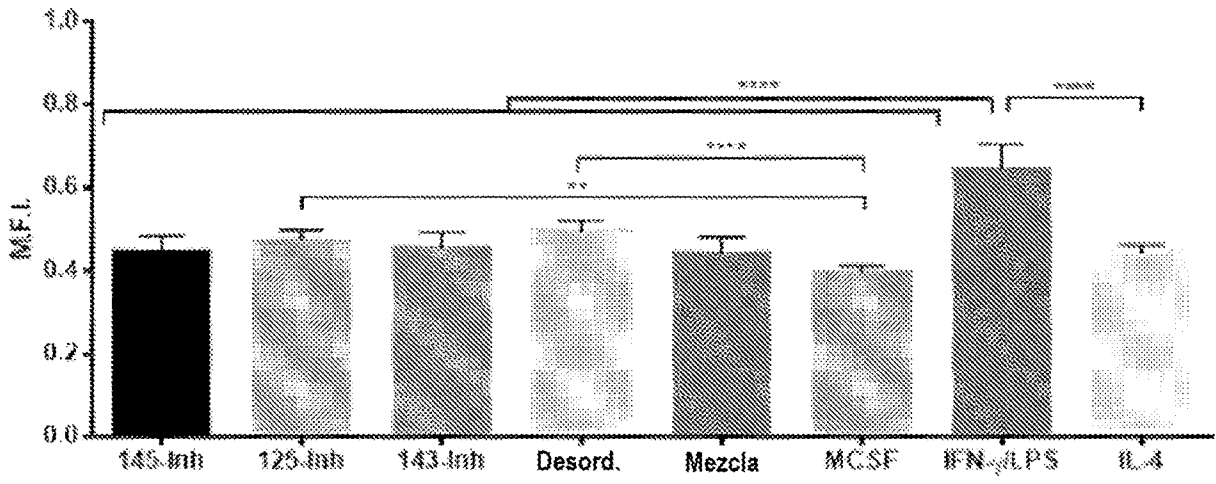
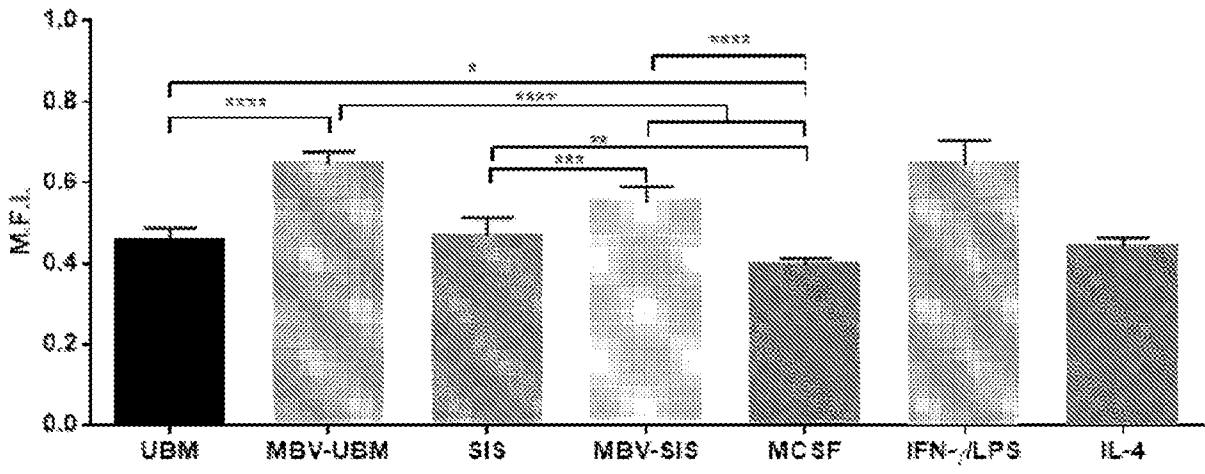
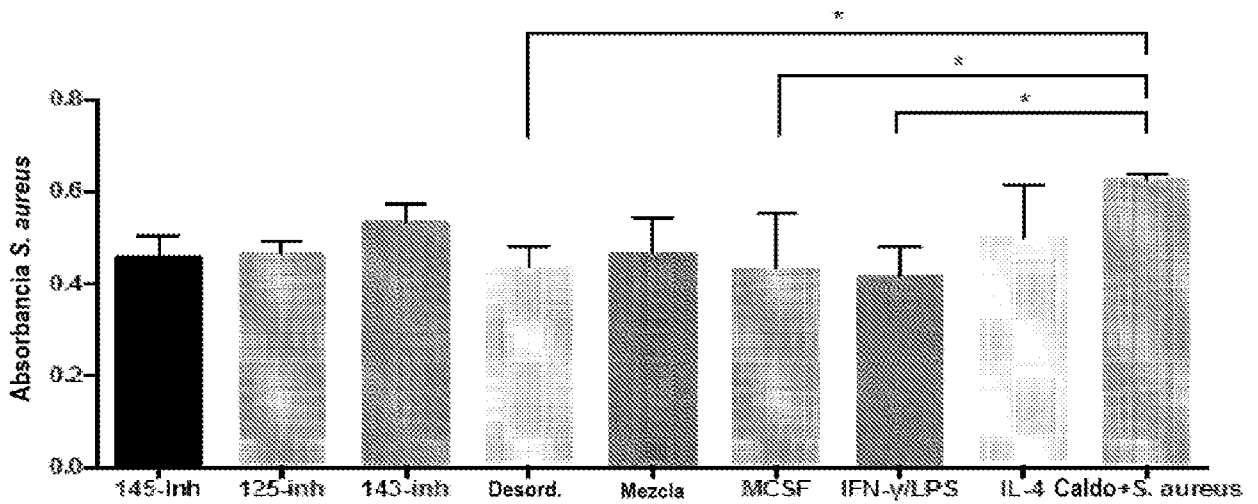
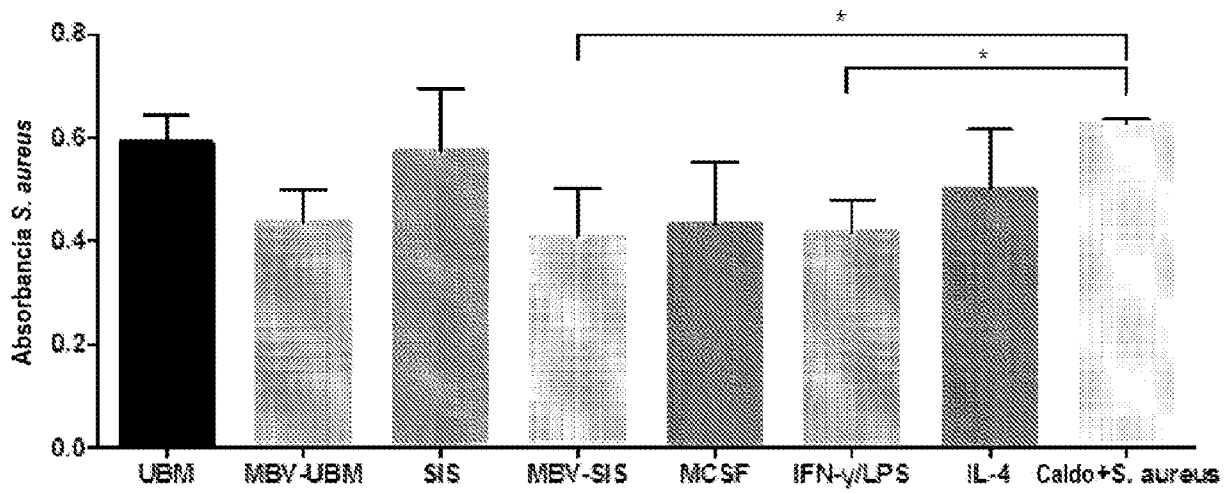


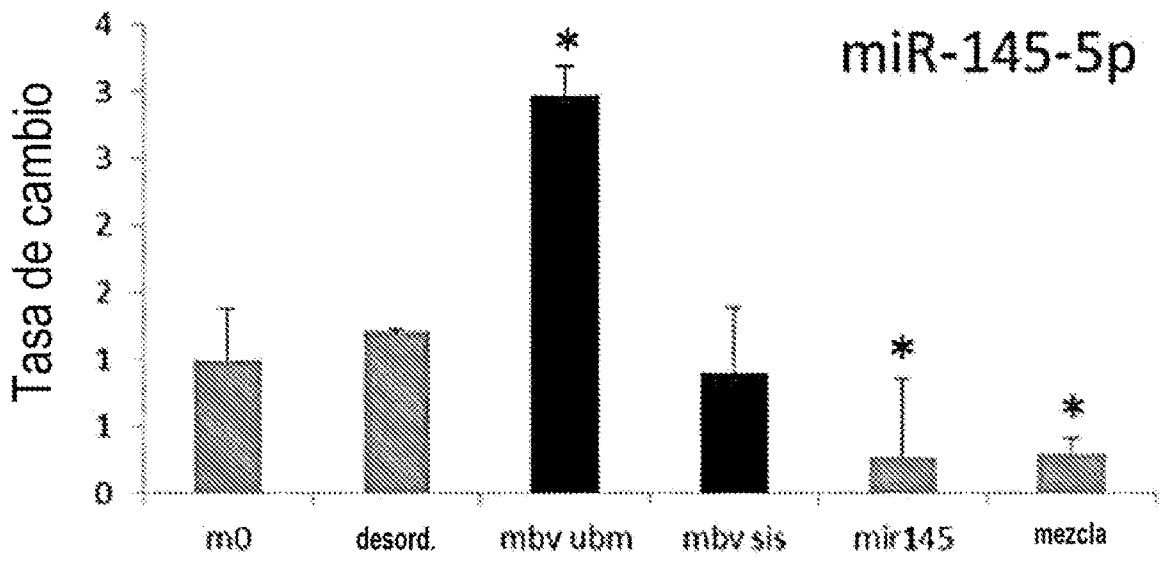
FIG. 18B



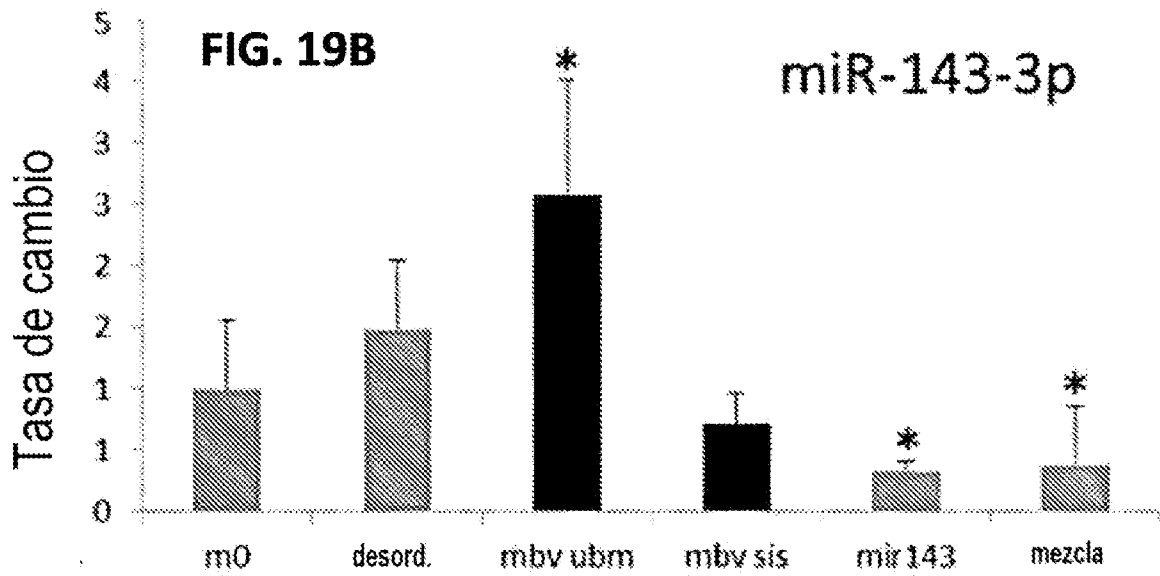
**FIG. 18C**



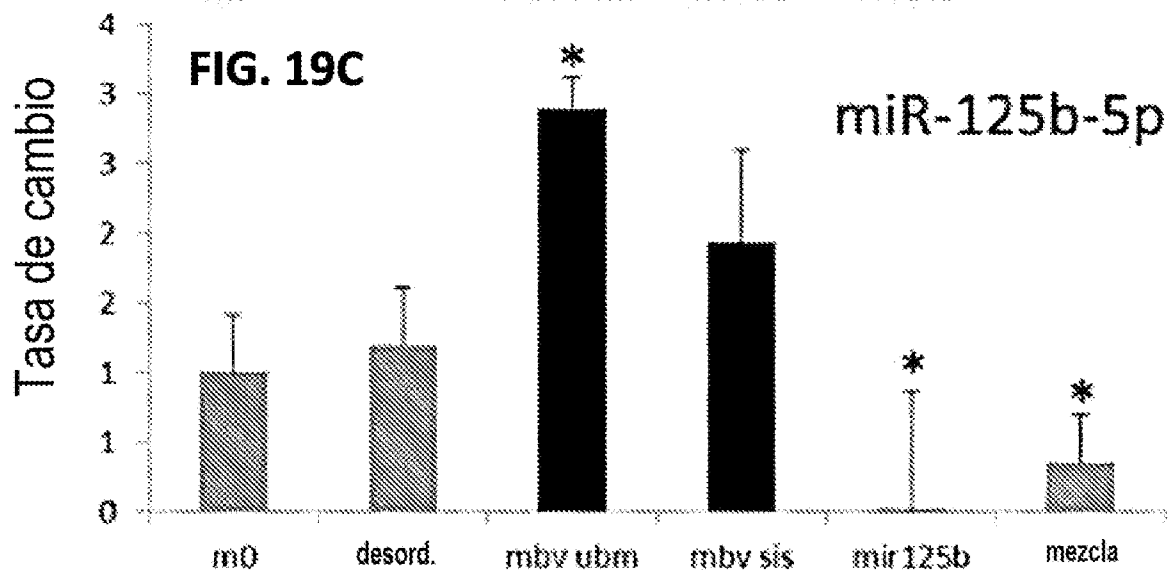
**FIG. 19A**



**FIG. 19B**



**FIG. 19C**



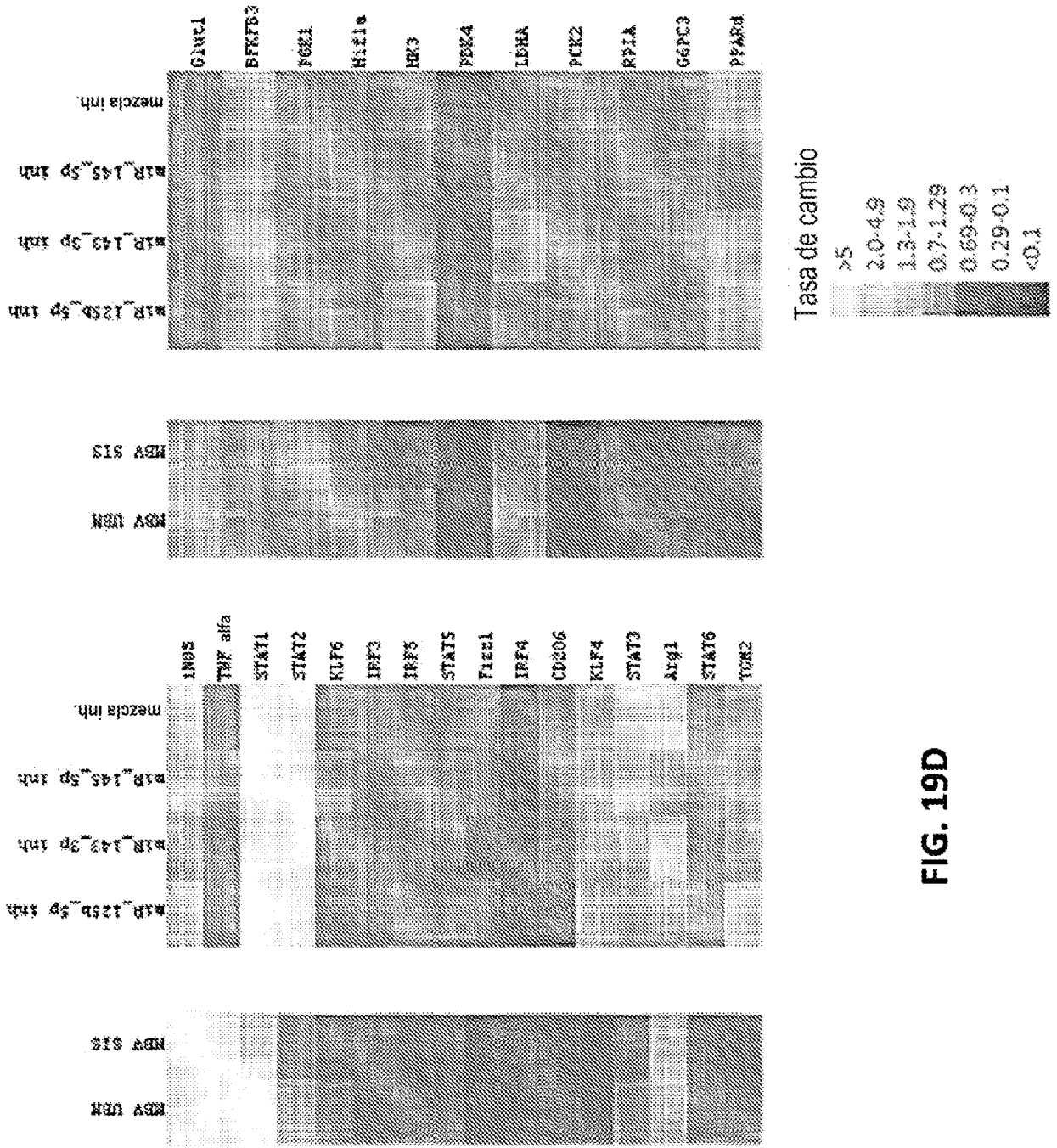


FIG. 19D

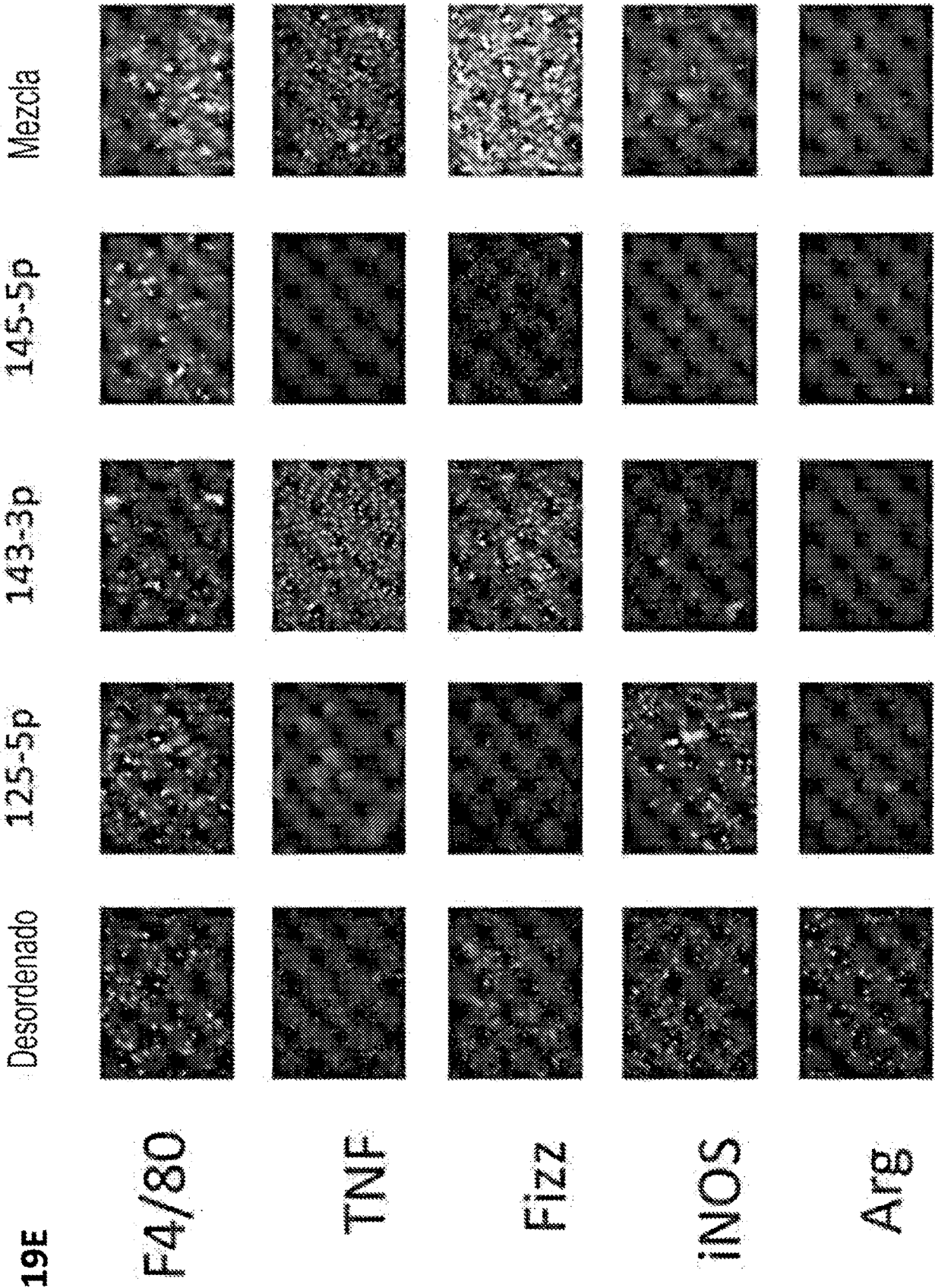


FIG. 19E