

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 925 527**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2017** **PCT/IL2017/050899**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2018** **WO18033911**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2017** **E 17841210 (2)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2022** **EP 3496730**

(54) Título: **Exosomas derivados de células mesenquimales para tratar trastornos neurológicos**

(30) Prioridad:

14.08.2016 US 201662374852 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.10.2022

(73) Titular/es:

RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (100.0%)
P.O. Box 39296
6139201 Tel-Aviv, IL

(72) Inventor/es:

OFFEN, DANIEL y
PERETS, NISIM

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 925 527 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

Exosomas derivados de células mesenquimales para tratar trastornos neurológicos

5 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención, en algunas formas de realización de la misma, se refiere a partículas derivadas de células madre mesenquimales para el tratamiento de trastornos neurológicos y, más particularmente, pero no exclusivamente, del autismo.

[0002] Los trastornos del espectro autista (TEA) son discapacidades del neurodesarrollo caracterizadas por tres síntomas centrales: deterioro grave de las interacciones sociales y habilidades de comunicación, comportamientos repetitivos incrementados e inflexibilidad cognitiva (Blenner, Reddy y Augustyn, 2011). Aunque la fisiopatología subyacente del TEA aún no está clara, la evidencia reciente sugiere que varias disfunciones moleculares, como déficits en la neurogénesis (Wegiel et al., 2010), procesos neuroinmunes (Ashwood et al., 2011; Li et al., 2009) y la disponibilidad de factores neurotróficos (Nickl-Jockschat & Michel, 2011) están involucrados. Los ratones BTBR son una hebra endogámica que muestra déficits de comunicación e interacción social, así como inflexibilidad cognitiva y aumento de los comportamientos repetitivos (Bolivar et. Al. 2007). Neurológicamente, BTBR sufre una neurogénesis hipocampal disminuida, que se correlaciona con los humanos autistas (Stephenson et. al. 2011). Se ha demostrado que el trasplante de MSC a los ventrículos laterales del cerebro de ratones BTBR, adyacentes a la zona subventricular, tiene la capacidad de beneficiar sus comportamientos de tipo autista, como aumentar el interés en ratones macho desconocidos, reducir los comportamientos repetitivos y inflexibilidad cognitiva (Segal-Gavish et.al. 2015).

[0003] La esquizofrenia (SCZ) es un trastorno grave del neurodesarrollo con un riesgo de por vida mundial de aproximadamente el 1% y se caracteriza por síntomas positivos (p. ej., delirios y alucinaciones), síntomas negativos (p. ej., aplanamiento afectivo, apatía y retraimiento social) y disfunción cognitiva. La SCZ es causada por una combinación de factores genéticos y agresiones ambientales, incluida la infección prenatal, las complicaciones perinatales y el consumo de cannabis. Los mecanismos patológicos que subyacen al curso prolongado de la SCZ aún no se han dilucidado por completo. En consecuencia, los tratamientos antipsicóticos actuales para SCZ tienen un efecto insuficiente sobre los síntomas negativos y los déficits cognitivos, que se consideran la característica central de esta devastadora enfermedad.

[0004] Inicialmente se pensó que los exosomas eran un mecanismo para eliminar proteínas de membrana innecesarias de los reticulocitos, pero los estudios actuales han demostrado que se usan para la comunicación de célula a célula al llevar información genética de una célula a otra. Varios estudios han informado que los exosomas derivados de MSC tienen funciones similares a las de las MSC, como reparar el daño tisular, suprimir las respuestas inflamatorias y modular el sistema inmunitario (Yu et. al. 2014). Los exosomas se pueden rastrear fácilmente y pueden dirigirse a áreas específicas, lo que facilita el seguimiento de su mecanismo de acción en comparación con las células (Valadi et. Al. 2007). Además, se ha demostrado que los exosomas tienen efectos biológicos significativos en el cerebro cuando se administran por vía intranasal, como la disminución de la inflamación (Zhuang et. Al. 2011).

[0005] El documento US 20150190430 enseña exosomas de MSC para tratar la enfermedad de Alzheimer y el Parkinson.

[0006] El documento WO2013150303 enseña exosomas de células madre neurales para tratar trastornos de ND.

[0007] Yu et al., Int J Mol Sci. 2014 marzo; 15(3): 4142-4157 enseña exosomas de MSC para tratar la enfermedad de Alzheimer.

[0008] Doeppner et al. muestran que específicamente las vesículas extracelulares derivadas de células madre como los exosomas mejoran la neorregeneración posterior al accidente cerebrovascular y previenen la inmunosupresión posisquémica (Doeppner, et al., Stem Cells Translation Medicine 4(10), p. 1131-43, 3 de septiembre de 2015).

[0009] Xin et al. probó el tratamiento sistémico del accidente cerebrovascular con exosomas derivados de células estromales mesenquimales multipotentes y pudo demostrar que dichas células promueven la recuperación funcional y la remodelación neurovascular y la recuperación funcional después del accidente cerebrovascular en ratas (Xin, et al., Journal Cerebral Blood Flow Metabolism 33(11), pág. 1711-5, 21 de agosto de 2013).

[0010] Hadar et al. describen el uso de MSC, administradas al cerebro para mejorar el comportamiento relacionado con el autismo en ratones BTBR. Además, los autores sugieren que el efecto terapéutico de las MSC se basa en parte en la secreción de BDNF por parte de las células (Hadar. et al., Autism Research vol. 9(1), p. 17-32, 10 de agosto de 2015).

[0011] Zuangh et al. realizó la administración intranasal de exosomas de MSC que transportan fármacos a tres modelos de ratón diferentes de enfermedades inflamatorias cerebrales, predictivas de Alzheimer, Parkinson y esquizofrenia (Zuangh et al., Molecular Therapy vol. 19(10), p. 1769-1779, 13 de septiembre de 2011).

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

5 [0012] Se proporcionan métodos para tratar una enfermedad neurológica en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de exosomas derivados de células madre mesenquimales (MSC), en los que la enfermedad neurológica no es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, tratando así la enfermedad neurológica en el sujeto.

10 [0013] De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de exosomas derivados de células madre mesenquimatosas, tratando así el trastorno del espectro autista.

15 [0014] De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para usar en el tratamiento del ictus en un sujeto que lo necesite que comprende la administración intranasal al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de exosomas derivados de células madre mesenquimales, tratando así el ictus en el sujeto.

20 [0015] Según otras características de las formas de realización preferidas descritas, la enfermedad neurológica es la esquizofrenia.

25 [0016] Según otras características de las formas de realización preferidas descritas, la administración comprende la administración por vía intranasal.

30 [0017] Según otras características de las formas de realización preferidas descritas, las células madre mesenquimales se derivan de la pulpa dental.

35 [0018] Según otras características de las formas de realización preferidas descritas, las células madre mesenquimales se derivan de la médula ósea.

[0019] Según otras características de las formas de realización preferidas descritas, las MSC son MSC humanas.

40 [0020] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

[0021] En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitativos.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

45 [0022] Aquí se describen algunas formas de realización de la invención, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las formas de realización de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica las formas de realización de la invención.

50 [0023] En los dibujos:

45 FIG. 1. MSC-exosomas teñidos con PKH26 cuando se administran por vía intravenosa, intranasal y estereotáctica. Los cerebros se analizaron 1 hora después de la administración. La administración estereotáctica arrojó un 100%, intranasal, 68,5% e intravenosa, 11,2%.

FIGs. 2A-B. Se encontraron MSC-exosomas intranasales en las neuronas. DAPI-NEUN-PKH26. X60.

55 FIGs. 3A-C. Mejora específica de las vocalizaciones ultrasónicas después de la administración intranasal de MSC-exosomas. A. BTBR MSC-exo tenía más sílabas de vocalizaciones ultrasónicas en comparación con la solución salina BTBR. B. Ninguna diferencia significativa entre los grupos en el contacto social (nariz con nariz y nariz con los genitales), lo que sugiere un efecto específico en las vocalizaciones ultrasónicas. C. visualización de sílabas típicas de cada grupo. BTBR MSC-exo se acercó más a C57bl en características de duración y complejidad de la sílaba. **p<0,01, ***p<0,001, SEM.

60 FIGs. 4A-B. Los exosomas de MSC aumentan la interacción social de hombre a hombre (A) y disminuyen los comportamientos repetitivos durante la interacción social (B). Cada grupo se analizó en cuanto a comportamientos basales (gris) y se analizó nuevamente 3 semanas después del tratamiento (solución salina o MSC-exo, negro). BTBR MSC-exo fue el único grupo que tuvo una diferencia significativa antes y después del tratamiento en el tiempo dedicado a la interacción social y en los comportamientos repetitivos durante la interacción social (prueba T pareada, SEM). BTBR MSC-exo fue significativamente diferente del grupo de solución salina C57bl antes del tratamiento y significativamente diferente del grupo de solución salina BTBR (ANOVA1, SEM). ***p<0,001.

65 FIG. 5. Los exosomas de MSC disminuyen el comportamiento repetitivo de aseo personal. Cada grupo se analizó en cuanto a comportamientos basales (gris) y se analizó nuevamente 3 semanas después del tratamiento (solución salina o MSC-exo, negro). BTBR MSC-exo fue el único grupo que tuvo una diferencia significativa antes y después del tratamiento en el tiempo dedicado al aseo personal (prueba T pareada, SEM). BTBR MSC-exo fue

significativamente diferente del grupo de solución salina C57bl antes del tratamiento y significativamente diferente del grupo de solución salina BTBR (ANOVA1, SEM). *p<0,05.

FIGs. 6A-B. MSC-Exosomas disminuyen la rigidez cognitiva. Los ratones BTBR-exo tenían más probabilidades de aprender la inversión del ensayo Water T-Maze y menos probabilidades de volver al patrón aprendido en el primer y segundo día (A). Los ratones BTBRexo fueron más rápidos en su aprendizaje, ya que 4 ratones aprendieron a seguir constantemente el camino de reversión en el sexto ensayo. Los ratones con solución salina BTBR tardaron más en aprender y era menos probable que giraran de manera consistente en la dirección correcta. Después de 10 ensayos, 3 de los 6 ratones con solución salina BTBR habían aprendido el nuevo camino, pero solo 2 de ellos podían seguirlo de manera confiable. La comparación entre grupos en cada prueba individual no es significativa, pero el número total de giros correctos es significativamente mayor en el grupo MSC-exo en comparación con el grupo de solución salina y la diferencia entre el éxito total del grupo es significativa (B), (t = 0,026).

FIG. 7. Los exosomas de MSC mejoran el aprendizaje de los comportamientos maternos. Las madres C57bl recolectaron todas las crías en un refugio en un promedio de 9,9 segundos (C57bl, blanco), las vírgenes ingenuas no recolectaron ninguna de las crías después de 180 segundos (c57bl, gris pálido) y las vírgenes que pasaron 3 días con la madre C57BL aprendieron a recolectar todos los cachorros en un promedio de 37 segundos (C5bl, gris oscuro). Las madres BTBR con administración de solución salina no recogieron la mayoría de las crías después de 180 segundos. Las vírgenes ingenuas de BTBR no recogieron ninguno de los cachorros después de 180 segundos. BTBR MSC-exo, después de pasar 2 días con la madre de solución salina BTBR, recolectó todas las crías en un promedio de 55 segundos (SEM).

FIGs. 8A-B son gráficos que ilustran que los ratones tratados con exosomas de MSC tenían una actividad reducida después de la inyección de PCP en comparación con el control.

FIG. 9 es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento subcrónico de PCP en el procesamiento de información central. El diagrama de barras muestra el porcentaje de tiempo congelado en sujetos no preexpuestos (NPE) y preexpuestos (PE) durante el tono CS durante la fase de acondicionamiento de la tarea de inhibición latente. Los símbolos (*) y (**) se refieren a una significancia estadística de P<0,05 y P<0,01 respectivamente. Todos los valores son medias ± SEM.

FIG. 10 es un gráfico que ilustra los efectos del tratamiento subcrónico de PCP sobre la susceptibilidad a la anfetamina sistémica (2,5 mg/kg, i.p.). El tratamiento con PCP aumentó la respuesta locomotora a la anfetamina sistémica medida por la distancia recorrida (en cm) de los ratones en campo abierto. La significación estadística se ilustró solo después del pico de actividad de 40 min.

FIG. 11 es un gráfico que ilustra los resultados de una prueba de enfoque social de tres cámaras. Se midió el tiempo pasado en las proximidades de la jaula social y la jaula no social. Se presenta el índice de preferencia, que indica la cantidad de tiempo pasado cerca del estímulo social en relación con el tiempo pasado cerca de estímulos sociales y no sociales. Los símbolos (*) y (**) se refieren a una significancia estadística de P<0,05 y P<0,01 respectivamente. Todos los valores son medias ± SEM.

FIG. 12A es un gráfico que ilustra que los exosomas derivados de MSC pero no los exosomas derivados de NSC mejoran la interacción social de macho a macho y reducen los comportamientos repetitivos durante la interacción social en ratones BTBR. Solo los ratones tratados con MSC-exo presentaron un aumento significativo en el tiempo dedicado a la interacción social y una reducción significativa en los comportamientos repetitivos en comparación con los ratones tratados con solución salina y los tratados con NSC-exo (prueba T no pareada, *p<0,05, ***p<0,001). Los datos se presentan como media+SEM.

FIG. 12B es un gráfico que ilustra que hay una mejora significativa de las vocalizaciones ultrasónicas después de la administración intranasal de MSC-exo. NSC-exo no fue efectivo.

DESCRIPCIÓN DE FORMAS DE REALIZACIÓN ESPECÍFICAS DE LA INVENCIÓN

[0024] La presente invención se refiere a exosomas derivados de células madre mesenquimales para el tratamiento de trastornos neurológicos y, más particularmente, pero no exclusivamente, del autismo.

[0025] Antes de explicar en detalle al menos una forma de realización de la invención, debe entenderse que la aplicación de la invención no está necesariamente limitada a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos.

[0026] Inicialmente se pensó que los exosomas eran un mecanismo para eliminar proteínas de membrana innecesarias de los reticulocitos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que también se utilizan para la comunicación de célula a célula mediante el transporte de información genética de una célula a otra. Los exosomas contienen principalmente proteínas, así como ARN y una gran cantidad de micro ARN. Aproximadamente el 25 por ciento de estas proteínas y ARN juegan un papel en el crecimiento y mantenimiento celular.

[0027] Los presentes inventores investigaron si los exosomas derivados de células madre mesenquimatosas tienen un efecto beneficioso sobre las enfermedades neurológicas.

[0028] En el primer caso, los inventores investigaron el efecto de los exosomas derivados de células madre mesenquimales sobre el autismo utilizando la cepa de ratón consanguínea BTBR T1tf/J (BTBR) que incorpora múltiples fenotipos conductuales relevantes para los tres síntomas de diagnóstico del autismo: deterioro grave de interacciones

sociales y habilidades de comunicación, aumento de comportamientos repetitivos e inflexibilidad cognitiva. Los ratones BTBR presentan un enfoque social selectivamente reducido, interacciones sociales recíprocas bajas y juego juvenil deteriorado en comparación con los controles C57BL.

- 5 **[0029]** Los presentes inventores han demostrado que los ratones con administración intranasal de exosomas derivados de células madre mesenquimales (también denominados en el presente documento como MSC-exo) presentan una mejora significativa en el dominio de interacción social. Los ratones macho BTBR tratados con exosomas derivados de MSC presentaron un mayor interés social en otros machos extraños en comparación con sus propios comportamientos de referencia antes del tratamiento y en comparación con otros machos tratados con solución salina (Figuras 4A-B). El tiempo que dedicaron a la interacción social fue comparable al del grupo c57bl. En la comunicación de vocalización ultrasónica (USV) de macho a hembra, los ratones tratados con MSC-exo tenían un número significativamente mayor de USV en comparación con el grupo tratado con solución salina hacia la hembra (Figuras 3A-C). El segundo síntoma central del comportamiento de tipo autista de los ratones BTBR es el aumento del tiempo dedicado a comportamientos repetitivos de excavación y acicalamiento. Aquí, los presentes inventores muestran que los ratones tratados con exosomas derivados de MSC pasaron menos tiempo, en comparación con su línea de base, en comportamientos repetitivos durante la interacción social y mientras estaban aislados (Figura 5). El tercer síntoma central de los comportamientos de tipo autista de los ratones BTBR, la rigidez cognitiva. Los presentes inventores muestran que los ratones tratados con exosomas derivados de MSC tuvieron significativamente menos errores durante la condición de inversión de la plataforma de rescate en comparación con el grupo tratado con solución salina durante el ensayo del laberinto en T de agua (Figuras 6A-B).
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- [0030]** Los presentes inventores también han examinado el efecto de los exosomas derivados de MSC en el comportamiento de recuperación de las crías. Se sabe que después de dar a luz, la madre hace un nido para las crías recién nacidas y cuando las crías están aisladas, la madre inmediatamente las recupera y las devuelve al nido. Una hembra virgen ingenua no recuperará al cachorro aislado, pero si la virgen pasa unos días con la madre, la virgen puede aprender el comportamiento de recuperación del cachorro y así convertirse en una virgen experimentada (Marlin, Mitre, D'amour, Chao, & Froemke, 2015). Aquí, los presentes inventores muestran que ni las madres BTBR ni BTBR experimentaron un comportamiento de línea de base virgen presente de recuperación de cachorros como lo hacen las madres c57bl. Sin embargo, cuando se trata con exosomas derivados de MSC, las vírgenes experimentadas con BTBR tienen los mismos comportamientos de recuperación de cachorros que las vírgenes experimentadas con c57bl (Figura 7).
- [0031]** En el segundo caso, los inventores investigaron el efecto de los exosomas derivados de células madre mesenquimales sobre la esquizofrenia utilizando un modelo farmacológico de roedores basado en fenciclidina (PCP), que actúa como antagonista del receptor de glutamato NMDA.
- [0032]** Las Figuras 8A-B y 10 ilustran que los ratones tratados con exosomas derivados de células madre mesenquimales mostraron una respuesta locomotora reducida a la administración sistémica de anfetamina cuando se les administró PCP. La Figura 9 ilustra el efecto positivo de los exosomas derivados de MSC en el procesamiento de información central en ratones tratados con PCP, analizados evaluando el reflejo de sobresalto acústico. Además, los ratones tratados con exosomas mostraron la mayor preferencia por el estímulo social en este modelo (Figura 11).
- [0033]** En conjunto, los presentes inventores han demostrado el efecto positivo de los exosomas derivados de células madre mesenquimales en dos trastornos neurológicos con etiologías muy diferentes. Por consiguiente, los presentes inventores proponen que los exosomas derivados de células madre mesenquimatosas servirán como un agente terapéutico útil para enfermedades neurológicas en general.
- [0034]** Por lo tanto, se proporcionan métodos para tratar una enfermedad neurológica en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de exosomas derivados de células madre mesenquimales, en los que la enfermedad neurológica no es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, tratando así la enfermedad neurológica en el sujeto.
- [0035]** El término "células madre mesenquimales" se refiere a células estromales multipotentes que pueden diferenciarse en una variedad de tipos de células, que incluyen: osteoblastos (células óseas), condrocitos (células de cartílago), miocitos (células musculares) y adipocitos (células grasas). En su estado pluripotente, las células madre mesenquimatosas típicamente expresan los siguientes marcadores: CD105, CD166, CD29, CD90 y CD73, y no expresan CD34, CD45 y CD133.
- [0037]** Las células madre mesenquimales pueden aislarse de una variedad de tejidos que incluyen, pero no se limitan a, médula ósea, tejido adiposo, pulpa dental, mucosa oral, sangre periférica y líquido amniótico.
- [0038]** Los métodos de aislamiento, purificación y expansión de células madre mesenquimales (MSC) son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos por Caplan y Haynesworth en las patentes de EE. UU. N° 5.486.359 y Jones EA et al., 2002, Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells, Arthritis Rheum. 46(12): 3349-60.
- [0039]** Preferiblemente, los cultivos de células madre mesenquimales se generan diluyendo aspirados de MO (normalmente 20 ml) con volúmenes iguales de solución salina equilibrada de Hank (HBSS; GIBCO Laboratories, Grand

Island, NY, EE. UU.) y colocando las células diluidas en capas sobre aproximadamente 10 ml de una columna Ficoll (Ficoll-Paque; Pharmacia, Piscataway, NJ, EE. UU.). Después de 30 minutos de centrifugación a 2500 xg, la capa de células mononucleares se retira de la interfase y se suspende en HBSS. A continuación, las células se centrifugan a 1.500 xg durante 15 minutos y se resuspenden en un medio completo (MEM, medio α sin desoxirribonucleótidos ni ribonucleótidos; GIBCO); 20 % de suero de ternero fetal (FCS) derivado de un lote seleccionado para el crecimiento rápido de MSC (Atlanta Biologicals, Norcross, GA); 100 unidades/ml de penicilina (GIBCO), 100 µg/ml de estreptomicina (GIBCO); y L-glutamina 2 mM (GIBCO). Las células resuspendidas se sembraron en aproximadamente 25 ml de medio en una placa de cultivo de 10 cm (Corning Glass Works, Corning, NY) y se incubaron a 37 °C con CO₂ humidificado al 5 %. Despues de 24 horas en cultivo, las células no adherentes se desechan y las células adherentes se lavan minuciosamente dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). El medio se reemplaza con un medio completo fresco cada 3 o 4 días durante aproximadamente 14 días. A continuación, las células adherentes se recogen con tripsina al 0,25 % y EDTA 1 mM (tripsina/EDTA, GIBCO) durante 5 min a 37 °C, se vuelven a sembrar en una placa de 6 cm y se cultivan durante otros 14 días. A continuación, las células se tripsinizan y se cuentan utilizando un dispositivo de recuento de células como, por ejemplo, un hemocitómetro (Hausser Scientific, Horsham, PA). Las células cultivadas se recuperan por centrifugación y se resuspenden con DMSO al 5 % y FCS al 30 % a una concentración de 1 a 2 x 10⁶ células por ml. Se congelan lentamente alícuotas de aproximadamente 1 ml cada una y se almacenan en nitrógeno líquido.

[0040] Para expandir la fracción de células madre mesenquimales, las células congeladas se descongelan a 37 °C, se diluyen con un medio completo y se recuperan mediante centrifugación para eliminar el DMSO. Las células se resuspenden en un medio completo y se cultivan en placa a una concentración de aproximadamente 5.000 células/cm². Despues de 24 horas en cultivo, las células no adherentes se eliminan y las células adherentes se cosechan usando tripsina/EDTA, se disocian pasándolas a través de una pipeta Pasteur estrecha y preferiblemente se vuelven a sembrar a una densidad de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3,0 células/cm². En estas condiciones, los cultivos de MSC pueden crecer en aproximadamente 50 duplicaciones de población y expandirse en aproximadamente 2000 veces [Colter DC., et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 97: 3213-3218, 2000].

[0041] Los cultivos de MSC utilizados por algunas formas de realización de la invención incluyen preferiblemente tres grupos de células que se definen por sus características morfológicas: células pequeñas y agranulares (denominadas RS-1, en lo sucesivo), células pequeñas y granulares (denominadas RS-2, en lo sucesivo) y células grandes y moderadamente granulares (denominadas MSC maduras, en lo sucesivo). La presencia y concentración de dichas células en cultivo puede ensayarse identificando la presencia o ausencia de varios marcadores de superficie celular, usando, por ejemplo, inmunofluorescencia, hibridación *in situ* y ensayos de actividad.

[0042] Como se mencionó, la presente invención contempla el uso de partículas derivadas de células madre mesenquimales para el tratamiento de enfermedades neurológicas.

[0043] El término "partícula", como se usa en el presente documento, se refiere a una entidad discreta que incorpora materia biológica tal como proteínas y/o ARN. Se apreciará que la partícula de este aspecto de la presente divulgación no es una célula biológica.

[0044] La partícula es un exosoma. Las partículas descritas aquí pueden comprender cualquiera o más de las propiedades de los exosomas descritos aquí.

[0045] Los exosomas pueden comprender una vesícula o una esfera aplanada limitada por una bicapa lipídica. Los exosomas pueden comprender diámetros de 40-100 nm. Los exosomas pueden tener una densidad de aproximadamente 1,13-1,19 g/ml y pueden flotar en gradientes de sacarosa. Los exosomas pueden estar enriquecidos en colesterol y esfingomielina, y marcadores de balsas lipídicas como GM1, GM3, flotillina y la proteína quinasa src Lyn. Los exosomas pueden comprender una o más proteínas presentes en las células madre mesenquimales o en el medio acondicionado de células madre mesenquimales (MSC-CM), como una proteína característica o específica de las MSC o MSC-CM. Pueden comprender ARN, por ejemplo miARN.

[0046] Como se usa en el presente documento, el término "exosoma" se refiere a una vesícula extracelular que se libera de una célula tras la fusión de un cuerpo multivesicular (MVB) con la membrana plasmática.

[0047] El exosoma puede (a) tener un tamaño de entre 50 nm y 100 nm determinado por microscopía electrónica; (b) comprender un complejo de peso molecular >100 kDa, que comprende proteínas de <100 kDa; (c) comprender un complejo de peso molecular >300 kDa, que comprende proteínas de <300 kDa; (d) comprender un complejo de peso molecular >1000 kDa; (e) tener un tamaño de entre 2 nm y 200 nm, determinado por filtración frente a un filtro de 0,2 pM y concentración frente a una membrana con un límite de peso molecular de 10 kDa; o (f) un radio hidrodinámico de menos de 100 nm, determinado por difracción láser o dispersión de luz dinámica.

[0048] Los exosomas pueden ser algo que se pueda aislar de una célula madre mesenquimatala (MSC) o un medio acondicionado de células madre mesenquimales (MSC-CM). Los exosomas pueden ser responsables de al menos una actividad de MSC o MSC-CM. Los exosomas pueden ser responsables y llevar a cabo sustancialmente la mayoría o todas las funciones del MSC o MSC-CM. Por ejemplo, la partícula puede ser un sustituto (o un sustituto biológico) de MSC o

MSC-CM.

[0049] Los exosomas preferiblemente tienen al menos una propiedad de una célula madre mesenquimatosa. Los exosomas pueden tener una propiedad biológica, tal como una actividad biológica. Los exosomas pueden tener cualquiera de las actividades biológicas de una MSC. Los exosomas pueden tener, por ejemplo, una actividad terapéutica o restauradora de una MSC.

[0050] Los exosomas se pueden producir o aislar de varias formas. Tal método puede comprender aislar los exosomas de una célula madre mesenquimal (MSC). Tal método puede comprender aislar los exosomas de un medio acondicionado de células madre mesenquimales (MSC-CM).

[0051] Los exosomas se pueden aislar, por ejemplo, separándolos de los componentes no asociados en función de cualquier propiedad de los exosomas. Por ejemplo, los exosomas se pueden aislar en función del peso molecular, el tamaño, la forma, la composición o la actividad biológica.

[0052] El medio acondicionado se puede filtrar o concentrar o ambos durante, antes o después de la separación. Por ejemplo, se puede filtrar a través de una membrana, por ejemplo una con un límite de tamaño o peso molecular. Puede estar sujeto a filtración de fuerza tangencial o ultrafiltración.

[0053] Por ejemplo, se puede usar la filtración con una membrana de un peso molecular o tamaño de corte adecuado, como se describe en los Ensayos de peso molecular en otra parte de este documento.

[0054] El medio acondicionado, opcionalmente filtrado o concentrado o ambos, puede someterse a otros medios de separación, como cromatografía en columna. Por ejemplo, se puede utilizar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con varias columnas. Las columnas pueden ser columnas de exclusión de tamaño o columnas de enlace.

[0055] Se pueden usar una o más propiedades o actividades biológicas de los exosomas para rastrear su actividad durante el fraccionamiento del medio acondicionado de células madre mesenquimales (MSC-CM). Como ejemplo, se pueden usar detectores de dispersión de luz, índice de refracción, dispersión de luz dinámica o detectores UV-visibles para seguir los exosomas. Por ejemplo, se puede usar una actividad terapéutica tal como una actividad cardioprotectora para rastrear la actividad durante el fraccionamiento.

[0056] Los siguientes párrafos proporcionan un ejemplo específico de cómo se puede obtener una partícula de células madre mesenquimatas como un exosoma.

[0057] Se puede producir una partícula de células madre mesenquimatas cultivando células madre mesenquimatas en un medio para acondicionarlas. El medio puede comprender DMEM. El DMEM puede ser tal que no contenga rojo de fenol. El medio puede complementarse con insulina, transferrina o selenoproteína (ITS), o cualquier combinación de los mismos. Puede comprender FGF2. Puede comprender PDGF AB. La concentración de FGF2 puede ser de aproximadamente 5 ng/ml de FGF2. La concentración de PDGF AB puede ser de aproximadamente 5 ng/ml. El medio puede comprender glutamina-penicilina-estreptomicina o -mercaptoetanol, o cualquier combinación de los mismos.

[0058] Las células se pueden cultivar durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días o más, por ejemplo, 3 días. El medio acondicionado puede obtenerse separando las células del medio. El medio acondicionado se puede centrifugar, por ejemplo a 500 g. se puede concentrar por filtración a través de una membrana. La membrana puede comprender una membrana >1000 kDa. El medio acondicionado se puede concentrar unas 50 veces o más.

[0059] El medio acondicionado puede someterse a cromatografía líquida tal como HPLC. El medio acondicionado puede separarse por exclusión de tamaño. Se puede utilizar cualquier matriz de exclusión de tamaño, como Sepharose. Como ejemplo, puede emplearse una TSK Guard column SWXL, 6 x 40 mm o un gel TSK G4000 SWXL, 7,8 x 300 mm. El tampón eluyente puede comprender cualquier medio fisiológico tal como solución salina. Puede comprender tampón fosfato 20 mM con NaCl 150 mM a pH 7,2. El sistema de cromatografía se puede equilibrar a un caudal de 0,5 ml/min. El modo de elución puede ser isocrático. Se puede utilizar la absorbancia UV a 220 nm para seguir el progreso de la elución. Las fracciones se pueden examinar para la dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando un detector de dispersión de luz cuasi-elástica (QELS).

[0060] Las fracciones que muestran dispersión de luz dinámica pueden conservarse. Por ejemplo, se encuentra que una fracción que se produce por el método general como se describe anteriormente, y que eluye con un tiempo de retención de 11-13 minutos, tal como 12 minutos, presenta dispersión de luz dinámica. La r.sub.h de las partículas en este pico es de aproximadamente 45-55 nm. Tales fracciones comprenden partículas de células madre mesenquimales tales como exosomas.

[0061] Los exosomas pueden tener un tamaño superior a 2 nm. Los exosomas pueden tener un tamaño superior a 5 nm, 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm o 50 nm. Los exosomas pueden tener un tamaño superior a 100 nm, tal como superior a 150 nm. Los exosomas pueden tener un tamaño de sustancialmente 200 nm o mayor.

5 [0062] El exosoma o exosomas pueden tener un rango de tamaños, como entre 2 nm a 20 nm, 2 nm a 50 nm, 2 nm a 100 nm, 2 nm a 150 nm o 2 nm a 200 nm. El exosoma o exosomas pueden tener un tamaño entre 20 nm a 50 nm, 20 nm a 100 nm, 20 nm a 150 nm o 20 nm a 200 nm. El exosoma o exosomas pueden tener un tamaño entre 50 nm a 100 nm, 50 nm a 150 nm o 50 nm a 200 nm. El exosoma o los exosomas pueden tener un tamaño entre 100 nm y 150 nm o entre 100 nm y 200 nm. El exosoma o exosomas pueden tener un tamaño entre 150 nm y 200 nm.

10 [0063] El tamaño puede determinarse por varios medios. En principio, el tamaño puede determinarse por fraccionamiento por tamaño y filtración a través de una membrana con el corte de tamaño correspondiente. A continuación, el tamaño del exosoma puede determinarse mediante el seguimiento de la segregación de las proteínas componentes con SDS-PAGE o mediante un ensayo biológico.

15 [0064] El tamaño puede comprender un radio hidrodinámico. El radio hidrodinámico de los exosomas puede estar por debajo de 100 nm. Puede estar entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 70 nm. El radio hidrodinámico puede estar entre alrededor de 40 nm y alrededor de 60 nm, tal como entre alrededor de 45 nm y alrededor de 55 nm. El radio hidrodinámico puede ser de aproximadamente 50 nm.

20 [0065] El radio hidrodinámico de los exosomas se puede determinar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, difracción láser o dispersión de luz dinámica.

25 [0066] Los exosomas pueden comprender una o más proteínas o polinucleótidos secretados por una célula madre mesenquimatosa. Los exosomas pueden comprender una o más proteínas o polinucleótidos presentes en el medio acondicionado de células madre mesenquimales (MSC-CM). En una forma de realización particular, los exosomas pueden comprender miARN que se derivan de MSC.

30 [0067] Por ejemplo, los exosomas pueden comprender 10 % o más, 20 % o más, 30 % o más, 40 % o más, 50 % o más, 60 % o más o 70 % o más de estas proteínas y/o polinucleótidos. Los exosomas pueden comprender sustancialmente alrededor del 75% de estas proteínas y/o polinucleótidos. Las proteínas pueden definirse por referencia a una lista de proteínas o productos génicos de una lista de genes.

35 [0068] Los sujetos que pueden tratarse incluyen sujetos mamíferos, tales como seres humanos, ratones, ratas, monos, perros y gatos.

40 [0069] El término "enfermedad neurológica" se refiere a una enfermedad del cerebro, la columna vertebral y/o los nervios que los conectan. En una forma de realización preferida, la enfermedad es un trastorno del neurodesarrollo como el autismo o la esquizofrenia.

45 [0070] Según otra forma de realización, la enfermedad es una enfermedad del comportamiento tal como esquizofrenia, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, autismo, trastorno obsesivo compulsivo.

50 [0071] En otra forma de realización, la enfermedad neurológica no es un accidente cerebrovascular.

[0072] Según una forma de realización particular, la enfermedad neurológica es un trastorno del espectro autista (TEA).

55 [0073] Como se mencionó, los exosomas de las formas de realización de esta invención se pueden usar para preparar un medicamento (denominado indistintamente como composición farmacéutica), mediante el cual dicho medicamento se formula para tratar enfermedades neurológicas.

[0074] Los exosomas de la presente invención se pueden administrar al individuo tratado usando una variedad de enfoques de trasplante, cuya naturaleza depende del sitio de implantación.

50 [0075] El término o frase "trasplante", "reemplazo de células" o inyección de "injerto" se usan indistintamente en este documento y se refieren a la introducción de los exosomas de la presente invención en el tejido diana, como el cerebro, la materia gris, etc. Las células madre mesenquimales de donde se obtienen los exosomas pueden derivar del receptor (alogénico) o de un donante no alogénico o xenogénico.

55 [0076] [0077] Los exosomas se pueden trasplantar directamente en la médula espinal (por vía intratecal), por vía intravenosa, directamente en el cerebro o combinaciones de los mismos de manera que llegue al cerebro. En una forma de realización, los exosomas se administran de forma no invasiva, por ejemplo, por vía intranasal. También se contemplan otros modos de administración, como la administración sistémica.

60 [0078] Una dosis ejemplar de exosomas que puede administrarse (por ejemplo, por vía intranasal) por tratamiento puede estar entre 1×10^6 - 1×10^{20} y más preferiblemente entre 1×10^9 - 1×10^{15} para un ser humano de 70 kg.

65 [0079] En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las partículas se pueden administrar *per se* o, preferiblemente, como parte de una composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 [0080] Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de las partículas descritas en el presente documento, con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes farmacéuticamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de las partículas a un sujeto.

10 [0081] De aquí en adelante, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa a un sujeto y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Ejemplos, sin limitaciones, de vehículos son propilenglicol; salina; emulsiones; tampones; medio de cultivo como DMEM o RPMI; medio de almacenamiento hipotérmico que contiene componentes que eliminan los radicales libres, proporcionan amortiguación del pH, soporte oncolítico/osmótico, sustratos de energía y concentraciones iónicas que equilibran el estado intracelular a bajas temperaturas; y mezclas de disolventes orgánicos con agua.

15 [0082] Normalmente, el vehículo farmacéutico conserva el número de exosomas (por ejemplo, no se reduce en más del 90 %) en la composición durante al menos 24 horas, al menos 48 horas o incluso al menos 96 horas.

20 [0083] Aquí, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un compuesto y mantener la viabilidad de las células a una temperatura predeterminada durante un período de tiempo adecuado antes del trasplante/inyección. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen albúmina, plasma, suero y líquido cefalorraquídeo (LCR), antioxidantes como N-acetilcisteína (NAC) o resveratrol.

25 [0084] Según una forma de realización preferida de la presente invención, el vehículo farmacéutico es una solución acuosa de tampón o un medio de cultivo como DMEM.

30 [0085] Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. Preferiblemente, se formula una dosis en un modelo animal para lograr una concentración o título deseado. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos.

35 [0086] La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales de experimentación.

40 [0087] Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse para formular un rango de dosificación para uso en seres humanos. Puede obtenerse más información de los estudios clínicos; consulte, por ejemplo, Salem HK et al., *Stem Cells* 2010; 28:585-96; y Uccelli et al. *Lancet Neurol.* 2011; 10:649-56.

45 [0088] La dosificación puede variar según la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La fórmula exacta, la vía de administración y la dosis pueden ser elegidas por el médico individual en vista de la condición del paciente (ver, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Capítulo 1 p.1).

50 [0089] Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico y agentes adicionales como se describe aquí anteriormente.

55 [0090] La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente a niveles del ingrediente activo que sean suficientes para tratar eficazmente el trastorno neurológico. Las dosis necesarias para lograr el efecto deseado dependerán de las características individuales y la vía de administración.

60 [0091] Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la condición a tratar, la dosificación de exosomas puede ser de una sola o una pluralidad de administraciones, con un curso de tratamiento que dura desde varios días hasta varias semanas o meses dependiendo de cuando se consigue la disminución del estado de la enfermedad.

65 [0092] La cantidad de exosomas a administrar dependerá, por supuesto, del individuo que se esté tratando, la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico que prescribe, etc. La dosis y el momento de la administración dependerán responder a un seguimiento cuidadoso y continuo de la condición cambiante del individuo.

[0093] Después de la administración, los exosomas se pueden rastrear para garantizar que hayan alcanzado el sitio objetivo. Esto se puede llevar a cabo utilizando nanopartículas de oro, por ejemplo; consulte el documento WO 2013186735 A3.

65 [0094] Los exosomas de la presente invención, en al menos algunas formas de realización, se pueden preenvasar en formas de dosificación unitaria en una jeringa lista para usar. La jeringa puede estar etiquetada con el nombre de los exosomas y su fuente. El marcapasos también puede comprender información relacionada con la función de los exosomas. La jeringa se puede envasar en un envase que también esté etiquetado con información sobre los exosomas.

- 5 [0095] Los exosomas de la presente invención se pueden coadministrar con agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de trastornos neurológicos, tales como gangliosidos; antibióticos, neurotransmisores, neurohormonas, toxinas, moléculas promotoras de neuritas; y antimetabolitos agentes de molécula pequeña y precursores de moléculas neurotransmisoras como L-DOPA. Además, o como alternativa, los exosomas de la presente invención pueden administrarse conjuntamente con otras células capaces de aliviar al menos un síntoma de la enfermedad neurológica.
- 10 [0096] Como se usa en el presente documento, el término "alrededor de" se refiere al $\pm 10\%$.
- 15 [0097] Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero no se limita a".
- 20 [0098] El término "que consta de" significa "que incluye y se limita a".
- 25 [0099] El término "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir ingredientes, pasos y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, pasos y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, el método o la estructura reivindicados.
- 30 [0100] Como se usa en el presente documento, la forma singular "un", "una", "el" y "ella" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluidas sus mezclas.
- 35 [0101] Cuando se indique un intervalo numérico en este documento, incluirá cualquier número citado (fraccionario o integral) dentro del intervalo indicado. Las frases "rango/intervalo entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "rango/intervalo desde" un primer número indicado "hasta" un segundo número indicado se usan aquí de manera intercambiable y pretenden incluir el primer y segundo número indicado y todos los números fraccionarios e integrales entre ellos.
- 40 [0102] Tal como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a formas, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea determinada, incluidos, entre otros, aquellos modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de formas conocidas, medios, técnicas y procedimientos por practicantes de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.
- 45 [0103] Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.
- 50 [0104] Varias formas de realización y aspectos de la presente invención, tal como se delinearon anteriormente y como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.
- 55 **EJEMPLOS**
- 60 [0105] Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas formas de realización de la invención de manera no limitativa.
- 65 [0106] En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican detalladamente en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, RM, ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se establece en la patente de EE. UU. números 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, JE, ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, NY (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan JE, ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8^a edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); Los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la literatura científica y de patentes, véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. números 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia como si se establecieran

completamente en este documento. Se cree que los procedimientos allí descritos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

EJEMPLO 1

5

Exosomas derivados de MSC para tratar el autismo

MATERIALES Y MÉTODOS

10 **[0107] Preparación de células madre mesenquimales (MSC):** se adquirieron MSC humanas de Lonza (Basilea, Suiza). Las células se cultivaron y expandieron como se describió anteriormente (Sadan et al., 2012).

Protocolo de purificación:

15 **[0108]** Los exosomas se purificaron tomando el fluido de cultivo y centrifugando durante 10 minutos a 300 g. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó durante 10 minutos a 2000g. Una vez más, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó durante 30 minutos a 10000 g. Se tomó el sobrenadante, se pasó por un filtro de 0,22 um y se centrifugó durante 70 minutos a 100000 g. El sedimento, que contenía los exosomas y las proteínas, se lavó en PBS y luego se centrifugó durante 70 minutos a 100000 g. El sedimento, que contenía los exosomas purificados, se resuspendió en 200 ul de PBS esterilizado. Cada centrifugación se produjo a 4 grados Celsius.

$$\text{Número de partículas administradas por ratón} = 8,5 \times 10^9 \text{ partículas/ul}$$

25 **[0109] Protocolo de tinción:** la solución madre se creó mezclando 2 ul de pKH 26 en 500 ul de diluyente. Del stock, se añadieron 100 ul a 50 ul de exosomas en PBS. Después de 5 minutos, se añadieron 100 ul de plaquetas libres de exosomas a la mezcla anterior y luego se centrifugó durante 90 minutos a 100 ga 4 grados centígrados. El sedimento se resuspendió en 200 ul de PBS. Se tomaron imágenes de fluorescencia de todo el cerebro con Maestro CRI, filtro de excitación 523 y filtro de emisión 560.

30 **[0110] Animales:** Se criaron ratones BTBR T1tf/J a partir de parejas adultas compradas originalmente en Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). A las 5 semanas de edad, la primera cohorte de ratones machos compañeros de camada se asignó aleatoriamente a la administración intranasal de solución salina (solución salina, n=7) o a la administración intranasal de MSC-exo (MSC-exo, n=7). A las 5 semanas de edad, la primera cohorte de ratones hembra compañeros de camada se asignó aleatoriamente a la administración intranasal de solución salina (solución salina, n=9) o a la administración intranasal de MSC-exo (MSC-exo, n=6).

35 **[0111]** Se criaron ratones C57bl/6 a partir de parejas adultas compradas originalmente en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). A las 5 semanas de edad, la primera cohorte de ratones machos compañeros de camada recibió solución salina por administración intranasal (Solución salina, n=7) y sin solución salina (Ninguno, n=11).

40 **[0112]** Los ratones se alojaron en grupos de 3-5 compañeros de camada por jaula. Los ratones se probaron inicialmente en cuanto a los comportamientos de referencia 5-7 semanas antes de la administración de los exosomas, que se produjo a las 7-9 semanas. (Se administraron 5 ul de exosomas o solución salina en días alternos durante 14 días, para un total de 35 ul).

45 **[0113]** Tres semanas después de administrar los exosomas, se colocaron 6 hembras vírgenes BTBR-MSC-exo con una hembra embarazada con solución salina BTBR para conductas de aprendizaje maternal. Cinco hembras vírgenes con solución salina BTBR se colocaron con una hembra embarazada con solución salina C57 para conductas de aprendizaje maternal.

50 **[0114] Campo abierto:** Los ratones se colocaron en un 45 X 45 X 45 cm durante un total de 20 minutos. Se utilizó Ethovision v10.11 para medir la distancia total recorrida y la cantidad de tiempo pasado en el centro.

55 **[0115] Vocalizaciones ultrasónicas:** Las vocalizaciones ultrasónicas de macho a hembra se probaron utilizando el programa de grabación Avisoft-RECODER v. 4.2.21. La configuración incluía una frecuencia de muestreo de 250 kHz y un formato de 16 bits. Para la generación de espectrogramas, las grabaciones se transfirieron a Avisoft-SASLab Pro Versión 5.2.07 y se realizó una transformación rápida de Fourier (FFT). Los espectrogramas se generaron con una longitud FFT de 256 puntos y una superposición de ventana de tiempo del 50% (100% Frame, ventana FlatTop). Ambos machos BTBR T1tf/J y C57bl/6 se encontraron con hembras C57bl/6. Cada macho se colocó en una jaula separada durante 1 hora, luego se colocó una hembra en la jaula. Las vocalizaciones ultrasónicas se registraron durante los primeros cinco minutos del encuentro y se filmaron para el análisis de la interacción social entre hombres y mujeres.

65 **[0116] Prueba de interacción social diádica recíproca:** La prueba de interacción social diádica recíproca (Silverman et al., 2012) se llevó a cabo usando un ratón extraño C57BL/6 macho de 5 semanas de edad como estímulo social. El ratón

extraño se colocó en una jaula de 40 x 40 x 20 cm con el ratón de prueba. Ambos ratones se registraron durante 20 minutos; los últimos 10 min fueron cuantificados por un observador ciego al tratamiento. Ambos ratones fueron aislados durante 1 hora antes de la prueba. Se utilizó el software Cowlog V3 para puntuar el contacto social iniciado por el ratón de prueba (Universidad de Helsinki, Helsinki, Finlandia). La puntuación se determinó por la duración de la participación de los ratones en los comportamientos sociales del ratón extraño. Se cuantificaron los siguientes comportamientos sociales: olfatear nariz con nariz (es decir, acercarse al frente del extraño), olfatear nariz con genitales (es decir, acercarse a la parte posterior del extraño), atacar (es decir, el ratón de prueba inicia una pelea con el extraño ratón) y evitar (es decir, cuando el ratón de prueba evita deliberadamente la interacción cuando el ratón desconocido la inicia). Durante las interacciones sociales, también se observó y cuantificó el tiempo dedicado a comportamientos repetitivos, a saber, arreglarse y cavar.

5 [0117] **Comportamientos repetitivos no durante la interacción social:** Los ratones fueron colocados solos en una arena con dimensiones de 40 X 40 X 20 cm durante 20 min; los últimos 10 minutos se cuantificaron para acicalar y cavar. Mientras se observaba el comportamiento de acicalamiento, los ratones se colocaron en una jaula limpia que no contenía 10 virutas de madera para evitar que cavaran. Mientras se observaba el comportamiento de excavación, no se midió el aseo personal.

15 [0118] **Aprendizaje del comportamiento materno:** Se ensayó la latencia de cuatro madres C57BL/6J y 3 madres BTBR para recoger crías y traerlas de vuelta al nido. Cada madre se probó con 3 crías. Si la madre no devolvía a las crías al nido 20 180 segundos después de colocarlas fuera del nido, se consideraba un fracaso. Cada una de las madres compartió una jaula con tres hembras vírgenes (vírgenes de aprendizaje) durante un par de días. Las vírgenes con solución salina BTBR y C57 pasaron tiempo con la madre C57BL/6J y sus crías, y las hembras BTBR MSC-exo lo pasaron con la hembra BTBR y sus crías. También se probó un grupo de vírgenes ingenuas, que nunca antes habían estado expuestas a cachorros 25 (vírgenes ingenuas BTBR, vírgenes ingenuas C57BL/6J). Durante la prueba, se sacaron todas las hembras de la jaula y, al final de cada prueba, se devolvieron los ratones. a su jaula de casa y se les dio 15 minutos de reaclimatización. Cada cachorro tenía entre 2 y 4 días de edad en el momento de la prueba. Las pruebas fueron filmadas con una cámara SAMSUNG de 11mp.

30 [0119] **Ensayo de laberinto en T de agua:** El laberinto en T de agua (Guariglia y Chadman, 2013; Karvat y Kimchi, 2013) era una cámara de plexiglás en forma de T con tres brazos de tamaño 22 X 3 X 11 cm y una zona central de tamaño 11 X 3 X 11 cm. El laberinto se llenó con agua a 15 cm de profundidad, se mantuvo a 25 ± 1°C. Se sumergió una plataforma con una longitud de lado de 3 cm de modo que la parte superior estuviera 0,5 cm por debajo del nivel del agua. Cada animal tuvo 10 ensayos cada día de los tres días del experimento, para un total de 30 ensayos. Los animales se colocaron en el brazo de salida de cara a la zona central y se les dio 90 segundos para encontrar la plataforma. Cuando el animal 35 subió a la plataforma, se le permitió permanecer en ella durante 5 segundos. Si un ratón no encontraba la plataforma en 90 segundos, se lo guiaba suavemente hasta la plataforma y se le permitía permanecer en ella durante 15 segundos. El intervalo entre ensayos fue >5 min. En el primer y segundo día, la plataforma se ubicó en el brazo derecho, mientras que en el tercer día se ubicó en el brazo opuesto, izquierdo; el brazo de salida fue idéntico cada día. A un ratón no se le permitió comenzar las pruebas de inversión hasta que tuvo éxito en 8/10 pruebas, lo que resultó en que algunos ratones 40 tuvieran un día adicional de aprendizaje y hasta un total de 40 pruebas. La cantidad de tiempo necesario para llegar a la plataforma, la cantidad de errores y la tendencia a girar en la dirección correcta o incorrecta se midieron desde el momento en que el ratón entró en el agua hasta que se paró en la plataforma.

RESULTADOS

45 [0120] **Alta eficacia de la administración intranasal de exosomas de MSC:** Se realizaron comparaciones entre la administración intravenosa, intranasal y estereotáctica de exosomas teñidos con PKH26. Se utilizó un cálculo de fluorescencia celular total corregida (CTCF) para estimar la eficiencia de las diferentes estrategias de administración (McCloy et al., 2014). La cuantificación de la fluorescencia en relación con la inyección estereotáctica mostró que el 68,5 % de los exosomas administrados por vía intranasal se encontraron en el cerebro, mientras que se encontraron el 11,2 % de los exosomas intravenosos (Figura 1). Las inmunotinciones DAPI y NeuN mostraron que los exosomas se encontraron en las células y en sus membranas (Figuras 2A-B).

55 [0121] **Exosomas de MSC mejoraron las vocalizaciones ultrasónicas de macho a hembra:** Las vocalizaciones ultrasónicas se consideran una forma de comunicación de apareamiento entre ratones macho y hembra. Los déficits de comunicación son un síntoma central en el autismo, por lo que se evaluó el efecto del tratamiento sobre este tipo de comportamiento. Los ratones con solución salina BTBR emitieron 317 sílabas en los primeros 5 minutos de interacción con la hembra (SEM = 39,4), mientras que los ratones BTBR MSC-exo emitieron 571 sílabas durante el mismo tiempo, lo que representa un aumento del 180 % (SEM = 74), mientras que los ratones C57BL/6J (control) emitieron 854,5 sílabas en los primeros 5 minutos (SEM = 65,2). (FIG. 3A, ANOVA1, F = 19,2 P < 0,001). No hubo una diferencia significativa en el tiempo dedicado a olfatear los genitales o la cara de la hembra, lo que significa que el efecto parecía impactar específicamente en las vocalizaciones ultrasónicas y no en el interés por las feromonas de la hembra (FIG. 3B). Cualitativamente, se puede ver a partir de los espectrogramas que las vocalizaciones BTBR MSC-exo se volvieron más complejas y largas en comparación con el grupo salino BTBR, haciéndolas más similares a C57BL/6J (FIG. 3C).

65 [0122] **Exosomas de MSC mejoran la interacción social de macho a macho y los comportamientos repetitivos**

- durante la interacción social:** Se ensayó la interacción de macho a macho en ratones antes y después de la administración de MSC-exo o solución salina. El análisis intrasujeto muestra que el grupo BTBR MSC-exo mejoró significativamente después del tratamiento y pasó más tiempo en contacto social con hombres extraños, mientras que los grupos de solución salina BTBR y solución salina C57bl no se vieron afectados (FIG. 4A, prueba t pareada. $t<0,0001$). El análisis de comparación de grupos muestra que antes del tratamiento no hay diferencia entre los comportamientos basales de solución salina de BTBR MSC-exo y BTBR, y ambos difieren significativamente del comportamiento basal de solución salina de c57bl (ANOVA1, $F=14,4$, $p<0,01$). Después del tratamiento, BTBR MSC-exo es significativamente diferente del grupo de solución salina BTBR (ANOVA1, $F=9,44$, $p<0,01$).
- 5
- 10 **[0123]** También se midieron los comportamientos repetitivos durante la interacción social. El análisis intrasujeto muestra que el grupo BTBR MSC-exo mejoró significativamente después del tratamiento y pasó menos tiempo en comportamientos repetitivos, mientras que los grupos de solución salina BTBR y solución salina C57bl no se vieron afectados (FIG. 4B, prueba t pareada. $t<0,001$). El análisis de comparación de grupos muestra que antes del tratamiento no hay diferencia entre los comportamientos basales de solución salina de BTBR MSC-exo y BTBR, y ambos difieren significativamente del comportamiento basal de solución salina de c57bl (ANOVA1, $F=13,71$, $p<0,001$). Después del tratamiento, BTBR MSC-exo no es significativamente diferente del grupo de solución salina BTBR y del grupo C57bl; sin embargo, hay un cambio significativo con respecto al BTBR MSC-exo antes y después del tratamiento.
- 15
- 20 **[0124] Exosomas de MSC disminuyen el aseo personal y la excavación:** el aseo personal y la excavación también se midieron sin interacciones sociales. Se analizó la interacción de macho a macho en los ratones antes y después de la administración de MSC-exo o solución salina. En la prueba de aseo, el análisis intrasujeto mostró que el grupo BTBR MSC-exo mejoró significativamente después del tratamiento y pasó menos tiempo acicalándose, mientras que los grupos de solución salina BTBR y solución salina C57bl no cambiaron (FIG. 4A, prueba t pareada, $t<0,05$). El análisis de comparación de grupos muestra que antes del tratamiento no hay diferencia entre los comportamientos basales de solución salina de BTBR MSC-exo y BTBR, y ambos difieren significativamente del comportamiento basal de solución salina de c57bl (ANOVA1, $F=12,4$, $p<0,05$). Después del tratamiento, BTBR MSC-exo es significativamente diferente del grupo de solución salina BTBR (ANOVA1, $F=13,83$, $p<0,01$).
- 25
- 30 **[0125] Exosomas de MSC mejoran la rigidez cognitiva en el laberinto en T de agua:** se usó el ensayo del laberinto en T de agua para analizar los comportamientos de aprendizaje y la rigidez cognitiva. Debido a las diferentes capacidades de natación entre los ratones c57bl y BTBR, su comportamiento en la prueba no fue comparable y, por lo tanto, se excluyeron los ratones c57bl. En total, los ratones tratados con BTBR MSC-exo cometieron significativamente menos errores en el aprendizaje inverso en los 10 ensayos (FIG. 6A). El análisis de la tasa de éxito en cada prueba de las condiciones de reversión muestra que, a partir de la prueba 4, los ratones tratados con MSC-exo tuvieron tasas de éxito más altas que el grupo de solución salina para girar correctamente (FIG. 6B).
- 35
- 40 **[0126] MSC-exo mejora el aprendizaje del comportamiento materno:** Todas las madres C57bl recogieron todas las crías (12/12) en el nido en un tiempo medio de 9,9 segundos (SEM = 1,08). Ninguna de las vírgenes ingenuas de C57bl recogió ninguno de los cachorros en 180 segundos. El grupo de vírgenes de aprendizaje C57bl recolectó todos los cachorros en un tiempo promedio de 38,3 segundos (SEM = 11,9). Solo una de las tres madres BTBR analizadas recogió a los cachorros, sin embargo, después de 150 segundos, no los trajo de regreso al nido, sino que los colocó en lugares aleatorios; su comportamiento era desorganizado en comparación con las madres C57bl y las vírgenes aprendices. Ninguna de las vírgenes ingenuas de BTBR recolectó ninguno de los cachorros en 180 segundos. Ninguna de las vírgenes de aprendizaje de BTBR recolectó ninguno de los cachorros, incluso después de pasar días con una madre C57bl. BTBR MSC-EXO recolectó todos los cachorros en un tiempo promedio de 55,7 segundos (SEM = 12,8), curiosamente, BTBR MSC-exo pasó días con una madre BTBR que era incapaz de recuperar cachorros por sí misma.
- 45
- 50 **EJEMPLO 2**
- 55 **Exosomas derivados de MSC para tratar la esquizofrenia**
- MATERIALES Y MÉTODOS**
- 60 **[0127] Sensibilidad a la actividad hiperlocomotora inducida por anfetamina:** El experimento se llevó a cabo en varias fases. En la primera fase, 30 ratones C54/bl se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos; un grupo tratado con solución salina, un grupo tratado con PCP y un grupo tratado con PCP + exosoma (el grupo de tratamiento). Los grupos de PCP recibieron inyecciones subcutáneas diarias de 10 mg/kg de PCP durante un período de 14 días. Al mismo tiempo, el grupo de solución salina recibió un volumen equivalente de inyecciones de solución salina y el grupo de exosomas recibió inyecciones de PCP, así como 2 μ l de exosomas por administración intranasal. Los otros grupos recibieron 2 μ l de solución salina con la misma técnica. Una semana después del final de las inyecciones, los ratones se sometieron a pruebas de comportamiento.
- 65 **[0128]** Todos los grupos se sometieron a inyección sistémica de anfetamina y se controlaron en la prueba de campo abierto durante 120 minutos y se midió el índice de actividad, promediado cada 5 minutos.
- 65 **[0129] Inhibición latente.** El efecto de los exosomas en el procesamiento central de la información en ratones tratados

con PCP se analizó evaluando el reflejo de sobresalto acústico. Se asignaron tres ratones de cada grupo al grupo no preexpuesto (NPE) y siete ratones al grupo de preexposición (PE). A los ratones PE se les presentaron 50 presentaciones de un estímulo de tono de 30 s (el estímulo condicionado - CS), mientras que los sujetos no preexpuestos (NPE) se confinaron en la cámara durante un período de tiempo equivalente sin ninguna presentación de estímulo. Inmediatamente 5 después, tanto los grupos de PE como los de NPE se sometieron a un acondicionamiento, compuesto por tres emparejamientos entre CS y un estímulo no condicionado (US): un estímulo de tono seguido inmediatamente por la aplicación de una descarga de pie de 1 segundo a 0,3 mA. Después de 24 horas se llevó a cabo la fase de prueba. Después de un período inicial de aclimatación de 360 s, se entregó el tono CS y se continuó durante 90 s, en los que se 10 evaluó el tiempo de congelación condicionada al estímulo del tono.

10 **[0130] Interacción social en la interacción social de 3 cámaras:** Se trataron 3 grupos de ratones de la siguiente manera:

- 15 1. grupo salino (n=19),
 2. grupo PCP (n=17),
 3. PCP + exosomas (n=18)

RESULTADOS

20 **[0131] Sensibilidad a la actividad hiperlocomotora inducida por anfetamina:** después de la inyección de anfetamina, la actividad locomotora de todos los ratones tratados con anfetamina aumentó y alcanzó su punto máximo aproximadamente 40 minutos después de la inyección. A lo largo de todo el período de medición, el efecto potenciador de la anfetamina sistémica fue significativamente más pronunciado en los sujetos tratados con PCP.

25 **[0132]** Como se ilustra en las Figuras 8A-B y 10, los ratones tratados con PCP (sin tratamiento con exosomas) fueron más activos y se movieron una mayor distancia que el grupo de control negativo tratado con solución salina y también fueron más activos que el grupo tratado con exosomas. Esto es más evidente después de 40 minutos, después del pico de actividad inspirado por la anfetamina.

30 **[0133] Inhibición latente:** no se encontraron diferencias entre los sujetos durante la fase de prueba (resultados no mostrados). Durante el acondicionamiento, tanto los grupos tratados con solución salina como los tratados con exosomas mostraron una diferencia significativa entre su respuesta de congelación en los grupos de PE y NPE, mientras que el grupo tratado con PCP no mostró un aumento significativo en la congelación de NPE (Figura 9), lo que indica una reducción del efecto LI en ratones tratados con PCP y un efecto positivo del tratamiento con exosomas.

35 **[0134] Sensibilidad a la actividad hiperlocomotora inducida por anfetamina:** La actividad locomotora de todos los ratones tratados con anfetamina aumentó y alcanzó su punto máximo aproximadamente 40 minutos después de la inyección. Durante la mayor parte del período de medición, el efecto potenciador de la anfetamina sistémica fue significativamente más pronunciado en los sujetos tratados con PCP. Como se ilustra en la Figura 10, el grupo tratado con solución salina (grupo 4) que recibió administración intranasal de exosomas no se vio afectado (no hubo una diferencia significativa con el grupo de solución salina (1). Los ratones tratados con PCP (grupo 2) fueron más activos y movieron una mayor distancia que el grupo de control tratado con solución salina (grupo 1) y también más activos que el grupo tratado con exosomas (grupo 3). Esto es más evidente después de 40 minutos, después del pico de actividad inspirado por la anfetamina.

45 **[0135] Interacción social en la interacción social de 3 cámaras:** En el paradigma de 3 cámaras, los ratones tratados con PCP (n=17) mostraron una mayor preferencia por la jaula vacía (es decir, estímulo no social) sobre la jaula habitada por extraños (estímulo social), como lo revela el índice de preferencia. El grupo tratado con solución salina (n=19) mostró una preferencia por la jaula habitada por ratones, mientras que los ratones tratados con exosomas (n=18) mostraron la mayor preferencia por el estímulo social (Figura 11).

50 EJEMPLO 3

Comparación de exosomas de MSC derivadas de médula ósea frente a células madre neuronales en el modelo BTBR de autismo

55 MATERIALES Y MÉTODOS

[0136] Exosomas derivados de NSC: se usó la línea de células madre neurales (CTX0E03) (ReNeuron).

60 **[0137] Grupos de tratamiento:** Los ratones recibieron administración intranasal de MSC-exo (N=5), NSC-exo (N=5) o solución salina (N=7) durante 12 días, 5 μ l al día (2,5 μ L x 2), cada dos días (un total de 30 μ l por ratón).

RESULTADOS

65 **[0138] Como se ilustra en las Figuras 12A-B,** la administración de exosomas derivados de MSC aumentó la interacción social, la reducción de los comportamientos repetitivos y el aumento de la comunicación en comparación con el grupo

tratado con solución salina, mientras que los ratones tratados con exosomas derivados de células madre neuronales (NSC-exo) no presentan la misma diferencia de comportamiento en comparación con el grupo tratado con solución salina (ANOVA1, $F_{2,14} = 4,28$, $p < 0,05$, Bonferroni).

- 5 **[0139]** Aunque la invención se ha descrito junto con formas de realización específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende exosomas derivados de células madre mesenquimales (MSC), para uso en el tratamiento de un trastorno del espectro autista (TEA).
5
2. Una composición farmacéutica que comprende exosomas derivados de células madre mesenquimales (MSC), para uso en el tratamiento del accidente cerebrovascular mediante administración intranasal.
3. Una composición farmacéutica que comprende exosomas derivados de células madre mesenquimales (MSC), para uso en el tratamiento de un trastorno del neurodesarrollo, en el que el trastorno del neurodesarrollo es esquizofrenia.
10
4. Una composición farmacéutica que comprende exosomas derivados de células madre mesenquimales (MSC), para uso en el tratamiento de un trastorno del neurodesarrollo, en el que el trastorno del neurodesarrollo es un trastorno por déficit de atención con hiperactividad.
15
5. Una composición farmacéutica que comprende exosomas derivados de células madre mesenquimales (MSC), para uso en el tratamiento de un trastorno del neurodesarrollo, en el que el trastorno del neurodesarrollo es un trastorno obsesivo compulsivo.
6. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5, en la que la composición se administra por vía intranasal.
20
7. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dichas células madre mesenquimales se derivan de la pulpa dental.
25
8. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dichas células madre mesenquimales se derivan de la médula ósea.
9. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 6, en la que dichas células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo.
30
10. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dichas MSC son MSC humanas.
11. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dichas MSC son alogénicas.
35
12. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dichas MSC no son alogénicas.
40

FIG. 1

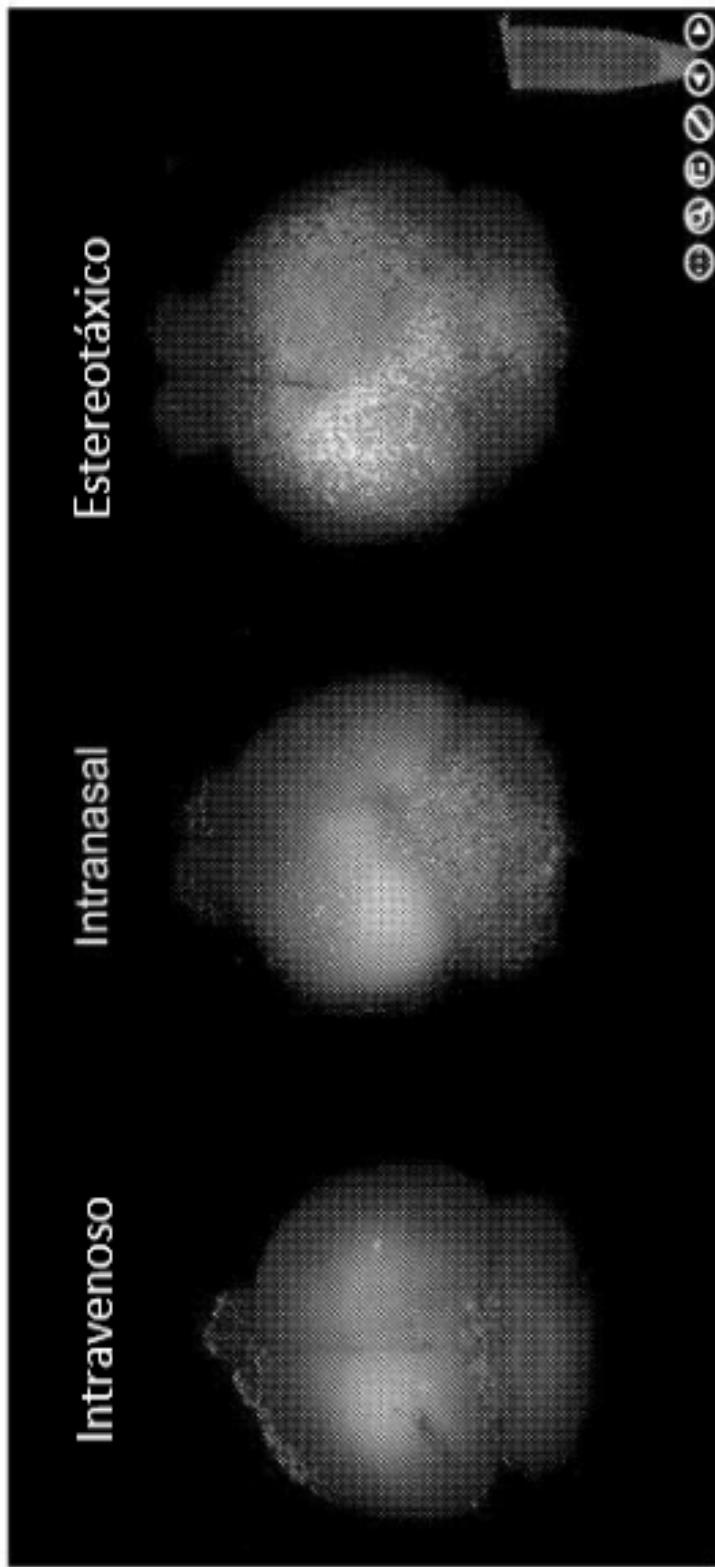


FIG. 2A

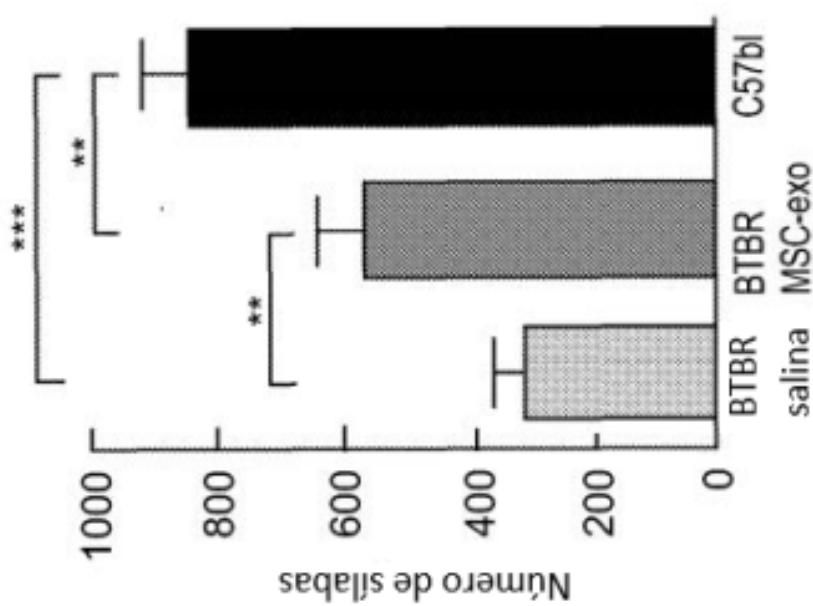
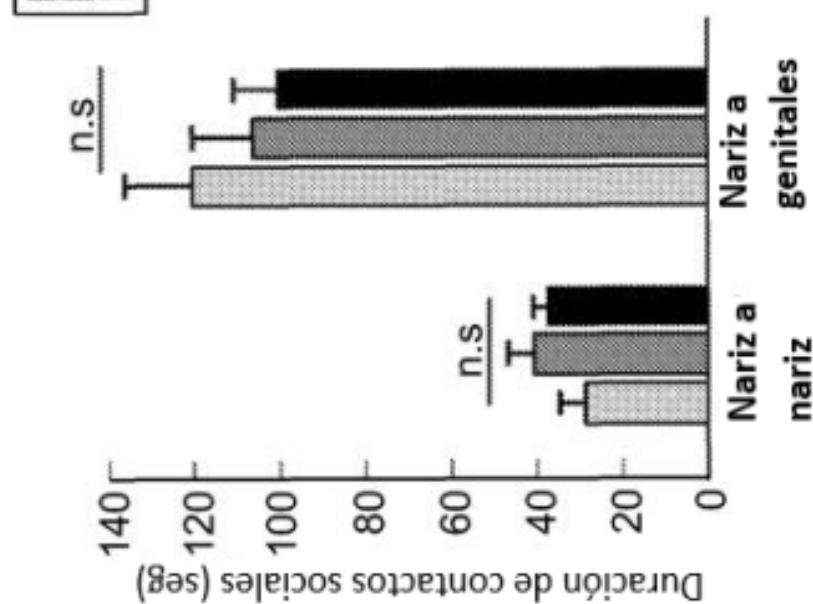


FIG. 2B



Vocalizaciones C57bl



FIG. 3A

Vocalizaciones de BTBR salina

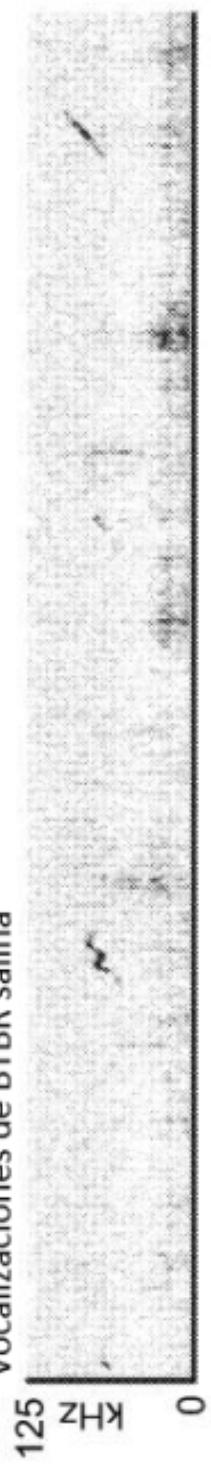


FIG. 3B

Vocalizaciones de BTBR MSC-exo

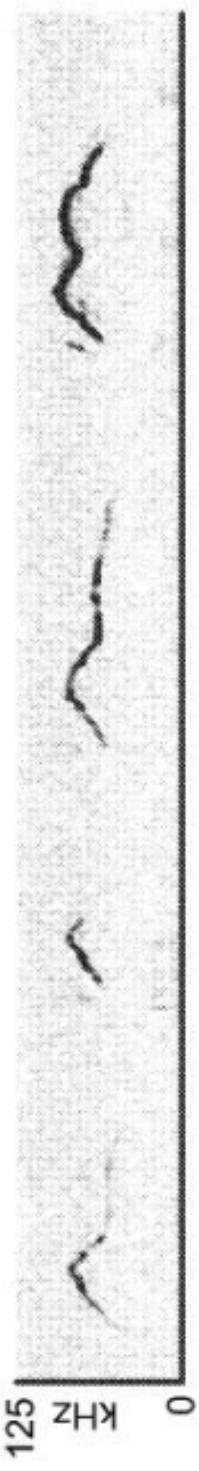


FIG. 3C

FIG. 4A

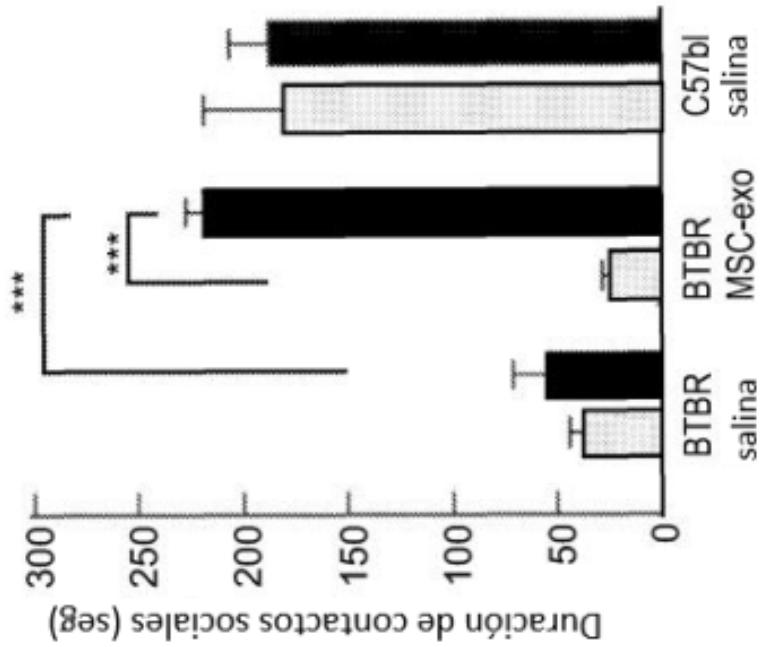


FIG. 4B

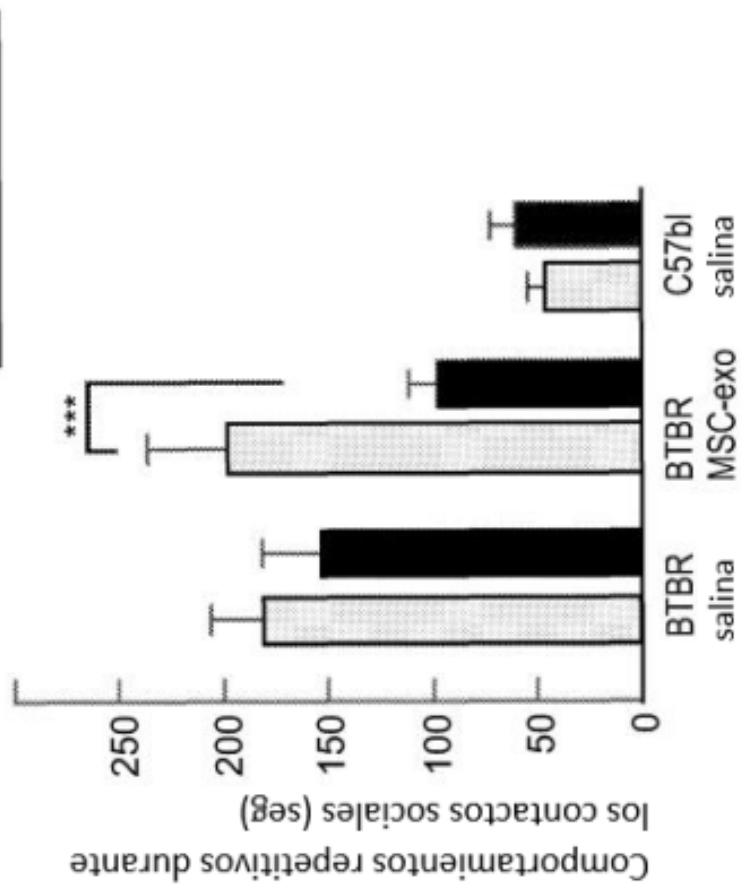


FIG. 5

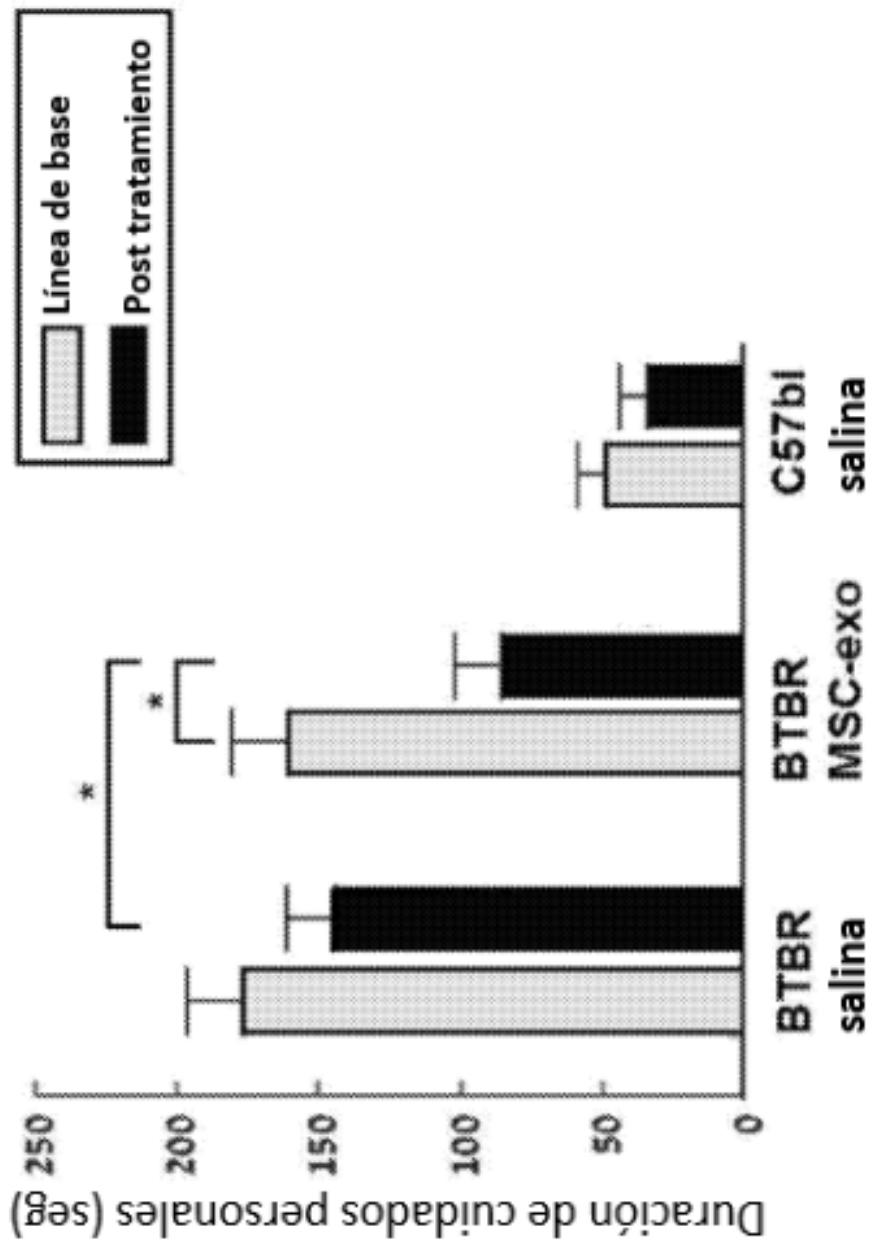


FIG. 6A

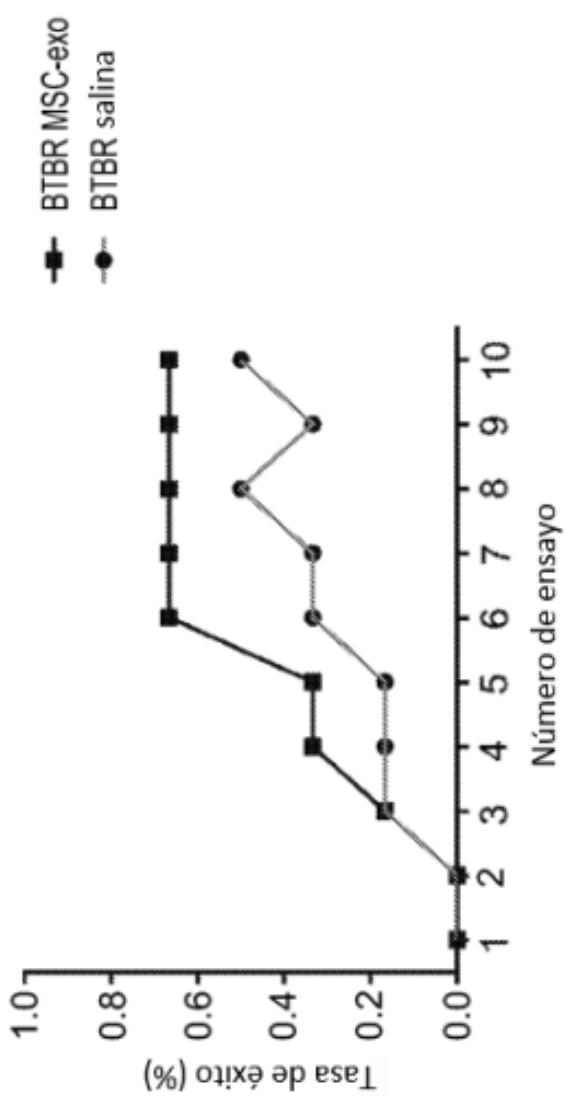


FIG. 6B

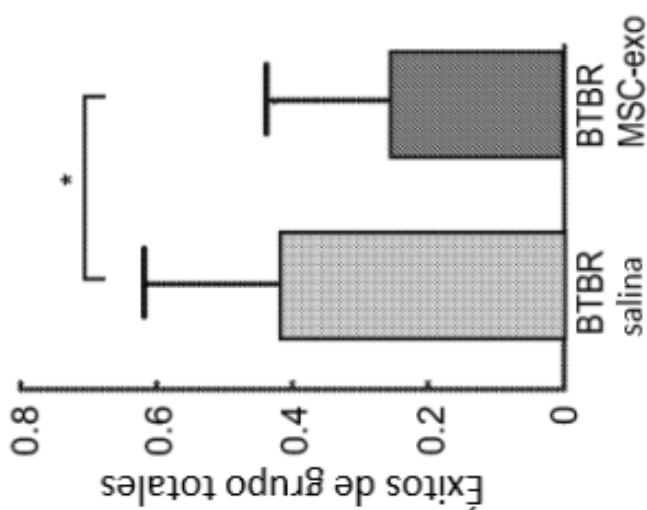


FIG. 7

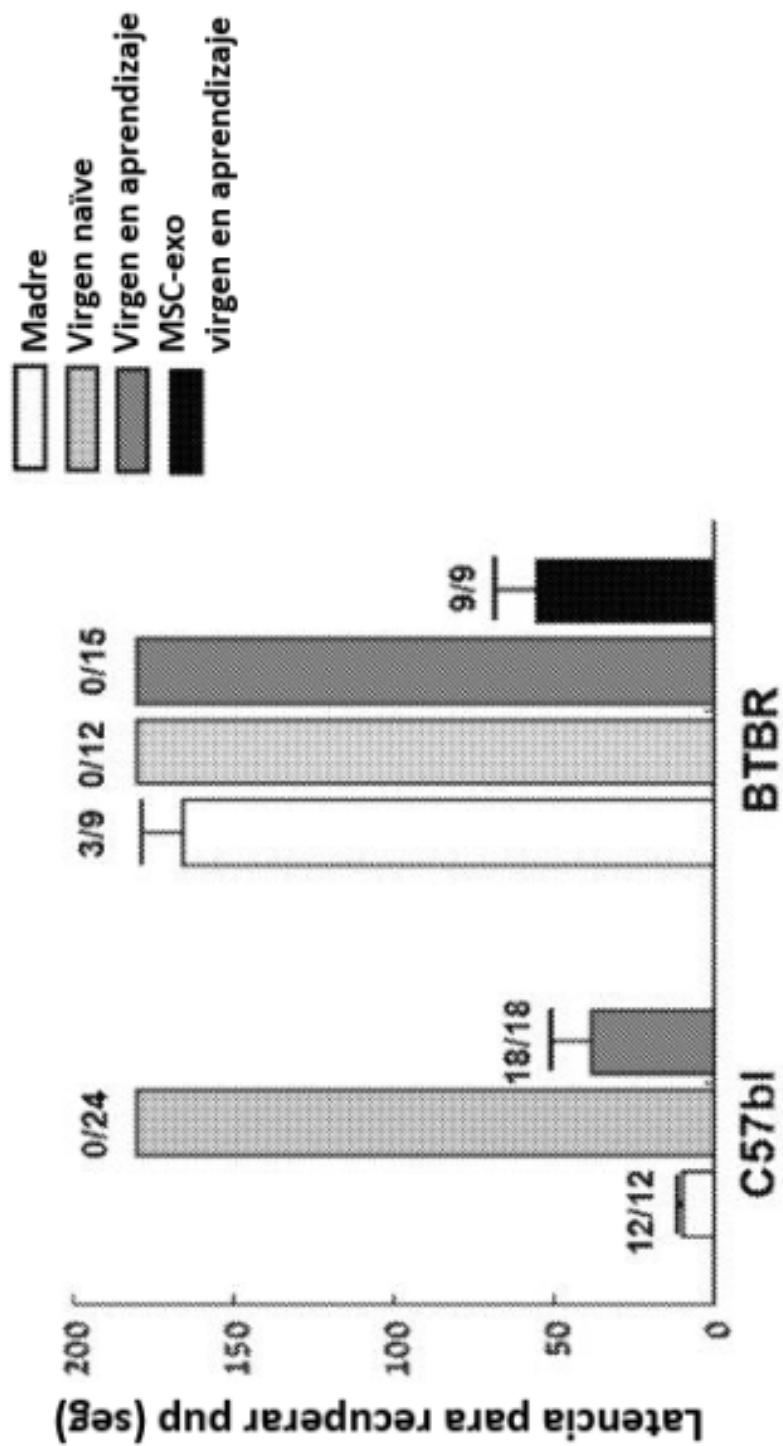


FIG. 8A

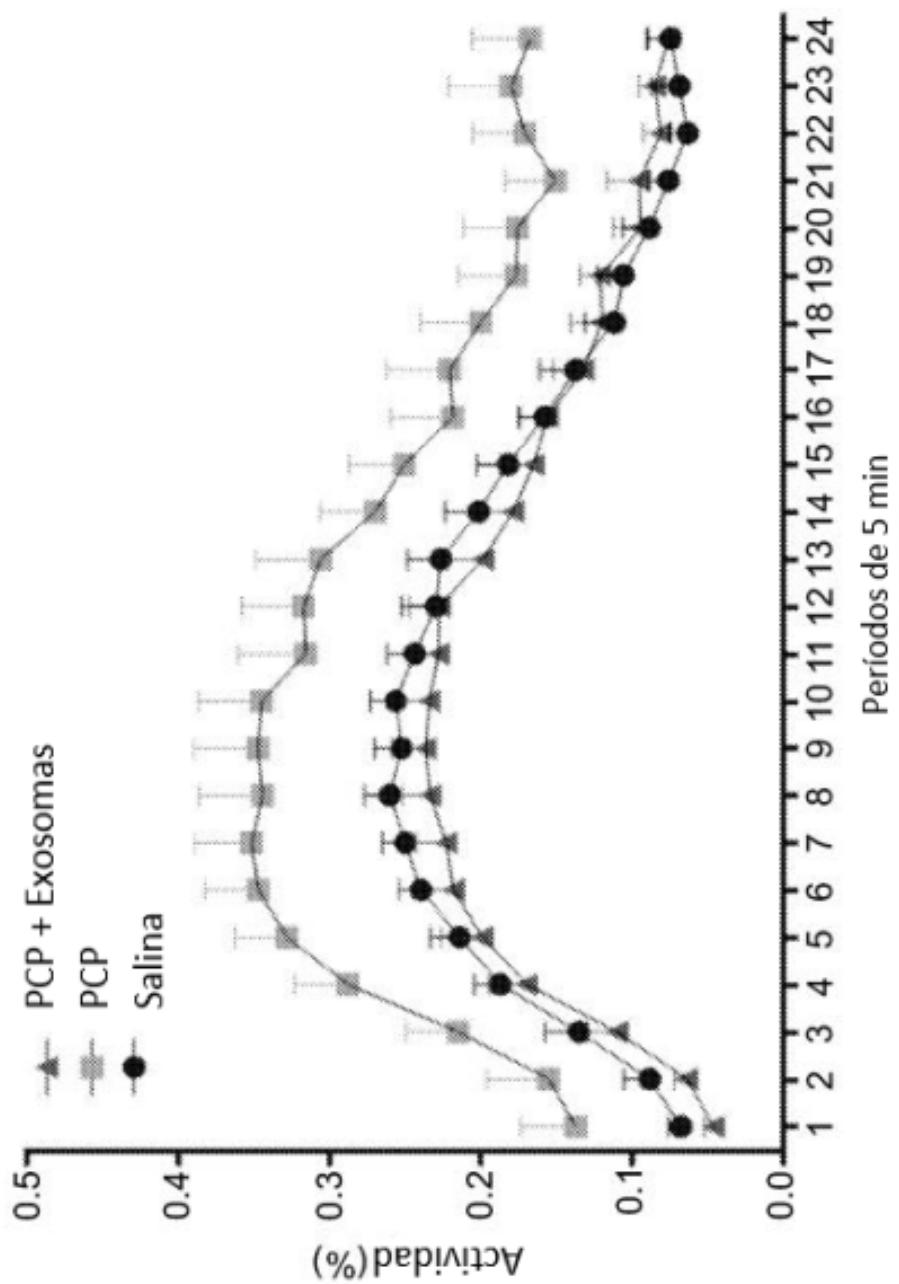


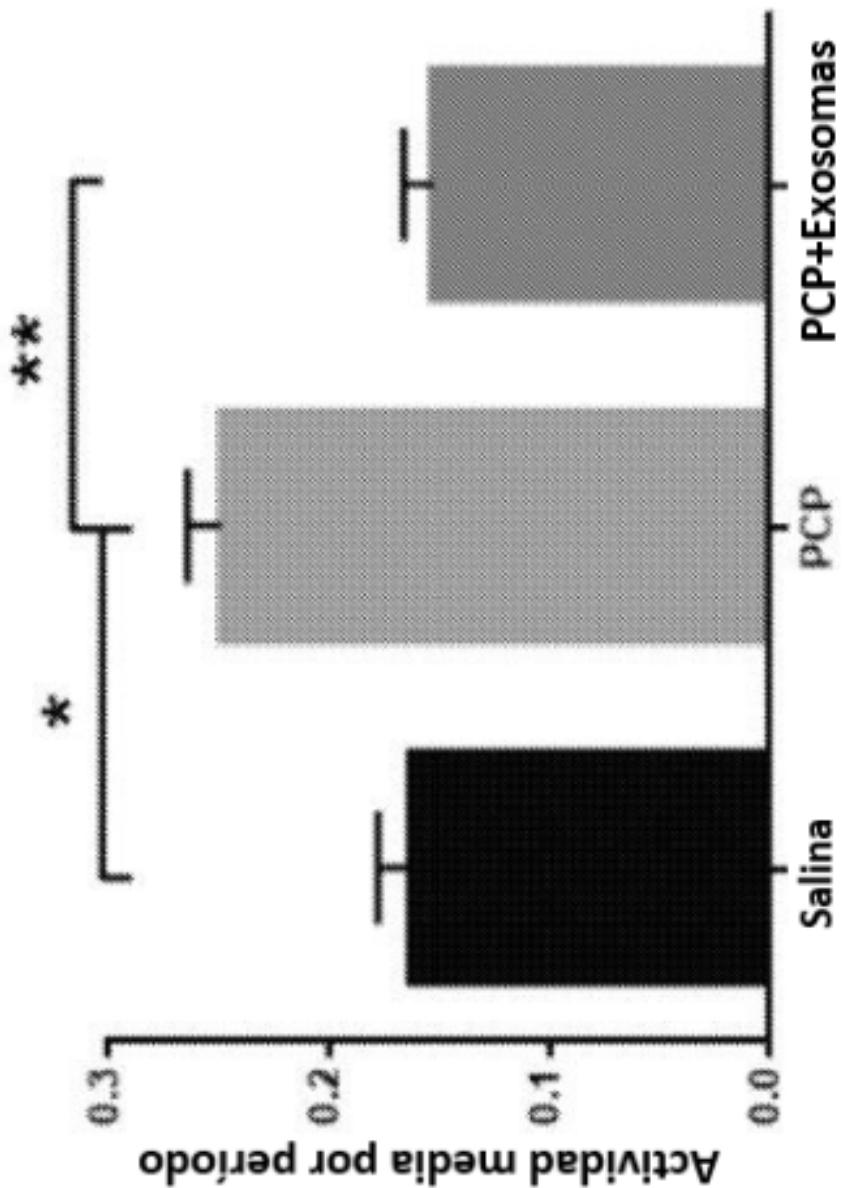
FIG. 8B

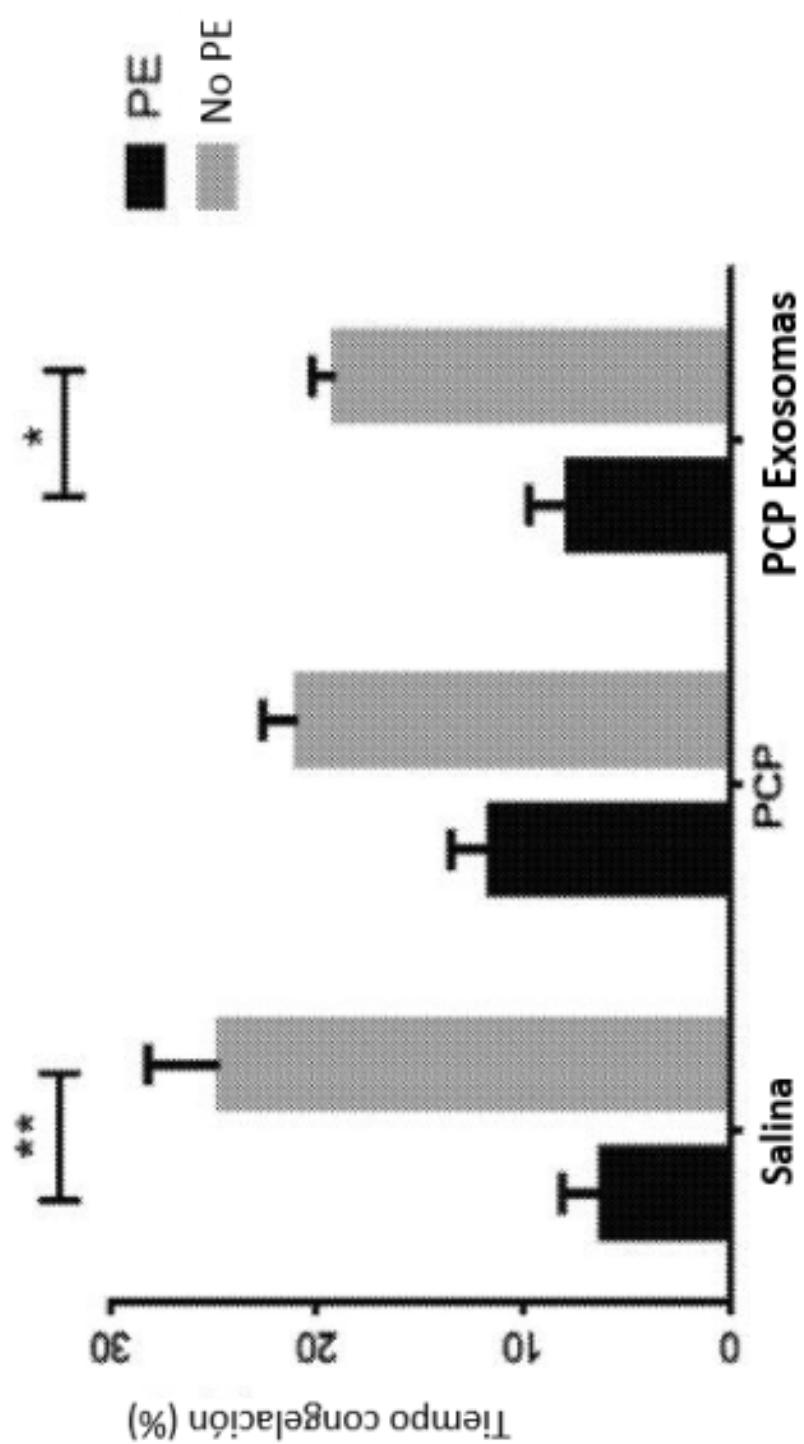
FIG. 9

FIG. 10

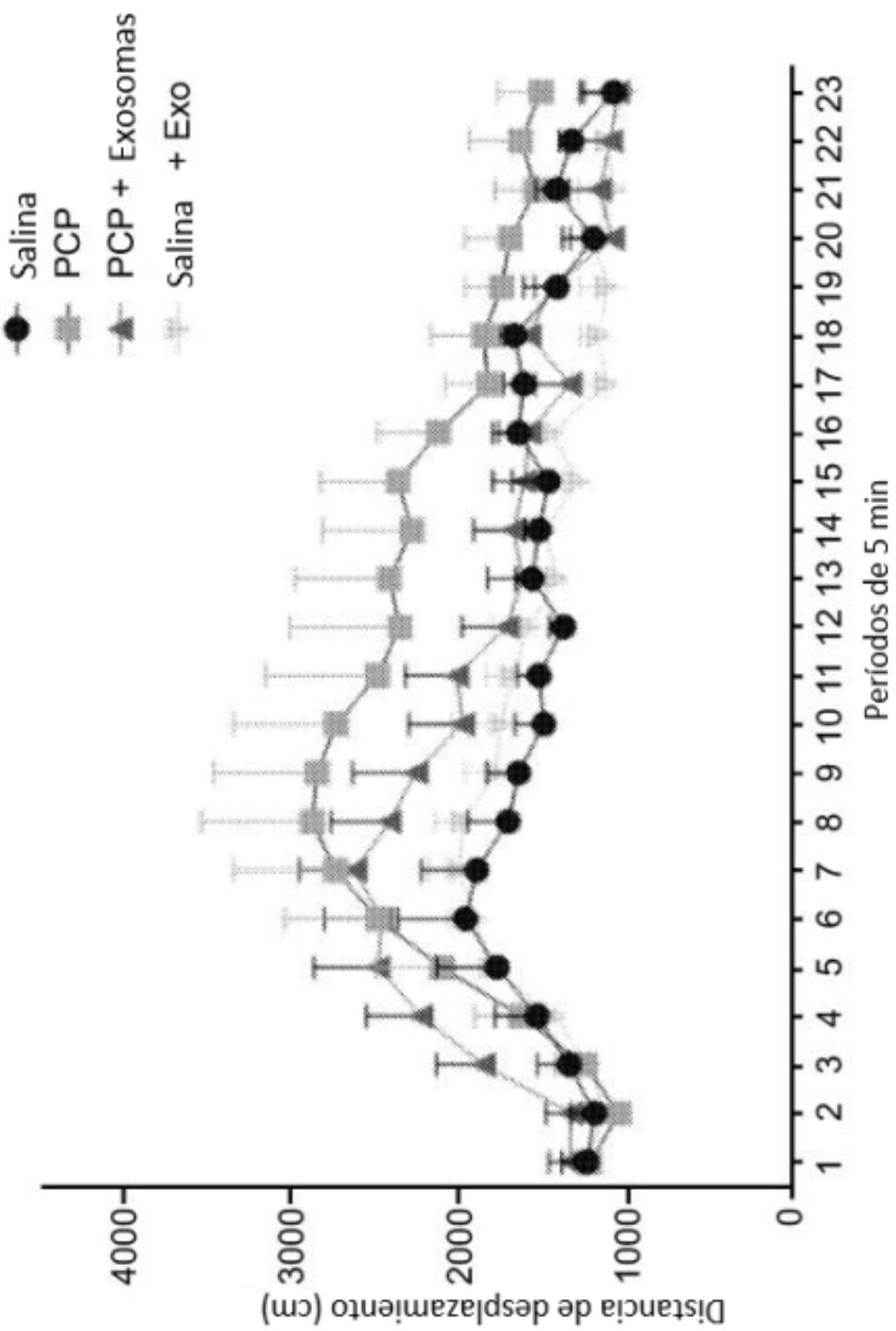


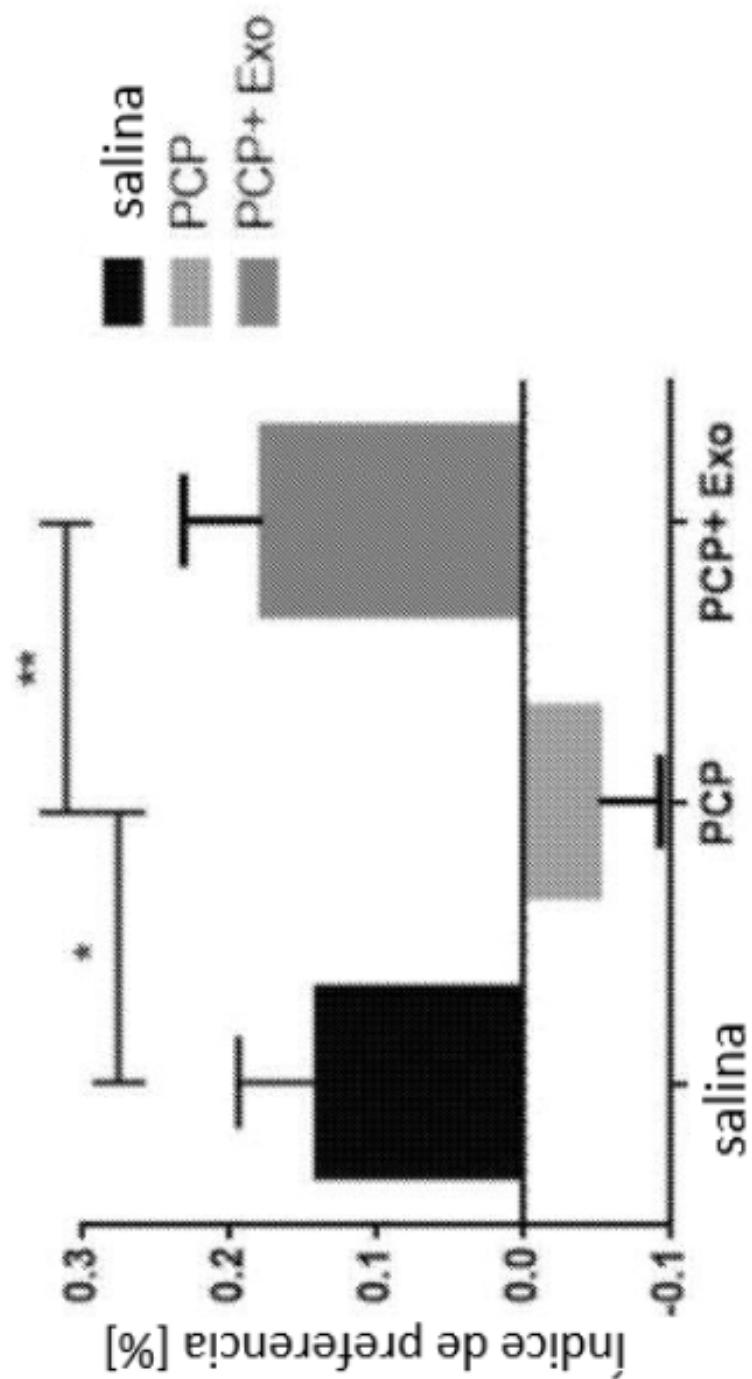
FIG. 11

FIG. 12A

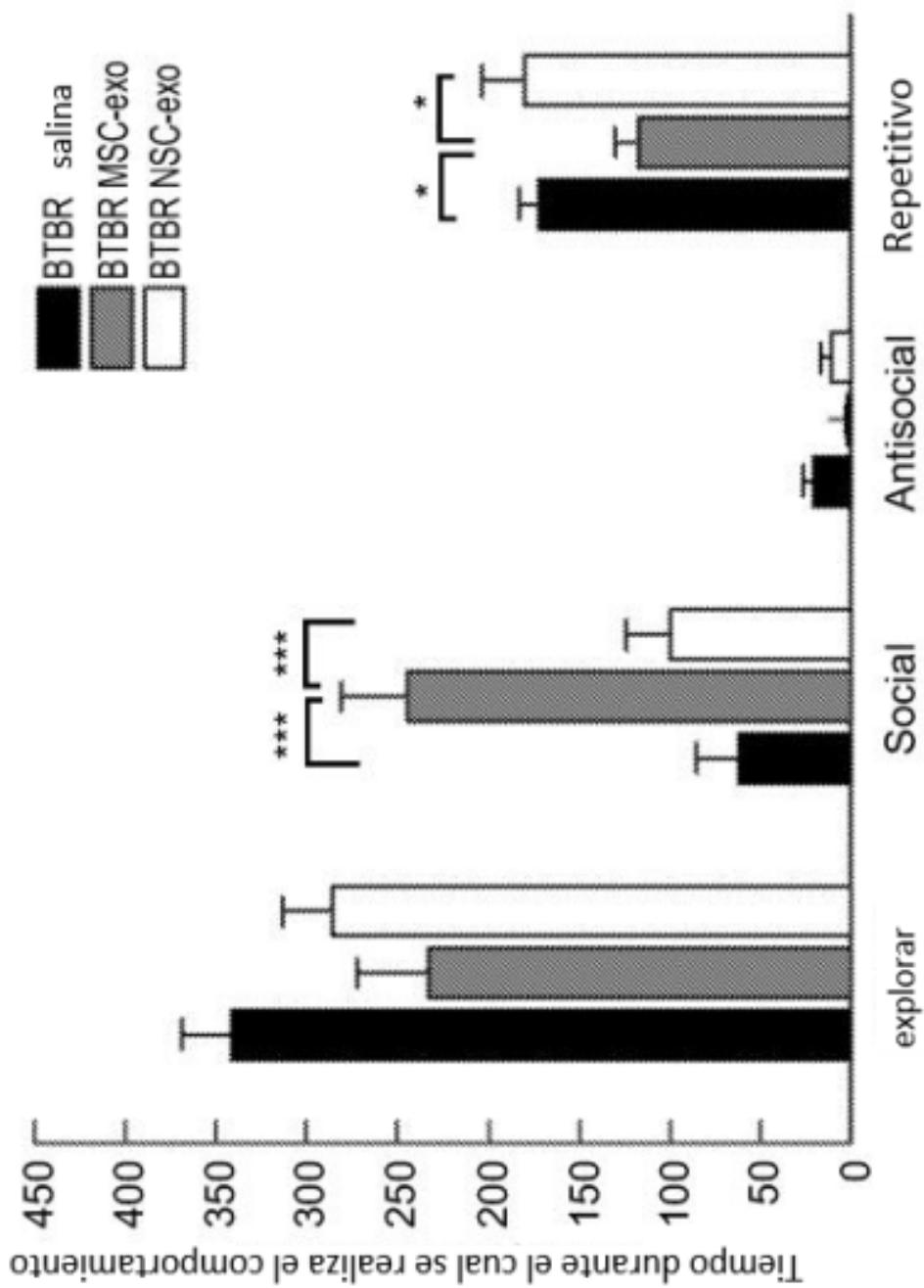


FIG. 12B

