

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 949 637**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 35/12</b>	(2015.01) <b>A61P 25/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/28</b>	(2015.01) <b>A61P 37/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/16</b>	(2015.01) <b>A61P 7/06</b>	(2006.01)
<b>G01N 1/34</b>	(2006.01) <b>A61P 9/00</b>	(2006.01)
<b>G01N 1/40</b>	(2006.01) <b>A61P 17/02</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/88</b>	(2006.01) <b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/127</b>	(2006.01) <b>A61P 37/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/98</b>	(2006.01) <b>A61P 43/00</b>	(2006.01)
<b>A61Q 19/00</b>	(2006.01) <b>A61P 35/04</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01) <b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014** **E 19212541 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2023** **EP 3677271**

54 Título: **Método de aislamiento y purificación de microvesículas a partir de sobrenadantes de cultivos celulares y fluidos biológicos**

30 Prioridad:

**13.03.2013 US 201361778591 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.10.2023**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 949 637 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de aislamiento y purificación de microvesículas a partir de sobrenadantes de cultivos celulares y fluidos biológicos

5 Campo técnico de la invención

La presente invención está relacionada con los campos de la medicina, biología celular, biología molecular y genética. En particular, la presente invención proporciona métodos para aislar y purificar microvesículas a partir de sobrenadantes de cultivos celulares y fluidos biológicos. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas de microvesículas para promover o mejorar la cicatrización de heridas, estimular la regeneración de tejidos, remodelar tejidos cicatrizados, modular reacciones inmunitarias, alterar el crecimiento y/o movilidad de células neoplásicas, o alterar el crecimiento y/o movilidad de células normales. La presente invención también proporciona composiciones de microvesículas para ser utilizadas como reactivos de diagnóstico, y métodos para preparar las composiciones de microvesículas.

15 Antecedentes de la invención

Las microvesículas son secretadas por muchos, si no todos, los tipos de células *in vitro* e *in vivo*, y están presentes en fluidos biológicos como, por ejemplo, la sangre, el líquido intersticial, la orina, la saliva y las lágrimas. Las microvesículas son vesículas que comprenden bicapas lipídicas, formadas a partir de la membrana plasmática de las células, y tienen un tamaño heterogéneo, que oscila entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 5000 nm. La célula a partir de la cual se forma una microvesícula se denomina en la presente "célula hospedera". Las microvesículas son una población heterogénea de vesículas e incluyen, por ejemplo, ectosomas, micropartículas, microvesículas, nanovesículas, vesículas de desprendimiento y partículas de membrana.

Las microvesículas presentan proteínas de membrana de su célula huésped en su superficie de membrana, y también pueden contener moléculas dentro de la microvesícula procedentes de la célula huésped, como, por ejemplo, ARNm, ARNm, ARNt, ARN, ADN, lípidos, proteínas o partículas infecciosas. Estas moléculas pueden proceder o ser moléculas recombinantes introducidas en la célula hospedera. Las microvesículas desempeñan un papel fundamental en la comunicación intercelular, y pueden actuar local y distalmente dentro del organismo, induciendo cambios en las células al fusionarse con una célula diana, introduciendo las moléculas transportadas sobre y/o en la microvesícula a la célula diana. Por ejemplo, se ha implicado a las microvesículas en la reversión antitumoral, el cáncer, la inmunosupresión tumoral, la metástasis, las interacciones tumor-estroma, la angiogénesis y la regeneración tisular. Las microvesículas también pueden utilizarse para diagnosticar enfermedades, ya que se ha demostrado que portan biomarcadores de varias enfermedades, incluyendo, por ejemplo, la enfermedad cardíaca, el VIH y la leucemia.

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

Por ejemplo, la patente estadounidense 7,807,438 divulga un método para aislar el virus de la hepatitis C. El método comprende la separación de partículas denominadas exosomas del plasma sanguíneo de un individuo infectado con el virus de la hepatitis C (VHC) y la extracción de ARN de estas partículas exosómicas.

En otro ejemplo, la solicitud de patente estadounidense US20030198642A1 divulga [e]xosomas... derivados de compartimentos enriquecidos en CHM de clase II en células presentadoras de antígeno... [para] un ... vehículo de vacunación.

En otro ejemplo, la solicitud de patente estadounidense US20060116321A1 divulga métodos y composiciones para su uso en la mediación de una reacción inmunosupresora. Las composiciones ... comprenden exosomas que tienen actividad inmunosupresora. Tales exosomas pueden derivarse de una variedad de diferentes tipos de células, incluyendo células presentadoras de antígenos tales como células dendríticas y macrófagos. Antes del aislamiento de los exosomas, las células pueden ser modificadas genéticamente para expresar moléculas capaces de potenciar la actividad inmunosupresora de dichos exosomas y/o pueden ser expuestas a uno o más agentes, como citocinas o inhibidores de citocinas, que también son capaces de potenciar la actividad inmunosupresora de los exosomas. La presente invención también se refiere al uso de dichos exosomas para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la activación indeseable del sistema inmunitario. La presente invención también incluye exosomas aislados directamente del suero que han demostrado ser inmunosupresores.

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

Otros han intentado métodos alternativos para aislar microvesículas. Sin embargo, los métodos alternativos empleados frecuentemente aíslan una subfracción de microvesículas, o son ineficaces. Por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense US2011003008A1 divulga una partícula secretada por una célula madre mesenquimal y que comprende al menos una propiedad biológica de una célula madre mesenquimal. La propiedad biológica puede comprender una



actividad biológica de un medio condicionado de células madre mesenquimales (MSC-CM), como cardioprotección o reducción del tamaño del infarto. La partícula puede comprender una vesícula o un exosoma.

En otro ejemplo, la solicitud de patente estadounidense US20120070858A1 divulga un método para aislar exosomas a partir de plaquetas sanguíneas usando nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), mediante un mecanismo de atracción de carga basado en el potencial Zeta predeterminado de los exosomas. El método consiste en utilizar nanopartículas de óxido de hierro previamente sintetizadas con una carga positiva predeterminada, que se unen a los exosomas de carga negativa contenidos en la muestra biológica. Durante la incubación, las nanopartículas magnéticas catiónicas son absorbidas por la superficie de la membrana de los exosomas debido a una interacción electrostática. La exposición del material a un campo magnético permite separar los exosomas unidos a las nanopartículas. El éxito de esta técnica se ha confirmado mediante la caracterización de los exosomas por citometría de flujo. El método ha demostrado ser adecuado para este fin, ya que permite aislar y purificar los exosomas, sin sufrir alteraciones de sus características morfológicas y estructurales originales.

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

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de proporcionar un método para aislar y purificar microvesículas sin dañarlas, y en cantidades suficientes para que las microvesículas aisladas puedan utilizarse posteriormente para el diagnóstico de enfermedades, terapias o investigación.

La presente invención proporciona métodos para aislar microvesículas de fluidos biológicos sin dañar la integridad estructural y/o funcional de las microvesículas. La presente invención también proporciona métodos para aislar ectosomas, micropartículas, microvesículas, nanovesículas, vesículas de desprendimiento, cuerpos apoptóticos o partículas de membrana de fluidos biológicos sin dañar su integridad estructural y/o funcional.

#### Breve descripción de la invención

La invención se expone en la reivindicación 1 adjunta. Otras realizaciones se describen en las reivindicaciones dependientes 2 a 14.

#### Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan a la presente y forman parte de la memoria descriptiva, ilustran varios ejemplos de la presente invención y, junto con la descripción, sirven además para explicar los principios de la invención y para permitir a una persona con conocimientos ordinarios en la técnica realizar y utilizar la invención. En los dibujos, números de referencia similares indican elementos idénticos o funcionalmente similares. Una apreciación más completa de la invención y muchas de las ventajas concomitantes de la misma se obtendrán fácilmente a medida que la misma se comprenda mejor por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considere en relación con los dibujos adjuntos, en donde:

La Figura 1 muestra un esquema de un protocolo utilizado para aislar microvesículas por ultracentrifugación.

La Figura 2 muestra un ejemplo de un método de aislamiento de microvesículas de la presente divulgación.

La Figura 3 muestra un ejemplo alternativo de un método de aislamiento de microvesículas de la presente divulgación.

La Figura 4 muestra un ejemplo de un aparato de la presente divulgación que facilita la clarificación del fluido biológico y la recolección de las microvesículas precipitadas por filtración.

La Figura 5 muestra microfotografías electrónicas de microvesículas derivadas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana aisladas por el método de ultracentrifugadora descrito en el Ejemplo 1 (paneles A y B) y aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención (paneles C y D) a los aumentos mostrados en los paneles.

La Figura 6 muestra microfotografías electrónicas de microvesículas derivadas del medio acondicionado usando células madre mesenquimales derivadas de médula ósea porcina aisladas por el método de ultracentrifugadora descrito en el Ejemplo 1 (paneles A y B) y aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención (paneles C y D) a los aumentos mostrados en los paneles.

La Figura 7 muestra microfotografías electrónicas de microvesículas derivadas de medio acondicionado usando células madre mesenquimales derivadas de médula ósea murina aisladas por el método de ultracentrifugadora descrito en el Ejemplo 1 (paneles A y B) y aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención (paneles C y D) a los aumentos mostrados en los paneles.

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

5 La Figura 9 muestra microfotografías electrónicas de microvesículas aisladas de plasma porcino de acuerdo con los métodos de la presente invención. Los paneles A a C muestran las microvesículas con aumentos crecientes, como muestran las barras de escala en los paneles.

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

15 La Figura 11 muestra un western blot, informando la expresión de HSP70, CD63, STAT 3 y STAT3 fosforilada en lisados de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana, microvesículas aisladas de medio acondicionado usando células madre derivadas de médula ósea humana, preparadas por ultracentrifugación (ultracentrifugadora MV de hMSC), o los métodos de la presente invención, como se describe en el ejemplo 3 (Precipitación PEG de hMSC). También se analizaron microvesículas derivadas de plasma humano y orina humana, preparadas por los métodos de la presente invención, como se describe en el ejemplo 3. (Precipitación PEG en plasma humano) y (Precipitación PEG en orina humana) respectivamente.

20 La Figura 12 muestra el efecto de las microvesículas aisladas del medio condicionado usando células madre mesenquimales humanas derivadas de médula ósea sobre la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos normales (A), fibroblastos dérmicos obtenidos de una úlcera de pie diabético (B) y fibroblastos dérmicos obtenidos de una úlcera de pie por presión (C). Se comparó el efecto de las microvesículas aisladas por ultracentrifugación (MV por U/C) y las  
25 microvesículas aisladas por los métodos de la presente invención (MV por PEG). Los fibroblastos tratados con PBS o medio de cultivo sin microvesículas se incluyeron como control. La proliferación se determinó mediante un ensayo MTT.

La Figura 13 muestra el efecto de las microvesículas aisladas del medio acondicionado con células madre mesenquimales humanas derivadas de médula ósea sobre la migración de fibroblastos dérmicos humanos, determinada por la capacidad  
30 de los fibroblastos para migrar a una región que había sido rascada. El panel denominado "pretratamiento" muestra una zona representativa de una placa de cultivo celular en la que se extrajeron las células, antes de añadir los tratamientos de prueba. El efecto de la migración de fibroblastos se ensayó usando microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención (precipitación con PEG) y microvesículas aisladas por ultracentrifugación (ultracentrifugadora) a las concentraciones mostradas. Los fibroblastos tratados con PBS o medio de cultivo sin  
35 microvesículas se incluyeron como control.

La Figura 14 muestra el efecto de las microvesículas aisladas del medio acondicionado con células madre mesenquimales humanas derivadas de médula ósea sobre la migración de fibroblastos dérmicos humanos obtenidos de una úlcera de pie diabético, determinada por la capacidad de los fibroblastos para migrar a una región que había sido rascada. El panel  
40 denominado "pretratamiento" muestra una zona representativa de una placa de cultivo celular en la que se extrajeron las células, antes de añadir los tratamientos de prueba. El efecto de la migración de fibroblastos se ensayó utilizando microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención (precipitación con PEG) y microvesículas aisladas por ultracentrifugación (ultracentrifugadora) a las concentraciones mostradas. Los fibroblastos tratados con PBS o medio de cultivo sin microvesículas se incluyeron como control.

45 La Figura 15 muestra la captación de las microvesículas de la presente invención en fibroblastos dérmicos humanos. Los núcleos celulares, resueltos usando el colorante Hoechst 33342, se muestran en los paneles denominados "Hoechst33342". Las células, resueltas usando el colorante vybrant, se muestran en el panel denominado "Vybrant-Dio". Las microvesículas, resueltas usando colorante PKH, se muestran en el panel etiquetado "MV etiquetado con PKH". En el panel "compuesto" se superponen las imágenes obtenidas con los tres colorantes.

50 La Figura 16 muestra la captación de las microvesículas de la presente invención en fibroblastos dérmicos humanos. Los núcleos celulares, resueltos usando el colorante Hoechst 33342, se muestran en los paneles denominados "Hoechst33342". Las células, resueltas usando el colorante vybrant, se muestran en el panel denominado "Vybrant-Dio". Las microvesículas, resueltas usando colorante PKH, se muestran en el panel etiquetado "MV etiquetado con PKH". En el panel "compuesto" se superponen las imágenes obtenidas con los tres colorantes.

La Figura 17 muestra un western blot de lisados de fibroblastos dérmicos humanos tratados con: microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención a partir de plasma obtenido de un paciente que padece artritis reumatoide (Precipitación MV PEG de plasma humano); microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención a partir de medio acondicionado con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (Precipitación MV PEG de hMSC humanas); microvesículas aisladas mediante ultracentrifugación a partir de medio acondicionado con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (ultracentrifugación MV de hMSC humanas); control de PBS; y un control de medio desprovisto (medio acondicionado de hMSC desprovisto de MV).

60 La Figura 18 muestra la presencia de la región que contiene el exón 15 de BRAF con la mutación T1799A, en: Células

SK-MEL28, a partir de ARN amplificado usando el cebador 1 (carril 3); células SK-MEL28, a partir de ARN amplificado usando el cebador 2 (carril 4); microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención a partir de medio acondicionado con células SK-MEL28, a partir de ARN amplificado usando el cebador 1 (carril 5); microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención a partir de medio acondicionado con células SK-MEL28, a partir de ARN amplificado usando el cebador 2 (carril 6); células SK-MEL28, a partir de ADN amplificado usando el cebador 1 (carril 7); células SK-MEL28, a partir de ADN amplificado usando el cebador 2 (carril 8); microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención a partir de medio acondicionado con células SK-MEL28, a partir de ADN amplificado usando el cebador 1 (carril 9); y microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención a partir de medio acondicionado con células SK-MEL28, a partir de ADN amplificado usando el cebador 2 (carril 10).

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

La Figura 20 muestra la captación de las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención a partir de medio de cultivo acondicionado con células madre derivadas de médula ósea obtenidas de un ratón que expresa proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) en fibroblastos dérmicos humanos. Los núcleos celulares, resueltos usando el colorante Hoechst 33342, se muestran en los paneles denominados "Hoechst33342". Las células, resueltas usando el colorante Vybrant, se muestran en el panel denominado "Vybrant-Dio". Las microvesículas etiquetadas con GFP se muestran en el panel denominado "GFP". En el panel "compuesto" se superponen las imágenes obtenidas con los tres colorantes.

La Figura 21 muestra la captación de las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención a partir de medio de cultivo acondicionado con células madre derivadas de médula ósea obtenidas de un ratón que expresa la GFP en fibroblastos dérmicos humanos. Los núcleos celulares, resueltos usando el colorante Hoechst 33342, se muestran en los paneles denominados "Hoechst33342". Las células, resueltas usando el colorante Vybrant, se muestran en el panel denominado "Vybrant-Dio". Las microvesículas etiquetadas con GFP se muestran en el panel denominado "GFP". En el panel "compuesto" se superponen las imágenes obtenidas con los tres colorantes.

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

La Figura 23 muestra imágenes de quemaduras de segundo grado en animales tratados con: (A) microvesículas aisladas del medio acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea por ultracentrifugación; (B) microvesículas aisladas del medio acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea de acuerdo con los métodos de la presente invención; y (C) animales no tratados, 7 días después de la herida. (D) muestra una herida de espesor total en un animal tratado con microvesículas aisladas del medio acondicionado usando células madre mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea mediante ultracentrifugación 7 días después de la herida. Las flechas indican la formación de un absceso en una herida de espesor total tratada con microvesículas aisladas por ultracentrifugación en el día 7 (40X). Esto no se observó en las heridas de espesor total tratadas con microvesículas preparadas de acuerdo con los métodos de la presente invención.

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

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

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

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

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

La Figura 29 muestra la presencia o ausencia de quimerismo en animales irradiados tras la administración de médula

ósea etiquetada con GFP.

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

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

La Figura 32 muestra el efecto de las microvesículas derivadas de médula ósea obtenidas mediante el método de la presente invención sobre el crecimiento o proliferación celular, usando un ensayo *in vitro* de crecimiento celular. El panel A muestra imágenes representativas tomadas usando un microscopio epifluorescente de cultivos de fibroblastos adultos normales tratados con microvesículas derivadas de médula ósea obtenidas usando el método de la presente invención ("MV de médula ósea") o PBS ("PBS"), tres días después del tratamiento. El panel B muestra el número promedio de células en cultivos de fibroblastos adultos normales tratados con microvesículas derivadas de médula ósea obtenidas mediante el método de la presente invención ("MV de médula ósea") o PBS ("PBS"), tres días después del tratamiento.

#### Descripción detallada de la invención

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

#### Métodos para aislar las microvesículas de la presente divulgación

En un ejemplo, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que contiene microvesículas en un método que comprende los pasos de:

- a) obtener un fluido biológico que contiene microvesículas,
- b) clarificar el fluido biológico para eliminar restos celulares,
- c) precipitar las microvesículas añadiendo un agente precipitante al fluido biológico clarificado,
- d) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante, y
- e) suspender las microvesículas lavadas en una solución para su almacenamiento o uso posterior.

En un ejemplo, el fluido biológico se clarifica por centrifugación. En un ejemplo alternativo, el fluido biológico se clarifica por filtración.

En un ejemplo, las microvesículas precipitadas se recolectan por centrifugación. En un ejemplo alternativo, las microvesículas precipitadas se recolectan por filtración.

En un ejemplo, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que contiene microvesículas en un método que comprende los pasos de:

- a) obtener un fluido biológico que contiene microvesículas,
- b) clarificar el fluido biológico para eliminar restos celulares,
- c) precipitar las microvesículas añadiendo un agente precipitante al fluido biológico clarificado,
- d) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante,
- e) suspender las microvesículas lavadas en una solución, y
- f) procesar las microvesículas para analizar el contenido en ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, pequeñas moléculas y/o proteínas.

En un ejemplo, el fluido biológico se clarifica por centrifugación. En un ejemplo alternativo, el fluido biológico se clarifica por filtración.

En un ejemplo, las microvesículas precipitadas se recolectan por centrifugación. En un ejemplo alternativo, las microvesículas precipitadas se recolectan por filtración.

En un ejemplo, la presente divulgación proporciona reactivos y kits para aislar microvesículas de fluidos biológicos de acuerdo con los métodos de la presente invención.

El fluido biológico puede ser sangre periférica, suero, plasma, ascitis, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), esputo, saliva, médula ósea, líquido sinovial, humor acuoso, líquido amniótico, cerumen, leche materna, líquido de lavado broncoalveolar, semen (incluido el líquido prostático), líquido de Cowper o líquido preeyaculatorio, eyaculado femenino, sudor, materia

fecal, cabello, lágrimas, líquido de quiste, líquido pleural y peritoneal, líquido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bilis, líquido intersticial, menstruación, pus, sebo, vómito, secreciones vaginales, secreción mucosa, agua fecal, jugo pancreático, fluidos de lavado de cavidades sinusales, aspirados broncopulmonares u otros fluidos de lavado.

5 El fluido biológico también puede derivarse de la cavidad del blastocisto, de la sangre del cordón umbilical o de la circulación materna, que puede ser de origen fetal o materno. El fluido biológico también puede derivarse de una muestra de tejido o biopsia.

10 El fluido biológico puede derivarse de células vegetales de cultivos de células vegetales. El fluido biológico puede derivarse de células de levadura o cultivos de células de levadura.

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

15 El término "acondicionado" o "medio acondicionado" se refiere a un medio en el que se cultiva una población de células o tejidos, o una combinación de los mismos, y la población de células o tejidos, o la combinación de los mismos aporta factores al medio. En uno de estos usos, la población de células o tejidos, o la combinación de los mismos, se retira del medio, mientras que los factores que producen las células permanecen. En un ejemplo, los factores producidos son microvesículas.

20 El medio puede acondicionarse mediante cualquier método adecuado seleccionado por un experto en la técnica. Por ejemplo, el medio puede cultivarse de acuerdo con los métodos descritos en el EP1780267A2.

25 En un ejemplo, las microvesículas se aíslan de células o tejidos que han sido pretratados antes del aislamiento de las microvesículas. El pretratamiento puede incluir, por ejemplo, cultivo en un medio específico, un medio que contiene al menos un aditivo, factor de crecimiento, medio desprovisto de suero, o una combinación de los mismos. Alternativamente, el pretratamiento puede comprender el contacto de células o tejidos con aditivos (por ejemplo, interleucina, VEGF, inductores de factores de transcripción, factores de transcripción, hormonas, neurotransmisores, compuestos farmacéuticos, microARN), agentes transformadores (por ejemplo, liposomas, virus, agentes transfectados, etc.).

30 Alternativamente, el pretratamiento puede comprender la exposición de células o tejidos a condiciones físicas alteradas (por ejemplo, hipoxia, choque frío, choque térmico).

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

40

45 En un ejemplo, el fluido biológico es un extracto de una planta. En un ejemplo alternativo, el fluido biológico es un medio de cultivo celular de un cultivo de células vegetales. En un ejemplo alternativo, el fluido biológico es un extracto de levadura. En un ejemplo alternativo, el fluido biológico es un medio de cultivo celular de un cultivo de células de levadura.

Aunque los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo a cualquier temperatura, una persona con conocimientos ordinarios en la técnica puede apreciar fácilmente que ciertos fluidos biológicos pueden degradarse, y dicha degradación se reduce si la muestra se mantiene a una temperatura inferior a la temperatura a la que se degrada el fluido biológico. En un ejemplo, el método de la presente divulgación se lleva a cabo a 4 °C. En un ejemplo alternativo, al menos un paso del método de la presente divulgación se lleva a cabo a 4 °C.

50

En ciertos ejemplos, el fluido biológico puede diluirse antes de ser sometido a los métodos de la presente invención. La dilución puede ser necesaria para fluidos biológicos viscosos, para reducir la viscosidad de la muestra, si la viscosidad de la muestra es demasiado grande para obtener un rendimiento aceptable de microvesículas. La dilución puede ser de 1:2. Alternativamente, la dilución puede ser 1:3. Alternativamente, la dilución puede ser 1:4. Alternativamente, la dilución puede ser 1:5. Alternativamente, la dilución puede ser 1:6. Alternativamente, la dilución puede ser 1:7. Alternativamente, la dilución puede ser 1:8. Alternativamente, la dilución puede ser 1:9. Alternativamente, la dilución puede ser 1:10. Alternativamente, la dilución puede ser 1:20. Alternativamente, la dilución puede ser 1:30. Alternativamente, la dilución puede ser 01:40. Alternativamente, la dilución puede ser 01:50. Alternativamente, la dilución puede ser 1:60. Alternativamente, la dilución puede ser 1:70. Alternativamente, la dilución puede ser 1:80. Alternativamente, la dilución puede ser 1:90. Alternativamente, la dilución puede ser 1:100.

55

60

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

65

En un ejemplo, el fluido biológico se clarifica mediante la aplicación de una fuerza centrífuga para eliminar los restos celulares. La fuerza centrífuga aplicada al fluido biológico es suficiente para eliminar cualquier célula, células lisadas, restos de tejido del fluido biológico, pero la fuerza centrífuga aplicada es insuficiente en magnitud, duración, o ambas, para eliminar las microvesículas. El fluido biológico puede requerir dilución para facilitar la clarificación.

La duración y magnitud de la fuerza centrífuga utilizada para clarificar el fluido biológico puede variar de acuerdo con un número de factores fácilmente apreciados por un experto en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el fluido biológico, el pH del fluido biológico, la pureza deseada de las microvesículas aisladas, el tamaño deseado de las microvesículas aisladas, el peso molecular deseado de las microvesículas, y similares. En un ejemplo, se aplica una fuerza centrífuga de 2000 x g al fluido biológico durante 30 minutos.

El fluido biológico clarificado se pone en contacto con un agente de precipitación para precipitar las microvesículas. En un ejemplo, el agente de precipitación puede ser cualquier agente que rodee las microvesículas y desplace el agua de solvatación. Tales agentes de precipitación pueden seleccionarse del grupo que consiste en polietilenglicol, dextrano y polisacáridos.

En un ejemplo alternativo, el agente de precipitación puede causar la agregación de las microvesículas.

En un ejemplo alternativo, el agente de precipitación se selecciona del grupo que consiste en iones de calcio, iones de magnesio, iones de sodio, iones de amonio, iones de hierro, disolventes orgánicos tales como sulfato de amonio y agentes floculantes, tales como alginato.

El fluido biológico clarificado se pone en contacto con el agente de precipitación durante un periodo de tiempo suficiente para precipitar las microvesículas. El periodo de tiempo suficiente para precipitar las microvesículas puede variar de acuerdo con una serie de factores fácilmente apreciados por un experto en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el fluido biológico, el pH del fluido biológico, la pureza deseada de las microvesículas aisladas, el tamaño deseado de las microvesículas aisladas, el peso molecular deseado de las macrovesículas, y similares. En un ejemplo, el periodo de tiempo suficiente para precipitar las microvesículas es de 6 horas.

En un ejemplo, el fluido biológico clarificado se pone en contacto con el agente de precipitación durante un periodo de tiempo suficiente para precipitar las microvesículas a 4 °C.

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

En un ejemplo, el agente de precipitación es polietilenglicol. El peso molecular del polietilenglicol utilizado en los métodos de la presente divulgación puede ser de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 10.000 Da. En un ejemplo, el peso molecular del polietilenglicol puede ser superior a 10.000 Da. La elección del peso molecular puede estar influenciada por una variedad de factores incluyendo, por ejemplo, la viscosidad del fluido biológico, la pureza deseada de las microvesículas, el tamaño deseado de las microvesículas, el fluido biológico utilizado, y similares.

En un ejemplo, el peso molecular del polietilenglicol utilizado puede ser de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 8.000 Da, o es aproximadamente cualquiera de 200, 300, 400, 600, 1000, 1500, 4000, 6000 u 8000.

En un ejemplo, el peso molecular del polietilenglicol utilizado es de aproximadamente 6000 Da.

En un ejemplo, el peso molecular promedio del polietilenglicol utilizado es de aproximadamente 8000 Da.

La concentración de polietilenglicol utilizada puede ser de aproximadamente 0,5% p/v a aproximadamente 100 % p/v. La concentración de polietilenglicol utilizada puede estar influenciada por una variedad de factores que incluyen, por ejemplo, la viscosidad del fluido biológico, la pureza deseada de las microvesículas, el tamaño deseado de las microvesículas, el fluido biológico utilizado y similares.

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

En un ejemplo, la concentración de polietilenglicol utilizada es de aproximadamente 8,5 % p/v.

En un ejemplo, la concentración de polietilenglicol utilizada es de aproximadamente 6 % p/v.

En un ejemplo, se utiliza polietilenglicol con un peso molecular promedio de 6000 Da, a una concentración del 8,5 % p/v. En un ejemplo, el polietilenglicol se diluye en cloruro de sodio 0,4 M.

En un ejemplo, la concentración de polietilenglicol utilizada es inversamente proporcional al peso molecular promedio del polietilenglicol. Por ejemplo, en un ejemplo, se utiliza polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 4000 Da, a una concentración de 20 % p/v. En un ejemplo alternativo, se utiliza polietilenglicol con un peso molecular promedio de 8000 Da, a una concentración del 10 % p/v. En un ejemplo alternativo, se utiliza polietilenglicol con un peso molecular promedio de 20000 Da, a una concentración del 4 % p/v.

En un ejemplo, las microvesículas precipitadas se recolectan mediante la aplicación de fuerza centrífuga. La fuerza centrífuga es suficiente y se aplica durante una duración suficiente para hacer que las microvesículas formen un precipitado, pero insuficiente para dañar las microvesículas.

La duración y magnitud de la fuerza centrífuga utilizada para precipitar las microvesículas de un fluido biológico puede variar de acuerdo con un número de factores fácilmente apreciados por un experto en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el fluido biológico, el pH del fluido biológico, la pureza deseada de las microvesículas aisladas, el tamaño deseado de las microvesículas aisladas, el peso molecular deseado de las microvesículas, y similares. En un ejemplo, las microvesículas precipitadas se recolectan mediante la aplicación de una fuerza centrífuga de 10000 x g durante 60 minutos.

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

En un ejemplo, el paso de lavado elimina el agente precipitante. En un ejemplo, las microvesículas se lavan mediante filtración centrífuga, usando un dispositivo de filtración con un corte de peso molecular de 100 kDa.

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

En un ejemplo, las microvesículas aisladas pueden procesarse posteriormente. El procesamiento posterior puede ser el aislamiento de una microvesícula de un tamaño específico. Alternativamente, el procesamiento adicional puede ser el aislamiento de microvesículas de un intervalo de tamaño particular. Alternativamente, el tratamiento posterior puede consistir en aislar una microvesícula de un peso molecular determinado. Alternativamente, el procesamiento adicional puede ser el aislamiento de microvesículas de un intervalo de peso molecular. Alternativamente, el procesamiento adicional puede ser el aislamiento de una microvesícula que presente o contenga una molécula específica.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente divulgación se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 1000 nm según lo determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 500 nm según lo determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 400 nm según lo determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 300 nm según lo determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 200 nm según lo determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 100 nm según lo determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm según lo determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 20 nm según lo determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación se procesan adicionalmente para aislar una preparación de microvesículas que tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 10 nm según lo determinado por microscopía electrónica.

En un ejemplo, la purificación posterior se realiza usando un método que se selecciona del grupo que consiste en inmutaafinidad, HPLC, filtración de flujo tangencial, separación/partición de fases y microfluidos.

En un ejemplo, las microvesículas aisladas se procesan adicionalmente para analizar las moléculas expuestas en, o contenidas dentro de las microvesículas. Las moléculas analizadas se seleccionan del grupo que consiste en ácido nucleico, carbohidrato, lípido, moléculas pequeñas, iones, metabolitos, proteína, y combinaciones de los mismos.

Fluido biológico que comprende medio de cultivo celular acondicionado con células cultivadas: En un ejemplo, las microvesículas se obtienen a partir de medio acondicionado usando células cultivadas. En los métodos de la presente

invención puede utilizarse cualquier célula cultivada o población de células. Las células pueden ser células madre, células primarias, líneas celulares, tejidos o explantes de órganos, o cualquier combinación de los mismos. Las células pueden ser de origen alogénico, autólogo o xenogénico.

5 En un ejemplo, las células son células derivadas de aspirado de médula ósea. En un ejemplo, las células derivadas de aspirado de médula ósea son células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. En un ejemplo, las células derivadas de aspirado de médula ósea son células mononucleares. En un ejemplo, las células derivadas del aspirado de médula ósea son una mezcla de células mononucleares y células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.

10 En un ejemplo, las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea se aíslan del aspirado de médula ósea cultivando el aspirado de médula ósea en frascos de cultivo de tejidos de plástico durante un periodo de tiempo de hasta aproximadamente 4 días, seguido de un lavado para eliminar las células no adherentes.

15 En un ejemplo, las células mononucleares se aíslan del aspirado de médula ósea mediante centrifugación de baja densidad usando un gradiente de ficoll, y recolectando las células mononucleares en la interfase.

20 En un ejemplo, antes del aislamiento de microvesículas de acuerdo con los métodos de la presente invención, las células se cultivan, crecen o mantienen a una temperatura y mezcla de gases apropiadas (normalmente, 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> para células de mamífero) en un incubador celular. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo de célula, y se determinan fácilmente por un experto en la técnica.

En un ejemplo, se varía una o más condiciones de cultivo. En un ejemplo, esta variación resulta en un fenotipo diferente.

25 En un ejemplo, cuando las células requieren suero en su medio de cultivo, para comenzar el procedimiento de aislamiento de microvesículas, el medio de cultivo celular se suplementa con suero libre de microvesículas y luego se añade a las células que se van a acondicionar. Las microvesículas se recolectan del medio de cultivo celular acondicionado. El suero puede desproveerse por cualquier método adecuado, como, por ejemplo, ultracentrifugación, filtración, precipitación y similares. La elección del medio, la concentración de suero y las condiciones de cultivo están influidas por una variedad de factores fácilmente apreciables por un experto en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el tipo de célula que se cultiva, la pureza deseada de las microvesículas, el fenotipo deseado de la célula cultivada y similares. En un ejemplo, el medio de cultivo celular que se acondiciona para el procedimiento de aislamiento de microvesículas es el mismo tipo de medio de cultivo celular en el que se cultivaron las células, antes del procedimiento de aislamiento de microvesículas.

35 En un ejemplo, para comenzar el procedimiento de aislamiento de microvesículas, se retira el medio de cultivo celular y se añade medio libre de suero a las células que se van a acondicionar. Después, las microvesículas se recogen del medio libre de suero acondicionado. La elección del medio y las condiciones de cultivo están influidas por una variedad de factores fácilmente apreciables por un experto en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el tipo de célula que se cultiva, la pureza deseada de las microvesículas, el fenotipo deseado de la célula cultivada y similares. En un ejemplo, el medio libre de suero se complementa con al menos un factor adicional que promueve o mejora la supervivencia de las células en el medio libre de suero. Dicho factor puede, por ejemplo, proporcionar apoyo trófico a las células, inhibir o prevenir la apoptosis de las células.

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

50 A continuación, las microvesículas se extraen del medio de cultivo mediante los métodos de la presente invención.

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

60 En un ejemplo, mientras las células se cultivan en el medio del que se recolectan las microvesículas, las células se tratan con al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un compuesto antiinflamatorio, un compuesto antiapoptótico, un inhibidor de la fibrosis, un compuesto capaz de mejorar la angiogénesis, un compuesto inmunosupresor, un compuesto que promueve la supervivencia de las células y un factor de crecimiento.

En un ejemplo, el compuesto antiinflamatorio puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la patente estadounidense núm. 6,509,369

65 En un ejemplo, el compuesto antiapoptótico puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la patente estadounidense núm. 6,793,945



En un ejemplo, el inhibidor de la fibrosis puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la patente estadounidense núm. 6,331,298

5 En un ejemplo, el compuesto capaz de potenciar la angiogénesis puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la solicitud de patente estadounidense 2004/0220393 o en la solicitud de patente estadounidense 2004/0209901.

En un ejemplo, el compuesto inmunosupresor puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la solicitud de patente estadounidense 2004/0171623.

10 En un ejemplo, el compuesto que promueve la supervivencia de las células puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la solicitud de patente estadounidense 2010/0104542.

15 En un ejemplo, el factor de crecimiento puede ser al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en miembros de la familia TGF- $\beta$ , incluyendo TGF- $\beta$ 1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores de crecimiento de fibroblastos -1 y -2, factor de crecimiento derivado de plaquetas- A, -AB, y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento insulínico (IGF-I, II) factor de diferenciación de crecimiento (GDF-5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (VEGF), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor 1-alfa inducible por hipoxia, péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), mimeticuerpos GLP-1 y GLP-2, y II, Exendin-4, nodal, noggin, NGF, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de la trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen dominios de unión a células y heparina de proteínas de matriz extracelular adhesiva como fibronectina y vitronectina, e inhibidores de MAPK, como, por ejemplo, los compuestos divulgados en la solicitud de patente estadounidense 2004/ 02099, solicitud de patente estadounidense 2004/ 0209901 y solicitud de patente estadounidense 2004/0132729.

En un ejemplo, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que comprende un medio de cultivo celular condicionado usando un cultivo de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea que comprende los pasos de:

30 a) obtener una población de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea y sembrar frascos a una dilución 1:4 de células,  
b) cultivar las células en medio hasta que las células sean confluentes en un 80 a 90 %,  
c) eliminar y clarificar el medio para eliminar los restos celulares,  
d) precipitar las microvesículas añadiendo un agente precipitante al medio de cultivo clarificado,  
35 e) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante, y  
f) suspender las microvesículas lavadas en una solución para su almacenamiento o uso posterior.

En un ejemplo, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que comprende un medio de cultivo celular condicionado usando un cultivo de células mononucleares derivadas de médula ósea que comprende los pasos de:

40 a) obtener una población de células mononucleares derivadas de médula ósea y sembrar frascos a una dilución 1:4 de células,  
b) cultivar las células en medio hasta que las células sean confluentes en un 80 a 90 %,  
c) eliminar y clarificar el medio para eliminar los restos celulares,  
45 d) precipitar las microvesículas añadiendo un agente precipitante al medio de cultivo clarificado,  
e) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante, y  
f) suspender las microvesículas lavadas en una solución para su almacenamiento o uso posterior.

50 En un ejemplo, las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea se cultivan en medio que comprende a-MEM suplementado con 20 % de suero bovino fetal y 1 % de penicilina/estreptomicina/glutamina a 37 °C en aire humidificado al 95 % y 5 % de CO<sub>2</sub>.

55 En un ejemplo, las células mononucleares derivadas de médula ósea se cultivan en medio que comprende a-MEM suplementado con 20 % de suero bovino fetal y 1 % de penicilina/estreptomicina/glutamina a 37 °C en aire humidificado al 95 % y 5 % de CO<sub>2</sub>.

En un ejemplo, el medio se clarifica por centrifugación.

60 En un ejemplo, el agente precipitante es polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 6000. En un ejemplo, el polietilenglicol se utiliza a una concentración de aproximadamente 8,5 % p/v. En un ejemplo, el polietilenglicol se diluye en una solución de cloruro de sodio que tiene una concentración final de 0,4 M.

En un ejemplo, las microvesículas precipitadas se recolectan por centrifugación.

65 En un ejemplo, las microvesículas aisladas se lavan mediante filtración centrífuga, usando una membrana con un corte de peso molecular de 100 kDa, usando solución solución amortiguada con fosfato.

Fluido biológico que comprende plasma: En un ejemplo, las microvesículas se obtienen a partir de plasma. El plasma puede obtenerse de un individuo sano o, alternativamente, de un individuo con un fenotipo de enfermedad particular.

5 En un ejemplo, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que comprende plasma que comprende los pasos de:

- a) obtener plasma y diluir el plasma con medio de cultivo celular,
- b) precipitar las microvesículas añadiendo un agente precipitante al plasma diluido,
- c) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante, y
- 10 d) suspender las microvesículas lavadas en una solución para su almacenamiento o uso posterior.

En un ejemplo, el plasma se diluye 1:10 con medio de cultivo.

15 En un ejemplo, el medio de cultivo es a-MEM. En un ejemplo, el agente precipitante es polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 6000. En un ejemplo, el polietilenglicol se utiliza a una concentración de aproximadamente 8,5 % p/v. En un ejemplo, el polietilenglicol se diluye en una solución de cloruro de sodio que tiene una concentración final de 0,4 M.

20 En un ejemplo, las microvesículas precipitadas se recolectan por centrifugación.

En un ejemplo, las microvesículas aisladas se lavan mediante filtración centrífuga, utilizando una membrana con un corte de peso molecular de 100 kDa, utilizando solución solución amortiguada con fosfato.

25 Fluido biológico que comprende aspirado de médula ósea: En un ejemplo, las microvesículas se obtienen a partir de aspirado de médula ósea. En un ejemplo, las microvesículas se obtienen a partir de la fracción celular del aspirado de médula ósea. En un ejemplo, las microvesículas se obtienen a partir de la fracción acelular del aspirado de médula ósea. En un ejemplo, las microvesículas se obtienen a partir de células cultivadas del aspirado de médula ósea. En un ejemplo, las células cultivadas a partir del aspirado de médula ósea se usan para acondicionar el medio de cultivo celular, a partir del cual se aíslan las microvesículas.

30 En un ejemplo, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que comprende aspirado de médula ósea que comprende los pasos de:

- a) obtener un aspirado de médula ósea y separar el aspirado de médula ósea en una porción acelular y una porción celular,
- b) diluir la porción acelular,
- c) clarificar la porción acelular diluida para eliminar los restos celulares,
- d) precipitar las microvesículas en la porción acelular añadiendo un agente precipitante a la porción acelular diluida,
- e) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante, y
- 40 f) suspender las microvesículas lavadas en una solución para su almacenamiento o uso posterior.

En un ejemplo, la porción acelular se diluye 1:10 con medio de cultivo.

45 En un ejemplo, el medio de cultivo es a-MEM.

En un ejemplo, la porción acelular diluida se clarifica por centrifugación.

50 En un ejemplo, el agente precipitante es polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 6000. En un ejemplo, el polietilenglicol se utiliza a una concentración de aproximadamente 8,5 % p/v. En un ejemplo, el polietilenglicol se diluye en una solución de cloruro de sodio que tiene una concentración final de 0,4 M.

En un ejemplo, las microvesículas precipitadas se recolectan por centrifugación.

55 En un ejemplo, las microvesículas aisladas se lavan mediante filtración centrífuga, usando una membrana con un corte de peso molecular de 100 kDa, usando solución salina amortiguada con fosfato.

60 En un ejemplo, la porción celular se procesa adicionalmente para aislar y recolectar células. En un ejemplo, la porción celular se procesa adicionalmente para aislar y recoger células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. En un ejemplo, la porción celular se procesa adicionalmente para aislar y recoger células mononucleares derivadas de la médula ósea. En un ejemplo, la porción celular se utiliza para acondicionar el medio, del que pueden derivarse posteriormente microvesículas.

65 En un ejemplo, las microvesículas se aíslan de la porción celular. La porción celular puede incubarse durante un periodo de tiempo antes del aislamiento de las microvesículas. Alternativamente, las microvesículas se pueden aislar de la porción celular inmediatamente después de que se recolecte la porción celular.

- 5 [En un ejemplo, la porción celular también se trata con al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un compuesto antiinflamatorio, un compuesto antiapoptótico, un inhibidor de la fibrosis, un compuesto capaz de mejorar la angiogénesis, un compuesto inmunosupresor, un compuesto que promueve la supervivencia de las células, un quimioterapéutico, un compuesto capaz de mejorar la migración celular, un compuesto neurogénico y un factor de crecimiento.
- En un ejemplo, el compuesto antiinflamatorio puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la patente estadounidense núm. 6,509,369
- 10 En un ejemplo, el compuesto antiapoptótico puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la patente estadounidense núm. 6,793,945
- En un ejemplo, el inhibidor de la fibrosis puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la patente estadounidense núm. 6,331,298
- 15 En un ejemplo, el compuesto capaz de potenciar la angiogénesis puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la solicitud de patente estadounidense 2004/0220393 o en la solicitud de patente estadounidense 2004/0209901.
- En un ejemplo, el compuesto inmunosupresor puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la solicitud de patente estadounidense 2004/0171623.
- 20 En un ejemplo, el compuesto que promueve la supervivencia de las células puede seleccionarse entre los compuestos divulgados en la solicitud de patente estadounidense 2010/0104542.
- 25 En un ejemplo, el factor de crecimiento puede ser al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en miembros de la familia TGF- $\beta$ , incluyendo TGF- $\beta$ 1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 y -13), factores de crecimiento de fibroblastos -1 y -2, factor de crecimiento derivado de plaquetas- A, -AB, y -BB, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento insulínico (IGF-I, II) factor de diferenciación de crecimiento (GDF-5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (VEGF), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros
- 30 compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor 1-alfa inducible por hipoxia, péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), mimeticuerpos GLP-1 y GLP-2, y II, Exendin-4, nodal, noggin, NGF, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de la trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen dominios de unión a células y heparina de proteínas de matriz extracelular adhesiva como fibronectina y vitronectina, e inhibidores de MAPK, como, por ejemplo, los compuestos divulgados en la solicitud de
- 35 patente estadounidense 2004/ 02099, solicitud de patente estadounidense 2004/ 0209901 y solicitud de patente estadounidense 2004/0132729.
- En un ejemplo, la porción celular se cultiva en condiciones hipóxicas.
- 40 En un ejemplo, la porción celular se somete a choque térmico.
- Fluido biológico que comprende orina: En un ejemplo, las microvesículas se obtienen a partir de orina. La orina puede obtenerse de un individuo sano o, alternativamente, de un individuo con un fenotipo de enfermedad particular. En un
- 45 ejemplo, las microvesículas se aíslan de un fluido biológico que comprende orina que comprende los pasos de:
- a) obtener una muestra de orina,  
b) clarificar la orina para eliminar restos celulares,  
c) precipitar las microvesículas añadiendo un agente precipitante a la orina clarificada,  
d) recoger las microvesículas precipitadas y lavar el material para eliminar el agente precipitante, y
- 50 e) suspender las microvesículas lavadas en una solución para su almacenamiento o uso posterior.
- En un ejemplo, la orina se clarifica por centrifugación.
- En un ejemplo, el agente precipitante es polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 6000. En un ejemplo, el polietilenglicol se utiliza a una concentración de aproximadamente 8,5 % p/v. En un ejemplo, el polietilenglicol se diluye
- 55 en una solución de cloruro de sodio que tiene una concentración final de 0,4 M.
- En un ejemplo, las microvesículas precipitadas se recolectan por centrifugación.
- En un ejemplo, las microvesículas aisladas se lavan mediante filtración centrífuga, utilizando una membrana con un corte
- 60 de peso molecular de 100 kDa, utilizando solución solución amortiguada con fosfato.
- En un ejemplo alternativo de la presente invención, los fluidos biológicos se clarifican por filtración. En un ejemplo alternativo, las microvesículas precipitadas se recolectan por filtración. En un ejemplo alternativo, los fluidos biológicos se clarifican y las microvesículas precipitadas se recogen por filtración.
- 65 En ciertos ejemplos, la filtración del fluido biológico y/o de las microvesículas precipitadas requiere la aplicación de una

fuerza externa. La fuerza externa puede ser la gravedad, ya sea gravedad normal o fuerza centrífuga. Alternativamente, la fuerza externa puede ser succión.

En un ejemplo, el presente ejemplo proporciona un aparato para facilitar la clarificación del fluido biológico por filtración. En un ejemplo, la presente divulgación proporciona un aparato para facilitar la recolección de las microvesículas precipitadas por filtración. En un ejemplo, la presente divulgación proporciona un aparato que facilita la clarificación del fluido biológico y la recogida de las microvesículas precipitadas por filtración. En un ejemplo, el aparato también lava las microvesículas.

En un ejemplo, el aparato es el aparato mostrado en la Figura 4. En este ejemplo, el fluido biológico se añade a la cámara interior. La cámara interior tiene un primer filtro con un tamaño de poro que permite el paso de las microvesículas, mientras que retiene cualquier partícula con un tamaño mayor que una microvesícula en la cámara interior. En un ejemplo, el tamaño de poro del filtro de la cámara interior es de  $1\ \mu\text{m}$ . En este ejemplo, cuando el fluido biológico pasa de la cámara interior a través del filtro, las partículas mayores de  $1\ \mu\text{m}$  son retenidas en la cámara interior, y todas las demás partículas se acumulan en la región entre el fondo de la cámara interior y un segundo filtro.

El segundo filtro tiene un tamaño de poro que no permite el paso de microvesículas. En un ejemplo, el tamaño de poro del segundo filtro de la cámara interior es de  $0,01\ \mu\text{m}$ . En este ejemplo, cuando el fluido biológico pasa a través del segundo filtro, las microvesículas son retenidas en la región entre el fondo de la cámara interior y el segundo filtro, y todas las partículas restantes y el fluido se acumulan en el fondo del aparato.

Una persona con conocimientos ordinarios en la técnica puede apreciar fácilmente que el aparato puede tener más de dos filtros, de diferentes tamaños de poro para seleccionar microvesículas de tamaños deseados, por ejemplo.

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

Las membranas de filtro utilizadas por el aparato de la presente divulgación pueden estar hechas de cualquier material adecuado, siempre que la membrana de filtro no reaccione con el fluido biológico, o se una con componentes dentro del fluido biológico. Por ejemplo, las membranas filtrantes pueden estar hechas de un material de bajo enlace, como, por ejemplo, polietersulfona, nylon6, politetrafluoroetileno, polipropileno, microfibras de vidrio modificadas zeta, nitrato de celulosa, acetato de celulosa, fluoruro de polivinilideno, celulosa regenerada.

Las microvesículas de la presente invención

En un ejemplo, las microvesículas de la presente divulgación tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 5000 nm según lo determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 1000 nm según lo determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 500 nm determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 400 nm determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 300 nm determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 200 nm determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 100 nm determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 20 nm determinado por microscopía electrónica. En un ejemplo alternativo, las microvesículas de la presente divulgación tienen un tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 10 nm determinado por microscopía electrónica.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente divulgación tienen un peso molecular de al menos 100 kDa.

Las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente divulgación pueden usarse para terapias. Alternativamente, las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente divulgación pueden usarse para pruebas de diagnóstico. Alternativamente, las microvesículas de la presente divulgación pueden utilizarse para alterar o manipular células o tejidos. En el caso de que las microvesículas de la presente divulgación se utilicen para alterar o manipular células o tejidos, las microvesículas pueden cargarse, etiquetarse con ARN, ADN, lípidos, carbohidratos, proteínas, fármacos, pequeñas moléculas, metabolitos o combinaciones de los mismos, que alterarán o manipularán una célula o tejido. Alternativamente, las microvesículas pueden aislarse de células o tejidos que expresen y/o contengan el ARN, ADN, lípidos, carbohidratos, proteínas, fármacos, pequeñas moléculas, metabolitos o combinaciones de los mismos.

Uso de las microvesículas de la presente divulgación en pruebas de diagnóstico

Las microvesículas de la presente divulgación pueden utilizarse en una prueba de diagnóstico que detecta biomarcadores

que identifican fenotipos particulares como, por ejemplo, una afección o enfermedad, o la etapa o progresión de una enfermedad. Los biomarcadores o marcadores de microvesículas específicas de células de origen pueden utilizarse para determinar regímenes de tratamiento para enfermedades, afecciones, estadios de enfermedad y estadios de una afección, y también pueden utilizarse para determinar la eficacia del tratamiento. Los marcadores de microvesículas específicas de la célula de origen también pueden utilizarse para identificar afecciones de enfermedades de origen desconocido.

Tal como se utiliza en la presente, el término "biomarcador" se refiere a un indicador de un estado biológico. Es una característica que se mide y evalúa objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Pueden evaluarse uno o más biomarcadores de la microvesícula para caracterizar un fenotipo. El biomarcador puede ser un metabolito, un ácido nucleico, péptido, proteína, lípido, antígeno, carbohidrato o proteoglicano, como ADN o ARN. El ARN puede ser ARNm, ARNm<sub>i</sub>, ARNsno, ARNs<sub>n</sub>, ARNr, ARNt, ARNs<sub>i</sub>, ARNh<sub>n</sub> o ARNsh.

Se puede caracterizar un fenotipo en un sujeto obteniendo una muestra biológica del sujeto y analizando una o más microvesículas de la muestra. Por ejemplo, la caracterización de un fenotipo de un sujeto o individuo puede incluir la detección de una enfermedad o afección (incluida la detección presintomática en estadio temprano), la determinación del pronóstico, diagnóstico o teranosis de una enfermedad o afección, o la determinación del estadio o progresión de una enfermedad o afección. La caracterización de un fenotipo también puede incluir la identificación de tratamientos apropiados o la eficacia de tratamientos para enfermedades, afecciones, estadios de enfermedad y etapas de afección específicas, predicciones y análisis de probabilidad de la progresión de la enfermedad, en particular la recurrencia de la enfermedad, la propagación metastásica o la recaída de la enfermedad. Un fenotipo también puede ser un tipo o subtipo clínicamente distinto de una afección o enfermedad, como un cáncer o tumor. La determinación del fenotipo también puede ser una determinación de una condición fisiológica, o una evaluación del sufrimiento de un órgano o del rechazo de un órgano, como después de una transplante. Los productos y procesos descritos en la presente permiten la evaluación de un sujeto de forma individual, lo que puede proporcionar beneficios de decisiones más eficientes y económicas en el tratamiento.

El fenotipo puede ser cualquiera de los fenotipos mencionados en la patente estadounidense 7.897.356. El fenotipo puede ser un tumor, una enfermedad o una infección. Un cáncer detectado o evaluado mediante los productos o procesos aquí descritos incluye, entre otros, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, pólipo hiperplásico, adenoma, cáncer colorrectal, displasia de alto grado, displasia de bajo grado, hiperplasia proestática, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer cerebral (como un glioblastoma), neoplasia hematológica, carcinoma hepatocelular, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), carcinoma de células renales (CCR) o cáncer gástrico. El cáncer colorrectal puede ser un CCR de Dukes B o Dukes C-D. La neoplasia hematológica puede ser leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma de células B-DLBCL, linfoma de células B-DLBCL de tipo centro germinal, linfoma de células B-DLBCL de tipo células B activadas y linfoma de Burkitt. El fenotipo también puede ser una afección premaligna, como el esófago de Barrett.

El fenotipo también puede ser una enfermedad inflamatoria, inmunitaria o autoinmunitaria. Por ejemplo, la enfermedad puede ser una enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU), inflamación pélvica, vasculitis, psoriasis, diabetes, hepatitis autoinmune, esclerosis múltiple, miastenia grave, diabetes de tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, espondilitis anquilosante, enfermedad de Sjögrens, síndrome de CREST, esclerodermia, enfermedad reumática, rechazo de órganos, enfermedad de injerto contra huésped, colangitis esclerosante primaria o sepsis.

El fenotipo también puede ser una enfermedad cardiovascular, como aterosclerosis, insuficiencia cardíaca congestiva, placa vulnerable, apoplejía o isquemia. La enfermedad o afección cardiovascular puede ser hipertensión, estenosis, oclusión vascular o un evento trombótico.

El fenotipo también puede ser una enfermedad neurológica, como la esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Alzheimer (EA), esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, autismo, enfermedad de Prion, enfermedad de Pick, demencia, enfermedad de Huntington (EH), síndrome de Down, enfermedades cerebrovasculares, encefalitis de Rasmussen, meningitis vírica, lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico (LESNPS), esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, encefalopatía espongiiforme transmisible, daño por reperfusión isquémica (por ejemplo, accidente cerebrovascular), traumatismo cerebral, infección microbiana o síndrome de fatiga crónica. El fenotipo también puede ser una afección como la fibromialgia, el dolor neuropático crónico o el dolor neuropático periférico.

El fenotipo también puede ser una enfermedad infecciosa, como una infección bacteriana, vírica o por hongos. Por ejemplo, la enfermedad o afección puede ser la enfermedad de Whipple, la enfermedad de Prion, cirrosis, staphylococcus aureus resistente a la meticilina, VIH, hepatitis, sífilis, meningitis, malaria, tuberculosis o influenza. Las proteínas virales, como las partículas similares al VIH o al VHC, pueden evaluarse en un exosoma, para caracterizar una afección viral.

El fenotipo también puede ser una afección perinatal o relacionada con el embarazo (por ejemplo, preeclampsia o parto prematuro), una enfermedad o afección metabólica, como una enfermedad o afección metabólica asociada con el metabolismo del hierro. La enfermedad o afección metabólica también puede ser diabetes, inflamación o una afección

perinatal.

El fenotipo puede detectarse mediante cualquier método de ensayo adecuado, como, por ejemplo, western blots, ELISA, PCR y similares. Los métodos de ensayo pueden combinarse para realizar análisis multiplexados de más de un fenotipo. Ejemplos de métodos de ensayo que pueden aplicarse a las microvesículas de la presente invención se divulgan en las solicitudes PCT WO2009092386A3 y WO2012108842A1.

En el caso en que el biomarcador sea ARN, el ARN puede aislarse de las microvesículas de la presente invención mediante los métodos divulgados en la patente estadounidense 8,021,847.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para las enfermedades divulgadas en la patente estadounidense 7,897,356.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para el cáncer de acuerdo con los métodos divulgados en la patente estadounidense 8,211,653.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para el cáncer de acuerdo con los métodos divulgados en la patente estadounidense 8,216,784.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para el cáncer de próstata de acuerdo con los métodos divulgados en la patente estadounidense 8,278,059.

En un ejemplo, las microvesículas de la invención presente se usan en una prueba de diagnóstico para el pronóstico para la supervivencia del cáncer de acuerdo con los métodos divulgados en la patente estadounidense 8,343,725.

En un ejemplo, las microvesículas de la invención presente se usan en una prueba de diagnóstico para el pronóstico para la supervivencia del cáncer de acuerdo con los métodos divulgados en la patente estadounidense 8,349,568.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para la leucemia linfónica aguda de acuerdo con los métodos divulgados en la patente estadounidense 8,349,560.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para la leucemia linfónica aguda de acuerdo con los métodos divulgados en la patente estadounidense 8,349,561.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para el virus de la hepatitis C. En un ejemplo, el ARN viral de la hepatitis C se extrae de las microvesículas de la presente invención de acuerdo con los métodos descritos en la patente estadounidense 7,807,438 para probar la presencia del virus de la hepatitis C en un paciente.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para determinar la respuesta de un paciente a la terapia contra el cáncer de acuerdo con los métodos divulgados en la patente estadounidense 8,349,574.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para diagnosticar tumores malignos de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud de patente estadounidense US20120058492A1.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para diagnosticar cáncer o resultados adversos del embarazo de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud de patente estadounidense US20120238467A1.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico de eventos cardiovasculares de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud de patente estadounidense US20120309041A1.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico de eventos cardiovasculares de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud de patente estadounidense US20120309041A1.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico de eventos cardiovasculares de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud PCT WO2012110099A1.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico de eventos cardiovasculares de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud PCT WO2012126531A1.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico de eventos cardiovasculares de acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud PCT WO2013110253A3.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para melanoma de

acuerdo con los métodos divulgados en la solicitud PCT WO2012135844A2.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan en una prueba de diagnóstico para melanoma metastásico analizando microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención para la presencia del biomarcador BRAF. La presencia de BRAF puede determinarse mediante western blot o, alternativamente, mediante PCR. En un ejemplo, la prueba de melanoma metastásico es capaz de detectar BRAF de tipo silvestre y maligno. En un ejemplo, la prueba de melanoma metastásico es capaz de detectar variantes de corte y empalme del BRAF maligno.

En un ejemplo, las microvesículas que se usan en la prueba de diagnóstico de melanoma metastásico se aíslan usando un método que comprende los pasos descritos en la Figura 3.

En un ejemplo, las microvesículas se obtienen de un paciente que desea ser diagnosticado de la presencia de melanoma metastásico. En un ejemplo, las microvesículas se obtienen del plasma del paciente.

En un ejemplo, la presencia de melanoma metastásico se determina mediante PCR, usando uno de los dos conjuntos de cebadores siguientes:

Secuencia 1:

Directo: AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA  
Inverso: CTGATGGGACCCACTCCATC  
Longitud del amplicón: 70

Secuencia 2:

Directo: GAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG  
Inverso: CTGATGGGACCCACTCCATC  
Longitud del amplicón: 82

En otro ejemplo, la presencia de melanoma metastásico se determina mediante western blot, usando el anticuerpo de ratón anti-BRAF V600E (NewEast Biosciences, Malvern, PA).

Uso de las microvesículas de la presente invención en terapias

Las microvesículas de la presente invención pueden usarse como terapia para tratar una enfermedad.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan como vacunas de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente estadounidense US20030198642A1.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan para modular o suprimir la respuesta inmunitaria de un paciente de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente estadounidense US20060116321A1.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan para modular o suprimir la respuesta inmunitaria de un paciente de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente PCT WO06007529A3.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan para modular o suprimir la respuesta inmunitaria de un paciente de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente PCT WO2007103572A3.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan para modular o suprimir la respuesta inmunitaria de un paciente de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente estadounidense 8,288,172.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan como terapia para el cáncer de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente PCT WO2011000551A1.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan como terapia para el cáncer o una enfermedad inflamatoria de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud de patente estadounidense US20120315324A1.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan como terapia para lesiones vasculares de acuerdo con los métodos descritos en la patente estadounidense 8,343,485.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan para administrar moléculas a las células. El suministro de moléculas puede ser útil para tratar o prevenir una enfermedad. En un ejemplo, la administración se realiza de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud PCT WO04014954A1. En un ejemplo alternativo, la administración se realiza de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud PCT WO2007126386A1. En un ejemplo alternativo, la administración se realiza de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud PCT WO2009115561A1. En un ejemplo alternativo, la administración se realiza de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud PCT WO2010119256A1.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan para promover o mejorar la cicatrización de heridas. En un ejemplo, la herida es una quemadura de espesor total. En un ejemplo, la herida es una quemadura de segundo grado.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan para promover o mejorar la angiogénesis en un paciente.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan para promover o mejorar la regeneración neuronal en un paciente.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan para reducir la formación de cicatrices en un paciente.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se usan para reducir la formación de arrugas en la piel de un paciente.

En un ejemplo, las microvesículas de la presente invención se utilizan para organizar la regeneración de tejidos complejos en un paciente.

En un ejemplo, la presente invención proporciona una preparación aislada de microvesículas que puede promover la regeneración funcional y la organización de estructuras tisulares complejas. En un ejemplo, la presente invención proporciona una preparación aislada de microvesículas que puede regenerar tejido hematopoyético en un paciente con anemia aplásica. La presente invención proporciona una preparación aislada de microvesículas que puede regenerar al menos un tejido en un paciente con piel enferma, dañada o ausente seleccionada del grupo que consiste en: En un ejemplo, la presente invención proporciona una preparación aislada de microvesículas que puede regenerar tejido y/o células de las tres capas germinales.

En un ejemplo, la presente invención proporciona una preparación aislada de microvesículas que se utiliza para modular el sistema inmunitario de un paciente.

En un ejemplo, la presente invención proporciona una preparación aislada de microvesículas que mejora la supervivencia de tejido o células que se trasplantan a un paciente. En un ejemplo, el paciente se trata con la preparación aislada de microvesículas antes de recibir el tejido o las células trasplantadas. En un ejemplo alternativo, el paciente es tratado con la preparación aislada de microvesículas después de recibir el tejido o las células trasplantadas. En un ejemplo alternativo, el tejido o las células se tratan con la preparación aislada de microvesículas. En un ejemplo, el tejido o las células se tratan con la preparación aislada de microvesículas antes del trasplante.

En un ejemplo, la presente invención proporciona una preparación aislada de microvesículas que contiene al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en ARN, ADN, lípido, carbohidrato, metabolito, proteína y combinación de los mismos de una célula hospedera. En un ejemplo, la célula hospedera está diseñada para expresar al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en ARN, ADN, lípido, carbohidrato, metabolito, proteína y combinación de los mismos. En un ejemplo, la preparación aislada de microvesículas que contienen al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en ARN, ADN, lípido, carbohidrato, metabolito, proteína, y combinación de los mismos de una célula hospedera se usa como agente terapéutico.

La presente invención se ilustra, además, pero no se limita a, los siguientes ejemplos.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Aislamiento de microvesículas del medio de cultivo celular por ultracentrifugación

Este ejemplo ilustra el método habitual por el que se aíslan microvesículas del medio de cultivo celular, o de cualquier fluido biológico. En la Figura 1 se muestra un esquema del método para aislar microvesículas del medio de cultivo celular. En resumen, las células se cultivan en medio suplementado con suero libre de microvesículas (el suero se puede desproveer de microvesículas por ultracentrifugación, filtración, precipitación, etc.). Tras cultivar las células durante cierto tiempo, se retira el medio, se transfiere a tubos cónicos y se centrifuga a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar las células. Después, el sobrenadante se transfiere a nuevos tubos cónicos y se centrifuga a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C para eliminar más células y restos celulares. Esto puede ir seguido de otro paso de centrifugación (por ejemplo, 10000 x g durante 30 minutos para eliminar aún más los restos celulares y/o eliminar las microvesículas más grandes). El sobrenadante resultante se transfiere a tubos de ultracentrifuga, se pesa para asegurar un peso igual y se ultracentrifuga a 70000+ x g durante 70 minutos a 4 °C para sedimentar las microvesículas.

El sobrenadante se desecha y el sedimento se resuspende en PBS helado. La solución se ultracentrifuga a 70000+ x g durante 70 minutos a 4 °C para sedimentar las microvesículas. El sedimento enriquecido en microvesículas se resuspende en un pequeño volumen (aproximadamente 50-100 µl de un amortiguador apropiado (por ejemplo, PBS).



**Ejemplo 2: Aislamiento de microvesículas a partir de medio de cultivo celular mediante los métodos de la presente invención**

Este ejemplo ilustra cómo se aíslan las microvesículas del medio de cultivo celular por los métodos de la presente invención. En las Figuras 2 y 3 se muestra un esquema del método para aislar microvesículas del medio que tiene células cultivadas. En resumen, las células se cultivan en medio suplementado con suero libre de microvesículas (el suero se puede eliminar de microvesículas por ultracentrifugación, filtración, precipitación, etc.). Tras cultivar las células durante cierto tiempo, se retira el medio, se transfiere a tubos cónicos y se centrifuga a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar las células. Después, el sobrenadante se transfiere a nuevos tubos cónicos y se centrifuga a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C para eliminar más células y restos celulares. Esto puede ir seguido de otro paso de centrifugación (por ejemplo, 10000 x g durante 30 minutos para eliminar aún más los restos celulares y eliminar las partículas más grandes).

A continuación, las microvesículas se precipitan a 4 °C utilizando 8,5 % p/v de PEG 6000 y 0,4 M de NaCl. Esta mezcla se centrifuga a 10000 x g a 4 °C durante 30 minutos. Se elimina el sobrenadante y el sedimento se resuspende en un amortiguador adecuado (por ejemplo, PBS). Puede utilizarse para reacciones de flujo descendente inmediatas o purificarse más. Otros procedimientos de purificación pueden incluir el uso de filtros centrifugos (p. ej., MWCO de 100 kDa), inmunoafinidad, HPLC, filtración de flujo tangencial, separación/partición de fases, microfluidos, etc.

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

Se solicitó médula ósea humana de donante normal a AllCells LLC (Emeryville, CA, <http://www.all-cells.com>). Las MSC se aislaron mediante un método estándar de adherencia plástica. Las células mononucleares de médula ósea se aislaron mediante centrifugación de baja densidad utilizando Ficoll-Paque Premium (densidad: 1,077 g/ml) de acuerdo con el protocolo del fabricante (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Las células mononucleares se recogieron en la interfase, se lavaron tres veces en solución amortiguada con fosfato (PBS) suplementada con FBS al 2 % (Atlanta Biologies, Atlanta, GA), y se resuspendieron en medio MSC consistente en medio esencial alfa mínimo (a-MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) y FBS al 20 %, Penicilina/Estreptomicina al 1 % (Lonza, Allendale, NJ) y glutamina al 1 % (Lonza).

Los cultivos iniciales de CMM o células mononucleares se sembraron entre 2-3 x 10<sup>5</sup> células/cm en placas tratadas con cultivo tisular (BD Biosciences, San Jose, CA) y se colocaron en una incubadora celular a 37 °C en aire humidificado al 95 % y CO<sub>2</sub> al 5 %. Transcurridas 48-72 horas, se retiraron las células no adherentes, se enjuagaron los frascos de cultivo una vez con PBS y se añadió medio fresco al frasco. Las células se cultivaron hasta alcanzar el 80 % de confluencia y, después, se pasaron por tripsina-EDTA (Life technologies, Carlsbad, CA). Las células se dividieron en una proporción de 1:4 en multiflasks de 5 capas (BD Biosciences). Alternativamente, las MSC criopreservadas se descongelaron a 37 °C y se cultivaron inmediatamente en a-MEM suplementado con un 20 % de suero bovino fetal libre de microvesículas y un 1 % de penicilina/estreptomicina/glutamina a 37 °C en aire humidificado al 95 % y un 5 % de CO<sub>2</sub>. Se expandieron de forma similar a la anterior.

Las células se cultivaron en los multifrascos hasta alcanzar una confluencia del 80-90 %. Los matraces se enjuagaron dos veces con PBS y a-MEM suplementado con 1 %.

Se añadió penicilina/estreptomicina/glutamina. Después de 24 horas, el medio condicionado se transfirió a tubos de centrifuga cónicos de 50mL (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) e inmediatamente se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar cualquier célula no adherente. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos de centrifuga cónicos de 50 ml y se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C para eliminar más células y restos celulares.

Se recogieron los sobrenadantes y se colocaron en recipientes estériles desechables de polipropileno de 250 ml (Corning, Corning, NY). Al sobrenadante se le añadió polietilenglicol libre de masa y proteasa de peso molecular promedio 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final 0,4 M). La solución se colocó en una cámara frigorífica a 4 °C durante toda la noche con rotación. La solución se transfirió a tubos de centrifuga cónicos de 50 mL y se centrifugó a 10000x g a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento enriquecido en microvesículas se resuspendió en solución amortiguada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrifugo amicon ultra 15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtrado se lavaron con solución solución amortiguada con fosfato y se centrifugaron de nuevo a 5000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200 µl) del fondo del dispositivo de filtrado. La concentración de proteínas se determinó mediante el equipo de ensayo de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso posterior (por ejemplo, extracción de proteínas, ARN y ADN).

**Ejemplo 4: Aislamiento de microvesículas a partir de plasma mediante los métodos de la presente invención**

Se recogieron aproximadamente 6-8 ml de sangre (humana y porcina) mediante venopunción y se colocaron en tubos BD Vacutainer de plástico EDTA de color lavanda (BD Biosciences, San Jose, CA). Los tubos de venopunción se centrifugaron

a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo el plasma (aproximadamente 3-4 ml) y se colocó en nuevos tubos de centrifuga cónicos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL). Se añadió medio esencial mínimo alfa estéril (a-MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) en una proporción de 1:10 (plasma/medio).

- 5 A la solución se le añadió polietilenglicol libre de masa y proteasa de peso molecular promedio 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final 0,4 M). La solución se colocó en una cámara frigorífica a 4 °C durante toda la noche con rotación. La solución se centrifugó a 10000 x g a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento enriquecido en microvesículas se resuspendió en solución solución amortiguada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrífugo amicon ultra 15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtrado se lavaron con solución salina amortiguada por fosfatos y se centrifugaron de nuevo a 5000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200-400 µl) del fondo del dispositivo de filtrado. La concentración de proteínas se determinó mediante el equipo de ensayo de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso posterior (por ejemplo, extracción de proteínas, ARN y ADN).

#### **Ejemplo 5: Aislamiento de microvesículas a partir de aspirado de médula ósea mediante los métodos de la presente invención**

- 20 Se aisló médula ósea de cerdo de la cresta ilíaca. La zona de la piel se limpió cuidadosamente con povidina yodada al 7,5 % e isopropanol al 70 %. Se insertó un trocar de 3 mm de calibre 11 (Ranafac, Avon, MA) en la cresta ilíaca. Se cargó una jeringa de aspiración con 5000 - 1000 unidades de heparina para evitar la coagulación de la muestra de médula. Se aspiraron aproximadamente 20-25 ml de médula y la solución se transfirió a tubos de centrifuga cónicos de 50 ml. Alternativamente, se adquirió médula ósea humana de donante normal (aproximadamente 50 ml) de AllCells LLC (Emeryville, CA,

- Los tubos cónicos de 50 ml se centrifugaron a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recolectó el sobrenadante (la porción acelular) (aproximadamente 10-12 ml por cada 50 ml) y se colocó en nuevos tubos de centrifuga cónicos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL). Se añadió medio esencial mínimo alfa estéril (a-MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) en una proporción de 1:10 (sobrenadante de médula ósea/medio). La solución se transfirió a nuevos tubos cónicos de 50 ml y se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos cónicos de 50 ml y a esta solución se añadieron polietilenglicol libre de masa y proteasa de peso molecular medio 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final 0,4 M).

- 35 La solución se colocó en una cámara frigorífica a 4 °C durante toda la noche con rotación. La solución se centrifugó a 10000 x g a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento enriquecido en microvesículas se resuspendió en solución solución amortiguada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrífugo amicon ultra 15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtrado se lavaron con solución solución amortiguada con fosfato y se centrifugaron de nuevo a 5000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200-400 µl) del fondo del dispositivo de filtrado. La concentración de proteínas se determinó mediante el equipo de ensayo de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso posterior (por ejemplo, extracción de proteínas, ARN y ADN).

- 45 La porción celular se recolectó y procesó para el aislamiento de vástagos mesenquimales o para el aislamiento completo de médula ósea.

#### **Ejemplo 6: Aislamiento de microvesículas a partir de orina mediante los métodos de la presente invención**

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

- Los tubos cónicos de 50 ml se centrifugaron a 400 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se retiró y se centrifugó. El sobrenadante se retiró y se colocó en nuevos tubos cónicos de centrifugación de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL). La solución se transfirió a nuevos tubos cónicos de 50 ml y se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos cónicos de 50 ml y a esta solución se añadieron polietilenglicol libre de masa y proteasa de peso molecular medio 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final 0,4 M).

- 60 La solución se colocó en una cámara frigorífica a 4 °C durante toda la noche con rotación. La solución se centrifugó a 10000 x g a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento enriquecido en microvesículas se resuspendió en solución salina amortiguada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrífugo amicon ultra 15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtrado se lavaron con solución solución amortiguada con fosfato y se centrifugaron de nuevo a 5000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200-400 µl) del fondo del dispositivo de filtrado. La concentración de proteínas se determinó mediante el equipo de ensayo

de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso posterior (por ejemplo, extracción de proteínas, ARN y ADN).

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

La médula ósea se obtuvo a partir de un aspirado (véase el ejemplo 1) y los glóbulos rojos se lisaron utilizando una solución de cloruro de amonio al 0,8 % que contenía EDTA 0,1 mM (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC). Las células nucleadas se sedimentaron en un cojín de suero fetal bovino (Atlanta Biologies, Atlanta, GA) a 400 X g durante 5 minutos. Las células nucleadas se lavaron en medio McCoy's 5a (Mediatech Inc., Manassas, VA) por sedimentación a 400 x g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en medio de cultivo a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml y se sembraron en matraces de 25, 75 o 225 cm (Corning, Corning, NY).

Los medios de cultivo consistían en medio 5a de McCoy, 1 % bicarbonato de sodio (Life technologies, Carlsbad, CA), 0-4 % MEM aminoácidos no esenciales (Life Technologies), 0-8 % MEM aminoácidos esenciales (Life technologies), 1 % L-glutamina (Lonza, Allendale, NJ), 0,1 mM de hidrocortisona (Life Technologies), 1 % de penicilina/estreptomicina (Lonza), 12-5 % de suero fetal de ternera (Atlanta Biologies) y 12-5 % de suero de caballo (Stem Cell Technology). Los cultivos se incubaron a 33 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. La alimentación se realizó semanalmente añadiendo la mitad del volumen original de medio sin retirar ningún medio durante las primeras nueve semanas de cultivo. Si los cultivos crecían más de nueve semanas, el volumen de medio de cultivo se reducía al volumen original y cada semana se añadía la mitad del volumen original de medio fresco.

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

Después de 24 horas, el sobrenadante se transfirió a tubos de centrifuga cónicos de 50mL (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) e inmediatamente se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C para pelar cualquier célula no adherente. El medio original almacenado se añadió de nuevo a las células. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos de centrifuga cónicos de 50 ml y se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C para eliminar más células y restos celulares.

Se recogió el sobrenadante y se colocó en recipientes estériles desechables de polipropileno de 250 ml (Corning, Corning, NY). Al sobrenadante se le añadió polietilenglicol libre de masa y proteasa de peso molecular promedio 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final 0,4 M). La solución se colocó en una cámara frigorífica a 4 °C durante toda la noche con rotación. La solución se transfirió a tubos de centrifuga cónicos de 50 mL y se centrifugó a 10000x g a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento enriquecido en microvesículas se resuspendió en solución amortiguada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrifugo amicon ultra 15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtrado se lavaron con solución amortiguada con fosfato y se centrifugaron de nuevo a 5000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200 µl) del fondo del dispositivo de filtrado. La concentración de proteínas se determinó mediante el equipo de ensayo de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso posterior (por ejemplo, extracción de proteínas, ARN y ADN).

#### **Ejemplo 8: Análisis de las microvesículas de la presente invención**

Las muestras de microvesículas se analizaron por microscopía electrónica. Para la microscopía electrónica de transmisión (TEM), cada espécimen de microvesículas se cargó en rejillas de cobre de malla 150 recubiertas de formvar (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) durante 20 minutos. Las rejillas se escurrieron y se dejaron flotar en gotas de glutaraldehído al 2 % durante 5 minutos, después se lavaron en agua bidestilada (DDOH), seguidas de tinción en gotas de acetato de uranilo acuoso al 4 % y múltiples lavados en DDOH. Las rejillas se examinaron a 80kV en un microscopio electrónico Philips CM 10.

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

Las Figuras 5 a 7 ilustran las diferencias entre las microvesículas aisladas por los métodos de la presente divulgación en

comparación con el aislamiento por ultracentrifugación. Las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención tienen bordes que son más lisos, no corrugados y parecen más "intactos."

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

Para analizar la expresión de proteínas en muestras de microvesículas, las células y microvesículas se lisaron en amortiguador RIPA (Cell signaling technology, Danvers, MA) y la concentración de proteínas se estimó mediante el equipo de ensayo microBSA (Pierce, Rockford, IL). Aproximadamente 20 microgramos de lisado se cargaron en cada carril y las membranas se sondearon durante la noche (1:1000) con anticuerpo conejo anti-63 (SBI Biosciences, Mountain View, CA), conejo anti-hsp70 (SBI Biosciences), conejo STAT3 (Cell signaling technology), y/o conejo fosfo-STAT3 (Cell signaling technology).

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

#### **Ejemplo 9: Efecto de las microvesículas de la presente invención sobre la proliferación y migración de fibroblastos**

Para estudiar la capacidad de las microvesículas de la presente invención para promover o mejorar la cicatrización de heridas, se probó la capacidad de las microvesículas para estimular la proliferación de fibroblastos dérmicos. Los fibroblastos dérmicos humanos adultos normales se obtuvieron de Life Technology (Carlsbad, CA). Los fibroblastos de pacientes con heridas crónicas (úlceras del pie por presión y úlcera del pie diabético) se recolectaron conforme a un protocolo aprobado por el IRB (IND# BB IND 13201) de heridas de 2 años de duración sin evidencia de cicatrización a pesar de los tratamientos estándar y avanzados para el cuidado de heridas. Se sembraron fibroblastos de heridas normales y crónicas a razón de 5 x 10<sup>4</sup> células por pocillo en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (BD Biosciences, San Jose, CA). Se realizaron ensayos de proliferación celular con MTT el día 0 y el día 3. Se añadieron microvesículas el día 0. Tanto las microvesículas aisladas por PEG como las aisladas por ultracentrifugación fueron aproximadamente equivalentes en el aumento del crecimiento de fibroblastos normales y de fibroblastos de heridas crónicas al cabo de 3 días. La solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) y el medio MSC condicionado desprovisto de microvesículas mostraron escaso crecimiento. Véase la Figura 12.

En los experimentos de cocultivo, se sembraron fibroblastos adultos normales y fibroblastos de una úlcera de pie diabético en placas de veinticuatro pocillos. Cada pocillo se sembró hasta alcanzar el 100 % de confluencia (aproximadamente 1x10<sup>5</sup> células por pocillo). Para evitar la influencia de la proliferación celular, 2 horas antes del raspado se sustituyó el medio por un medio de cultivo fresco sin suero que contenía mitomicina a 10 mg/ml. A continuación, se rayó la monocapa confluyente con una punta de pipeta estéril de 1 ml para dejar un raspado de 0,4-0,5 mm de anchura. A continuación, se retiró inmediatamente el medio de cultivo (junto con las células desprendidas). El medio eliminado se sustituyó por medio de cultivo fresco (10 % de FBS) que contenía microvesículas (PEG o derivadas de ultracentrifuga), PBS o medio condicionado de MSC desprovisto de microvesículas. La zona raspada se monitorizó recogiendo imágenes digitalizadas inmediatamente después del raspado y 3 días después del tratamiento. Las imágenes digitalizadas se capturaron con un microscopio Olympus TX81 invertido (Olympus America, Center Valley, PA, <http://www.olympusamerica.com>) y una cámara digital Hamamatsu ORCA-AG (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Pref. de Shizuoka, Japón, <http://www.hamamatsu.com>). Tres días después del tratamiento, las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención mostraron la mayor migración (esencialmente cerrando la herida), seguidas de las microvesículas derivadas de ultracentrifuga. Los controles (PBS) y el medio condicionado MSC desprovisto en microvesículas (desprovisto) mostraron poca migración. Véase la Figura 13.

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

#### **Ejemplo 10: Captación de las microvesículas de la presente invención en células**

Las microvesículas de MSC humanas aisladas del medio condicionado de acuerdo con los métodos de la presente invención se etiquetaron con el colorante de enlace celular fosfolípido PKH-26 (rojo) según las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los fibroblastos de piel normal se marcaron con Vybrant-Dio (Life Technology) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fibroblastos de piel normal se colocaron en placas de 4 pocillos recubiertas de fibronectina (Sigma-Aldrich) Nunc\* Lab-Tek\* II Chamber Slides (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) (5 x 10 células por pocillo). Las células se tiñeron con el colorante nuclear Hoechst 33342 (Life Technology) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fibroblastos marcados con Dio se trataron con microvesículas etiquetadas con PKH-26 durante 24

horas. Las imágenes se capturaron con un microscopio Olympus 1X81 invertido y una cámara digital Hamamatsu ORCA-AG. Los fibroblastos dérmicos normales (teñidos con el colorante verde de membrana lipídica Dio) demostraron la captación de MV MSC humanas etiquetadas con PKH-26 aisladas por precipitación con PEG en una localización perinuclear. Véanse la Figura 15 y Figura 16. En la Figura 16, las microvesículas se observan en una localización perinuclear.

#### **Ejemplo 11: Uso de las microvesículas de la presente invención como diagnóstico de la artritis reumatoide**

Se colocaron fibroblastos dérmicos normales a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos (BD Biosciences). Los fibroblastos se privaron de suero durante la noche y se trataron con PBS (control), 10 microgramos de microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención a partir de plasma obtenido de un paciente que padece artritis reumatoide (Precipitación MV PEG de plasma humano); microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención a partir de medio acondicionado con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (Precipitación MV PEG de hMSC humanas); microvesículas aisladas mediante ultracentrifugación a partir de medio acondicionado con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (ultracentrifugación MV de hMSC humanas); control de PBS; y un control de medio desprovisto (medio acondicionado de hMSC desprovisto de MV). La cantidad de fosforilación de STAT3 observada en los fibroblastos fue mayor en las microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención. Véase la Figura 17.

#### **Ejemplo 12: Uso de las microvesículas de la presente invención como diagnóstico del melanoma metastásico**

BRAF es un gen humano que produce una proteína llamada B-Raf. Se han identificado más de 30 mutaciones del gen BRAF asociadas con cánceres humanos. Hemos diseñado por cebadores para amplificar la forma mutada de BRAF que está relacionada con el melanoma metastásico. La mutación es una mutación T1799A en el exón 15 de BRAF. Esto provoca la sustitución de valina (V) por glutamato (E) en el codón 600 (ahora denominado V600E). La presencia de esta mutación es necesaria para el tratamiento con el inhibidor de BRAF Vemurafenib.

Se sabe que la línea celular SK-Mel28, obtenida de ATCC (Washington DC, Maryland) tiene la mutación T1799A en el exón 15 de BRAF. Las microvesículas, aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención, se obtuvieron a partir de medio condicionado por una incubación de 3 días en EMEM (ATCC) + 10 % de suero (Atlanta biologics, Atlanta, Georgia).

Las microvesículas aisladas se procesaron para aislar ADN y ARN utilizando el equipo AUPrep ADN/ARN de Qiagen (Hilden, Alemania). Aproximadamente 50 ng de ARN de células SK-MEL28 y microvesículas se transcribieron inversamente usando la supermezcla de transcripción inversa de iScript™ (Biorad, Hercules, CA). Se utilizó una alícuota de 2 μl para la PCR utilizando Platinum® PCR SuperMix (Life technology) siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, se utilizaron 80 ng de ADN de células SK-MEL28 y microvesículas para la PCR utilizando Platinum® PCR SuperMix según las instrucciones del fabricante. Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 3% y se visualizaron con el sistema gel-doc de Biorad. Los resultados se muestra en la FIGURA 18.

Los cebadores utilizados fueron:

Secuencia 1:

Directo: AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA  
Inverso: CTGATGGGACCCACTCCATC  
Longitud del amplicón: 70

Secuencia 2:

Directo: GAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG  
Inverso: CTGATGGGACCCACTCCATC  
Longitud del amplicón: 82

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

#### **Ejemplo 13: Aislamiento de microvesículas a partir de medio condicionado usando un cultivo de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea etiquetadas con GFP mediante los métodos de la presente invención**

Los ratones transgénicos homocigotos que expresan la Proteína Fluorescente Verde (GFP) mejorada bajo la dirección del promotor de ubiquitina C humana (C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J) se obtuvieron de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Se sabe que estos ratones expresan GFP en todos los tejidos.

Los ratones GFP (de aproximadamente 3-4 semanas de edad) fueron eutanasiados por asfixia con CO<sub>2</sub>. Las extremidades se cortaron por encima de la cadera y por debajo de la articulación del tobillo. Se cosecharon las extremidades traseras y se retiró la piel, el músculo y todo el tejido conectivo. A continuación, se colocaron los huesos en un plato con IX PBS estéril helado y se lavaron varias veces en PBS. Los extremos de cada hueso se cortaron con tijeras. Se forzó una jeringa de 10 cc con medio calentado (a-MEM suplementado con un 20 % de suero bovino fetal y un 1 % de penicilina/estreptomicina/glutamina) a través del vástago óseo para extraer toda la médula ósea en una placa de 150 mm. Esto se repitió varias veces para asegurarse de que se extraía toda la médula. La mezcla celular se pipeteó varias veces para disociar las células y la suspensión celular se pasó por un colador celular (tamaño 70µm) (BD Biosciences, San Jose, CA) para eliminar los grumos celulares grandes o las partículas óseas. Los cultivos iniciales se sembraron entre 2-3 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> en placas tratadas con cultivo tisular (BD Biosciences, San Jose, CA) y se colocaron en una incubadora celular a 37 °C en aire humidificado al 95 % y CO<sub>2</sub> al 5 %. Transcurridas 72-96 horas, se retiraron las células no adherentes, se enjuagaron los frascos de cultivo una vez con PBS y se añadió medio fresco al frasco. Las células se cultivaron hasta alcanzar el 80 % de confluencia y, después, se pasaron por tripsina-ED-TA (Life technologies, Carlsbad, CA). Las células se dividieron en una proporción de 1:4.

Alternativamente, las MSC de ratón GFP criopreservadas se descongelaron a 37 °C y se cultivaron inmediatamente en a-MEM suplementado con suero bovino fetal al 20 % y penicilina/estreptomicina/glutamina al 1 % a 37 °C en aire humidificado al 95 % y CO<sub>2</sub> al 5 %. Se expandieron de forma similar a la anterior.

Las células se cultivaron en los matraces hasta alcanzar el 100 % de confluencia (aproximadamente 1 semana). El sobrenadante se transfirió a tubos de centrifuga cónicos de 50mL (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) e inmediatamente se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C para pelar cualquier célula no adherente. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos de centrifuga cónicos de 50 ml y se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C para eliminar más células y restos celulares.

Se recogieron los sobrenadantes y se colocaron en recipientes estériles desechables de polipropileno de 250 ml (Corning, Corning, NY). Al sobrenadante se le añadió polietilenglicol libre de masa y proteasa de peso molecular promedio 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final 0,4 M). La solución se colocó en una cámara frigorífica a 4 °C durante toda la noche con rotación. La solución se transfirió a tubos de centrifuga cónicos de 50 mL y se centrifugó a 10000x g a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento enriquecido en microvesículas se resuspendió en solución amortiguada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrifugo amicon ultra 15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtrado se lavaron con solución amortiguada con fosfato y se centrifugaron de nuevo a 5000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200-400 µl) del fondo del dispositivo de filtrado. La concentración de proteínas se determinó mediante el equipo de ensayo de proteínas micro BSA (Pierce, Rockford, IL) y la solución de microvesículas enriquecida se almacenó a -70 grados o se procesó para su uso posterior (por ejemplo, extracción de proteínas, ARN y ADN).

Para determinar la captación celular de las microvesículas, se marcaron fibroblastos de piel humana normal con Vybrant-Dio (Life technology) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fibroblastos de piel normal se colocaron en placas de 4 pocillos recubiertas de fibronectina (Sigma-Aldrich) Nunc\* Lab-Tek\* II Chamber Slides (Thermo Fisher Scientific Inc) (5 x 10 células por pocillo). Las células se tiñeron con el colorante nuclear Hoechst 33342 (Life Technology) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fibroblastos etiquetados con Dil se trataron con microvesículas aisladas de MSC de ratón que expresaban GFP durante 24 horas. Las imágenes se capturaron con un microscopio Olympus TX81 invertido y una cámara digital Hamamatsu ORCA-AG. Véanse la FIGURA 20 y FIGURA 21. Es importante destacar que estas imágenes muestran que las microvesículas que contienen GFP fueron absorbidas por las células.

#### **Ejemplo 14: Uso de las microvesículas de la presente invención como terapia para promover o mejorar la cicatrización de heridas**

Se crearon heridas de espesor total en la espalda de cerdos utilizando un instrumento de biopsia en sacabocados de 10 mm. Se aislaron microvesículas a partir de un medio de cultivo acondicionado con células madre mesenquimales autólogas derivadas de la médula ósea, bien de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1 (el método de ultracentrifugación "convencional"), bien con los métodos descritos en el Ejemplo 3. Se administraron 30 microgramos de microvesículas a las heridas mediante inyección local en el momento de la herida y en los Días 1 y 2. Los controles se trataron con solución salina o se dejaron cicatrizar al aire. Después de 5 días, se practicó la eutanasia a los animales y se examinaron las heridas.

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

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

En el transcurso del experimento (hasta 28 días después de la lesión por quemadura) las heridas tratadas con microvesículas preparadas por ultracentrifugación estaban significativamente más inflamadas que las tratadas con microvesículas preparadas de acuerdo con los métodos de la presente invención (es decir, de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3). Véase la Figura 23. Del mismo modo, las heridas tratadas con microvesículas preparadas por ultracentrifugación estaban significativamente más inflamadas que los controles salinos y los controles expuestos al aire. Las heridas por quemaduras tratadas con microvesículas preparadas de acuerdo con los métodos de la presente invención no parecían significativamente más inflamadas que los controles.

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

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

La Figura 25 muestra una herida por quemadura porcina de segundo grado tratada con solución salina 28 días después de la lesión por quemadura. Hay una regeneración dérmica mínima con una epidermis aplanada. La falta de formación de una cresta de rete significativa es altamente sugestiva de una epidermis inadecuadamente anclada. Estos hallazgos son mucho más indicativos de la formación de una cicatriz con el riesgo de una lesión continuada.

La Figura 26 muestra una herida porcina de espesor total tratada con microvesículas aisladas de acuerdo con los métodos de la presente invención 28 días después de la lesión. Hay crecimiento interno de un nervio (ilustrado por las flechas) en la dermis en remodelación, probablemente estimulado por la aplicación de las microvesículas. El crecimiento del nervio va acompañado de una respuesta angiogénica (zonas rodeadas por un círculo). El nervio parece ser una estructura desarrollada y no se debe a un simple brote de axones. Se trata de un hallazgo único del que nunca se había informado y que tampoco se observó en las heridas de control ni en las tratadas con microvesículas preparadas por ultracentrifugación. Estas observaciones son muy indicativas de una regeneración tisular compleja con capacidad para generar elementos maduros a partir de todas las capas germinales, incluida la epidermis, el estroma, la vasculatura y el tejido nervioso. Estos métodos parecen entonces ser ampliamente aplicables al tratamiento de numerosas afecciones incluyendo trastornos traumáticos, inflamatorios, neoplásicos y degenerativos de tejidos derivados ectodérmicos, endodérmicos y mesodérmicos.

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

Se observó formación ósea en todos los grupos de tratamiento (control y tratado con microvesículas) en el modelo porcino de herida de espesor total. Véase la Figura 28. Los animales recibieron un total de 1,44 mg de microvesículas (la mitad preparadas de acuerdo con los métodos de la presente invención y la otra mitad por ultracentrifugación). Se observó un efecto sistémico que estimulaba la formación de hueso en todas las heridas. La formación de hueso tendía a producirse más en las heridas más inflamatorias, lo que sugiere un efecto sinérgico de los mediadores inflamatorios locales y el efecto sistémico de las microvesículas.

**Ejemplo 15: Uso de las microvesículas de la presente invención como terapia para promover o mejorar la cicatrización de heridas**

Se irradiaron letalmente ratones C57/CJ6 (GFP) con dos ciclos de irradiación gamma de 400 cGy para ablacionar sus progenitores de médula ósea huésped. Tras la irradiación, los ratones fueron tratados en un área de aproximadamente 2 cm con un láser ablativo fraccionado Erbium: YAG. Tras el tratamiento con láser, se adhirió una cámara de plástico a la piel y se añadieron a la cámara células derivadas de la médula ósea obtenidas de un ratón transgénico GFP+ singénico. Las células de médula ósea GFP+ incluían células totales de médula ósea recién extraídas, células de médula ósea seleccionadas de linaje negativo, células madre mesenquimales y células cultivadas completas de médula ósea (como se describe en esta solicitud). Sólo en unos pocos animales se consiguió quimerismo, detectado por células GFP+ circulantes entre 4 y 6 semanas después de la administración de las células. Véase la Figura 29. Sorprendentemente, muchos animales sobrevivieron sin evidencia de injerto de médula ósea del donante. En general (en todos los grupos de células administradas) sobrevivieron el 30 % de los animales que recibieron células. Entre los distintos grupos, las tasas de supervivencia fueron más elevadas para los animales que recibieron células seleccionadas de linaje negativo (45 %) y células de médula ósea fresca (30 %). Los animales irradiados de control que no recibieron células tuvieron una tasa de mortalidad del 100 %. Las citocinas no lograron rescatar de forma similar a los animales irradiados letalmente y no se pudo demostrar el injerto funcional de médula ósea del donante en estos animales supervivientes. Es probable que las microvesículas secretadas por las células administradas sean las responsables de la recuperación de la médula ósea del huésped, lo que ha permitido la supervivencia de estos animales. Hemos demostrado que la médula ósea fresca (que incluye células de linaje negativo) y las células madre mesenquimales producen grandes cantidades de microvesículas que podrían lograr este efecto.

En otro estudio, ratones C57/CJ6 (GFP<sup>+</sup>) fueron irradiados letalmente con dos ciclos de irradiación gamma de 400 cGy para inhibir el crecimiento de su pelo y ablacionar parcialmente su médula ósea. Tras la irradiación, se afeitaron los lomos de los ratones y se les aplicó en un área de aproximadamente 2 cm un láser ablativo fraccionado de Erbium: YAG. Tras el tratamiento con láser se adhirió una cámara de plástico a la piel y se añadieron a la cámara células derivadas de la médula ósea obtenidas de un ratón transgénico GFP+ singénico. Las células de médula ósea GFP+ incluían células de médula ósea recién extraídas, células de médula ósea seleccionadas de linaje negativo, células madre mesenquimales y células cultivadas completas de médula ósea (como se describe en esta solicitud). En ningún animal se consiguió quimerismo, detectado por células GFP+ circulantes entre 4 y 6 semanas después de la administración de las células. Véase la Figura 30. En los animales tratados únicamente con láser no se observó crecimiento de vello corto o muy escaso. Figura 30 (A). En los animales a los que se administraron células de médula ósea se produjo un crecimiento del vello significativo y duradero. Figura 30 (A & B). Estos hallazgos fueron más dramáticos en ratones tratados con células seleccionadas de linaje negativo GFP+ y células de médula ósea GFP+ frescas totales. El crecimiento del pelo pudo detectarse en 2 semanas y continuó creciendo durante varios meses. Se tomaron biopsias de piel en la zona de crecimiento del nuevo pelo, pero no se detectaron células GFP+. El injerto funcional de células de médula ósea tampoco pudo detectarse en ningún animal mediante análisis FACS. Figura 30 (C). Al igual que en el ejemplo de la Figura 29, no se ha demostrado que las citocinas tengan este efecto en la restauración del crecimiento del pelo. Las microvesículas secretadas por las células administradas son probablemente las responsables de la estimulación del crecimiento del pelo.

**Ejemplo 16: Uso de las microvesículas de la presente invención para promover o estimular la angiogénesis y para promover o estimular la proliferación de fibroblastos.**

Aislamiento de microvesículas de aspirado de médula ósea: Se obtuvieron aproximadamente 25 ml de médula ósea entera fresca de Allicells, Inc. (Alameda, CA). La médula ósea se colocó cuidadosamente en nuevos tubos de centrífuga cónicos de 50 ml y se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante (aproximadamente 15 ml) y se colocó en nuevos tubos de centrífuga cónicos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific Inc, Weston, FL) y se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Se volvió a extraer cuidadosamente el sobrenadante y se colocó en nuevos tubos de centrífuga cónicos de 50 ml a los que se añadió medio esencial alfa mínimo (α-MEM) estéril (Mediatech Inc., Manassas, VA) en una proporción de 1:10 (sobrenadante de médula ósea/medio). A la solución se le añadió polietilenglicol libre de masa y proteasa de peso molecular promedio 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) al 8,5 % p/v y cloruro de sodio (concentración final 0,4 M). La solución se colocó en una cámara frigorífica a 4 °C durante toda la noche con rotación. La solución se centrifugó a 10000 x g a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento enriquecido en microvesículas se resuspendió en solución amortiguada con fosfato (PBS). La solución enriquecida en microvesículas se transfirió a unidades de filtro centrífugo amicon ultra 15 (límite de peso molecular nominal 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA) y se centrifugó a 5000 x g durante 30 minutos. Las unidades de filtrado se lavaron con solución salina amortiguada por fosfatos y se centrifugaron de nuevo a 5000 x g durante 30 minutos. Se recuperó la muestra concentrada (aproximadamente 200-400 µl) del fondo del dispositivo de filtrado.

Ensayo de angiogénesis: La angiogénesis se midió mediante un ensayo de formación de tubos endoteliales (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). Se cultivaron células endoteliales primarias de vena umbilical humana (HUVEC) criopreservadas (Invitrogen Life Technologies) en un matraz de cultivo tisular de 75 cm durante 6 días en medio 200PRF suplementado con un 2 % de suplemento de crecimiento bajo en suero (Invitrogen Life Technologies). A continuación, las células se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^4$  en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos que contenía medio sin suplemento. Las células HUVEC se trataron posteriormente con microvesículas de médula ósea (aproximadamente 100 mg). Se utilizó PBS como vehículo de control. Las células tratadas se incubaron durante 6 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se utilizó el colorante fluorescente calceína AM a una concentración de 2 µg/ml para la visualización de la formación de tubos. Las imágenes fluorescentes se capturaron con un microscopio Olympus 1X81 invertido (Olympus America, Center Valley, PA). La MV de médula ósea mostró una capacidad significativa de formación de tubos en comparación con el



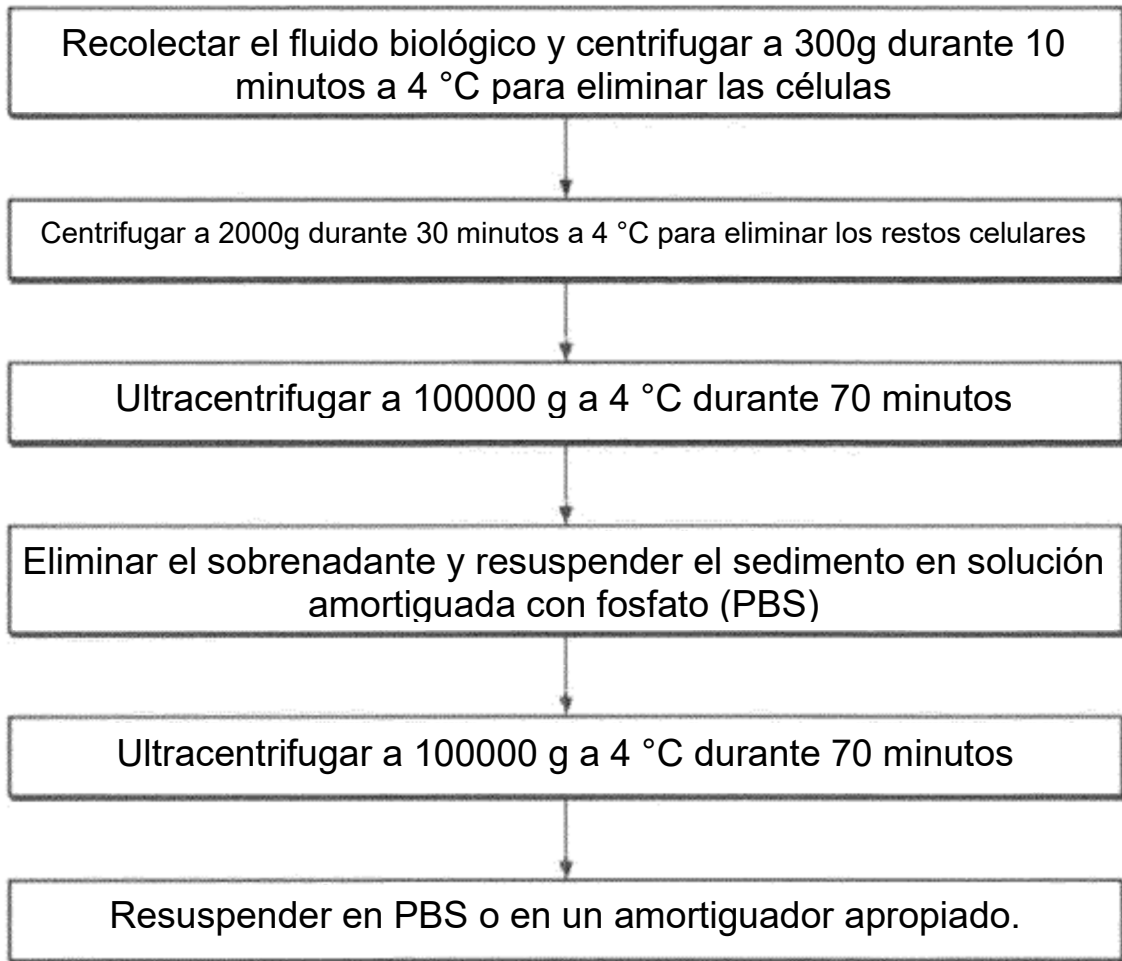
control del vehículo (PBS) (véase la Figura 31).

5 Ensayo de crecimiento: Se sembraron fibroblastos adultos normales en placas de 24 pocillos (10000 células/pocillo) en medio de crecimiento (5 % FBS, 1 % glutamina, 1 % Penicilina/Estreptomicina) para los ensayos. Tras una incubación de una noche, se seleccionaron tres pocillos al azar y se tiñeron las células con el reactivo NucBlue Live ReadyProbes (Invitrogen Life technologies) (Día 0). Se capturaron imágenes fluorescentes con el sistema EVOS FL Auto Cell Imaging System (Invitrogen Life technologies). Los fibroblastos se volvieron a alimentar con medio fresco que contenía microvesículas derivadas de la médula ósea (aproximadamente 100 mg) o PBS (control del vehículo) y después de tres días (día 3), las células se tiñeron y se obtuvieron imágenes. Los fibroblastos tratados con microvesículas derivadas de médula ósea aumentaron aproximadamente tres veces en número (en comparación con el día 0) y a un ritmo significativamente mayor que el control de vehículo (Figura 32, panel A y Figura 32, panel B).

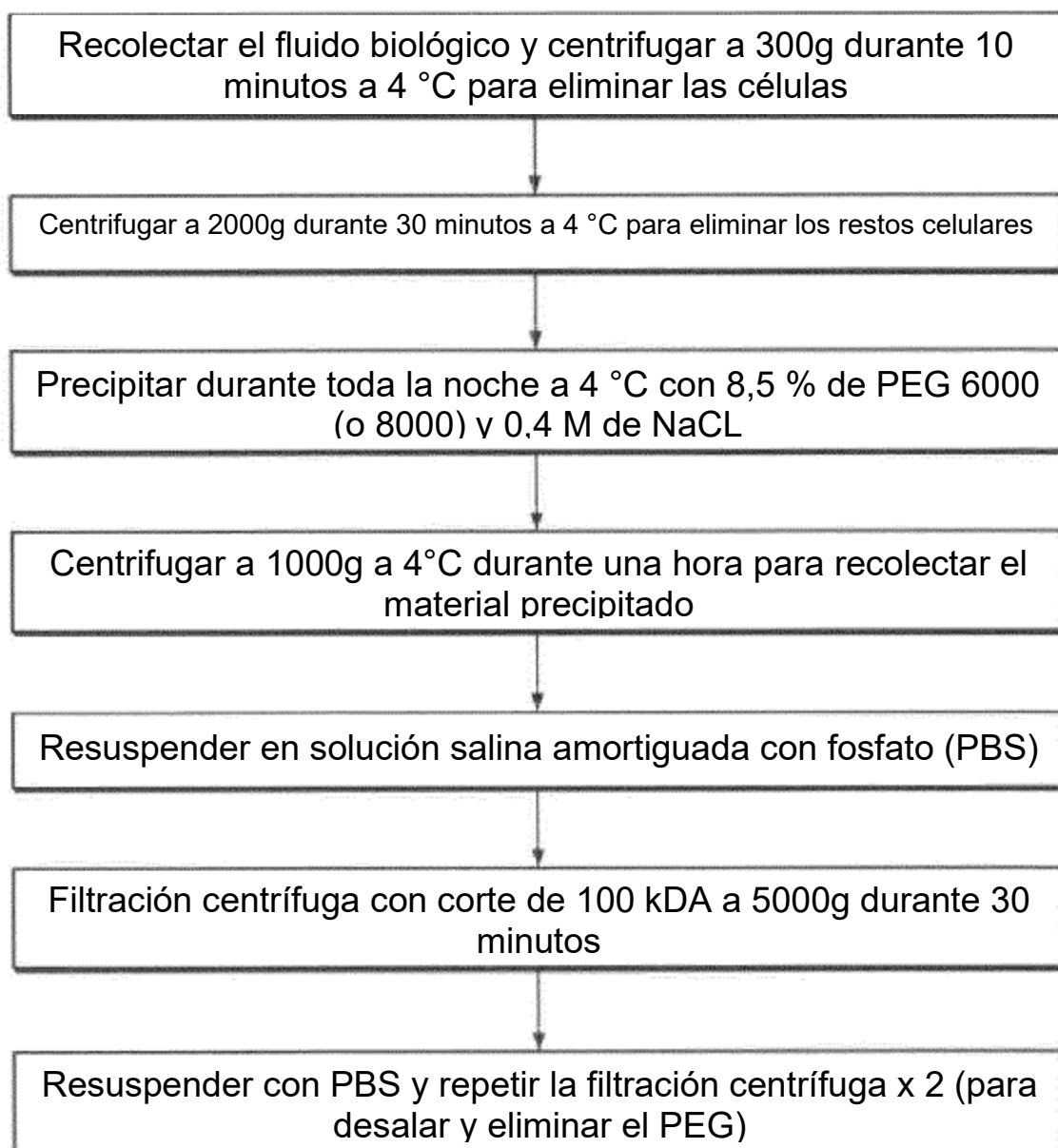
10 Aunque los diversos aspectos de la invención se han ilustrado anteriormente haciendo referencia a ejemplos y realizaciones preferidas, se apreciará que el alcance de la invención no se define por la descripción anterior, sino por las siguientes reivindicaciones interpretadas correctamente según los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

## REIVINDICACIONES

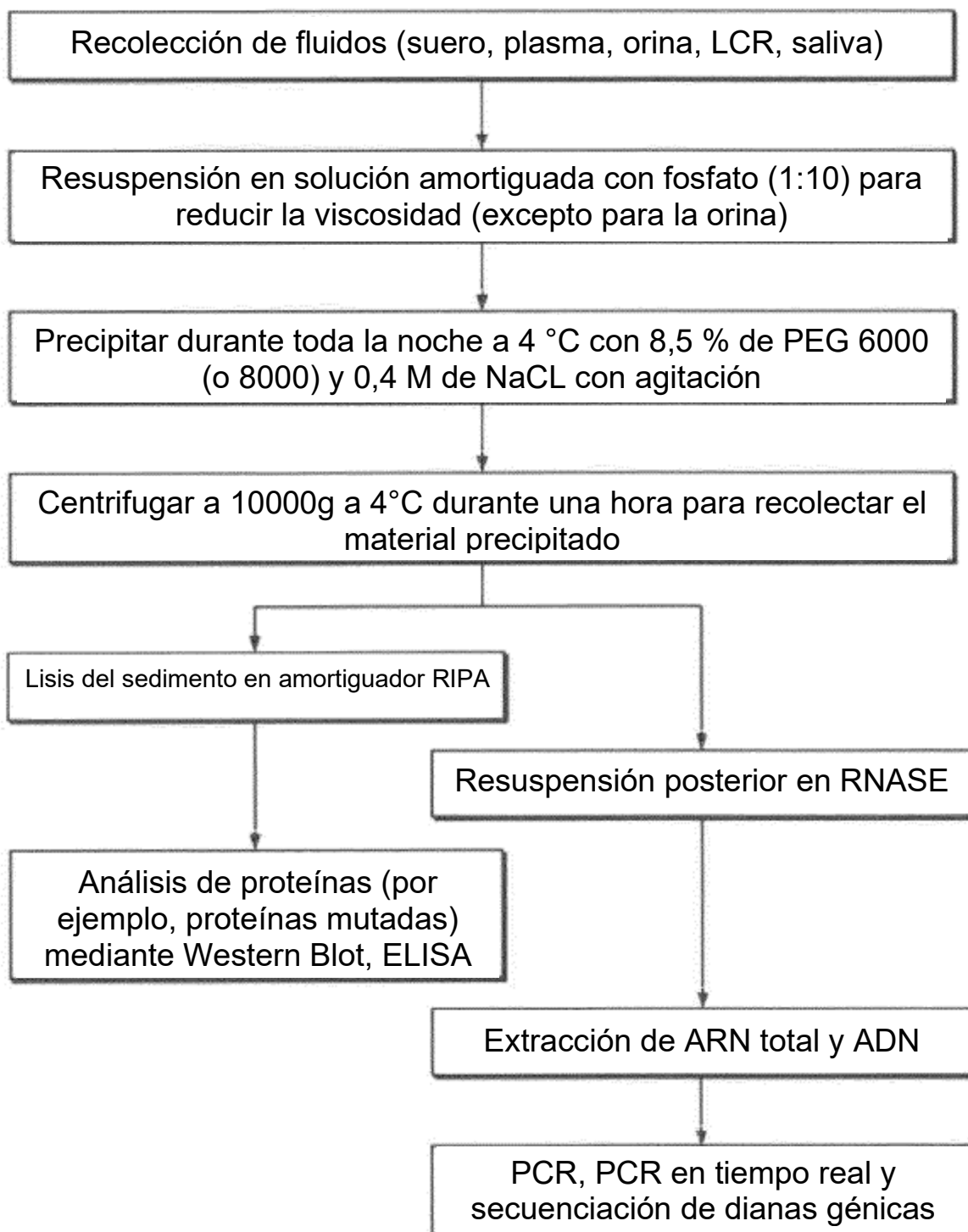
1. Una composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso en la terapia de la piel, en donde las microvesículas aisladas se preparan con un método que comprende los pasos de:
  - (a) obtener un fluido biológico que contiene microvesículas;
  - (b) clarificar el fluido biológico para eliminar restos celulares;
  - (c) precipitar las microvesículas añadiendo un agente precipitante, que es polietilenglicol, al fluido biológico clarificado;
  - (d) recoger las microvesículas precipitadas;
  - (e) lavar las microvesículas precipitadas para eliminar el agente precipitante; y
  - (f) opcionalmente suspender las microvesículas en una solución para almacenamiento o uso posterior para producir una preparación aislada de microvesículas, en donde las microvesículas se aíslan sin dañar la integridad estructural o funcional de las microvesículas, y
 en donde la terapia de la piel comprende regenerar al menos un tejido en un paciente con piel enferma, dañada o ausente seleccionado de un grupo que consiste en tejido epitelial, tejido estromal, tejido nervioso, tejido vascular y estructuras anexiales.
2. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de la reivindicación 1, en donde el agente de precipitación causa agregación de las microvesículas.
3. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde las microvesículas precipitadas se recolectan por centrifugación.
4. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de la reivindicación 1, en donde el fluido biológico se selecciona del grupo que consiste en médula ósea, fluido derivado de células o muestras de tejido, fluido de cultivo celular y fluido derivado de células cultivadas.
5. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de la reivindicación 1, en donde las microvesículas aisladas varían en tamaño de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 5.000 nm.
6. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las microvesículas aisladas se purifican adicionalmente usando uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en inmunoafinidad, HPLC, filtración de flujo tangencial, separación de fases, partición de fases y microfluidos.
7. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el fluido biológico que contiene microvesículas se obtiene de células madre mesenquimales y, en particular, de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.
8. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el fluido biológico que contiene microvesículas se obtiene a partir de células alogénicas.
9. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el fluido biológico que contiene microvesículas se obtiene a partir de células de mamífero.
10. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido epitelial, tejido estromal, tejido nervioso, tejido vascular y estructuras anexiales.
11. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la composición de microvesículas aisladas promueve la regeneración funcional y la organización de estructuras tisulares complejas.
12. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde las microvesículas contienen al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en ARN, ADN y proteína de una célula hospedera.
13. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de la reivindicación 12, en donde la célula hospedera está diseñada para expresar la al menos una molécula de ARN, ADN o proteína.
14. La composición farmacéutica de microvesículas aisladas para uso de la reivindicación 6, en donde las microvesículas aisladas se purifican adicionalmente usando filtración de flujo tangencial.



**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

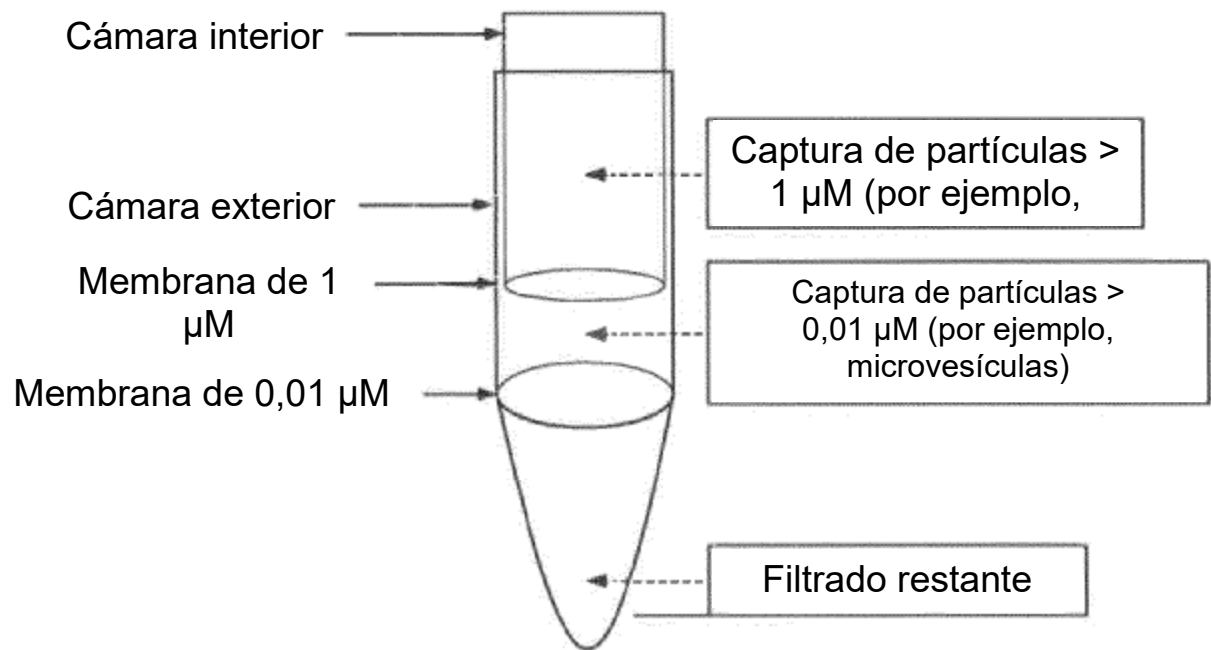
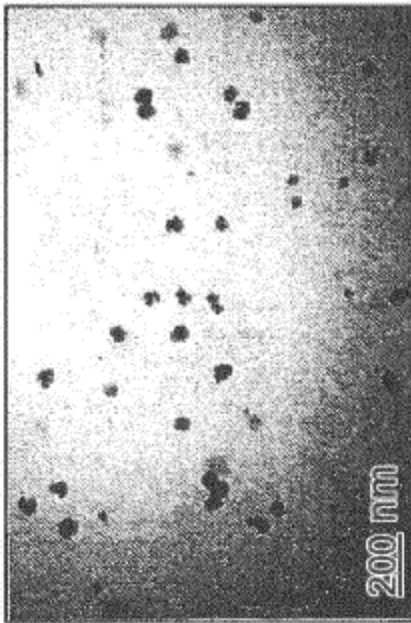
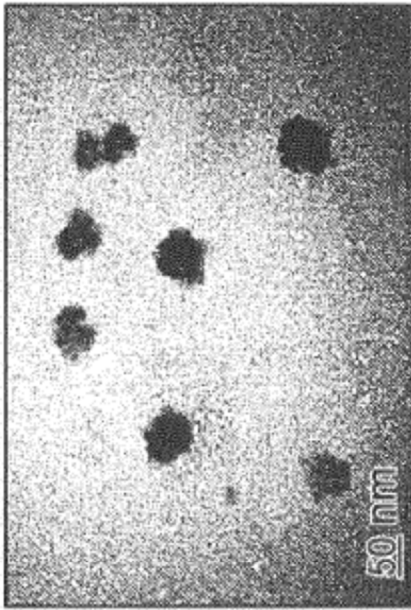


FIG. 4



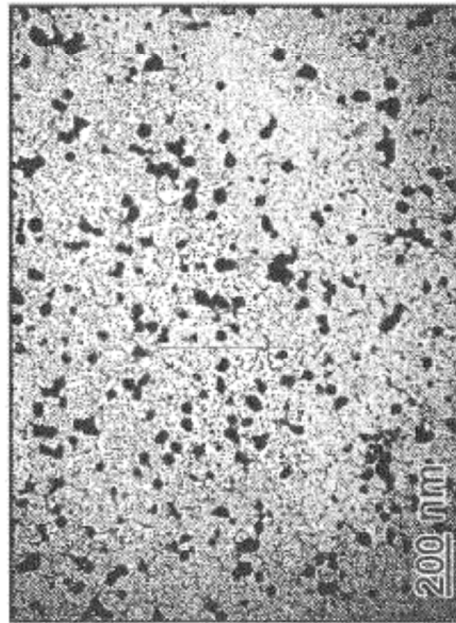
64000x

**FIG. 5A**



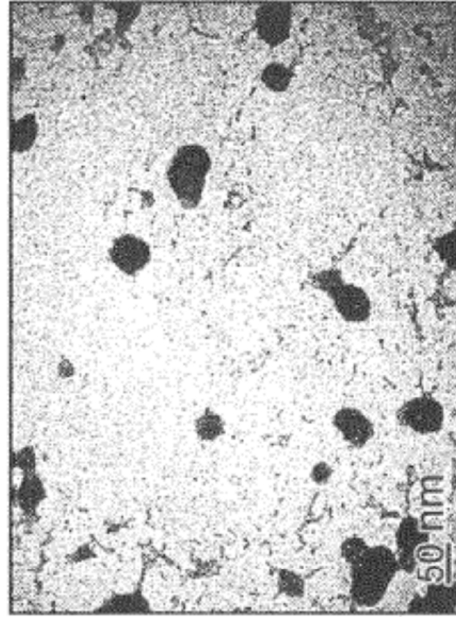
180000x

**FIG. 5B**



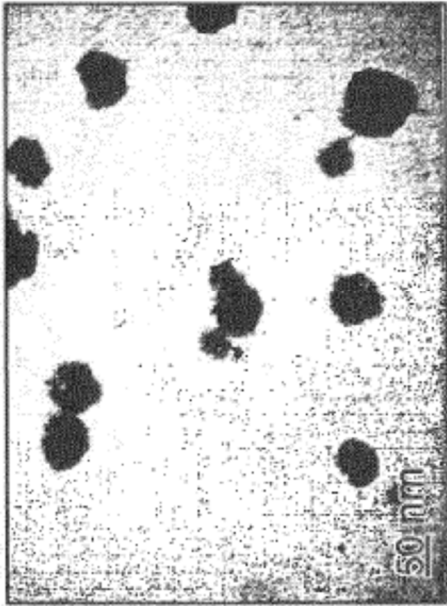
64000x

**FIG. 5C**

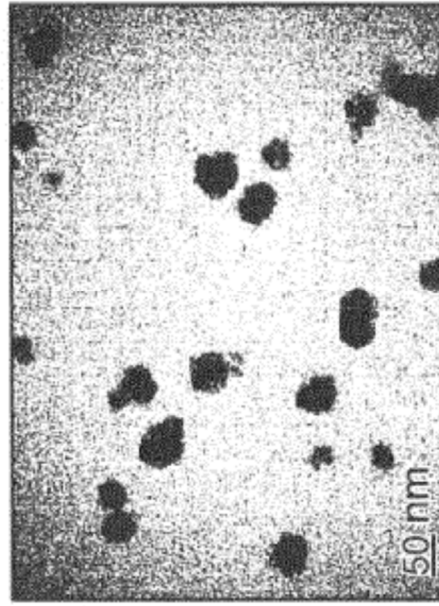


180000x

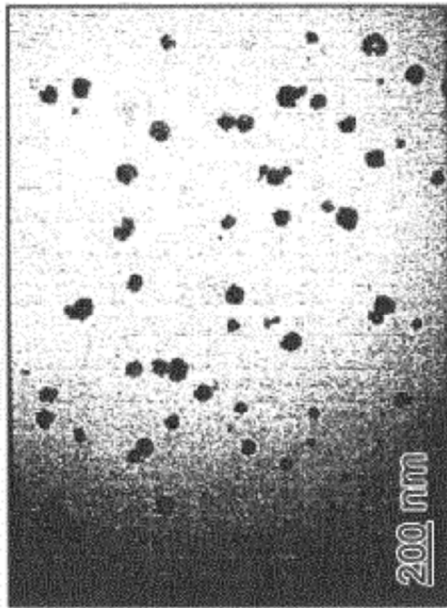
**FIG. 5D**



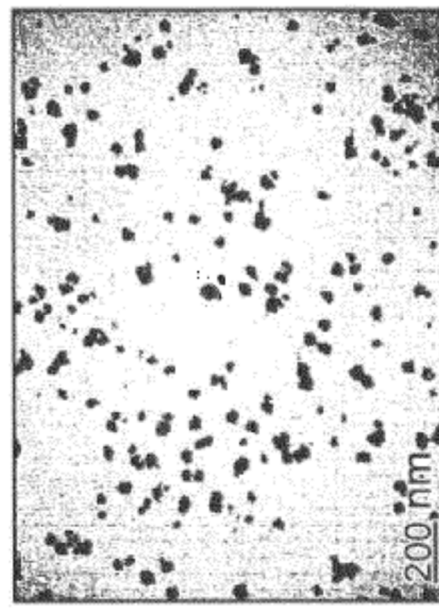
**FIG. 6B**



**FIG. 6D**

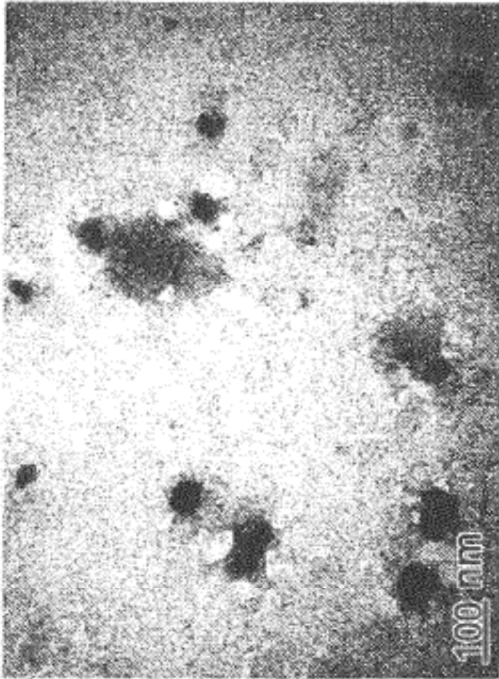


**FIG. 6A**

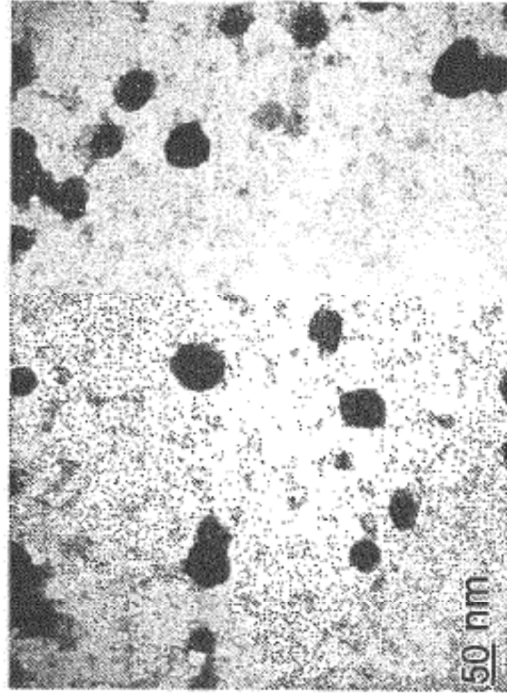


**FIG. 6C**

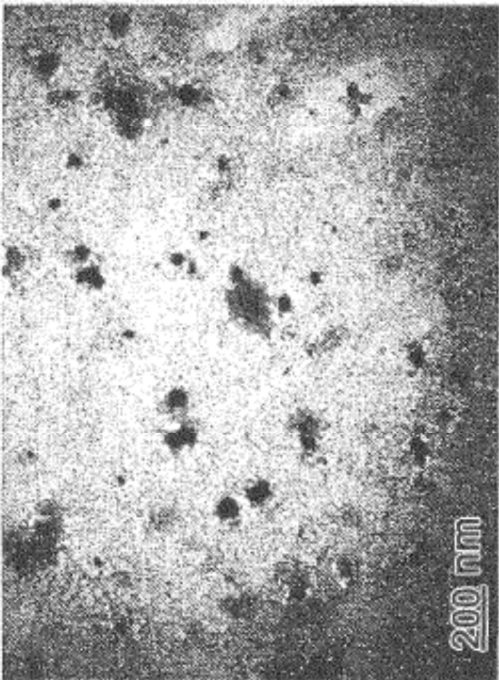




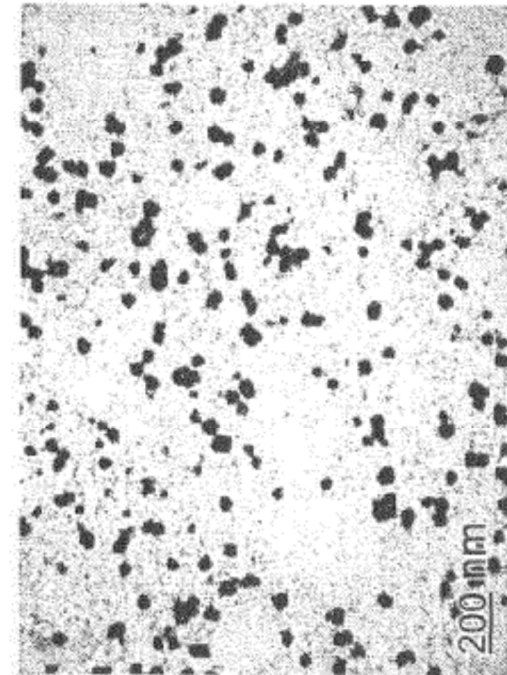
**FIG. 7B**



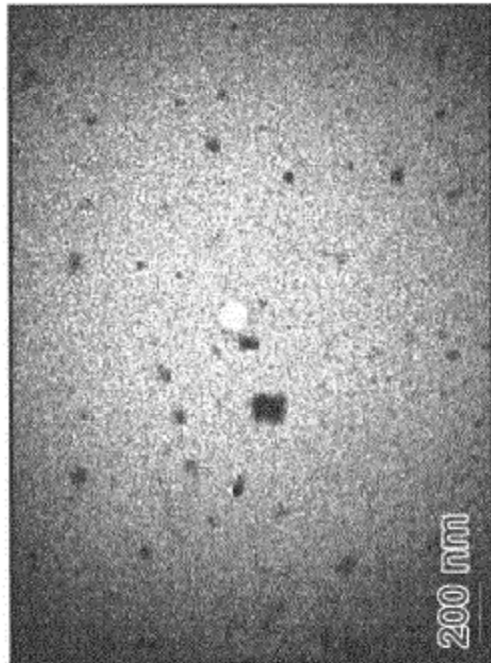
**FIG. 7D**



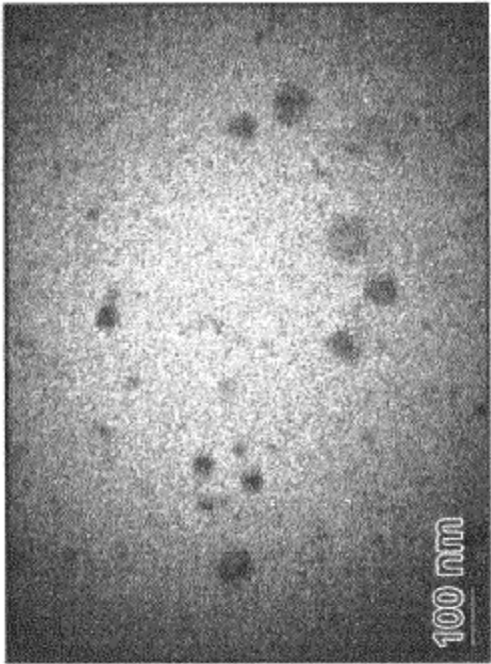
**FIG. 7A**



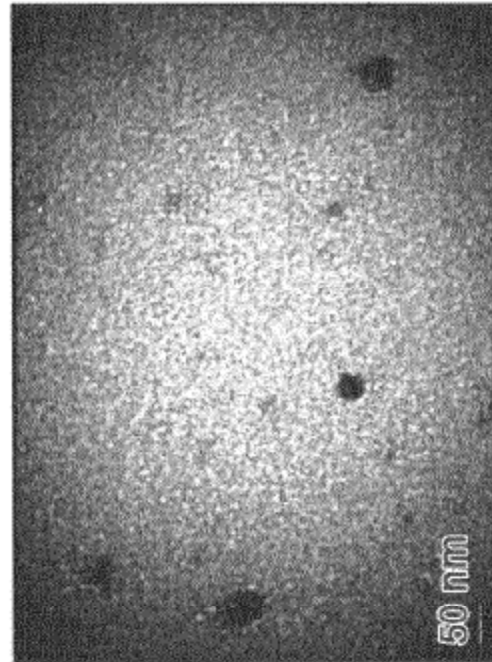
**FIG. 7C**



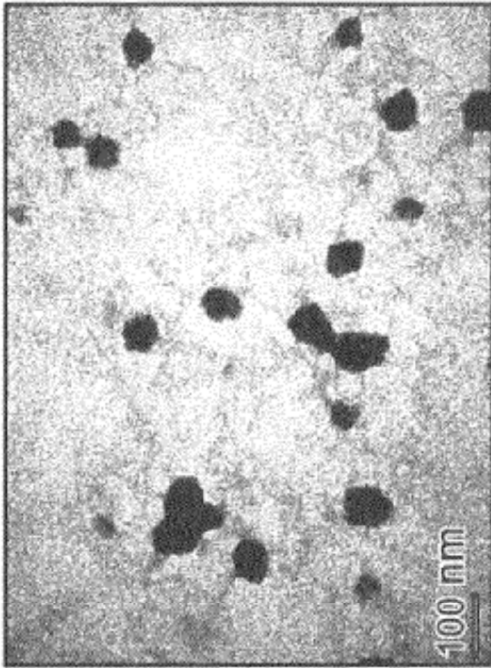
**FIG. 8A**



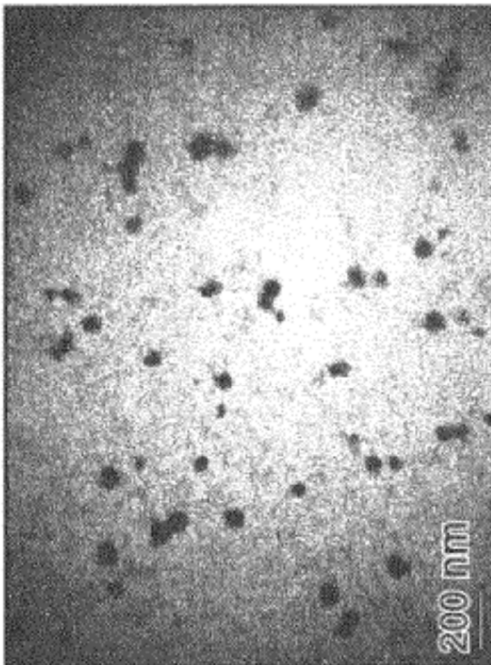
**FIG. 8B**



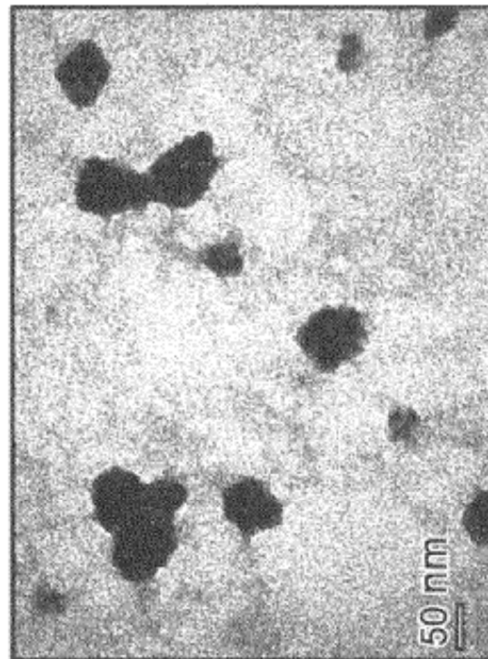
**FIG. 8C**



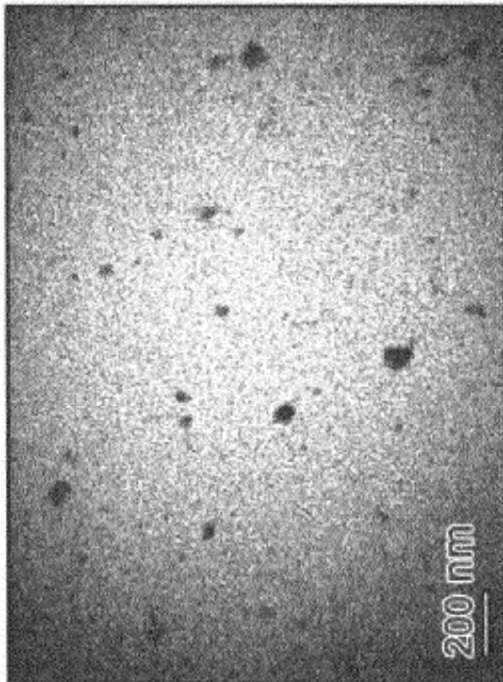
**FIG. 9B**



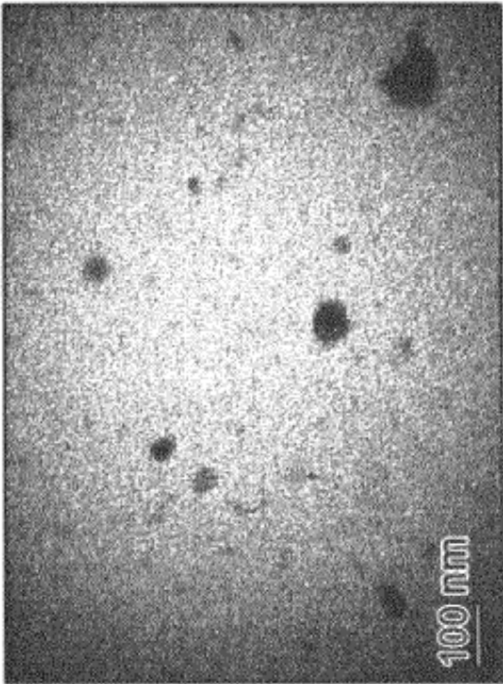
**FIG. 9A**



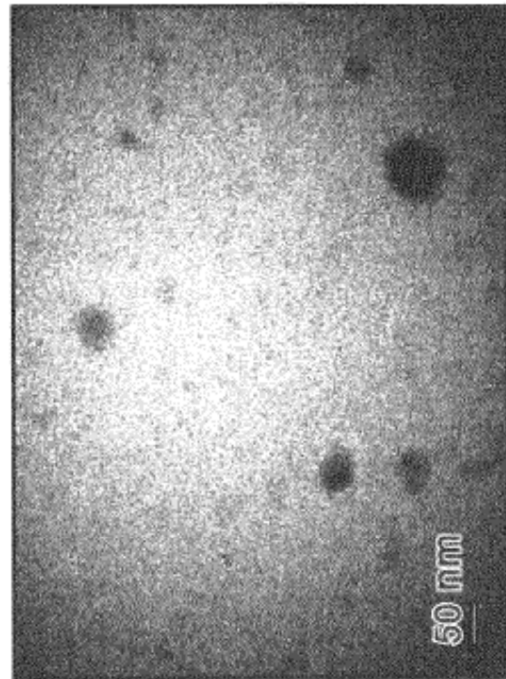
**FIG. 9C**



**FIG. 10A**



**FIG. 10B**



**FIG. 10C**

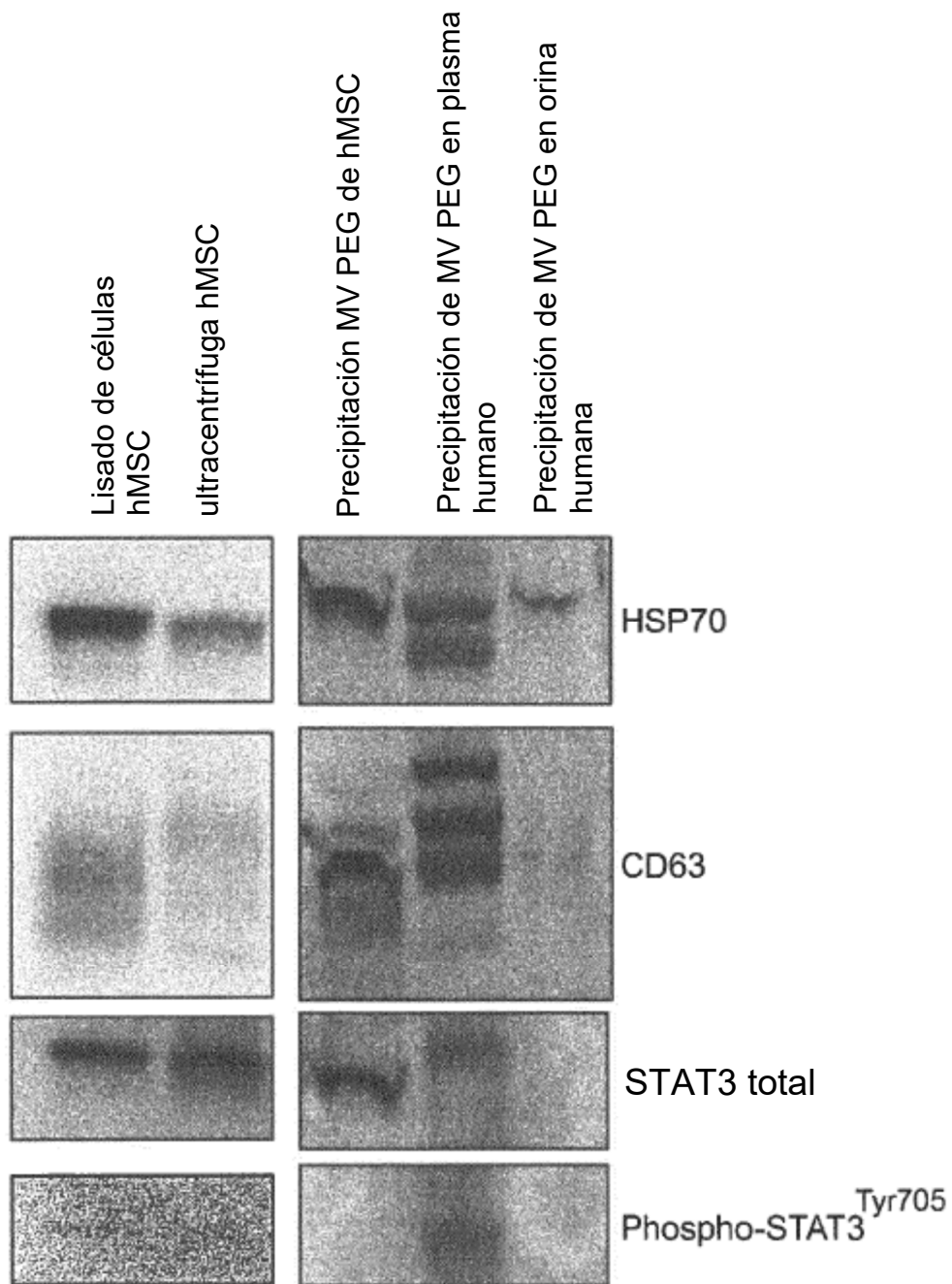
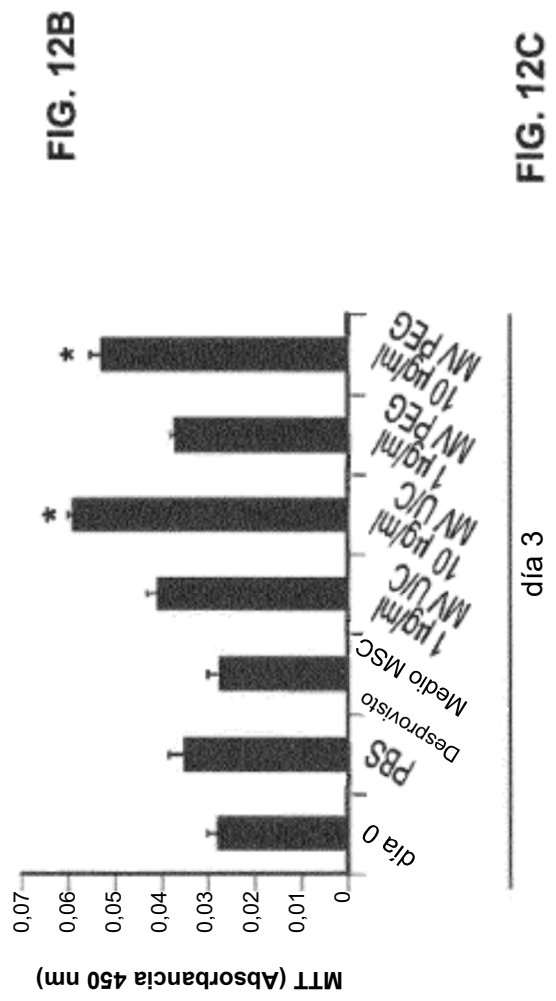
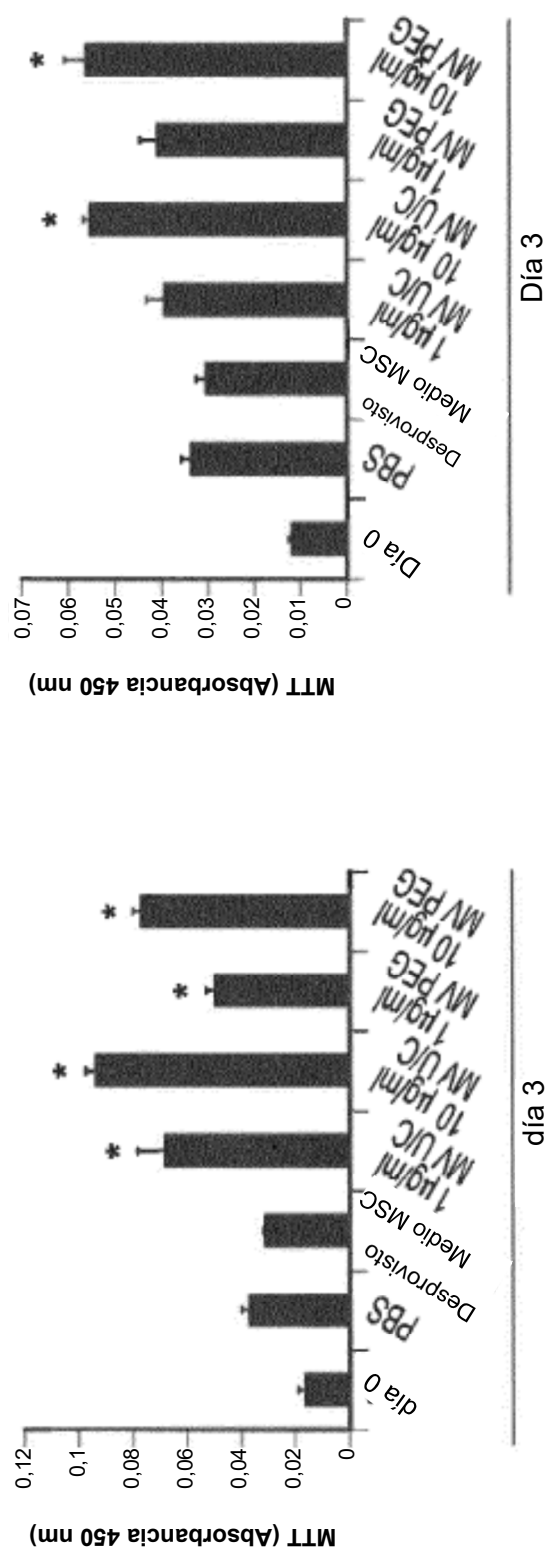
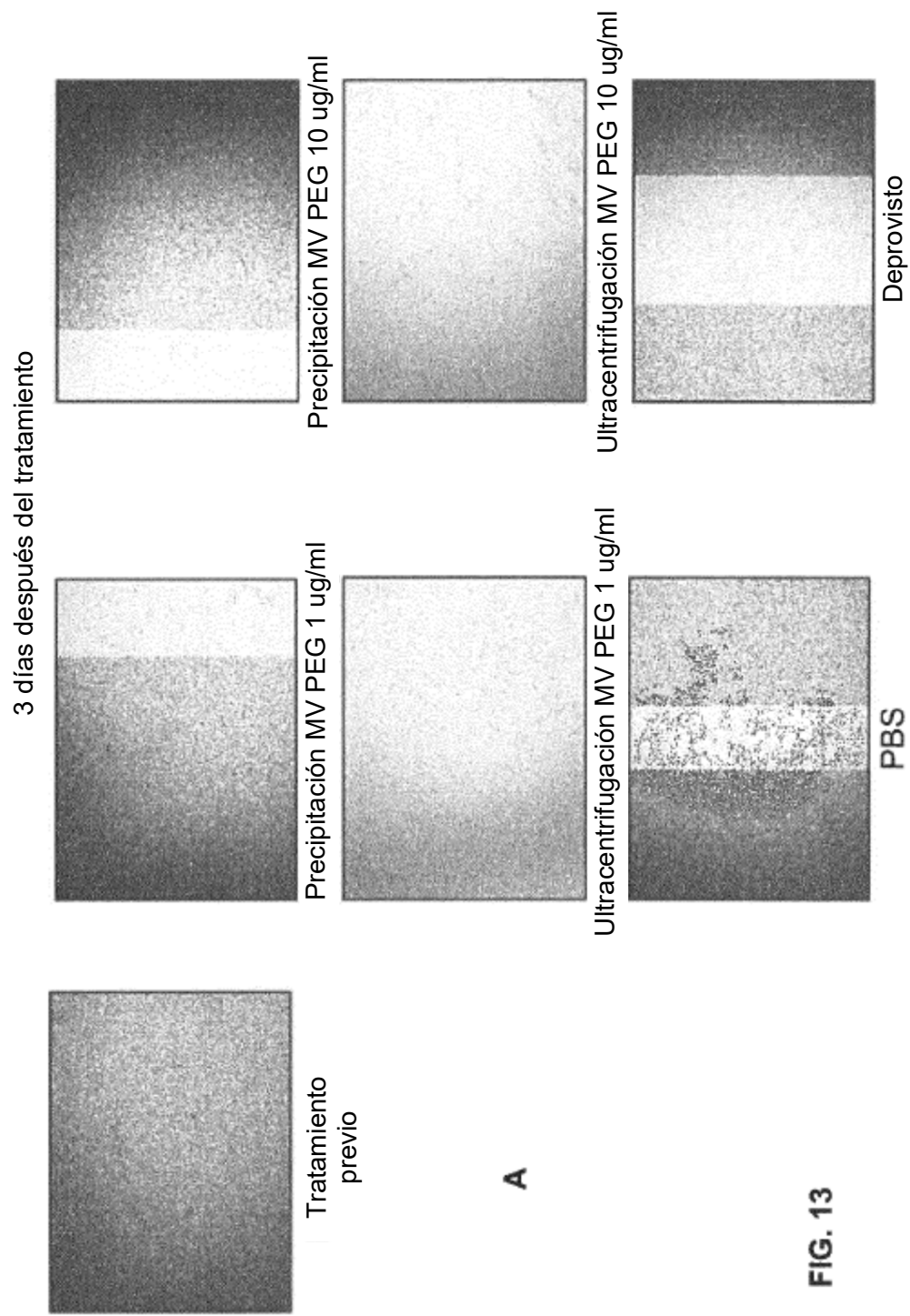


FIG. 11







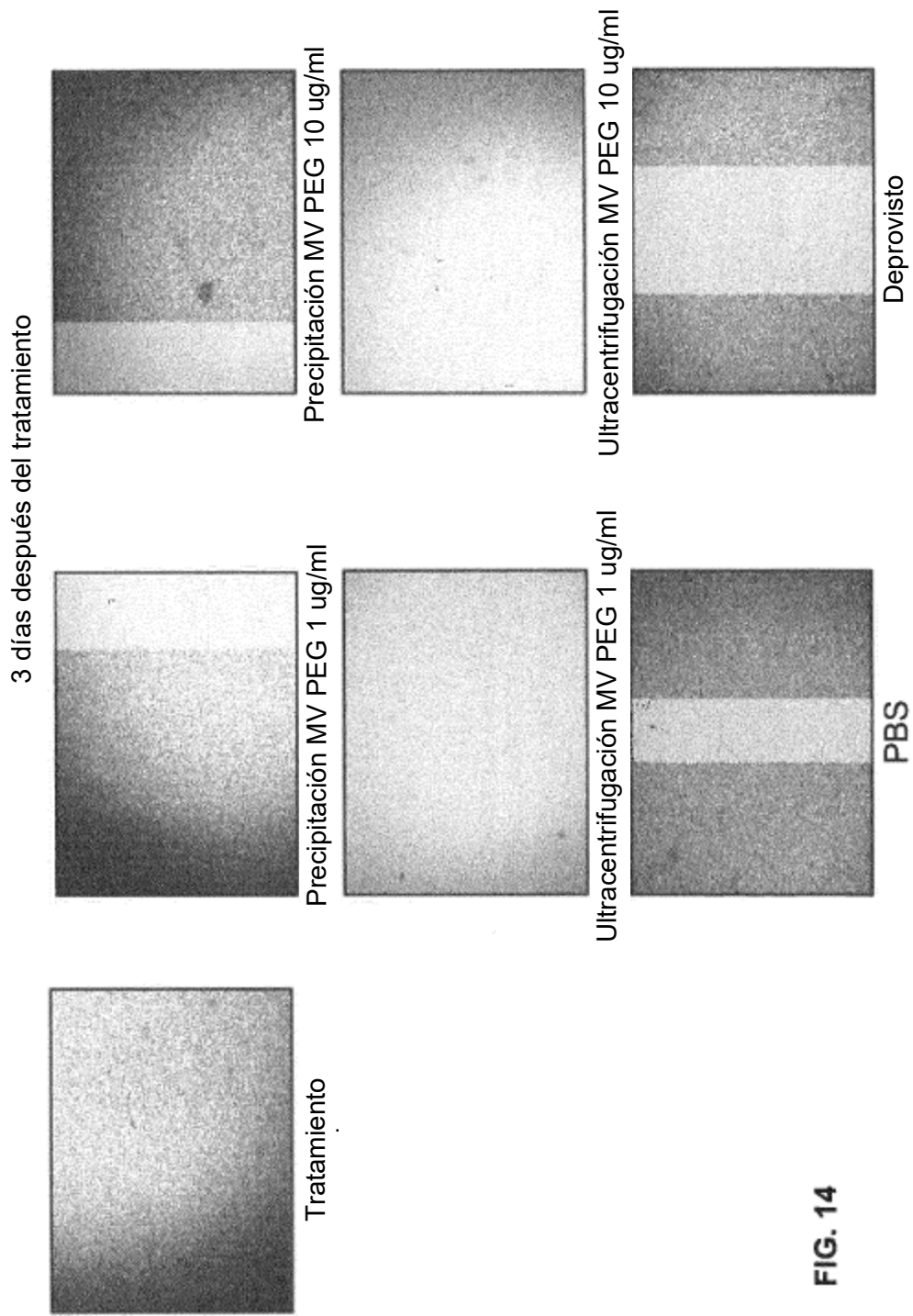


FIG. 14



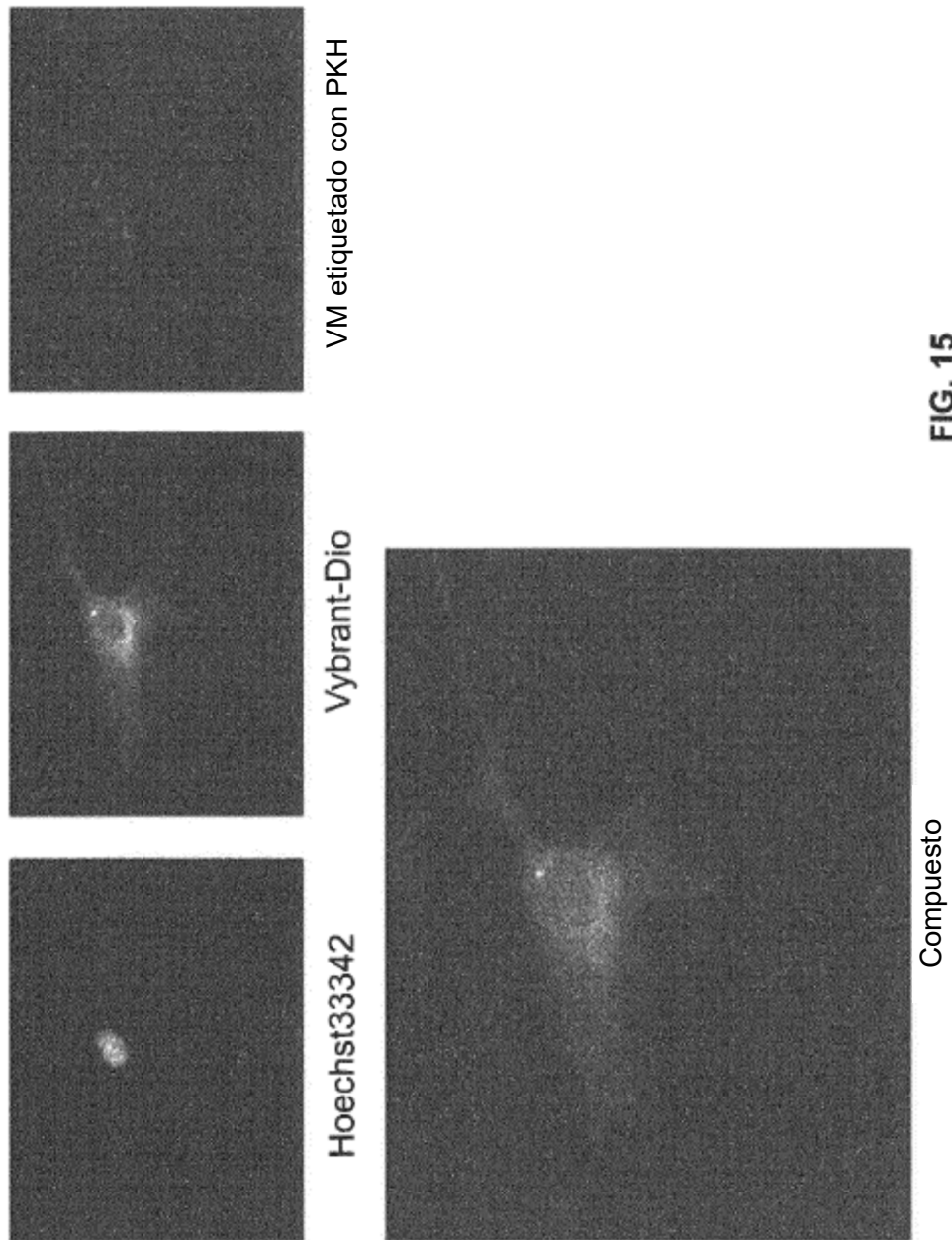
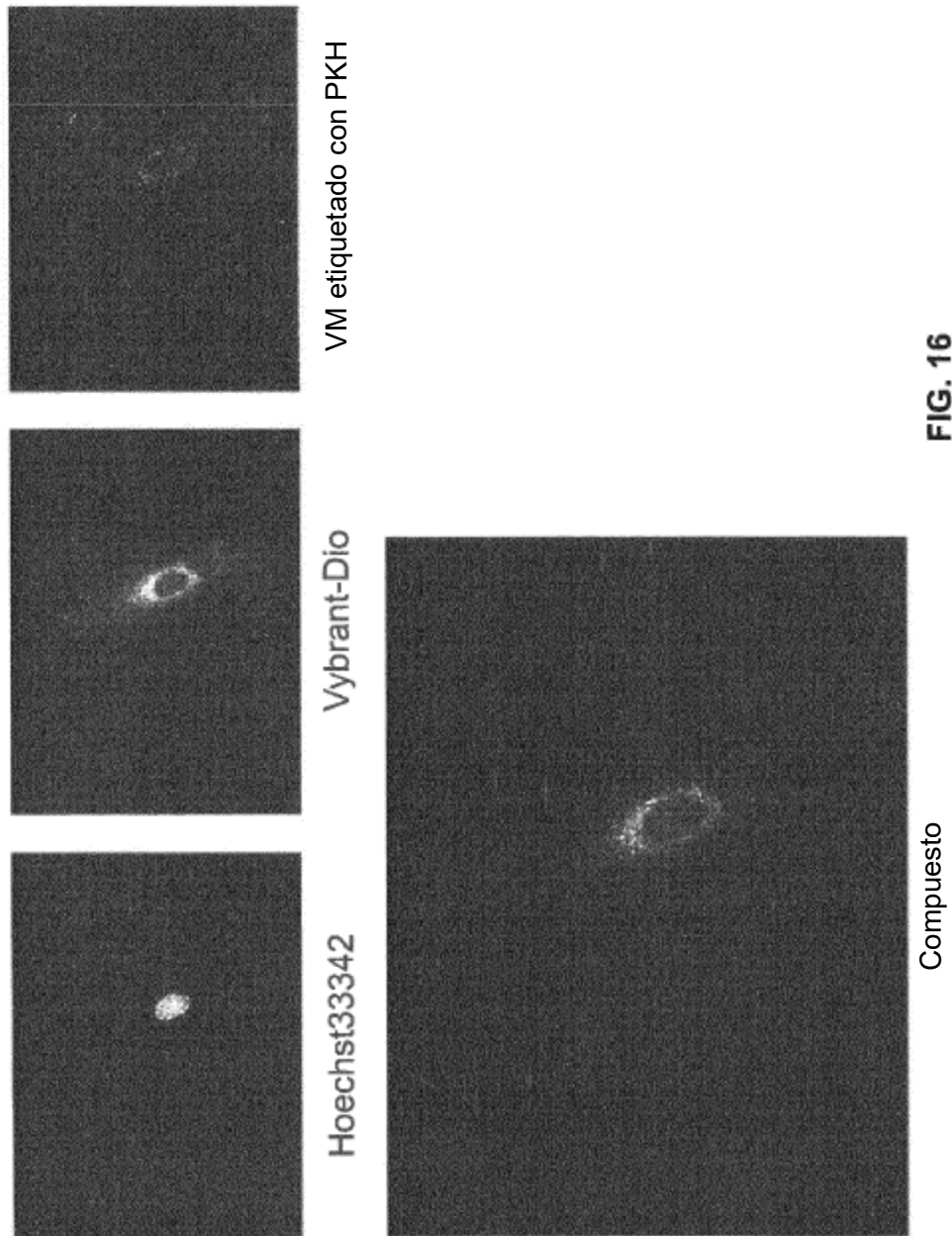


FIG. 15



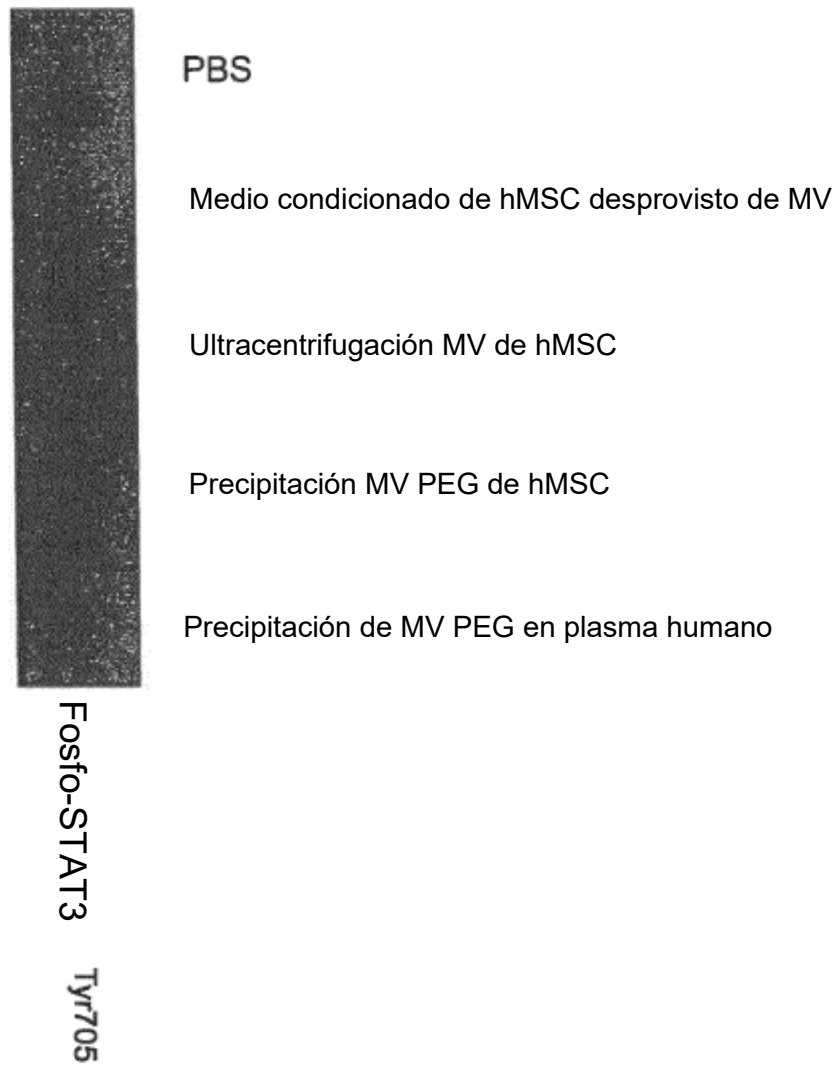
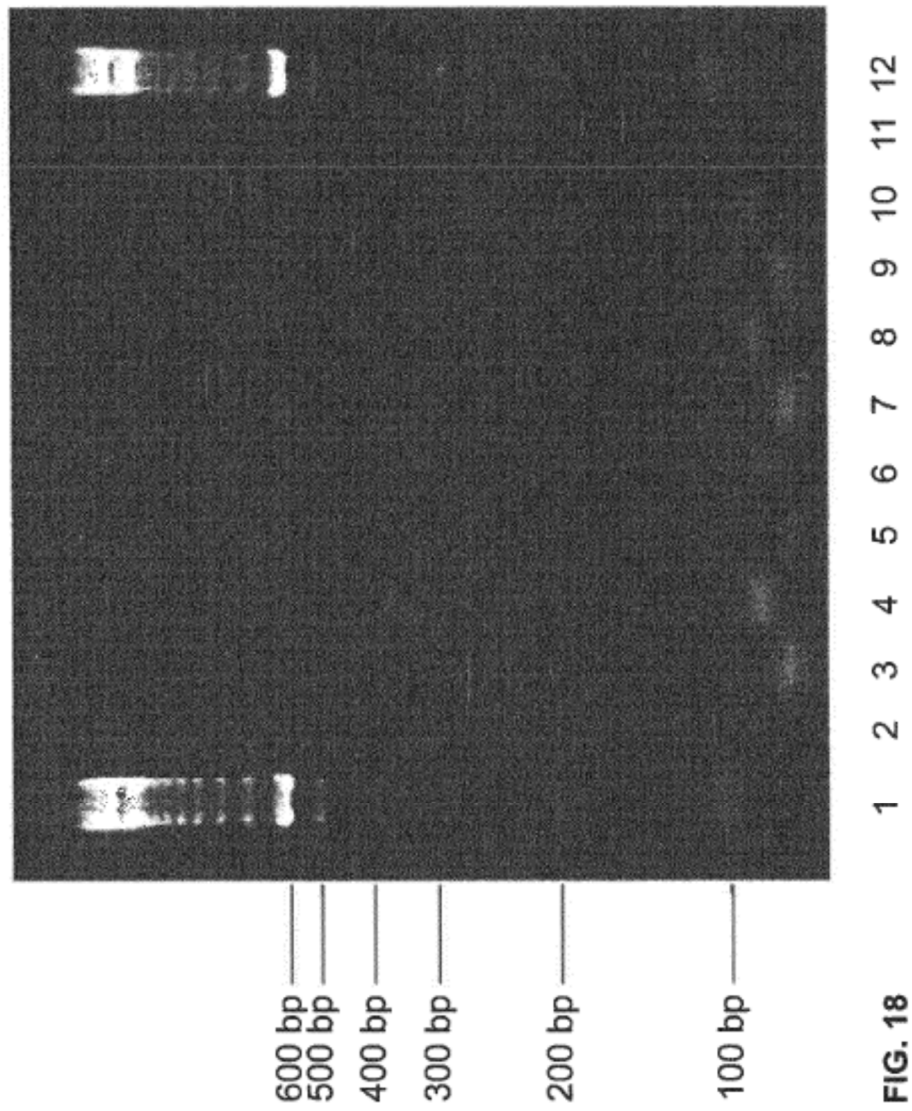
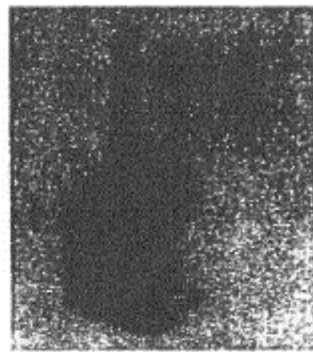


FIG. 17





Lisado de células SK-MEL28

Lisado de MV SK-MEL28

BRAF V600E

**FIG. 19**

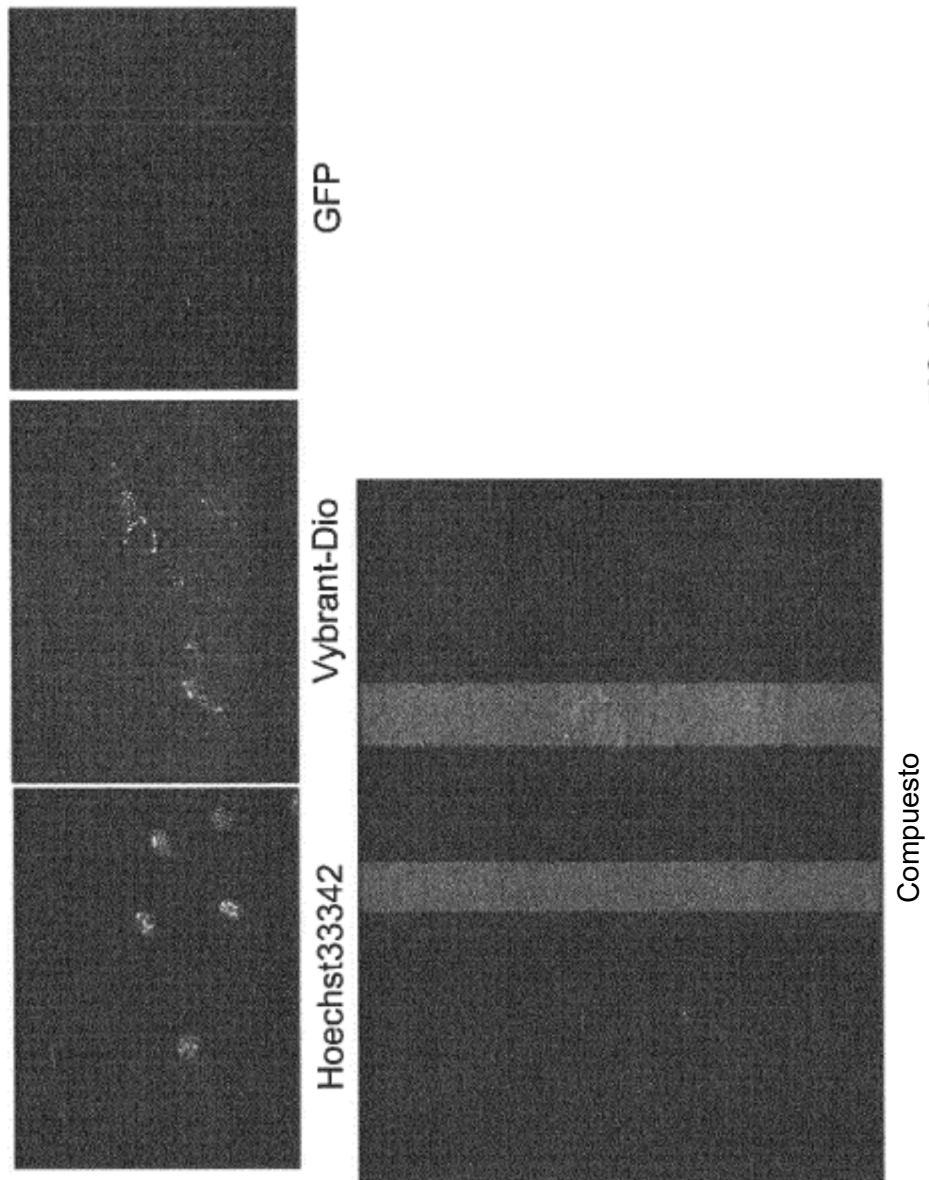


FIG. 20

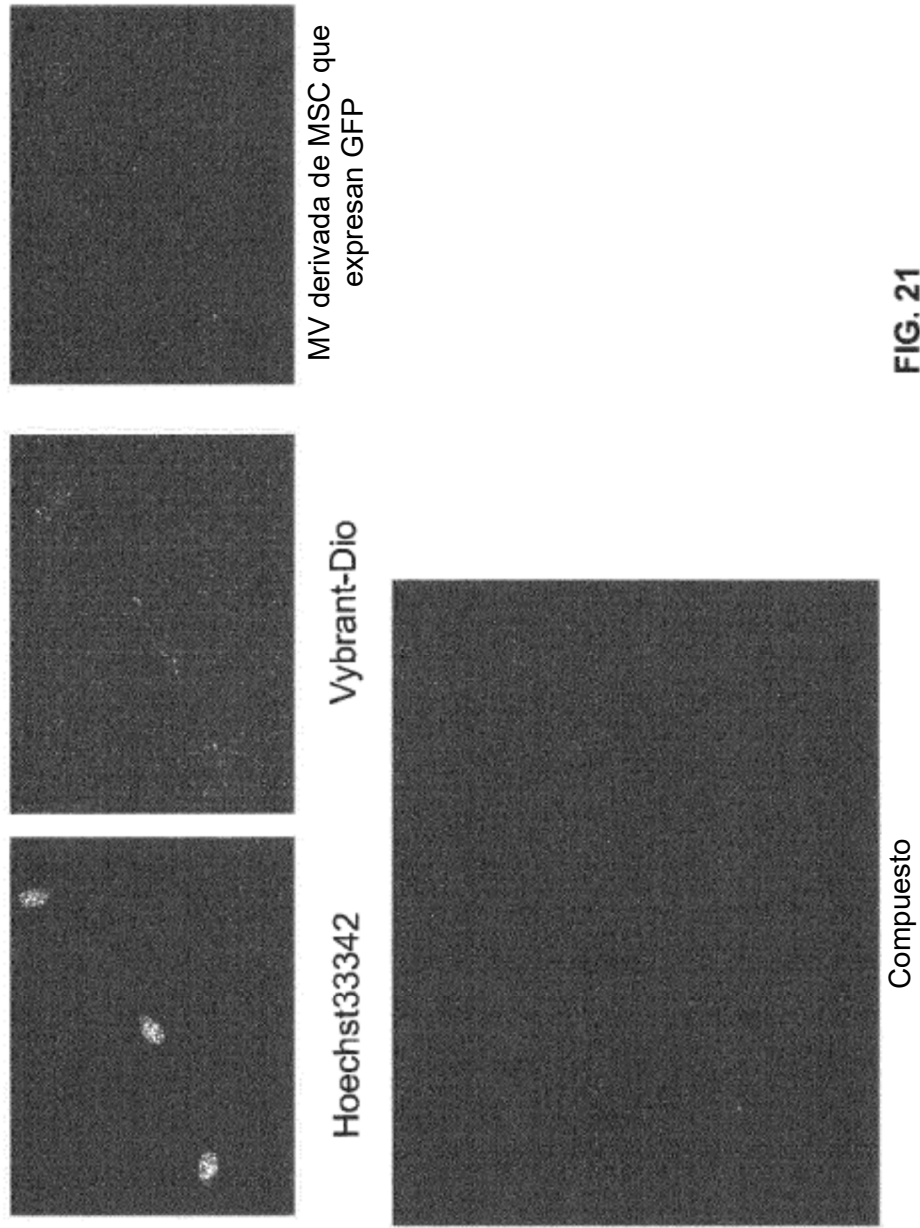




FIG. 22B



FIG. 22D



FIG. 22A



FIG. 22C



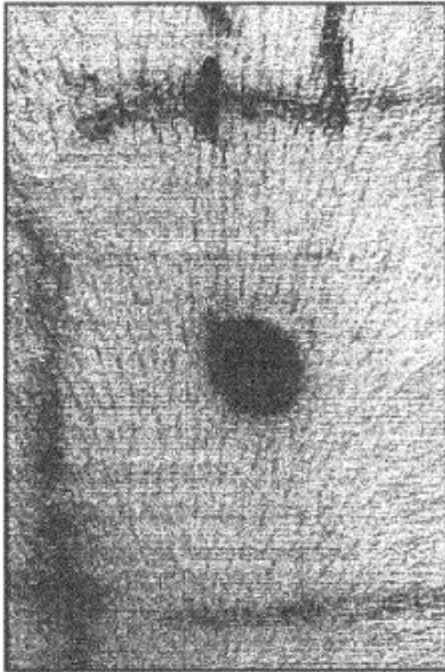


FIG. 23B

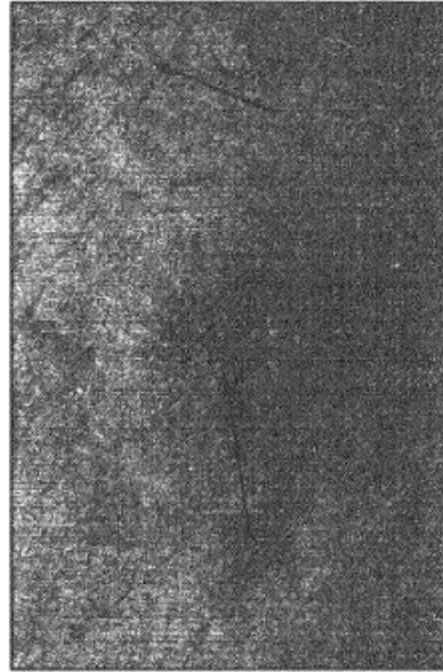


FIG. 23D

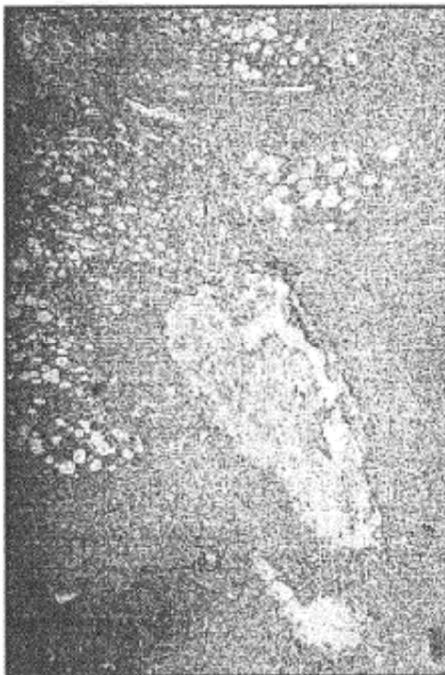


FIG. 23A

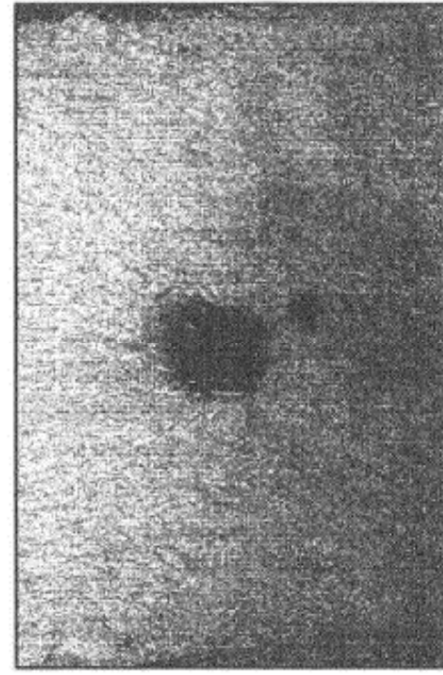


FIG. 23C



FIG. 24

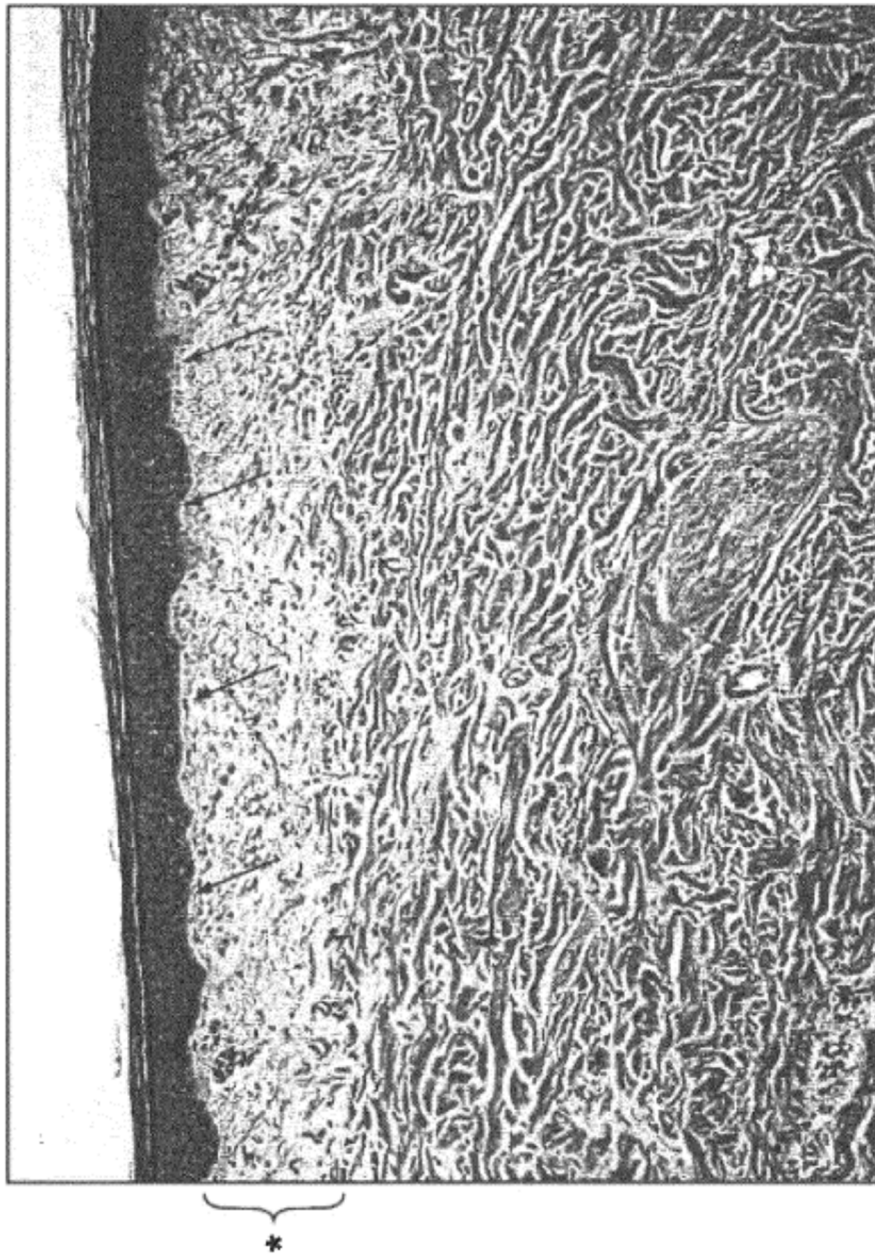
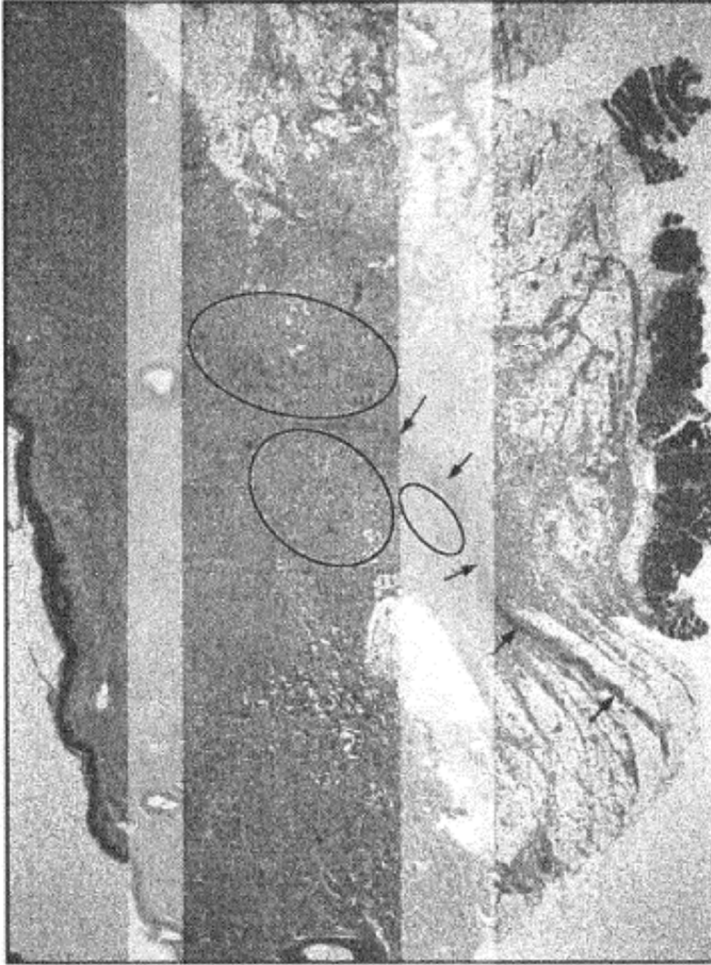


FIG. 25



**FIG. 26**

Figura 5: herida de espesor total tratada con MV preparadas por nuestros métodos en el día 28 (12,5X)  
 Las flechas ilustran el crecimiento de nuevos nervios en una herida en remodelación.  
 El crecimiento del nervio está asociado a la angiogénesis, resaltada en las zonas marcadas con un círculo.  
 Estos hallazgos son altamente indicativos de regeneración tisular.  
 Esto no se ha observado nunca.  
 No se observa en los controles ni en las heridas tratadas con VM ultracentrifugada.

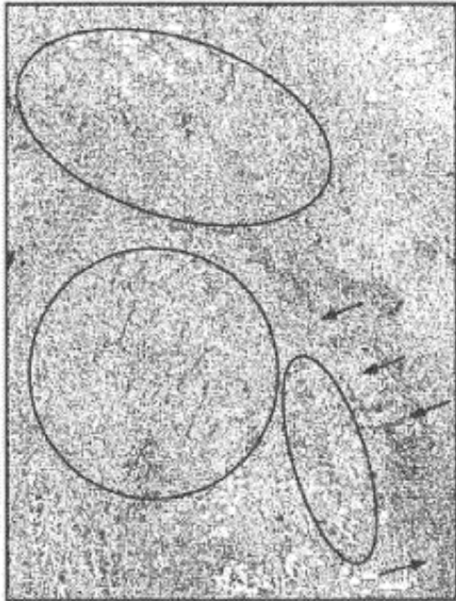


FIG. 27A

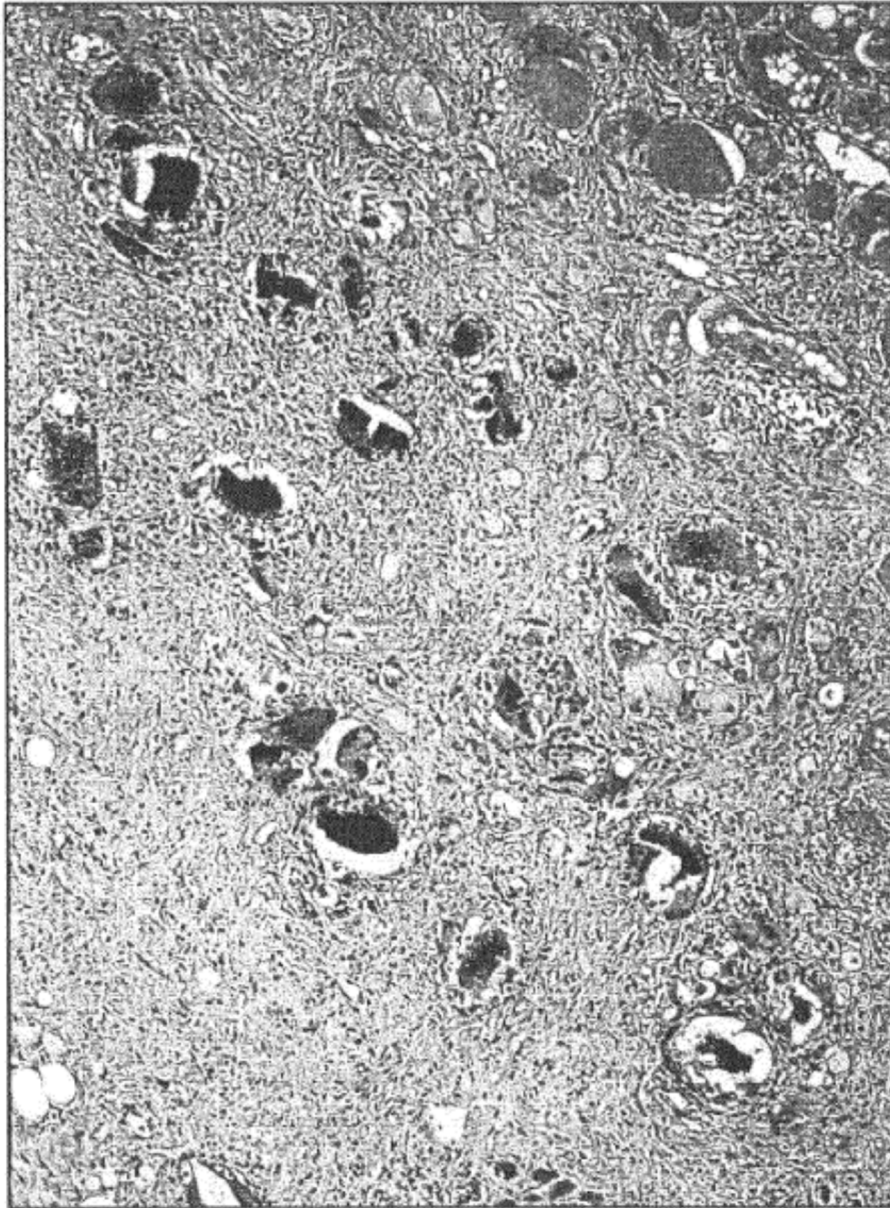


FIG. 27B

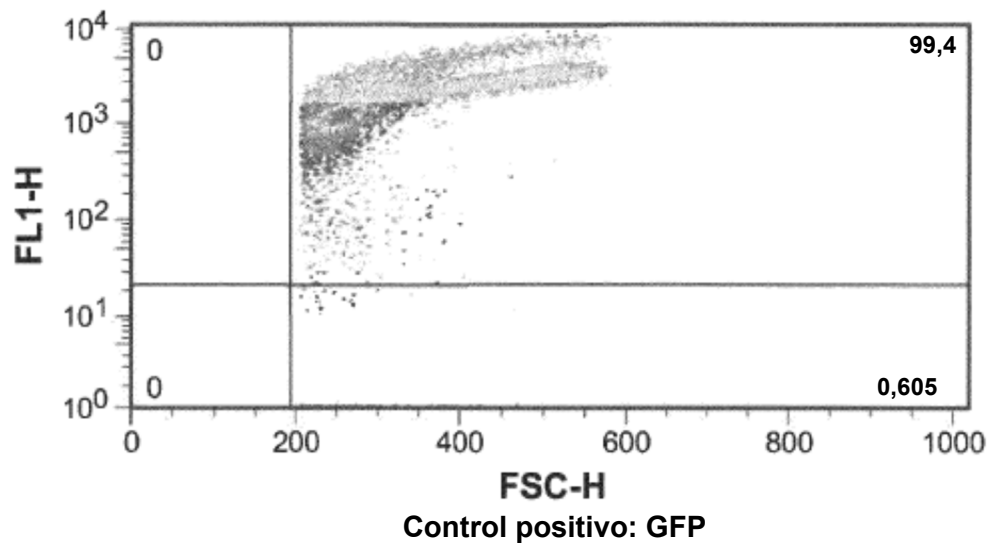


FIG. 27C

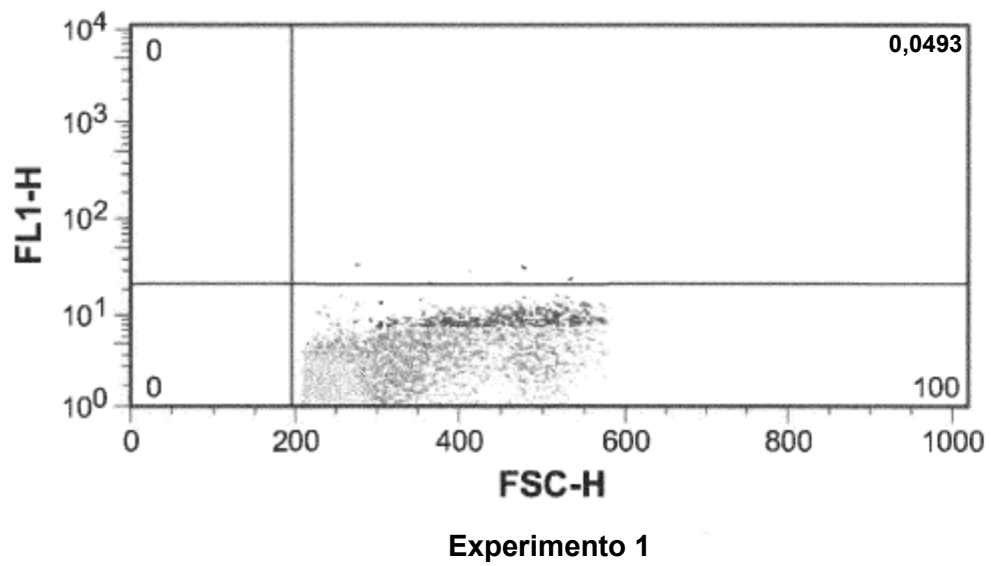




**FIG. 28**



**FIG. 29A**



**FIG. 29B**



FIG. 30A



FIG. 30B

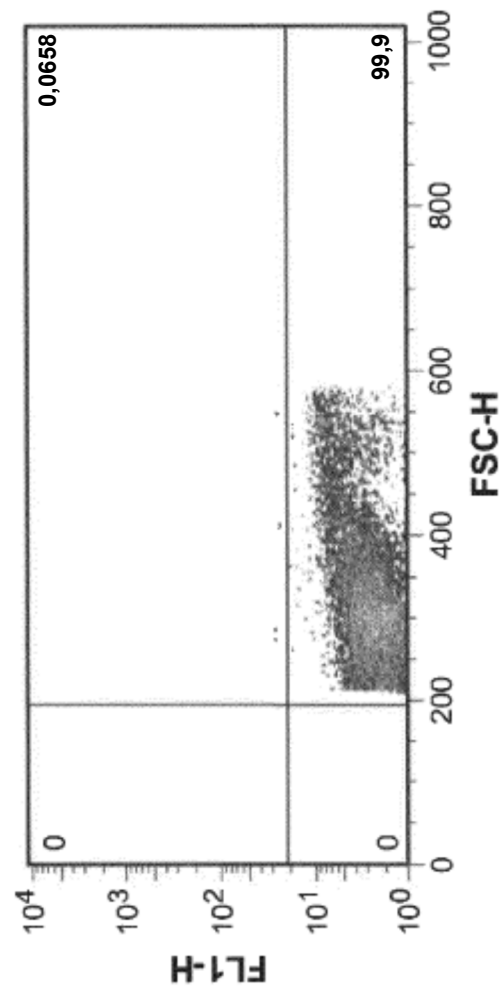
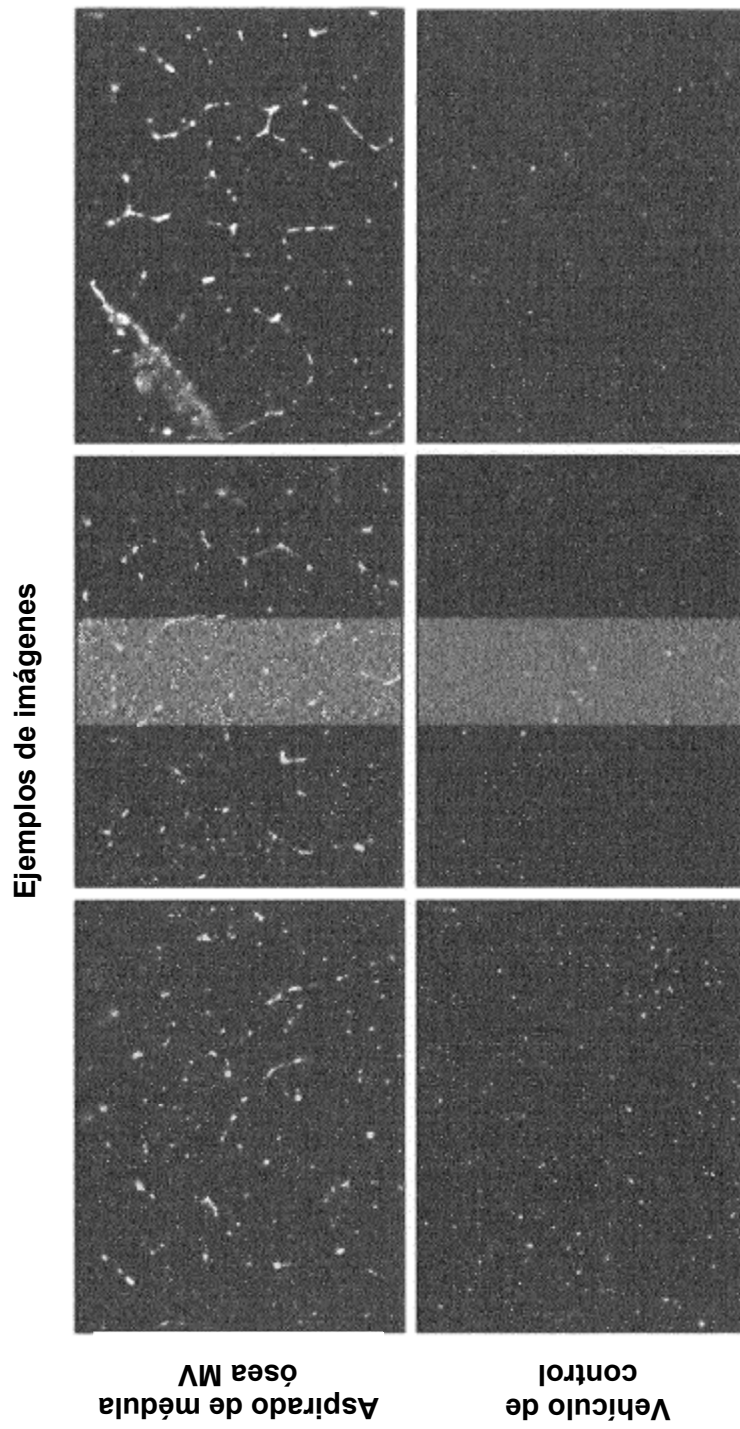


FIG. 30C





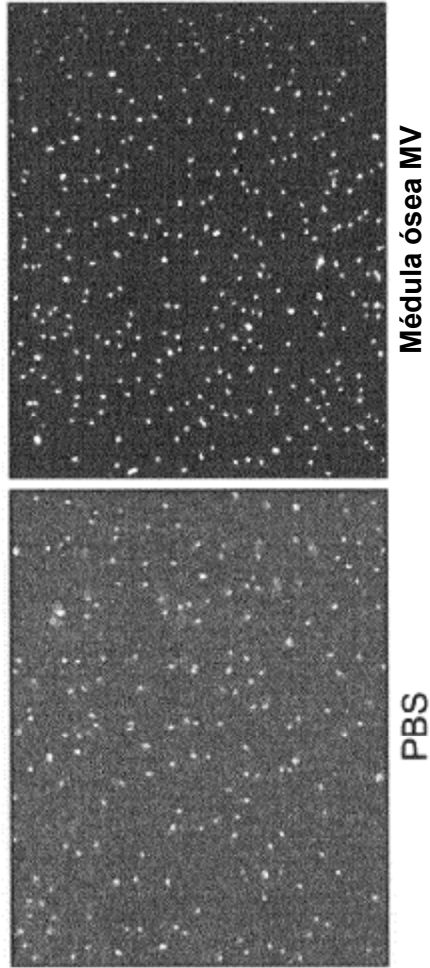


FIG. 32A

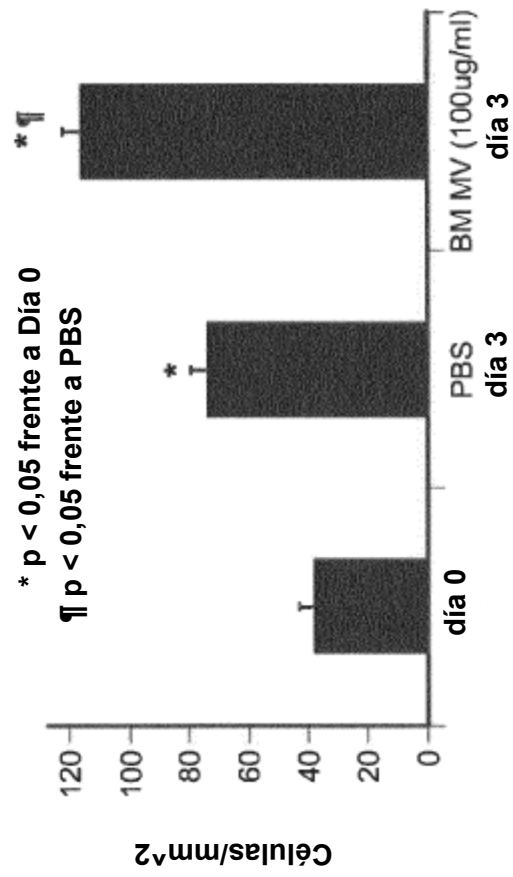


FIG. 32B