

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 941 757**

51 Int. Cl.:

A61K 35/50	(2015.01) A61P 25/00	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01) A61P 25/02	(2006.01)
A61P 1/16	(2006.01) A61P 25/16	(2006.01)
A61P 1/18	(2006.01) A61P 25/28	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A61P 9/10	(2006.01) A61P 37/08	(2006.01)
A61P 11/00	(2006.01)	
A61P 11/02	(2006.01)	
A61P 11/06	(2006.01)	
A61P 17/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2016 PCT/AU2016/050468**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16197196**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2016 E 16806439 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2023 EP 3307286**

54 Título: **Exosomas amnióticos alogénicos de mamífero para el tratamiento de una enfermedad fibrótica**

30 Prioridad:

12.06.2015 AU 2015902214
12.04.2016 AU 2016901349

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2023

73 Titular/es:

HUDSON INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH (50.0%)
27-31 Wright Street
Clayton, VIC 3168, AU y
MONASH UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

WALLACE, EUAN y
LIM, REBECCA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 941 757 T3

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

DESCRIPCIÓN

Exosomas amnióticos alogénicos de mamífero para el tratamiento de una enfermedad fibrótica

5 Antecedentes

Campo

10 La presente descripción se refiere en general al tratamiento de sujetos mamíferos mediante un enfoque terapéutico basado en células mejorado para facilitar la regeneración y/o reparación de tejidos. La presente descripción también incluye medicamentos útiles para el tratamiento de sujetos mamíferos.

Descripción de la técnica relacionada

15 Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que hace referencia el autor en esta memoria descriptiva se recopilan alfabéticamente al final de la descripción.

20 La referencia a cualquier estado de la técnica en esta memoria descriptiva no es, y no se debe tomar como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que este estado de la técnica forma parte del conocimiento general común en cualquier país.

25 La medicina moderna ha avanzado mucho mediante la identificación de agentes terapéuticos químicos y biológicos tales como los antibióticos. Sin embargo, muchos medicamentos tienen funciones multifactoriales, algunas de las cuales influyen en efectos fisiológicos fuera del objetivo. La terapéutica basada en células se ha propuesto como el próximo pilar de la medicina moderna (Fishback et al. (2013) *Sci Transl Med* 5:179 ps7,).

30 Uno de los factores limitantes de las terapias basadas en células es la posibilidad de que el producto sea incoherente. Esto se pone de manifiesto en los ensayos que involucran células madre. Las células madre mesenquimales (MSC), por ejemplo, aunque están bien caracterizadas en la bibliografía y han alcanzado el nivel de ensayo clínico, generalmente requieren un pasaje seriado para su uso. Esto puede afectar negativamente, y a menudo lo hace, en cuándo y cómo se pueden utilizar las células

35 Un enfoque para contrarrestar este problema ha sido utilizar células progenitoras mesenquimales almacenadas en bancos. De este modo, al menos se evita el retraso entre la recolección y la terapia. Sin embargo, esto introduce una variabilidad en la potencia de las células entre los donantes y no aborda el problema del impacto negativo del pasaje seriado.

40 Una medida provisional para abordar este problema es disponer de un banco de células "maestro". Una vez más, esto no supera el problema inevitable de que hay un número finito de pasajes que las células pueden experimentar antes de que se produzca la senescencia y los cambios epigenéticos/cariotípicos (Schellenberg et al. (2011) *Aging* (Albany NY) 3:873-888). También existe el riesgo de rechazo inmunitario después de dosis repetidas.

45 A modo de ejemplo, con las notables mejoras en la vigilancia obstétrica y los cuidados neonatales, cada vez sobreviven más bebés prematuros, lo que se traduce en un aumento de la prevalencia de las "enfermedades del prematuro". Una afección particularmente debilitante es la displasia broncopulmonar (BPD), que es una enfermedad pulmonar crónica incurable de los recién nacidos muy prematuros. Se caracteriza por el mal desarrollo y la detención de los alvéolos y la alteración de la arquitectura capilar pulmonar. La BPD es uno de los principales casos de morbilidad y mortalidad en recién nacidos. Los sobrevivientes de BPD también tienen un grave riesgo de padecer enfermedades respiratorias obstructivas en la edad adulta temprana (Doyle et al, (2006) *Paediatrics* 118: 108-113) y enfermedades crónicas generales y deterioro cognitivo (Lodha et al. (2014) *PLoS ONE*: e90843). Aunque las células madre mesenquimales se han propuesto como una posible terapia basada en células para la BPD, por los motivos expuestos anteriormente, es probable que haya lotes de células con una eficacia funcional muy diferente, lo que, además de causar estrés emocional, puede retrasar otras opciones terapéuticas.

55 El problema del daño a la arquitectura capilar pulmonar no se limita a los bebés prematuros humanos. La industria de las carreras de animales, y en particular la de las carreras de caballos, se enfrenta al problema de la hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (EIPH). En algunas jurisdicciones, a un caballo, por ejemplo, que presenta sangrado nasal más de dos veces después de una carrera se le prohíbe competir de por vida. Esto puede acarrear pérdidas económicas devastadoras. Es probable que un enfoque terapéutico químico para prevenir o tratar la EIPH origine problemas éticos en términos de mejora del rendimiento y, en cualquier caso, es improbable que dicho enfoque regenere los capilares estallados.

65 Se han documentado los efectos beneficiosos de las células epiteliales amnióticas humano (hAEC) (por ejemplo, Hodges et al. (2012) *Am J Obstet Gynecol* 206: 448e8-448e15; Murphy et al. (2012) *Cell Transplant* 1: 1477-1492; Vosdoganes et al. (2013) *Cytotherapy* 15:1021-1029; Yawno et al. (2013) *Dev Neurosci* 35:272-282). Sin embargo, es necesario determinar su mecanismo de acción.

Se determinó que las células epiteliales amnióticas humano pretérmino tienen un potencial reparador limitado. A diferencia de las hAEC a término, las hAEC pretérmino no se diferenciaron en un linaje pulmonar después del cultivo en medios de crecimiento de vías respiratorias pequeñas y las hAEC pretérmino también ejercieron efectos protectores significativamente menores que las hAEC a término tras una lesión pulmonar aguda (Lim et al. (2013) Placenta 34: 486-492). El documento WO 2008/144820 se refiere a un método de terapia celular para una enfermedad pulmonar que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de células madre epiteliales amnióticas (AEC) multipotentes. Se determinó además que las células epiteliales amnióticas humano no anulan la fibrosis pulmonar en ratones con función macrófaga alterada (Murphy et al. (2012) Cell Transplantation, 21(7): 1477-92).

Es evidente, por lo tanto, que se necesita abordar el problema de las terapias basadas en células y se requiere una estrategia alternativa.

Síntesis

De acuerdo con la presente invención se identifica un vehículo vesicular para la comunicación celular liberado por las células epiteliales amnióticas (AEC) de mamíferos. Las vesículas, denominadas en la presente "exosomas amnióticos", son vesículas extracelulares de tamaño nanométrico (50-100 nm) derivadas de endosomas tardíos y liberadas de las superficies celulares.

En la presente se enseña una forma mejorada de terapia basada en células epiteliales amnióticas de mamíferos. La mejora comprende el uso de exosomas amnióticos de tamaño nanométrico que son liberados por las células epiteliales y ejercen efectos reparadores mediante la activación de mecanismos de reparación endógenos. En la presente se muestra que los exosomas amnióticos actúan directamente sobre las células inmunitarias para, entre otras cosas, reducir la proliferación de células T, aumentar la fagocitosis de los macrófagos, activar las células madre e inhibir la producción de colágeno en los fibroblastos activados. En la presente se propone que los exosomas amnióticos liberan un perfil de carga exosómica forma de proteínas (por ejemplo, citoquinas) y moléculas genéticas (por ejemplo, ARNm, ARNm y ARN no codificadores).

La biogénesis de los exosomas implica la formación de vesículas intraluminales por el brote hacia el interior de la membrana limitante del endosoma tardío. A continuación, los endosomas tardíos se fusionan con la membrana plasmática para liberar los exosomas. Una vez secretados, los exosomas pueden ser captados por las células diana situadas muy cerca de la célula progenitora o desplazarse a sitios distales a través de la circulación. Mecánicamente, los exosomas funcionan como vectores complejos que contienen material de la célula progenitora. Pueden contener proteínas y material genético, que luego se transfieren a sus células diana.

La presente invención se basa, por lo tanto, en el desarrollo de un enfoque mejorado de la terapia basada en células. La presente descripción enseña el uso de los exosomas amnióticos que se liberan de las células epiteliales amnióticas de mamíferos y que tienen efectos inmunomoduladores, pro-regenerativos y reparadores. Los exosomas amnióticos ejercen un efecto sobre las células inmunitarias para reducir la proliferación de células T, aumentar la fagocitosis de macrófagos y activar las células madre endógenas mediante la liberación de moléculas proteómicas y genéticas beneficiosas tales como ARNm, ARNm y ARN no codificadoras.

Los exosomas amnióticos tienen efectos beneficiosos no solo en los seres humanos, sino también en mamíferos no humanos. Por lo tanto, la presente invención se extiende a aplicaciones humanas y veterinarias. Las AEC procedentes de sujetos humanos se denominan en la presente hAEC".

Los exosomas amnióticos se pueden producir en grandes cantidades mediante el cultivo de células epiteliales amnióticas de mamíferos en un biorreactor y aislamiento de los exosomas amnióticos del medio de cultivo acondicionado. Las células epiteliales se pueden mantener como una línea celular inmortalizada. Los exosomas amnióticos se pueden aislar cuando sea necesario o almacenar en estado liofilizado.

Una característica innovadora de la presente invención es que no es necesario identificar un donante compatible de células epiteliales amnióticas de mamíferos para utilizar los exosomas amnióticos. Los exosomas no inducen una reacción inmunológica adversa. Más bien, los donantes se seleccionan en función de la etapa gestacional y/u otras características tales como la salud del neonato o de los bebés nacidos a término. En una realización, sin embargo, los exosomas amnióticos se derivan de hAEC de pacientes en el período final terminal de un embarazo. Las células epiteliales amnióticas producen exosomas amnióticos que son al menos tan buenos para promover la reparación tisular o neuronal, regeneración y/o reparación en diferentes condiciones fisiológicas como las células epiteliales amnióticas. Sin embargo, no presentan ninguna de las desventajas de una terapia basada en células. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es la selección de donantes con el fin de identificar las células epiteliales amnióticas que producen exosomas amnióticos útiles para tratar una afección deseada. Esto puede llevar a la generación de un banco de células epiteliales amnióticas. A continuación, se puede seleccionar un lote particular de células en función de la enfermedad o afección que se va a tratar.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los exosomas amnióticos también se incluyen en las enseñanzas de la presente descripción.

En la presente se enseña una forma mejorada o modificada de terapia basada en células.

5 En consecuencia, la presente invención se refiere a exosomas amnióticos de mamífero derivados de células epiteliales amnióticas de mamífero alogénicas derivadas de un mamífero donante de la misma especie para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno fibrótico del pulmón, hígado, corazón, riñón o páncreas en un sujeto mamífero, que comprende la administración sistémica o local de dichos exosomas amnióticos de mamífero, en el que los exosomas se derivan de células epiteliales amnióticas a término o pretérmino o de un banco de células epiteliales amnióticas inmortalizadas.

Más preferentemente, los exosomas de mamífero son exosomas amnióticos humanos. Se prefiere además que el sujeto mamífero para tratar sea un ser humano.

15 Alternativamente, se prefiere que el sujeto mamífero para tratar sea un animal de carreras seleccionado del grupo que consiste en un caballo, perro y camello. Más preferentemente, el animal de carreras se está tratando por hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio.

20 Preferentemente, el sujeto humano se está tratando de una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en displasia broncopulmonar, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, infección pulmonar crónica, asma, rinitis alérgica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

25 Preferentemente, los exosomas amnióticos revierten la infección pulmonar y la fibrosis y revierten la activación de fibroblastos pulmonares primarios.

Se prefiere además que los exosomas de mamífero para uso de la presente invención estén comprendidos en una composición farmacéutica. Más preferentemente, la composición farmacéutica se administra por vía intranasal.

30 Breve descripción de las figuras

Algunas figuras contienen representaciones o entidades en color. Las fotografías en color se pueden solicitar al titular de la patente o a la Oficina de Patentes correspondiente. Si se obtienen en una Oficina de Patentes, se puede exigir el pago de un arancel.

35 Figura 1 es una representación fotográfica de (A) una micrografía electrónica de exosomas amnióticos que muestra la morfología típica en forma de copa y aproximadamente 100 nm de diámetro; (B) la expresión de marcadores de la biogénesis de exosomas, Alix y TSG101. Alix y TSG101 son biomarcadores de exosomas.

40 Figura 2 es una representación gráfica que muestra que (A) los exosomas amnióticos inhiben la proliferación de células T de forma similar a los medios acondicionados hAEC; (B) los exosomas amnióticos aumentan la fagocitosis de macrófagos.

45 Figura 3 es una representación gráfica que muestra la relación tejido:espacio aéreo mejora mediante los exosomas amnióticos en un modelo de ratón con displasia broncopulmonar (BPD).

Figura 4 es una representación diagramática del tiempo experimental utilizado en el Ejemplo 3 que muestra la inyección intraamniótica de LPS en E16, la inyección de exosomas/células en el día 4 posnatal 4 y los puntos de sacrificio (cruces).

50 Figura 5 es una representación gráfica que muestra que (A) los exosomas a término son más inmunosupresores que los exosomas pretérmino; (B) los exosomas a término son más capaces de aumentar la fagocitosis de los macrófagos, como muestra la marcación pHRodó n=3 donantes por grupo.

55 Figura 6 es una representación gráfica que muestra que los exosomas amnióticos revierten la inflamación pulmonar establecida y la fibrosis en un modelo de ratón de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. (A);(B) Ratones C57Bl6 hembra de 6-8 meses de edad. 10 µg o 50 µg de exosomas de hAEC a término, administrados por vía intranasal 7 días después de la estimulación con bleomicina.

60 Figura 7 es una representación gráfica que muestra que los exosomas amnióticos revierten la activación de fibroblastos pulmonares humanos primarios in vitro. Cuando se cultivaron en presencia de 5 mg/ml de factor de crecimiento transformante β, los exosomas redujeron los niveles de proteína de actina α de músculo liso en 24 horas.

65 Figura 8 (no es parte de la presente invención) es una representación diagramática que muestra que los exosomas amnióticos contienen ARNm dirigidos a vías de señalización de receptores de citoquinas. Los recuadros amarillos

indican una diana de uno o más ARNmi.

5 Figura 9 (no es parte de la presente invención) es una representación diagramática que muestra que los exosomas amnióticos contienen ARNmi dirigidos a vías de señalización Wnt. Los recuadros amarillos indican una diana de uno o más ARNmi.

10 Figura 10 (no es parte de la presente invención) es una representación diagramática que muestra que los exosomas amnióticos contienen ARNmi dirigidos a vías de señalización PI3K-Akt. Los recuadros amarillos indican una diana de uno o más ARNmi.

Figura 11 (no es parte de la presente invención) es una representación diagramática que muestra que los exosomas amnióticos contienen ARNmi dirigidos a vías de señalización TGF-β. Los recuadros amarillos indican una diana de uno o más ARNmi.

15 Figura 12A es una representación gráfica y las Figuras 12B, C y D son representaciones fotográficas que muestran los efectos regenerativos pulmonares de los exosomas amnióticos que comprenden la relación de espacio aéreo tisular (%) entre hAEC sanas de control, exosomas a término y exosomas pretérmino. Un exosoma “a término” es un exosoma aislado de hAEC al final del embarazo. El exosoma “pretérmino” se aísla antes del final del embarazo.

20 Figura 13A a C son representaciones fotográficas que muestran que los exosomas amnióticos desencadenan la regeneración en los pulmones al igual que las hAEC. La tintura oscura es evidencia de puntas positivas para elastina.

25 Figura 14 es una representación gráfica que muestra que los exosomas amnióticos, pero no los exosomas de fibroblastos, desencadenan una respuesta endógena de células madre en los pulmones. Esta respuesta es significativamente mayor que la inducida por las hAEC.

30 Figuras 15A y B muestran que los exosomas amnióticos fueron antifibróticos en el hígado, como se evidencia mediante la tinción con rojo Sirius (A) y el análisis inmunohistoquímico de α-actina de músculo liso (α-SMA) de secciones histológicas de hígado CCL4 + solución salina versus CCL4 + exosoma.

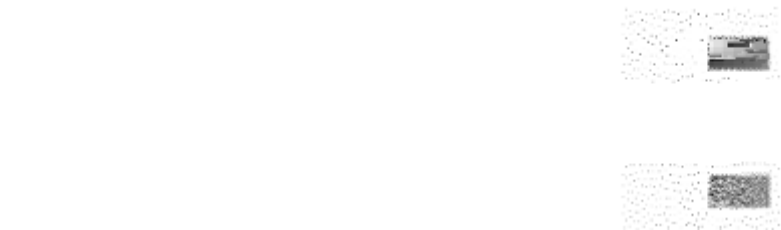
Figura 16 es una representación gráfica que muestra las diferencias en el nivel proteómico entre los exosomas a término versus hAEC pretérmino.

35 Figura 17 es una representación gráfica de una comparación de componentes celulares entre hAEC y células madre mesenquimales (MSC) totales. hAEC total exo total MSC exo (Anderson et al. (2016) Stem cells <http://doi.org/10.1002/stem.2298>).



hAEC total exo total MSC exo (Anderson et al. (2016) Stem cells <http://doi.org/10.1002/stem.2298>).

45 Figura 18 es una representación gráfica de una comparación del proceso biológico entre hAEC y MSC total (Anderson et al. (2016) supra).



hAEC total exo total MSC exo (Anderson et al. (2016) supra).

Descripción detallada

- 5 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprende” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, implican la inclusión de un elemento o número entero o etapa de método o grupo de elementos o números enteros o etapas de método indicados, pero no la exclusión de ningún elemento o número entero o etapa de método o grupo de elementos o números enteros o etapas de método.
- 10 Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen aspectos plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. En consecuencia, por ejemplo, la referencia a “una enfermedad o afección” incluye una única enfermedad o afección, así como dos o más enfermedades o afecciones; la referencia a “un exosoma” incluye un único exosoma, así como dos o más exosomas; la referencia a “la descripción” incluye un aspecto único y múltiples aspectos enseñados por la descripción; y similares. El término “invención” engloba los aspectos enseñados y facilitados en la presente. Una “enfermedad” o “afección” también
- 15 incluye un “trastorno”. Todos estos aspectos están permitidos dentro de la amplitud de la presente invención. Todas las variantes y derivados contemplados en la presente están comprendidos por las “formas” de la invención.
- 20 Los exosomas amnióticos también revierten la inflamación pulmonar establecida y la fibrosis pulmonar y revierten la activación de los fibroblastos pulmonares primarios. Esto también se aplica a la fibrosis de otros órganos tales como hígado, páncreas, corazón y riñón. Además, contienen ARNmi, ARNm y ARN no codificadores que se dirigen a las vías de señalización de receptores de citoquinas, vías de señalización de Wnt, vías de señalización de PI3K-Akt y vías de señalización de TGF- β , así como vías de señalización implicadas en una amplia variedad de procesos fisiológicos y neurológicos (no es parte de la presente invención).
- 25 Los exosomas amnióticos, en una realización, facilitan la reparación del daño pulmonar. Esto es importante en el tratamiento de la displasia broncopulmonar (BPD) en bebés humanos. También tiene aplicación veterinaria en el tratamiento de la hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (EIPH) en animales de carreras como caballos, perros de carreras (por ejemplo, galgos) y camellos.
- 30 En consecuencia, la presente invención habilitada en la presente son exosomas amnióticos de mamífero derivados de células epiteliales amnióticas de mamífero alogénicas de un mamífero donante de la misma especie para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno fibrótico del pulmón, hígado, corazón, riñón o páncreas en un sujeto mamífero, un sujeto mamífero(sic) que comprende la administración sistémica o local de dichos exosomas amnióticos de mamífero, en el que los exosomas se derivan de células epiteliales amnióticas a
- 35 término o pretérmino o de un banco de células epiteliales amnióticas inmortalizadas
- 40 La referencia a un “sujeto mamífero” incluye cualquier mamífero que requiera tratamiento. En una realización, el sujeto mamífero es un ser humano. El término “AEC” significa “célula epitelial amniótica”. Cuando proceden de un ser humano, las AEC se denominan “hAEC”.
- 45 Por lo tanto, la presente memoria descriptiva es instructiva para tratar a un sujeto humano, que comprende la administración sistémica o local de exosomas amnióticos humanos derivados de células epiteliales amnióticas humanas alogénicas de un donante humano.
- 50 En otra realización, el sujeto mamífero es un mamífero no humano tal como pero sin limitación, caballo, vaca, oveja, cabra, cerdo, alpaca, llama, perro, gato o camello.
- 55 En una realización, el sujeto mamífero necesita tratamiento. El término “tratamiento” abarca la reparación, regeneración o promoción de la regeneración y/o reparación de células, tejidos y vías fisiológicas. Los exosomas se proponen para el tratamiento de enfermedades, afecciones o trastornos fibróticos del pulmón, hígado, corazón, riñón y páncreas.
- 60 Sin pretender limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, se propone en la presente que los exosomas amnióticos de mamíferos representan un vehículo vesicular para la comunicación de las células epiteliales del amnios y liberan moléculas proteómicas y genéticas que proporcionan un cóctel de moléculas beneficiosas para facilitar la reparación, regeneración y restablecimiento. También se propone que el perfil de moléculas proteómicas y genéticas difiera en función de la etapa gestacional de la donante de la que se obtienen las células epiteliales del amnios. Por lo tanto, la presente memoria descriptiva enseña la creación de un banco de células epiteliales amnióticas de mamífero inmortalizadas de diferentes donantes en diferentes etapas gestacionales.
- 65 Las células epiteliales entonces se seleccionan sobre la base de la enfermedad o afección del sujeto para tratar y la base del perfil de moléculas proteómicas y genéticas que producen los exosomas amnióticos. La presente memoria descriptiva enseña que, de acuerdo con la enfermedad o afección que se va a tratar, se pueden preferir exosomas amnióticos que tengan un perfil proteómico y/o genético particular.
- 65 Cuando se utilizan en terapia, los exosomas amnióticos también se pueden denominar como medicamento, agente, producto terapéutico, agente derivado de terapia celular, ingrediente activo y similares.

La presente invención se extiende a una composición farmacéutica que comprende exosomas amnióticos alogénicos de mamífero seleccionados para su uso en el tratamiento de un sujeto mamífero, la composición farmacéutica comprende además uno o más portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

5 En una realización, el sujeto mamífero es un sujeto humano.

Por lo tanto, la presente invención enseña una composición farmacéutica que comprende exosomas amnióticos alogénicos humanos para su uso en el tratamiento de un sujeto humano, además la composición farmacéutica comprende uno o más portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden contener un compuesto fisiológicamente aceptable que actúa, por ejemplo, para estabilizar los exosomas amnióticos. Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o un dextrano, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular, o excipientes que incluyen agua o solución salina u otros estabilizadores y/o buffer. También se pueden utilizar detergentes para estabilizar o aumentar o disminuir la absorción de los exosomas amnióticos, incluidos los portadores liposómicos. Los portadores y formulaciones farmacéuticamente aceptables son conocidos por el experto y se describen en detalle en la bibliografía científica y de patentes, ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), 18ª edición, Mack Publishing Company, Easton, ("Remington's").

Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen conservantes que son útiles para prevenir el crecimiento o la acción de microorganismos en una formulación de exosomas amnióticos. Varios conservantes son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, ácido ascórbico. Los expertos en la técnica apreciarán que la elección de un portador farmacéuticamente aceptable que incluya un compuesto fisiológicamente aceptable depende, por ejemplo, de la vía de administración del exosoma amniótico de la presente invención y de la fisiología o bioquímica particular de las proteínas y ácidos nucleicos producidos por los exosomas.

La administración de los exosomas amnióticos, en forma de una composición farmacéutica, se puede realizar por cualquier medio conveniente conocido por los expertos en la materia y de acuerdo con la enfermedad o afección o sitio de la lesión. Las vías de administración incluyen, entre otras, por vía respiratoria, intratraqueal, nasofaríngea, intravenosa, intraperitoneal, intratorácica, subcutánea, intracraneal, intradérmica, intramuscular, intraocular, intratecal, intracerebral, intranasal, rectal, tópica, parche, vendaje e implante. En una realización, los exosomas amnióticos se pueden pulverizar, por ejemplo, en sujetos con heridas por quemaduras graves.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles.

Las soluciones inyectables estériles en forma de dispersiones se preparan generalmente mediante la incorporación de los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene los exosomas amnióticos.

Para la administración parenteral, los exosomas amnióticos se pueden formular con un portador farmacéutico y administrarse como suspensión. Los portadores adecuados ilustrativos son agua, solución salina, soluciones de dextrosa, soluciones de fructosa, etanol o aceites de origen animal, vegetal o sintético. El portador también puede contener otros ingredientes, por ejemplo, conservantes, buffer y similares. Cuando los exosomas amnióticos se administran por vía intratecal, también se pueden formular en líquido cefalorraquídeo.

Para la administración transmucosa o transdérmica, se pueden utilizar penetrantes apropiados para la barrera a permeabilizar para administrar el agente. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, para la administración transmucosa, sales biliares y derivados del ácido fusídico. Además, se pueden utilizar detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosa puede ser a través de aerosoles nasales o utilizando supositorios, por ejemplo, Sayani and Chien (1996) Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 13:85-184.

Los exosomas amnióticos para uso de la presente invención también se pueden administrar en mecanismos de administración sostenida o liberación sostenida, que pueden administrar los exosomas internamente durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, en las formulaciones de la invención se pueden incluir microesferas o cápsulas biodegradables u otras configuraciones poliméricas biodegradables capaces de administrar de forma sostenida los exosomas amnióticos (por ejemplo, Putney and Burke (1998) Nat Biotech 16:153-157).

En la preparación de composiciones farmacéuticas para el uso de la presente invención, se pueden utilizar y manipular diversas técnicas de formulación para alterar la biodistribución. Los expertos en la técnica conocen varios métodos para alterar la biodistribución. Los ejemplos de tales métodos incluyen la protección de los exosomas en vesículas compuestas de sustancias tales como proteínas, lípidos (por ejemplo, liposomas), carbohidratos o polímeros sintéticos. Para un análisis general de la farmacocinética, ver, por ejemplo, Remington's.

Las composiciones farmacéuticas para uso de la invención se pueden administrar en una variedad de formas de dosis unitarias de acuerdo con el método de administración. Tales dosis son típicamente de naturaleza

recomendatoria y se ajustan según el contexto terapéutico particular. La cantidad de exosomas amnióticos adecuada para obtener esto se define como “cantidad efectiva”. El esquema de dosificación y las cantidades efectivas para este uso, es decir, el “régimen de dosificación”, dependerán de diversos factores, que incluye el estadio de la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, el estado general de salud del paciente, el estado físico del paciente, la edad, la formulación farmacéutica y la concentración o selectividad de los exosomas amnióticos. Al calcular el régimen de dosificación para un paciente, también se tiene en cuenta el modo de administración. El régimen de dosificación también debe tener en cuenta la tasa de depuración de la composición farmacéutica, y similares. Ver, por ejemplo, Remington; Egleton y Davis (1997), *Peptides* 18:1431-1439; Langer (1990), *Science* 249:1527-1533. En una realización, se administran de 0,05 µg a 100 µg de exosomas amnióticos. En esto se incluye de 0,1 µg a 50 µg y de 0,1 µg a 20 µg y cualquier cantidad intermedia.

De acuerdo con la invención, los exosomas amnióticos o las composiciones farmacéuticas que los comprenden se pueden coadministrar en combinación con uno o más agentes. En la presente la referencia a “coadministrado” significa la administración simultánea en la misma formulación o en dos formulaciones diferentes por la misma vía o por vías diferentes, o la administración secuencial por la misma vía o por vías diferentes. En la presente la referencia a administración “secuencial” significa una diferencia de tiempo de segundos, minutos, horas o días entre la administración de los exosomas amnióticos y la de otro agente. La coadministración se puede producir en cualquier orden. Los ejemplos de agentes que se pueden coadministrar incluyen las citoquinas. Por lo general, la selección de otro agente se basa en la enfermedad o afección que se va a tratar.

Alternativamente, se pueden utilizar terapias de direccionamiento para administrar los exosomas amnióticos a tipos de células o localizaciones en el cuerpo, mediante el uso de sistemas de direccionamiento, tales como anticuerpos o ligandos específicos de células. El direccionamiento puede ser deseable por una variedad de motivos, por ejemplo, para promover el tratamiento local en un sitio que necesita tratamiento.

En la presente se describe además la producción de exosomas amnióticos, que no forma parte de la presente invención. Convenientemente, esto se logra en un biorreactor que puede estar en la forma de un reactor de cultivo por lotes o un reactor de cultivo de flujo continuo. Generalmente, las células epiteliales amnióticas se immortalizan y se utilizan para sembrar el medio de cultivo en el biorreactor. El medio acondicionado resultante luego se recolecta y los exosomas amnióticos se aíslan y formulan para su uso inmediato o se almacenan, por ejemplo, mediante liofilización, para su uso posterior.

En la presente también se contemplan kits, que no son parte de la presente invención. Los kits pueden ser terapéuticos o de diagnóstico. El kit terapéutico puede comprender un lote seleccionado de exosomas amnióticos liofilizados y uno o más portadores, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables y/u otro agente activo. Un kit de diagnóstico puede comprender reactivos para determinar el perfil proteómico o genético de un lote de exosomas amnióticos.

Ejemplos

Los aspectos enseñados en la presente se describen ahora con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Producción de exosomas amnióticos

Se desarrolla un protocolo para aislar exosomas amnióticos (Figura 1). Esta es la primera descripción de exosomas amnióticos y verificación de su actividad biológica. Los aislamientos primarios de hAEC se cultivan en medio libre de suero (medio Ultraculture, Lonza) durante 96 horas antes de que las células sean retiradas y el medio acondicionado procesado para el aislamiento de exosomas por medio de ultracentrifugación en serie a 110.000g. Aproximadamente 1,5 - 2 µg de exosomas purificados por millón de hAEC se purifican sistemáticamente sin tener en cuenta la edad gestacional. Esto se puede aumentar de escala en cultivos tipo biorreactor sin contaminación por cuerpos apoptóticos.

Se probó la capacidad de los exosomas amnióticos para ejercer un efecto similar. Los exosomas amnióticos suprimen la proliferación de células T en una medida similar a los medios acondicionados hAEC, con un efecto de dosis aparente (0,1 µg versus 1 µg). La reducción de los exosomas de los medios acondicionados hAEC (ExD CM) anuló este efecto (Figura 2A), lo que indica que los exosomas amnióticos son un mediador principal de la supresión de células T. Los exosomas amnióticos fueron capaces de aumentar directamente la actividad fagocítica de los macrófagos (Figura 2B). Estos hallazgos indican que los efectos inmunomoduladores de los medios acondicionados hAEC se atribuyen en gran medida a los exosomas.

Ejemplo 2

Actividad de exosomas amnióticos

Se determinó si los exosomas amnióticos eran funcionales in vivo. Se inyectó una alícuota de 1 µg de exosomas amnióticos por vía intravenosa a ratones con bpd en el día 4 posnatal y se realizó una evaluación de la relación tejido: espacio aéreo en el día 14 posnatal. Los exosomas amnióticos fueron efectivos para revertir la simplificación alveolar (figura 3). Los exosomas amnióticos desempeñan un papel fundamental al prevenir o revertir los cambios perjudiciales en la arquitectura pulmonar, mediante la reducción de la simplificación alveolar y el reclutamiento de las células madre endógenas, al tiempo que resuelven la inflamación en ratones con bpd.

En resumen, los datos indican que los exosomas amnióticos modulan los eventos inmunológicos del huésped y la reparación pulmonar de forma similar a sus células progenitoras. Se propone que los exosomas amnióticos pueden recapitular las capacidades regenerativas de las haec in vivo. Al descubrir la naturaleza de la carga exosómica amniótica, se pueden utilizar para ejercer un profundo efecto inmunomodulador y pro-reparativo.

Se utiliza un modelo de ratón de bpd para determinar que la administración neonatal de exosomas amnióticos puede recuperar la estructura pulmonar, activar los nichos de células madre pulmonares y modular la inflamación en ratones con bpd a niveles comparables a los de los animales tratados con haec. Además, se ha determinado que esto producirá mejoras en los resultados fisiológicos a largo plazo (por ejemplo, hipertensión pulmonar y función pulmonar). Se analiza el contenido proteómico y de arnm/arnmi de los exosomas amnióticos para identificar vías específicas asociadas con la reparación mediada por haec.

Ejemplo 3

Efectos reparativos de exosomas amnióticos en ratones BPD

Los datos indican que los exosomas amnióticos ejercen efectos inmunomoduladores y pro-regenerativos in vitro e in vivo. Para comprender cómo afectan los exosomas amnióticos a la intercomunicación celular durante la reparación y determinar si los exosomas amnióticos por sí solos son suficientes para recapitular los efectos reparadores de las hAEC en un modelo animal de BPD, se comparan los efectos de dos dosis de exosomas amnióticos (1 µg y 10 µg) frente a una dosis optimizada de hAEC. Los fibroblastos y los exosomas de fibroblastos se utilizan como controles.

Se utiliza un modelo de ratón de BPD que combina dos de los principales factores contribuyentes a la BPD humana - inflamación perinatal e hiperoxia postnatal- para evaluar los efectos de los exosomas amnióticos término y pretérmino en la reparación pulmonar. Si bien existen limitaciones para modelizar una enfermedad compleja como la BPD con roedores, este modelo se presta al análisis molecular detallado. Los estudios con roedores son relativamente asequibles para evaluar los efectos de las dosis y los estudios a largo plazo para examinar los resultados en adolescentes y adultos. Brevemente, se inyectan 0,2 µg de lipopolisacárido (LPS) en 5 µL de solución salina en cada saco amniótico de fetos de ratón en E16 utilizando agujas de vidrio microforjado (diámetro interno: 70-80 µm) y un microinyector (IM-300, Narashige). Una vez nacidas, las crías de ratón recién nacidas y sus madres lactantes se colocan en una cámara de hiperoxia (65% de oxígeno) o en aire ambiente. Las madres lactantes se rotan cada 48 horas para evitar la toxicidad del oxígeno. Esta combinación de inflamación prenatal e hiperoxia posnatal causa lesiones pulmonares parecidas a la BPD humana (Vosdoganes et al. (2013) *Cytotherapy* 15:1021-1029; Noldetal. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 110:14384-14389) La terapia se administra en el día 4 posnatal. En la Figura 4 se muestra la cronología experimental con la inyección intraamniótica de LPS en E16, las inyecciones de exosomas/células en el día 4 posnatal y los puntos de sacrificio (cruces).

Los exosomas o las células se administran por vía intravenosa a través de la vena temporal superficial, utilizando el mismo equipo descrito para las inyecciones intraamnióticas y agujas de vidrio más anchas (100-120 de diámetro interno). El volumen final de inyección es de 10 µL que es bien tolerado por ratones de 4 días. Las crías de ratón se sacrifican en los días 7 y 14 posnatales para evaluar los cambios inmunológicos y el reclutamiento de células madre pulmonares y la reparación pulmonar. Dos cohortes de animales luego se transfieren al aire ambiente tras el destete y se someten a pruebas a las 4 y 10 semanas de edad para evaluar los efectos de la terapia neonatal en los resultados a largo plazo, por ejemplo, hipertensión pulmonar, función cardiovascular y respiratoria durante la adolescencia y el inicio de la edad adulta.

Las hAEC se aíslan de embarazos humanos a término (37-40 semanas). Para los experimentos se utilizan aislamientos primarios. Las hAEC de seis donantes se mezclan por igual para obtener una población uniforme para todos los experimentos con animales. Los animales que reciben hAEC reciben una única inyección de 100.000 hAEC el día 4 posnatal. Para obtener los exosomas amnióticos, se coloca una parte de las hAEC mezcladas en un medio de cultivo (10 millones por 25 ml de medio Ultraculture, Lonza) durante 96 horas. A continuación, se aíslan los exosomas de los medios acondicionados. La naturaleza exosómica del pellet aislado se obtiene mediante la realización de transferencias western para marcadores exosómicos (TSG101 y Alix), así como el tamaño y la discriminación por microscopía electrónica. Los exosomas se resuspenden en solución salina y se administran en dosis de 1 µg a 10 µg en el día 4 posnatal.

Los fibroblastos de pulmón humano no favorecen la reparación pulmonar y son adecuados como tipo celular de control (Moodley et al. (2010) *Am J Respir Crit Care Med* i:643-651). Se administran fibroblastos de pulmón humano o exosomas de fibroblastos obtenidos mediante el mismo protocolo de cultivo que el anterior. Los fibroblastos se

administran a la misma dosis que las hAEC y los exosomas de fibroblastos a la dosis más alta (10 µg). Los grupos experimentales se describen en la Tabla 1.

Tabla 1

<i>Grupos experimentales</i>					
Ratones sanos		Grupo	Ratones BPD		Grupo
Solución salina	-	1	Solución salina	-	7
hAEC	100,000 células	2	hAEC	100,000 células	8
Exosomas amnióticos	1 µg	3	Exosomas amnióticos	1 µg	9
	10 µg	4		10 µg	10
Fibroblastos	100, 000 células	5	Fibroblastos	100, 000 células	11
Exosomas de fibroblastos	10 µg	6	Exosomas de fibroblastos	10 µg	12

5

Cambios inmunológicos

Los pulmones se recolectan y procesan para citometría de flujo como se describió previamente (Nold et al. (2013) supra; Tan et al. (2015) Stem Cell Res. Ther. 6:8). La fracción CD45 + se clasifica y se utiliza una combinación de marcadores de superficie y tinciones de citoquinas intracelulares para evaluar los cambios en el número, fenotipos y estados de activación de las células T (CD3, CD4, CD25, IFN γ , IL-4, IL17A, FoxP3), macrófagos (CD11b, F4/80, CD86, MHCII), neutrófilos (CD11c, Ly6G), células B (B220) y células NK (NK1.1). Se recolecta líquido de lavado broncoalveolar para medir los cambios en las citoquinas usando un Proteome Profiler (R&D Systems) como se describió previamente (Nold et al. (2013) supra).

15

Reclutamiento de células madre/progenitoras de pulmón

Los cambios en la población BASC se determinan mediante clasificación por flujo basada en los criterios CD45-/CD31-/Sca-1+/EpCam+ (Lee et al. (2014) Cell 156: 440-455). Para ello se utiliza la fracción CD45+ de células del estudio de células inmunitarias anterior. AT2 se clasifica sobre la base de la clasificación por flujo de CD31-/Sca-1-/autofluorescente^{alta}. Las diferencias en los perfiles transcripcionales se determinan mediante PCR digital de célula individual (Fluidigm, qdPCR 37K). Las células individuales clasificadas por flujo se capturan en una placa microfluidica de 96 pocillos (C1 Single Cell Autoprep System, Fluidigm) donde se producirá la lisis celular, el aislamiento del ARN, la preamplificación y la conversión del ADNc. A continuación, las muestras se cargan en tarjetas microfluidicas para la PCR digital. Los datos se analizan utilizando el conjunto de herramientas de análisis SINGULAR v2.0. Debido a que las vías de activación del nicho de BASC y AT2 están poco descritas, se ha desarrollado un ensayo deltaGene 48:48 a medida que cubre la pluripotencia, activación, reclutamiento y diferenciación de células madre, que incluyen el eje BMP1/NFATc1/Trombospondina-1 descrito recientemente (Lee et al. (2014) supra).

20

Simplificación alveolar

Se realiza un análisis de imagen cuantitativo que mide la relación tejido:espacio aéreo para determinar el grado de simplificación alveolar en todos los grupos experimentales.

25

Activación del nicho de células madre del huésped

Se realiza una tinción inmunohistoquímica (SPC+CC10+) de las BASC en los bronquiolos terminales para determinar los estados de activación de los nichos de células madre pulmonares (Lee et al. (2014) supra).

30

El objetivo es saber si los cambios en la estructura pulmonar y el reclutamiento de células madre pulmonares endógenas se extienden en mejoras a largo plazo de la función pulmonar y en una reducción de las complicaciones secundarias.

Estudios fisiológicos

Las pruebas de función pulmonar y la ecocardiografía se realizan en ratones adolescentes (de 4 semanas) y adultos jóvenes (de 10 semanas) recuperados.

Ecocardiografía

35

Los ratones se anestesian con isoflurano 3% y se continúa con 1-2% para alcanzar una frecuencia cardiaca de 350-450 lpm. Se utiliza el ecógrafo Vevo 2100 (Monash Bioimaging) y un transductor lineal de 40 MHz para realizar mediciones doppler PW del tiempo de aceleración de la arteria pulmonar a lo largo de la vista de eje largo paraesternal izquierdo angulado anteriormente. El grosor de la pared ventricular derecha se mide mediante la aplicación del modo M a lo largo de la vista del eje largo paraesternal derecho. Los mismos grupos de ratones se utilizan para pruebas invasivas de la función pulmonar. Se someten a traqueostomía con una cánula de 18 G conectada a un nebulizador ultrasónico en línea, un ventilador y un transductor de presión conectado (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá). La resistencia y distensibilidad de las vías respiratorias se evalúan mediante la exposición de los ratones a concentraciones crecientes de metacolina (1-30 mg/ml, 3 minutos por ciclo). Se obtienen los volúmenes espirados forzados, la capacidad vital y la capacidad inspiratoria. A diferencia de la pletismografía de cuerpo entero sin sujeción, no requiere el entrenamiento de los animales y permite una breve pausa en la ventilación mecánica para ejecutar maniobras de medición durante las cuales se miden presiones o formas de onda de volumen predefinidas. De este modo se superan los desafíos tradicionales enfrentados en la pletismografía, tal como el excesivo espacio muerto y las inexactitudes en las mediciones.

Se propone que los exosomas amnióticos tendrán un efecto beneficioso en su capacidad para desencadenar la polarización de los macrófagos, inducir la expansión de las Treg y reducir la activación de los neutrófilos y las células dendríticas en ratones con BPD. Se propone que los cambios inmunológicos son más profundos con la dosis de 10 µg de exosomas amnióticos en comparación con 1 µg de hAEC de control. Como tal, la reversión de la simplificación alveolar es mayor en los animales que reciben la dosis más alta de exosomas amnióticos. Esto se traduce en mejoras de los resultados fisiológicos a largo plazo, de forma que habrá una reducción dependiente de la dosis del engrosamiento de la pared ventricular derecha, una mejora de la hipertensión pulmonar y un restablecimiento de la función pulmonar normal. No se esperan cambios cuando se administran hAEC o exosomas amnióticos a ratones sanos. No se propone que los fibroblastos o exosomas de fibroblastos tengan un efecto sobre las células inmunitarias, la reparación pulmonar o los resultados fisiológicos a largo plazo.

Ejemplo 4

Mediadores únicos en exosomas amnióticos

La edad gestacional del donante de hAEC puede tener un impacto significativo en su capacidad reparativa (Lim et al. (2013) Placenta 34: 486-492). Se realiza una comparación entre la carga exosómica recolectada de hAEC término y pretérmino. En la preparación se administran exosomas amnióticos de donantes a término y pretérmino y se demostró que la simplificación alveolar solo se revierte en los animales que recibieron los exosomas amnióticos de donantes a término, lo que indica que la capacidad de activar vías de modulación inmunitaria y la regeneración están significativamente deterioradas los exosomas amnióticos pretérmino. Cuando se realiza un análisis proteómico inicial de presencia/ausencia de la carga exosómica, se identifican 242 y 21 proteínas únicas en el donante a término y pretérmino, respectivamente. Mediante un análisis de ontología génica, se determina que los exosomas amnióticos a término contienen mediadores de la señalización celular asociados con la cicatrización de heridas, la apoptosis, el desarrollo vascular, la inflamación aguda y el desarrollo de células epiteliales.

Para el análisis proteómico, se realiza una digestión con tripsina en solución de los exosomas amnióticos (a término y pretérmino, n=10 por grupo) seguida de cromatografía líquida y espectrometría de masas para la cuantificación absoluta (WEHI Proteomics Laboratory, Melbourne, Australia). Los datos se adquieren utilizando un espectrómetro de masas Q-Exactive híbrido cuadrupolo-orbitrap equipado con una fuente Nano-ESI (Proxeon) acoplada a un sistema nanoACQUITY UPLC (Waters). Las listas de picos de cada LC-MS/MS se fusionan en un único archivo MASCOT y se buscan en una base de datos de proteínas humanas Ref-Seq (tasa de falsos descubrimientos del 1%). Pipeline Pilot (Accelrys) y Spotfire (TIBCO) se utilizan para analizar los datos proteómicos cuantitativos. Para evaluar las diferencias de abundancia se utiliza la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. La base de datos UniProt sirve para clasificar las proteínas sobre la base de su función y localización subcelular, y especifica los genes implicados en la cicatrización de heridas, la supervivencia celular y la modulación inmunitaria.

Para el análisis de ácidos nucleicos, los perfiles digitales de expresión génica se realizan mediante el análisis masivo de extremos de ADNc (MACE, GenXpro GmbH). Esto permite una tasa de captura y cuantificación de transcritos a ~20 veces más profundidad que RNASeq (1-20 copias por millón de transcritos) tales como receptores y factores de transcripción, que normalmente se pierden en las micromatrices. MACE está optimizado para secuenciar ARN pequeños y ARNm a partir de exosomas y combina los beneficios de las matrices de qPCR y RNASeq mediante la marcación de cada molécula de ADNc. Identifica la poliadenilación alternativa, que influye en la interacción ARNm-ARNmi y, por lo tanto, determina la estabilidad y relevancia biológica de los transcritos. Se realizan análisis de enriquecimiento de ontología génica y de enriquecimiento de conjuntos de genes para comparaciones por pares.

Habrán firmas moleculares únicas entre los exosomas amnióticos a término y pretérmino, que se relacionan con sus efectos pro-reparadores y regenerativos.

Ejemplo 5

Efectos pro-regenerativos

Los efectos pro-regenerativos de los exosomas amnióticos se demostraron en un modelo de ratón neonatal de displasia broncopulmonar. Se observó poda alveolar después de la administración de exosomas procedentes de tejido amniótico a término o pretérmino (figuras 12a a d). El término "bpd" se refiere a los animales del modelo de ratón de displasia broncopulmonar.

Ejemplo 6

10 *Mecanismo de acción de los exosomas*

Los exosomas humanos derivados de término junto con las células epiteliales amnióticas humanas (hAEC) se analizaron para determinar la capacidad para inducir la regeneración pulmonar. Los resultados se muestran en las Figuras 13A a C. Los exosomas de término restauraron las crestas septales secundarias como se ve en las puntas teñidas de oscuro (elastina positiva) en la Figura 13

Además, la Figura 14 muestra que los exosomas amnióticos desencadenan una respuesta endógena de células madre en los pulmones. En efecto, los exosomas amnióticos fueron más del doble de efectivos que las hAEC.

20 También se observó que los exosomas amnióticos podían estimular directamente el aumento del crecimiento de células madre pulmonares exógenas. Esto se produjo en el tejido pulmonar alveolar, bronquiolar y mixto expuesto a los exosomas, en relación con un control.

Ejemplo 7

25 *Los exosomas son antifibróticos en el hígado*

Se indujo fibrosis hepática en ratones adultos de 8-12 semanas de edad mediante la inyección intraperitoneal 3 veces por semana de tetracloruro de carbono durante 12 semanas. En la semana 8, se inyectaron exosomas (1 µg) dos veces por semana. Los resultados se muestran en las figuras 15a y b. Las células fibróticas se determinaron mediante el ensayo de rojo sirius y el ensayo de expresión de α-actina en músculo liso (sma). A-sma desempeña un papel en la contractilidad de los fibroblastos. La expresión de α-sma se determinó mediante ensayos estándar y las áreas positivas de rojo sirius o α-sma se midieron por campo. Se utilizó la proteína inflamatoria de macrófagos ccl14. Ccl14 + exosomas produjo un número significativamente menor de células fibróticas por campo en comparación con ccl14 + control salino (figuras 15a y b).

Ejemplo 8

40 *Carga proteómica*

La figura 16 muestra que la carga proteómica entre los exosomas a término y las haec pretérmino es aproximadamente la misma. Hubo más diferencia entre la carga proteómica de las haec de término versus pretérmino. Las proteínas analizadas se enumeran en las tablas 2a y 2b. En la figura 17 se muestra una útil comparación de componentes celulares entre las hAEC y las MSC totales. En la Figura 18 también se comparan los procesos biológicos entre las hAEC y las MSC totales.

Tabla 2a

<i>Carga proteómica en exosomas amnióticos: Proteínas comunes en las MSC</i>			
ID/Accesos de búsqueda	Símbolo del gen	ID gen Entrez	Descripción del gen
PGK2	PGK2	5232	fosfoglicerato quinasa 2
CAND2	CAND2	23066	asociado a la cullina y asociado a la neddilación 2 (putativo)
CCDC80	CCDC80	151887	Dominio de doble espiral que contiene 80
RAB12	RAB12	201475	RAB12, miembro de la familia de oncogenes RAS
RAD23B	RAD23B	5887	RAD23 homólogo B (S. cerevisiae)
DBN1	DBN1	1627	drebrina 1
STRAP	STRAP	11171	proteína asociada al receptor serina/treonina quinasa
UBA6	UBA6	55236	enzima activadora del modificador 6 similar a la ubiquitina

(continuación)

<i>Carga proteómica en exosomas amnióticos: Proteínas comunes en las MSC</i>			
ID/Accesos de búsqueda	Símbolo del gen	ID Entrez	Descripción del gen
PEA15	PEA15	8682	fosfoproteína enriquecida en astrocitos 15
GLOD4	GLOD4	51031	dominio glioxalasa que contiene 4
COPE	COPE	11316	complejo proteico de coatómero, subunidad épsilon
BCAT1	BCAT1	586	transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada 1, citosólica
FSTL1	FSTL1	11167	Follistatina tipo 1
DYNC1LI2	DYNC1LI2	1783	dineína, citoplasmática 1, cadena intermedia ligera 2
GPS1	GPS1	2873	supresor de la vía de la proteína G 1
SPATA5	SPATA5	166378	asociado a la espermatogénesis 5
ID/Accesos de búsqueda	Símbolo del gen	ID Entrez	Descripción del gen
COPS5	COPS5	10987	COP9 subunidad 5 del señalosoma
GYG1	GYG1	2992	glucogenina 1
TCEB2	TCEB2	6923	factor de elongación de la transcripción B (Sill), polipéptido 2 (18kDa, elongina B)
APOC2	APOC2	344	apolipoproteína C-II
MAPK3	MAPK3	5595	proteína quinasa 3 activada por mitógenos
RUFY1	RUFY1	80230	dominio RUN y FYVE que contiene 1
HDLBP	HDLBP	3069	proteína de unión a lipoproteínas de alta densidad
TTC37	TTC37	9652	dominio de repetición tetratricopéptido 37
UBA2	UBA2	10054	enzima activadora de modificadores tipo ubiquitina 2
NCS1	NCS1	23413	sensor de calcio neuronal 1
CAV2	CAV2	858	caveolina 2
TM9SF4	TM9SF4	9777	Miembro 4 de la superfamilia de proteína de transmembrana 9
EIF5B	EIF5B	9669	factor 5B de iniciación de la traducción eucariota
TXNL1	TXNL1	9352	Tiorredoxina tipo 1

Tabla 2b

<i>Carga proteómica en exosomas amnióticos: Proteínas únicas para hACE</i>			
ID/Accesos de búsqueda	Símbolo del gen	ID Entrez	Descripción del gen
TNXA			
TES	TES	26136	transcripto derivado de testículo (3 dominios LIM)
NPEPSSL1			
UPK3BL			
POLR2J3			
DKFZp586I031			
SEPT14	SEPT14	346288	septina 14

(continuación)

<i>Carga proteómica en exosomas amnióticos: Proteínas únicas para hACE</i>			
ID/Accesos de búsqueda	Símbolo del gen	ID Entrez	gen Descripción del gen
DKFZp313C1541			
SLC2A14	SLC2A14	144195	familia 2 de portadores de solutos (transportador facilitado de glucosa), miembro 14
ID/Accesos de búsqueda	Símbolo del gen	ID Entrez	gen Descripción del gen
PPIAL4C			
PPIAL4E			
PPIAL4D	PPIAL4 D	645142	peptidilprolil isomerasa A (ciclofilina A) tipo 4D
CRABP1	CRABP1	1381	proteína 1 de unión al ácido retinoico celular
Sep-02			
TPPP3	TPPP3	51673	miembro 3 de la familia de proteínas promotoras de la polimerización de la tubulina
Sep-08			
ARPC4-TTLL3			
KIF5C	KIF5C	3800	miembro 5C de la familia de la kinesina
KIF5A	KIF5A	3798	miembro 5A de la familia de la kinesina
NSFL1C	NSFL1C	55968	NSFL1 (p97) cofactor (p47)
PERP	PERP	64065	PERP, efector de la apoptosis TP53
SKP1	SKP1	6500	proteína 1 asociada a la quinasa de fase S
ALPPL2	ALPPL2	251	fosfatasa alcalina placentaria 2
ALPI	ALPI	248	fosfatasa alcalina intestinal
PCYT2	PCYT2	5833	fosfato citidililtransferasa 2, etanolamina
CDH3	CDH3	1001	cadherina 3, tipo 1, P-cadherina (placentaria)

Ejemplo 9

5

Los exosomas promueven la mielinización (no es parte de la presente invención)

Los exosomas amnióticos se analizan en modelos animales de esclerosis múltiple. Se espera que los exosomas promuevan la remielinización y sean útiles en el tratamiento de la esclerosis múltiple, así como de otras afecciones tales como neuritis óptica, enfermedad de Devic, mielitis transversa, encefalomiелitis aguda diseminada y adrenoleucodistrofia y adrenomiелoneuropatía.

10

Ejemplo 10

15 *Actividad de exosomas*

Los exosomas aislados de los medios acondicionados de las células epiteliales amnióticas humanas tienen efectos inmunomoduladores y pro-regenerativos. Los exosomas amnióticos contienen (entre otros factores), alto nivel de HLA-G.

20

Los efectos inmunosupresores de los exosomas amnióticos se corresponden con la edad gestacional del donante. Esto se corresponde con la potencia del donante asociada a la edad gestacional, que los autores han publicado anteriormente en (Lim et al. (2013) supra).

25 Los exosomas amnióticos revierten la lesión pulmonar en un modelo de ratón neonatal de displasia broncopulmonar.

Los exosomas inyectados por vía intravenosa mejoran significativamente la relación tejido:espacio aéreo en comparación con la solución salina y, en consonancia con los nuestros in vitro, los exosomas amnióticos a término fueron superiores a los exosomas de pretérmino en su capacidad para mitigar el daño pulmonar relacionado con la BPD. Esto se asocia con una activación del nicho endógeno de células madre de los pulmones, es decir, la unión del conducto bronquioalveolar. Los resultados se muestran en la Figura 5. Se propone que los exosomas amnióticos serán útiles en el tratamiento de la fibrosis pulmonar y la fibrosis de otros órganos.

Los exosomas amnióticos revierten la inflamación pulmonar establecida y la fibrosis en un modelo de ratón de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. La administración intranasal de exosomas amnióticos 7 días después de la exposición a bleomicina redujo significativamente el porcentaje de miofibroblastos activados (α -actina de músculo liso positiva) en los pulmones. Esto fue coherente con la reducción de la deposición de colágeno en los pulmones. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Los exosomas amnióticos revierten directamente la activación de fibroblastos pulmonares humanos primarios in vitro. Cuando se cultivaron en presencia de 5 ng/ml de factor de crecimiento transformante β , los exosomas amnióticos disminuyeron los niveles de proteína de α -actina de músculo liso en 24 horas. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Los exosomas amnióticos contienen ARNm que se dirigen a las vías de señalización de receptores de citoquinas como se muestra en la Figura 8 (no es parte de la presente invención), donde los recuadros amarillos indican una diana de uno o más ARNm.

Los exosomas amnióticos contienen ARNm que se dirigen a las vías de señalización de Wnt como se muestra en la Figura 9 (no es parte de la presente invención), donde los recuadros amarillos indican una diana de uno o más ARNm.

Los exosomas amnióticos contienen ARNm que se dirigen a las vías de señalización de PI3K-Akt como se muestra en la Figura 10 (no es parte de la presente invención) donde los recuadros amarillos indican una diana de uno o más ARNm.

Los exosomas amnióticos contienen ARNm que se dirigen a las vías de señalización de TGF- β como se muestra en la Figura 11 (no es parte de la presente invención) donde los recuadros amarillos indican una diana de uno o más ARNm.

Está claro que los exosomas amnióticos son tan, sino más efectivos que las AEC tal como las hAEC y tienen una gran capacidad para inducir mecanismos de reparación celular y molecular en una amplia gama de procesos fisiológicos y neuronales.

Bibliografía:

Anderson et al. (2016) Stem Cells. <http://doi.org/10.1002/stem.2298> Doyle et al. (2006) Paediatrics 118: 108-113

Egleton and Davis (1997) Peptides 18:1431-1439

Fishback et al. (2013) Sci Transl Med 5:179 ps7)

Hodges et al. (2012) Am J Obstet Gynecol 206: 448e8-448e15 Langer (1990) Science 249:1527-1533

Lee et al. (2014) Cell 156:440-455

Lim et al. (2013) Placenta 34: 486-492

Lodha et al. (2014) PLoS ONE: e90843

Putney and Burke (1998) Nat Biotech 16:153-157

Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), 18th Edition, Mack Publishing Company, Easton, PA. Moodley et al. (2010) Am J Respir Crit Care Med 181:643-651

Murphy et al. (2012) Cell Transplant 21:1477-1492

Nold et al Proc. Natl Acad. Sci USA 110:14384-14389 Schellenberg et al. (2011) Aging (Albany NY) 3:873-888

Sayani and Chien (1996) Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 13:85-184 Tan et al. (2015) Stem Cell Res Ther

6:8

Vosdoganes et al. (2013) *Cytotherapy* 15:1021-1029

5 Yawno et al. (2013) *Dev Neurosci* 35:272-282

REIVINDICACIONES

- 5 1. Exosomas amnióticos de mamífero derivados de células epiteliales amnióticas de mamífero alogénicas derivadas de un mamífero donante de la misma especie para el uso en un método de tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno fibrótico de pulmón, hígado, corazón, riñón o páncreas en un sujeto mamífero, que comprende la administración sistémica o local de dichos exosomas amnióticos de mamífero, donde los exosomas se derivan de células epiteliales amnióticas a término o pretérmino o de un banco de células epiteliales amnióticas inmortalizadas.
- 10 2. Los exosomas de mamífero para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los exosomas son exosomas amnióticos humanos.
- 15 3. Los exosomas de mamífero para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto mamífero para tratar es un ser humano.
- 20 4. Los exosomas de mamífero para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto mamífero para tratar es un animal de carreras seleccionado del grupo que consiste en caballo, perro y camello.
- 25 5. Los exosomas de mamífero para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el sujeto humano se está tratando para una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en displasia broncopulmonar, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, infección pulmonar crónica, asma, rinitis alérgica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).
- 30 6. Los exosomas de mamífero para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los exosomas amnióticos revierten la infección pulmonar y la fibrosis y revierten la activación de los fibroblastos pulmonares primarios.
- 35 7. Los exosomas de mamífero para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el animal de carreras se está tratando de una hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio.
8. Los exosomas amnióticos de mamífero para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, están comprendidos en una composición farmacéutica.
9. Los exosomas amnióticos de mamífero para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición farmacéutica se administra por vía intranasal.

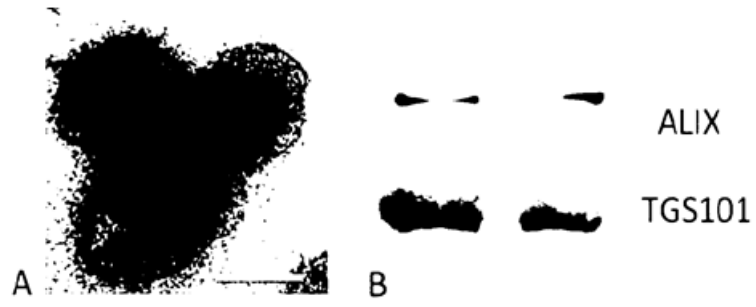


Figura 1

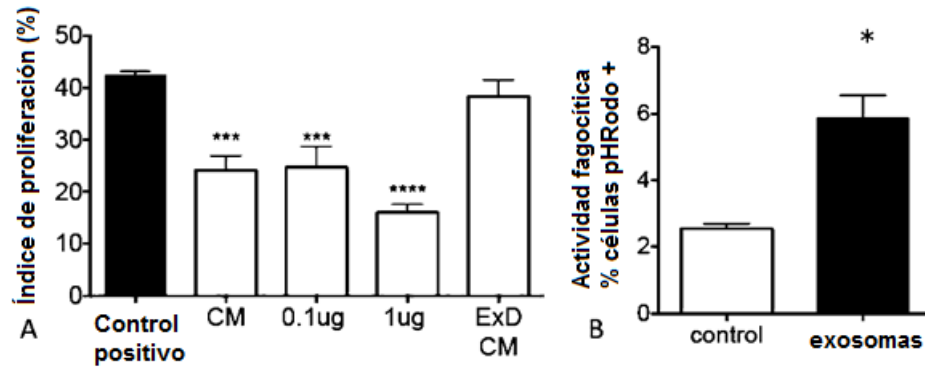


Figura 2

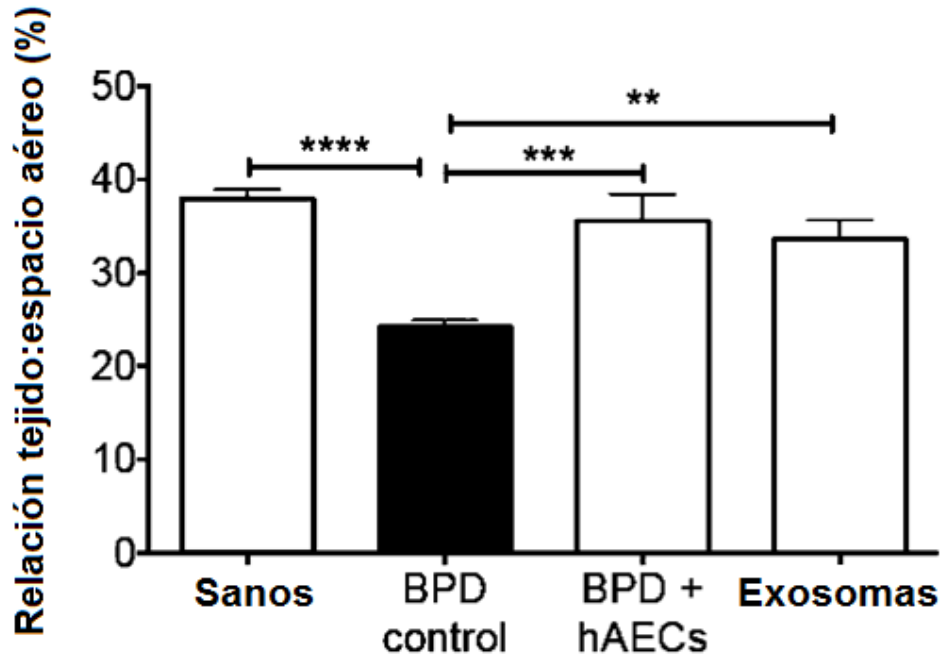


Figura 3

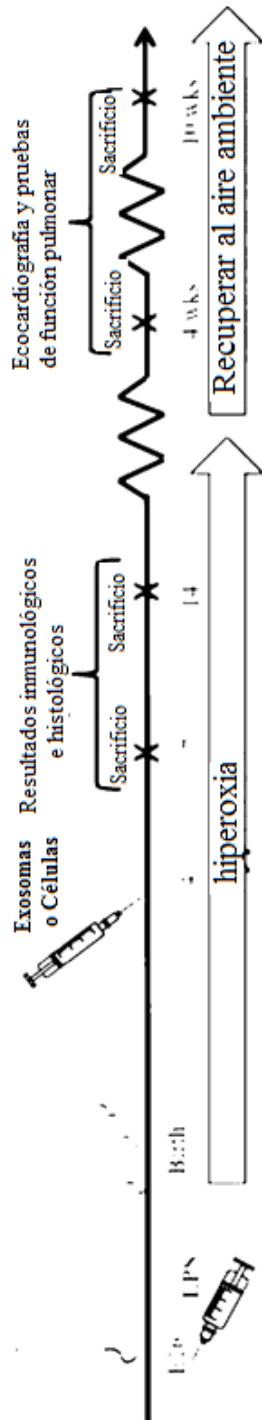


Figura 4

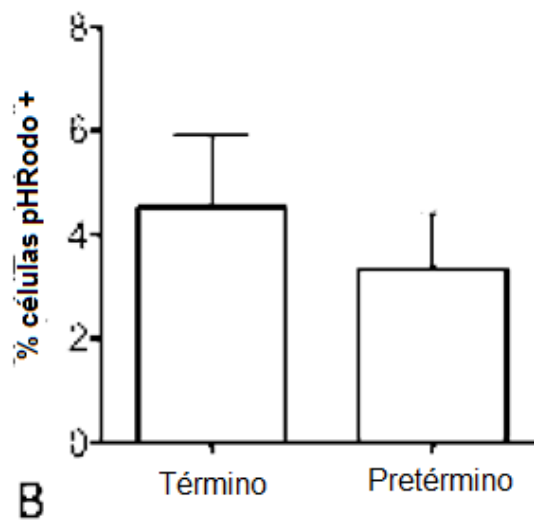
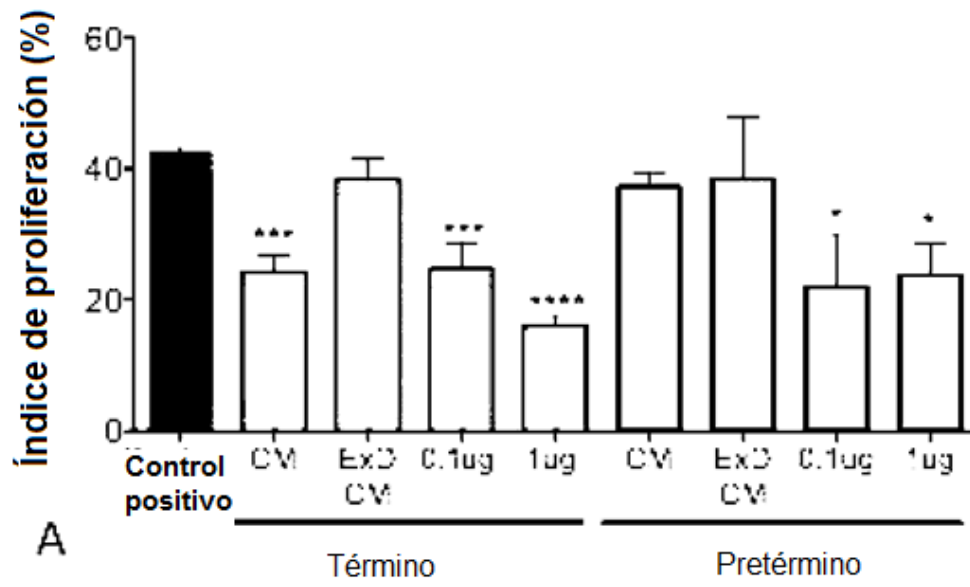
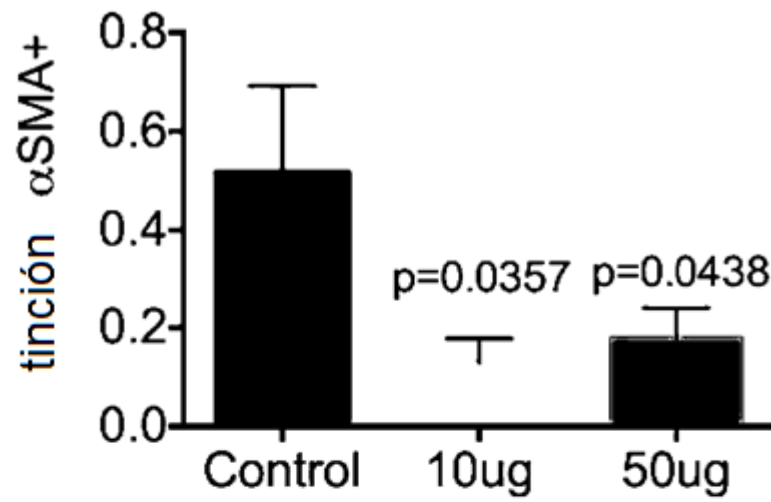


Figura 5

A



B

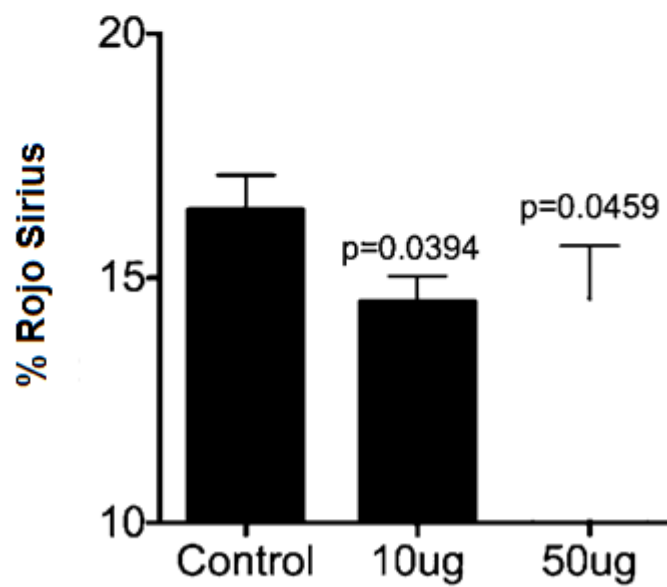


Figura 6

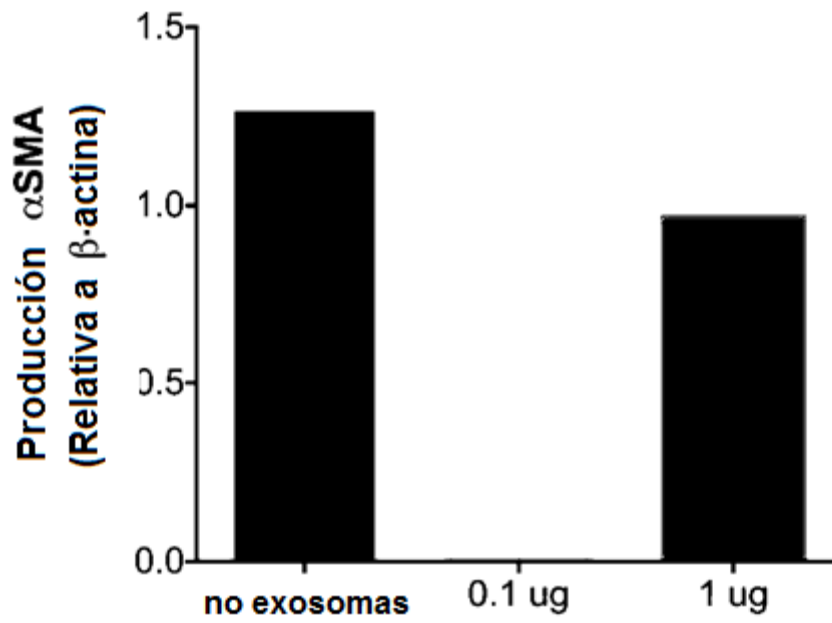


Figura 7

INTERACCIÓN DEL RECEPTOR CITOQUINA-CITOQUINA

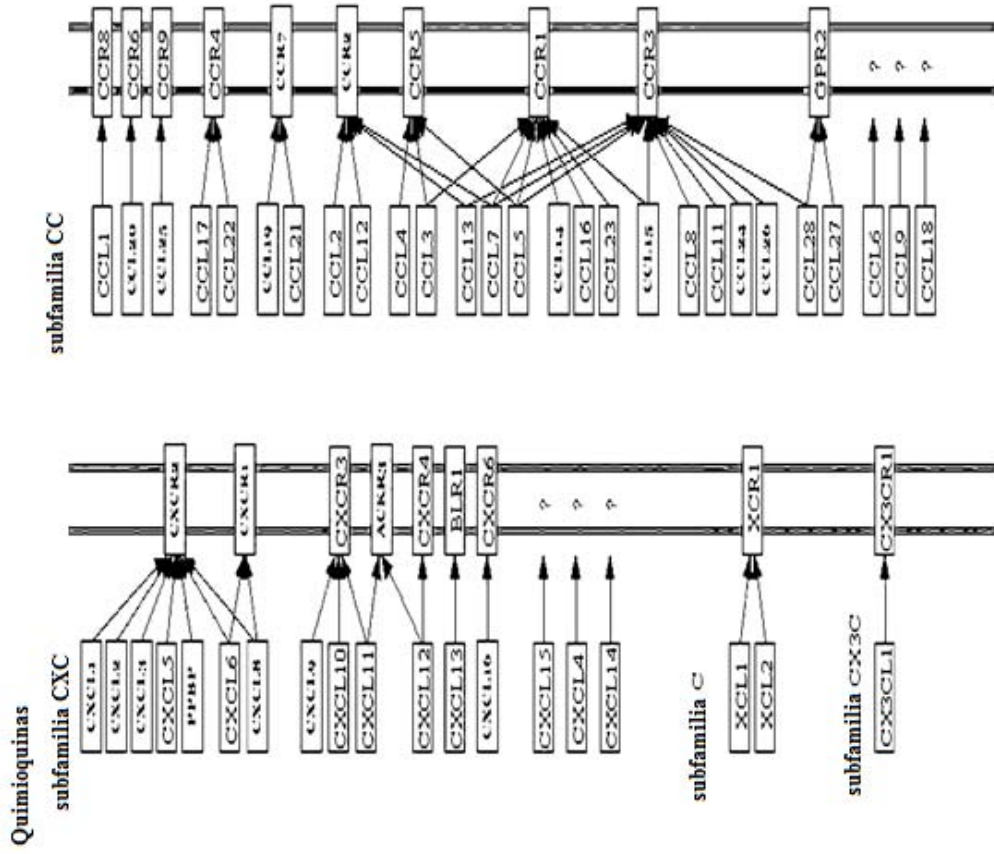


Figura 8A

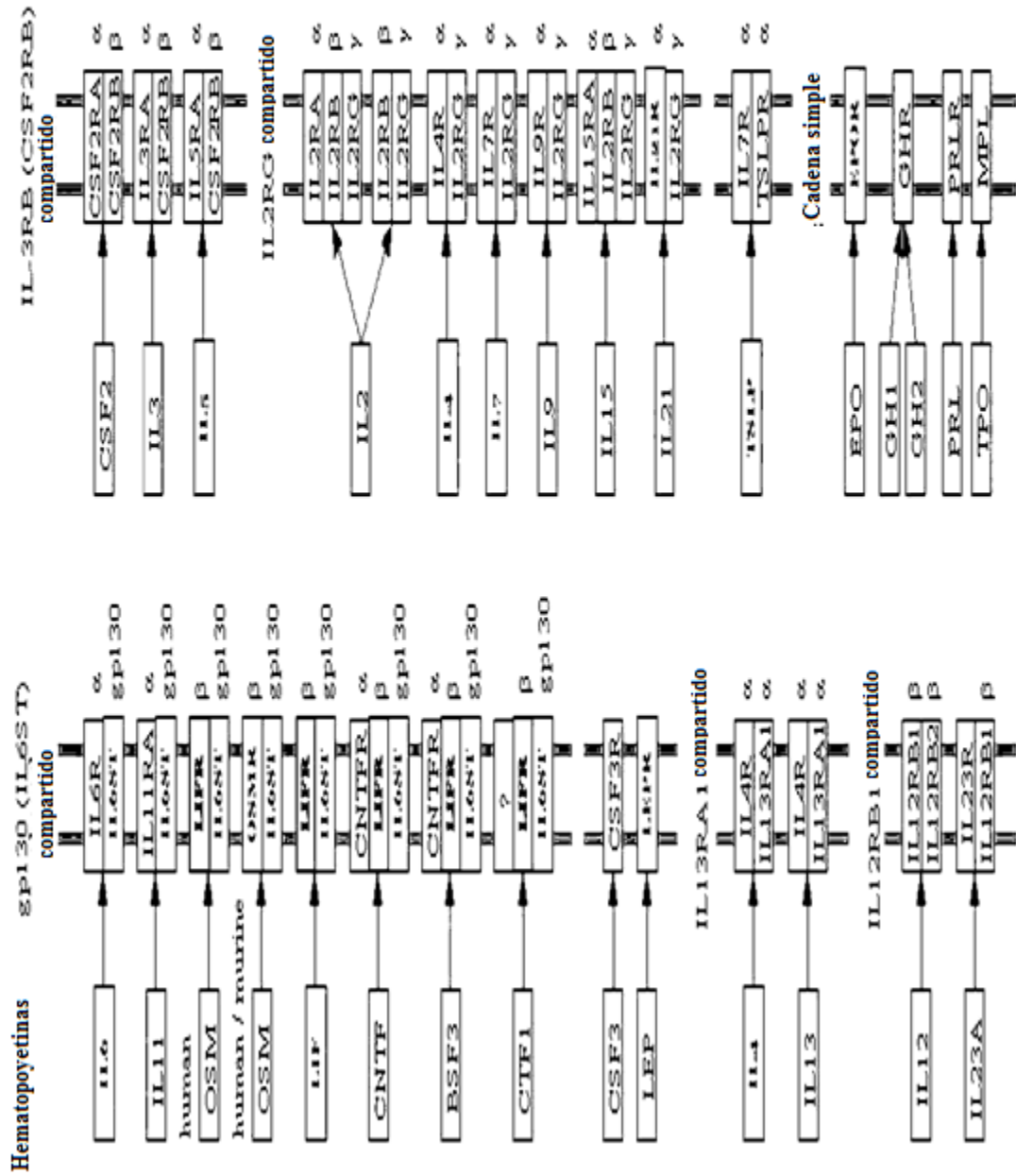


Figura 8B

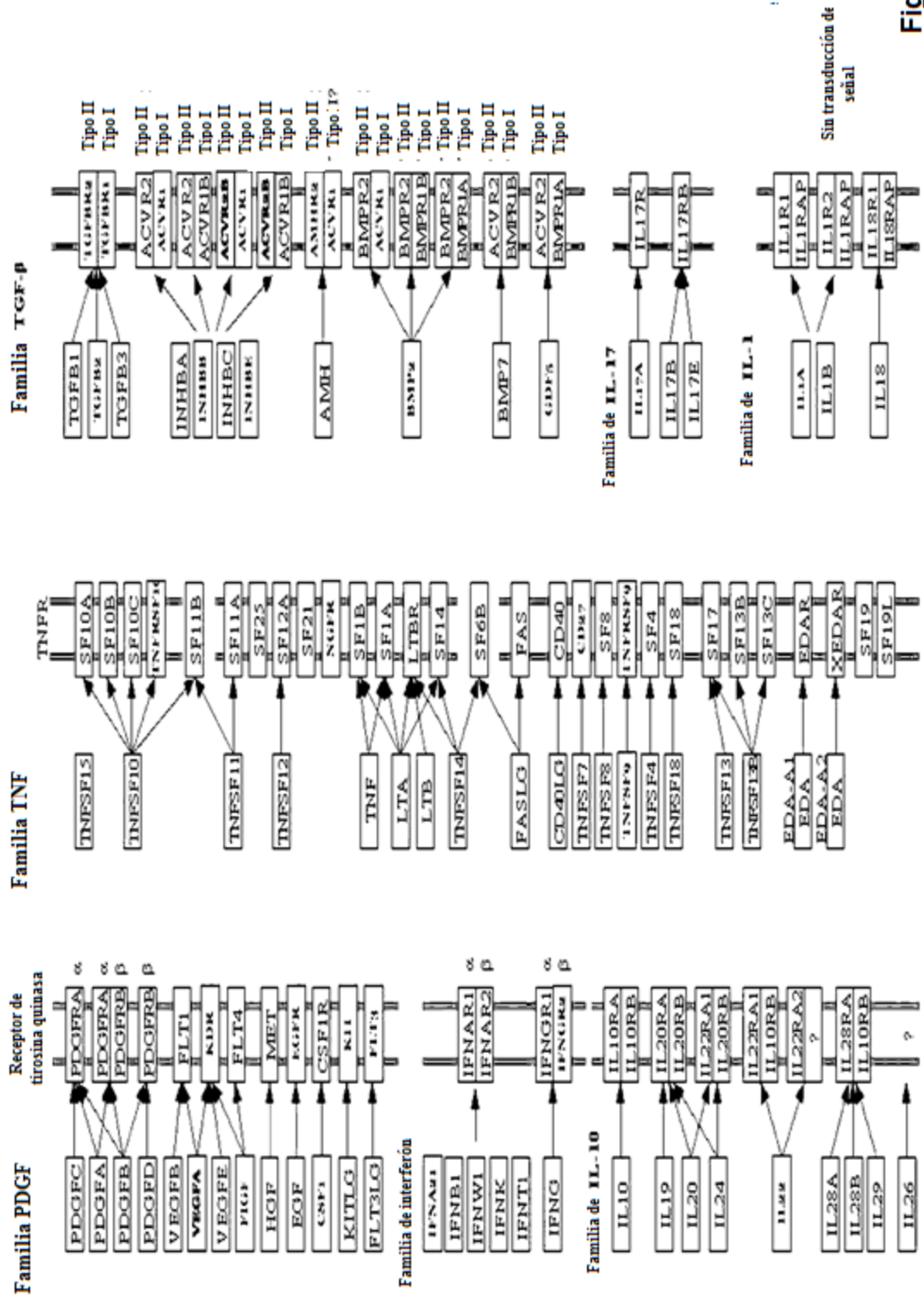


Figura 8C

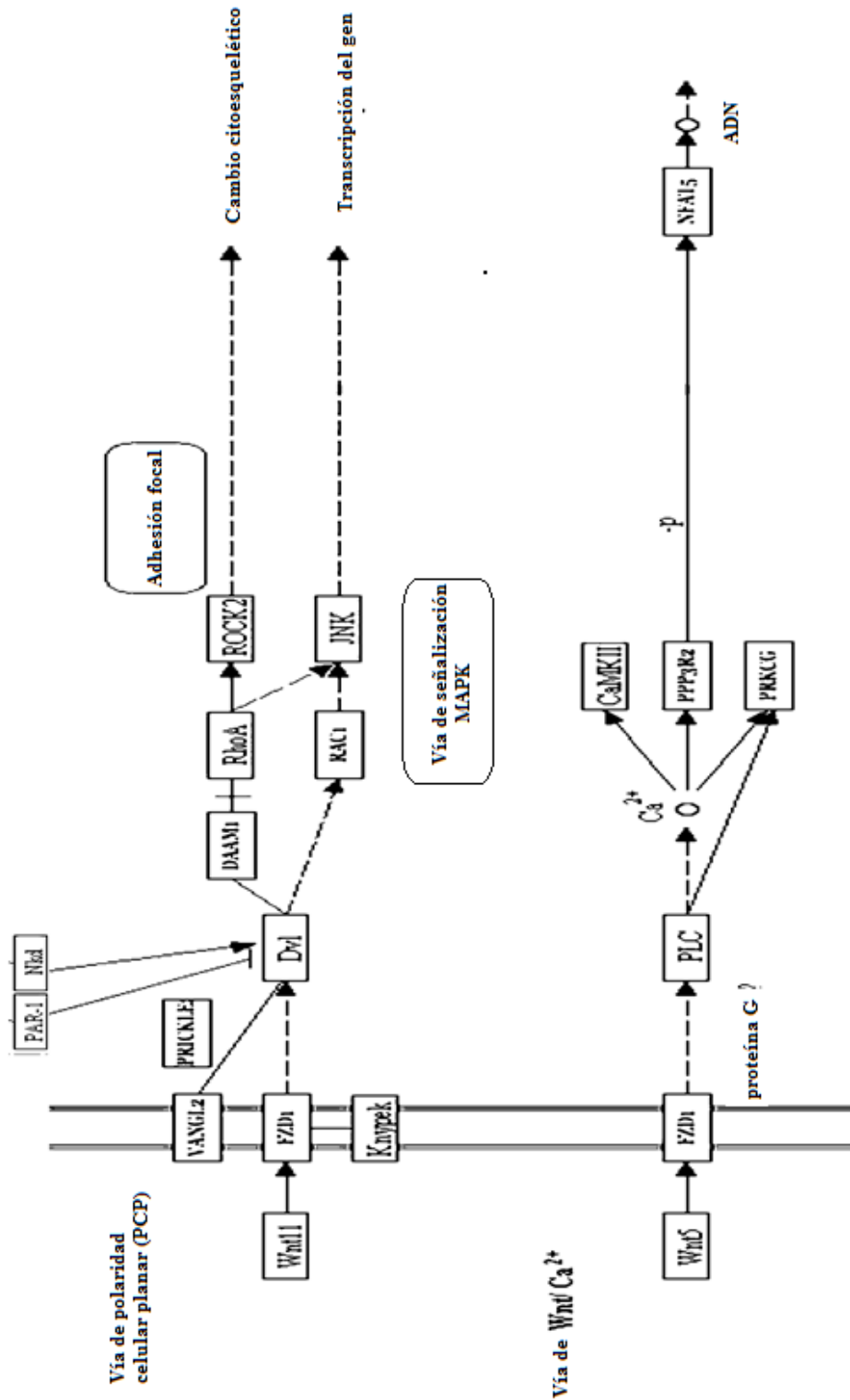


Figura 9B

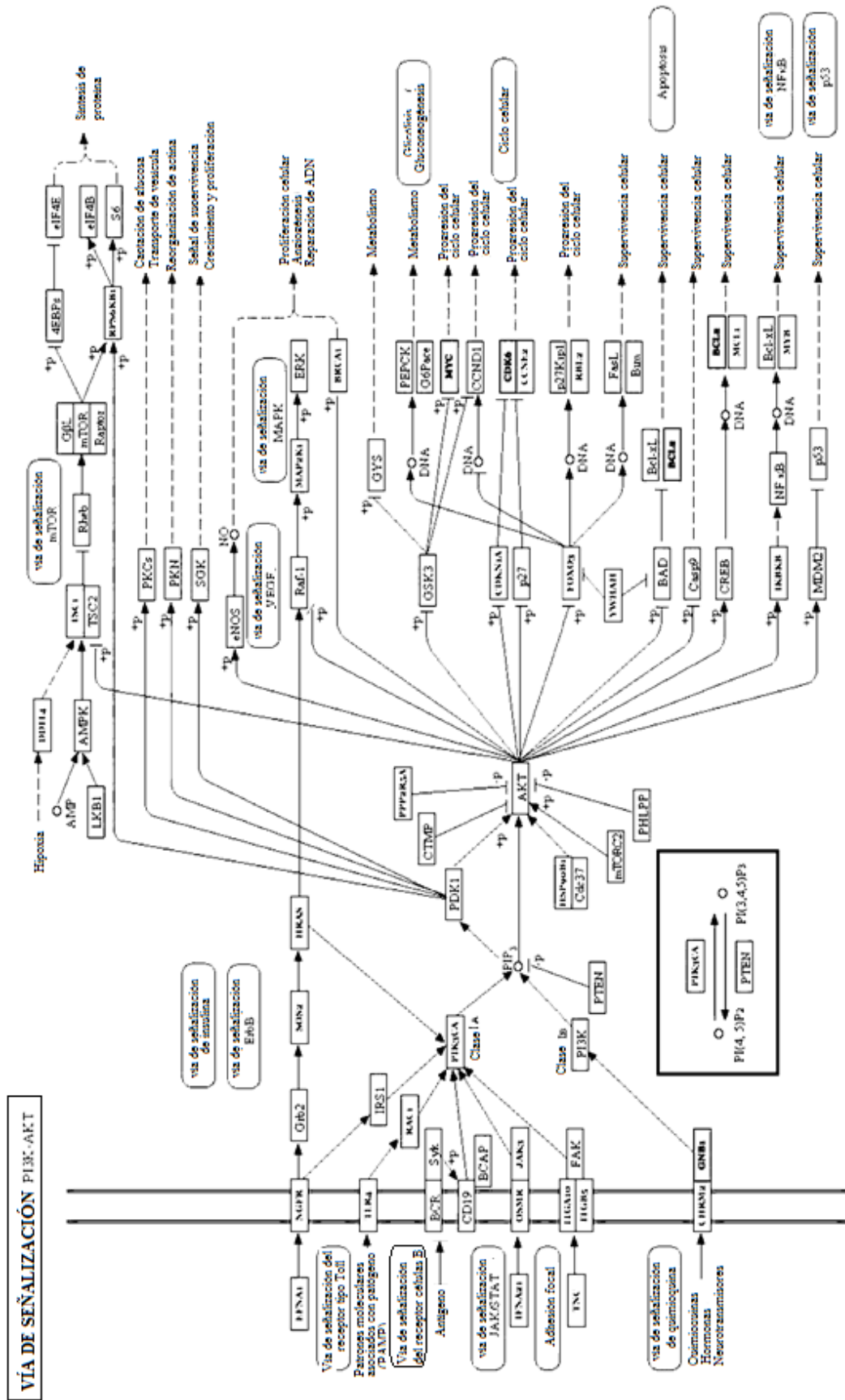


Figura 10

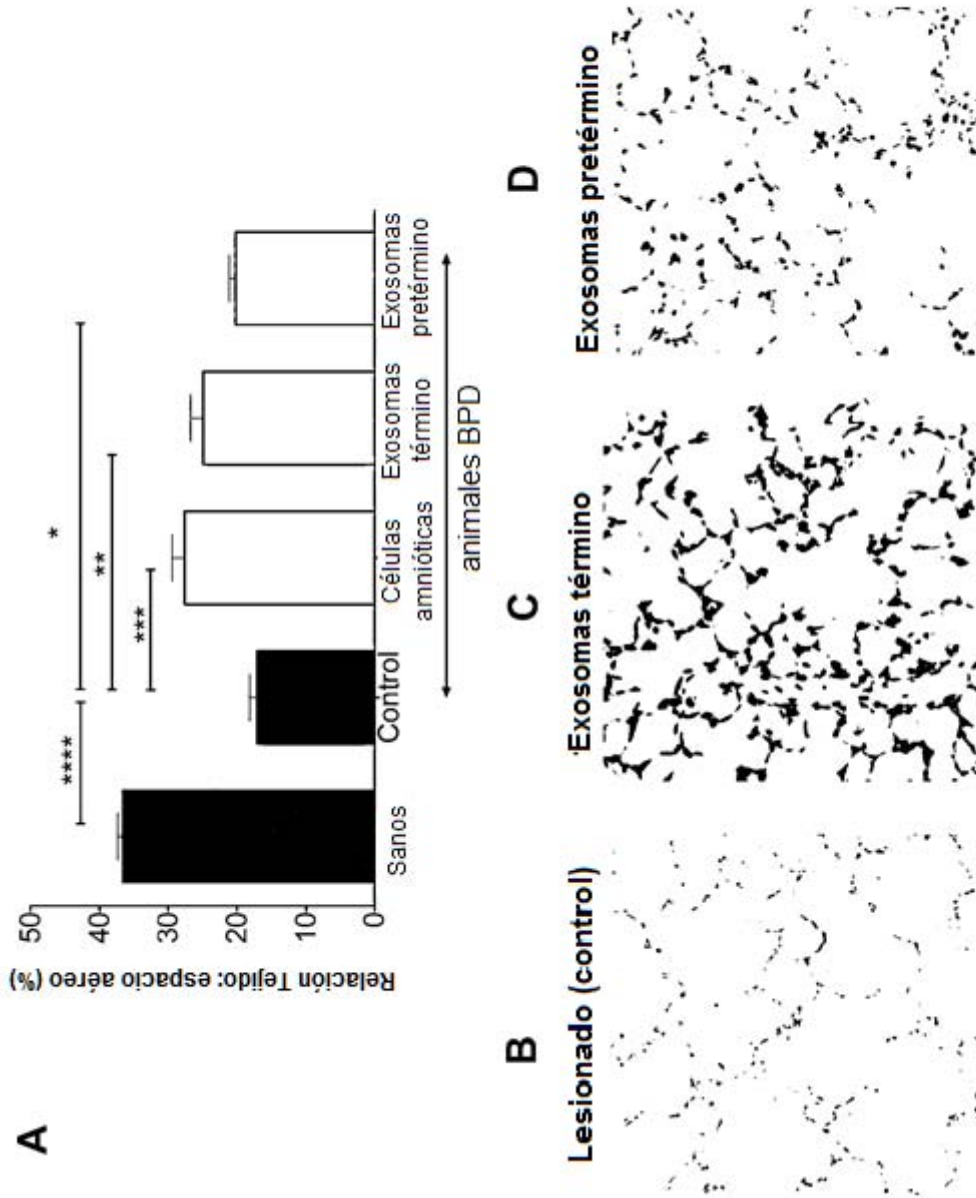


Figura 12



Figura 13

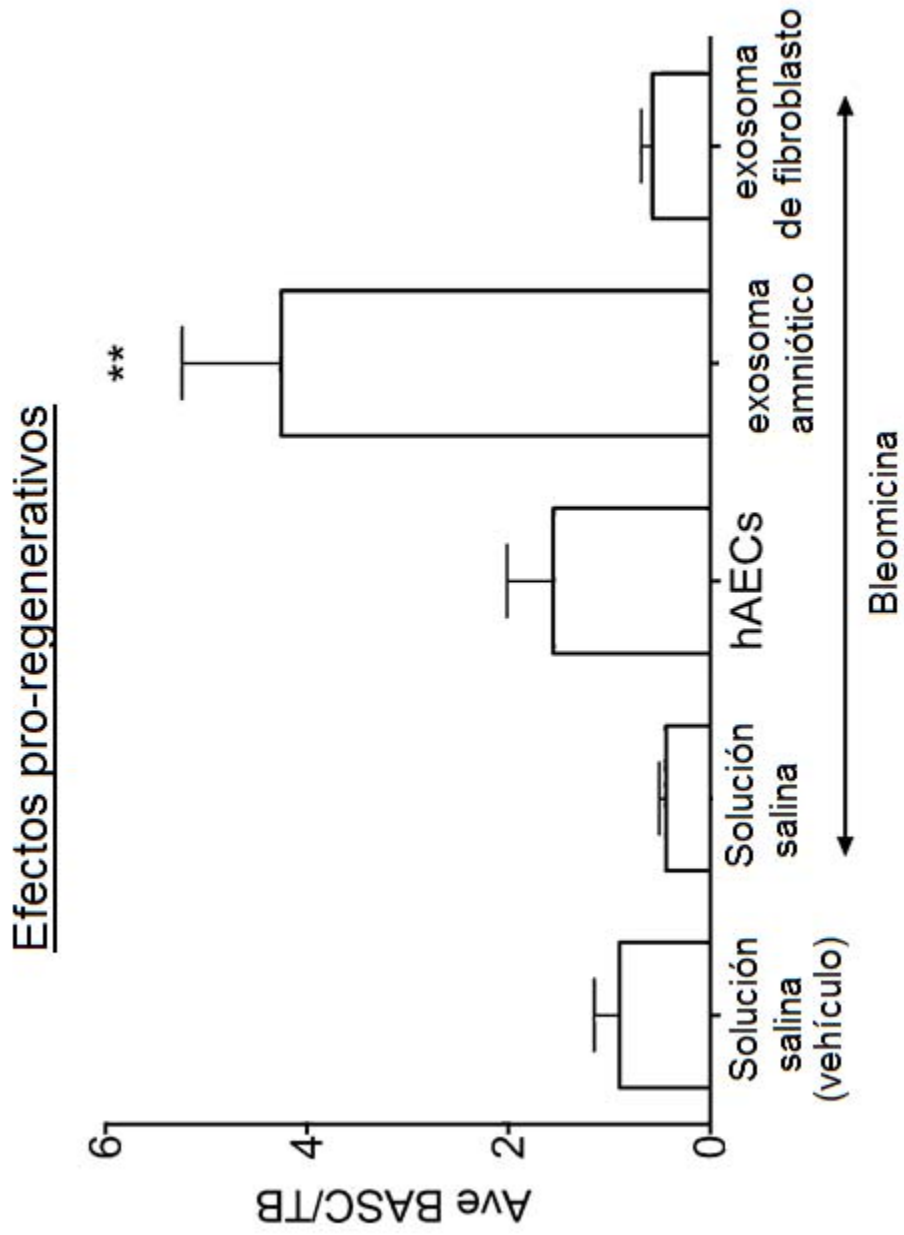


Figura 14



Figura 15

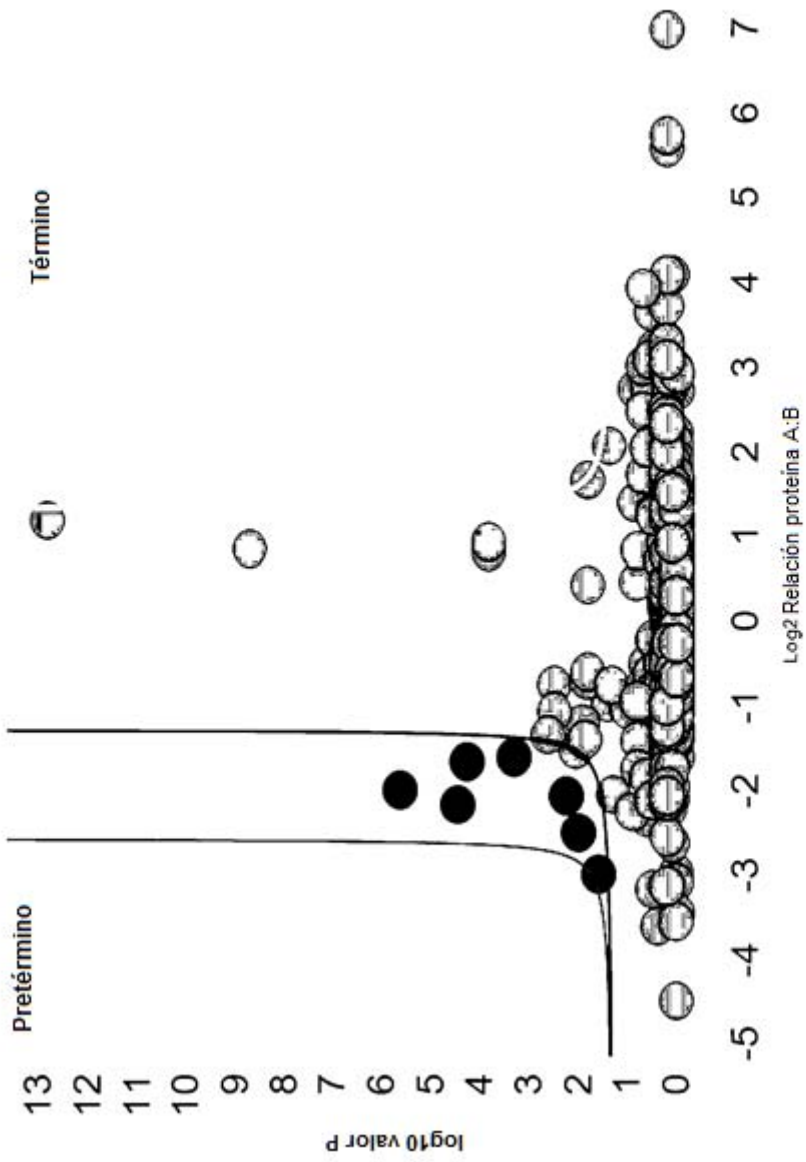


Figura 16

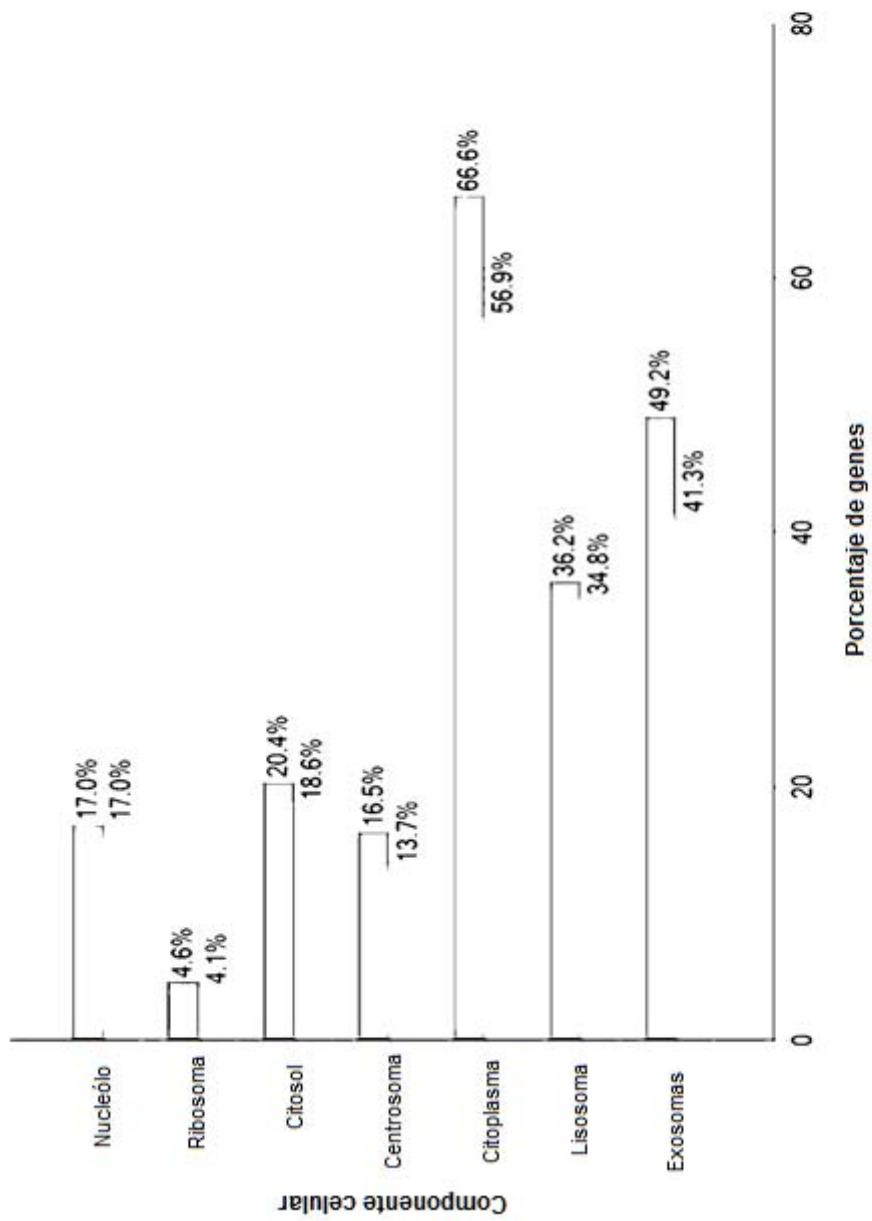


Figura 17

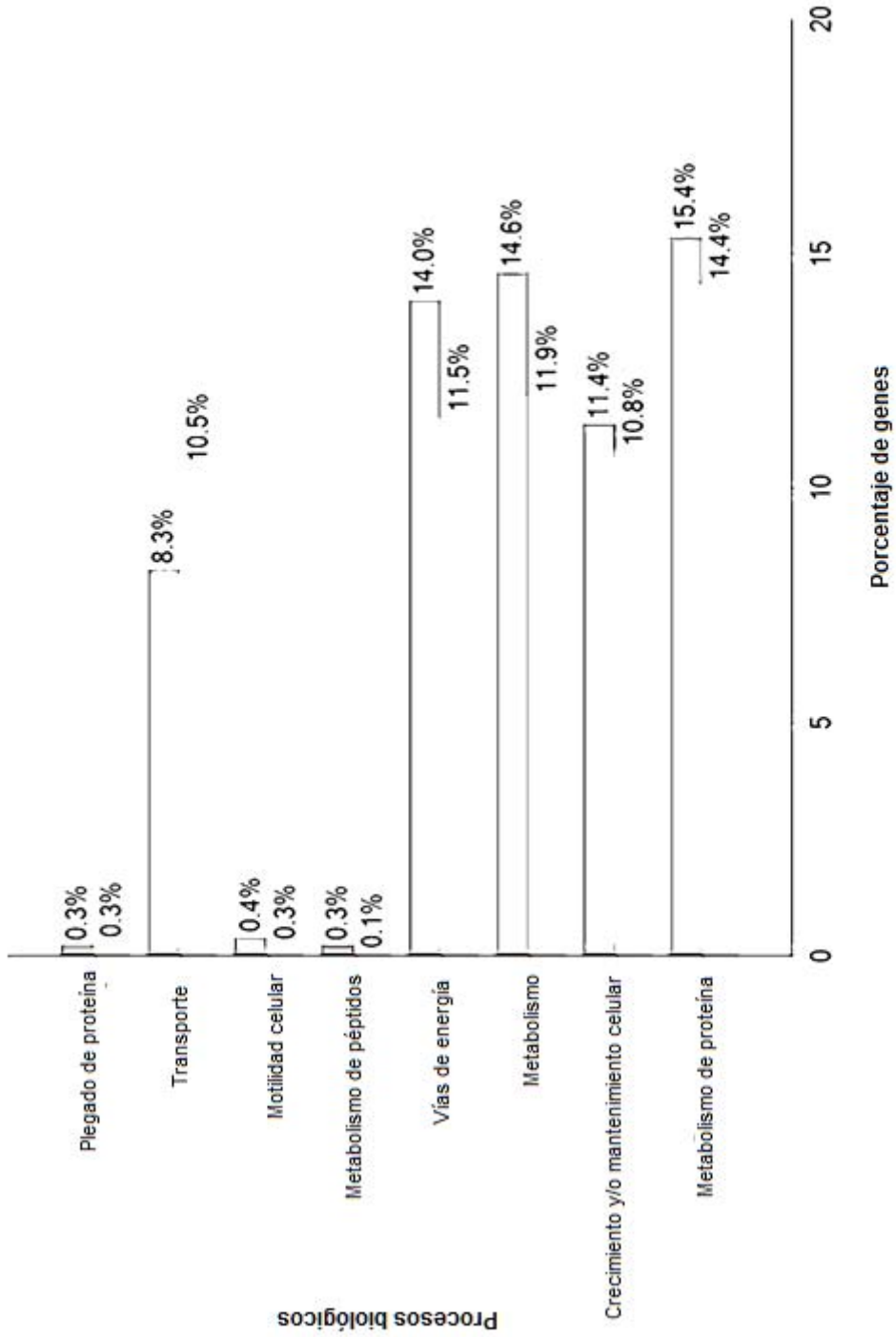


Figura 18