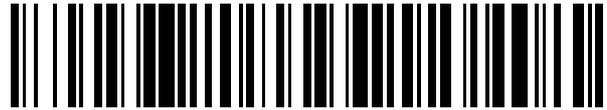


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 516**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0735** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2009** **E 09712571 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015** **EP 2254586**

54 Título: **Partículas de células troncales mesenquimatosas**

30 Prioridad:

**22.02.2008 US 66671 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.06.2015**

73 Titular/es:

**AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND  
RESEARCH (A\*STAR) (100.0%)  
1 Fusionopolis Way 20-10 Connexis  
Singapore 138632, SG**

72 Inventor/es:

**LIM, SAI KIANG**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 537 516 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

Partículas de células troncales mesenquimatosas

5 **Campo**

La presente invención se refiere a los campos de la biología del desarrollo, biología celular, biología molecular y genética. Más particularmente, la invención se refiere a exosomas y a procedimientos para obtener exosomas a partir de células troncales ("stem cells") mesenquimatosas.

10

**Antecedentes**

Las células troncales, al contrario que las células diferenciadas, presentan la capacidad de dividirse y autorrenovarse o diferenciarse en células hija fenotípica y funcionalmente diferentes (Keller, Genes Dev. 19:1129-1155, 2005; Wobus y Boheler, Physiol. Rev. 85:635-678, 2005; Wiles, Methods in Enzymology 225:900-918, 1993; Choi *et al.*, Methods Mol. Med. 105:359-368, 2005).

Las células troncales mesenquimatosas (CMM) son células troncales multipotentes con evidencia documentada de eficacia terapéutica en el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas, mejorando la función cardiaca en las enfermedades cardiovasculares y mejorando la gravedad de la EICH (Le Blanc y Pittenger, 2005). Al estar restringidos al linaje, presentan un potencial limitado aunque robusto de diferenciación en tipos celulares mesenquimales, por ejemplo adipocitos, condrocitos y osteocitos, y un riesgo insignificante de formación de teratomas. El rechazo inmunológico del huésped de las CMM trasplantadas se evita rutinariamente mediante el trasplante autólogo o alogénico. Las CMM pueden aislarse a partir de varios tejidos adultos, incluyendo la médula ósea (MO), los tejidos adiposos (adp), la sangre del cordón umbilical y expandirse *ex vivo*.

Las células troncales mesenquimatosas han sido utilizadas en aplicaciones clínicas y preclínicas para tratar una amplia abanico de enfermedades<sup>1,2</sup>, incluyendo la bioingeniería de tejido musculoesquelético<sup>3,4</sup> y las enfermedades cardiovasculares<sup>5,6</sup>. La capacidad terapéutica de las CMM para tratar un amplio espectro de enfermedades en aplicaciones clínicas y preclínicas de tratamiento de un amplio abanico de enfermedades [A1, A2], por ejemplo EICH [A1] en bioingeniería de tejido musculoesquelético [A3, A4] y en enfermedades cardíacas [A5, A6] se ha atribuido a su potencial de diferenciación en muchos tipos celulares reparadores diferentes.

Sin embargo, la disponibilidad de tejidos para su aislamiento sigue siendo limitativa y requiere procedimientos invasivos y peligrosos, y la expansión *ex vivo* de las CMM, aunque significativa, es sin embargo finita. Sin embargo, la eficiencia de las CMM trasplantadas en la diferenciación en células reparadoras funcionales en los tejidos u órganos dañados y en número terapéuticamente relevante nunca ha sido adecuadamente documentada o demostrada.

Algunos informes recientes sugieren que algunos de estos efectos de reparación podrían estar mediados por factores paracrinos secretados por las CMM<sup>7</sup>. Se ha planteado que estos factores estimulan la arteriogénesis mediante mecanismos paracrinos<sup>8</sup>, prestan soporte a las criptas de células troncales en el intestino<sup>9</sup>, protegen frente a las lesiones isquémicas renales<sup>10, 11</sup>, miocárdicas<sup>12-15</sup> y de tejido de las extremidades<sup>16</sup>; apoyan y mantienen la hematopoyesis<sup>17</sup>, apoyan la formación de megacariocitos y proplaquetas<sup>18</sup>.

Existe una necesidad no satisfecha de una opción terapéutica a base de CMM lista para usar, a un coste económico, con un mejor control de la calidad y consistencia. Es un requisito para la protección urgente frente lesiones tales como los daños por reperfusión en pacientes con IM agudo.

50 **Sumario**

Se describe una partícula secretada por una célula troncal mesenquimatosas y que comprende por lo menos una propiedad biológica de una célula troncal mesenquimatosas.

Según un primer aspecto de la presente invención, es proporcionado un exosoma aislado a partir de una célula troncal mesenquimatosas y que presenta un tamaño de entre 50 nm y 100 nm determinado mediante microscopía electrónica, comprendiendo el exosoma por lo menos una propiedad biológica de una célula troncal mesenquimatosas.

La propiedad biológica puede comprender una actividad biológica de un medio condicionado para células troncales mesenquimatosas (MC-CMM). La actividad biológica puede comprender la cardioprotección. El exosoma puede ser capaz de reducir el tamaño del infarto.

La reducción del infarto puede someterse a ensayo en un modelo de ratón o de cerdo de isquemia miocárdica y daño por reperfusión.

El exosoma puede ser capaz de reducir el estrés oxidativo. La reducción del estrés oxidativo puede someterse a

ensayo en un ensayo *in vitro* de muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

El exosoma puede contener por lo menos 70% de proteínas en un medio condicionado para células troncales mesenquimatosas (MC-CMM). Las proteínas pueden seleccionarse de la lista mostrada en la Tabla D1 o E2 o pueden ser productos génicos de los genes mostrados en la Tabla D2 o que comprenden uno o más miARN tal como se muestra en la Tabla E3.

El exosoma puede comprender un complejo de peso molecular >100 kDa. El complejo de peso molecular >100 kDa puede comprender proteínas de <100 kDa. El exosoma puede comprender un complejo de peso molecular >300 kDa. El complejo de peso molecular >300 kDa puede comprender proteínas de <300 kDa.

El exosoma puede comprender un complejo de peso molecular >1.000 kDa. El tamaño del exosoma puede determinarse mediante filtración frente a un filtro de 0,2 µm y la concentración, frente a una membrana con un valor de corte molecular de 10 kDa.

El exosoma puede comprender un radio hidrodinámico inferior a 100 nm. Puede comprender un radio hidrodinámico de entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 70 nm. Puede ser de entre aproximadamente 40 nm y aproximadamente 60 nm, tal como de entre aproximadamente 45 nm y aproximadamente 55 nm. El exosoma de la célula troncal mesenquimatosas puede comprender un radio hidrodinámico de aproximadamente 50 nm. El radio hidrodinámico puede determinarse mediante difracción láser o dispersión dinámica de la luz.

El exosoma puede comprender un lípido seleccionado de entre el grupo que consiste en fosfolípido, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, shingomielina, ceramidas, glucolípido, cerebrósido, esteroides y colesterol. La proporción de colesterol-fosfolípido puede ser superior a 0,3-0,4 (mol/mol). El exosoma puede comprender una balsa lipídica.

El exosoma puede ser insoluble en detergente no iónico, preferentemente Triton-X100. En el exosoma las proteínas de los pesos moleculares indicados podrían permanecer sustancialmente dentro de los complejos de los pesos moleculares indicados tras el tratamiento del exosoma con un detergente no iónico.

El exosoma puede ser sensible a la ciclodextrina, preferentemente ciclodextrina 20 mM. El tratamiento con ciclodextrina del exosoma puede causar una disolución sustancial de los complejos indicados.

El exosoma puede comprender ácido ribonucleico (ARN). El exosoma puede presentar una proporción de absorbancias de 1,9 (260:280 nm). El exosoma puede comprender un antígeno de superficie seleccionado de entre el grupo que consiste en CD9, CD109 y thy-1.

Se describe un procedimiento para producir una partícula tal como se ha indicado anteriormente, comprendiendo el procedimiento el aislamiento de la partícula a partir de un medio condicionado para células troncales mesenquimatosas (MC-CMM).

Según un segundo aspecto de la presente invención, es proporcionado un procedimiento para producir un exosoma tal como se ha indicado anteriormente, comprendiendo el procedimiento: (a) obtener un medio condicionado para células troncales mesenquimatosas (MC-CMM), (b) concentrar el medio condicionado para células troncales mesenquimatosas, (c) someter el medio condicionado para células troncales mesenquimatosas concentrado a cromatografía de exclusión por tamaño, y (d) seleccionar las fracciones absorbentes de UV.

El tamaño puede seleccionarse de entre los tamaños indicados anteriormente.

Se describe además un procedimiento para producir una partícula tal como se ha indicado anteriormente. El procedimiento puede comprender la obtención de un medio condicionado para células troncales mesenquimatosas (MC-CMM). Puede comprender la concentración del medio condicionado para células troncales mesenquimatosas. El medio condicionado para células troncales mesenquimatosas puede concentrarse mediante ultrafiltración a través de una membrana de >1.000 kDa. El procedimiento puede comprender someter el medio condicionado para células troncales mesenquimatosas concentrado a cromatografía de exclusión por tamaño. Puede utilizarse una precolumna TSK SWXL de 6x40 mm o una columna TSK gel G4000 SWXL de 7,8x300 mm. Pueden seleccionarse las fracciones absorbentes de UV a, por ejemplo, 220 nm, que muestren dispersión dinámica de la luz. La dispersión dinámica de la luz puede detectarse con un detector de dispersión de la luz cuasi-elástico (DDL). Pueden recogerse las fracciones que eluyan con un tiempo de retención de entre 11 y 13 minutos, tal como 12 minutos.

Es proporcionada, según un tercer aspecto de la presente invención, una composición farmacéutica que comprende un exosoma tal como se ha descrito conjuntamente con un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

Como cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona el exosoma o composición farmacéutica anteriormente descrito para la utilización en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad.

Es proporcionada, según un quinto aspecto de la presente invención, la utilización del exosoma anteriormente descrito para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad, en el que la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en:

5 insuficiencia cardíaca, enfermedad de la médula ósea, enfermedad de la piel, quemaduras y enfermedades degenerativas tales como la diabetes, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, cáncer, infarto de miocardio, una lesión cutánea, un trastorno dermatológico, una lesión dermatológica, dermatitis, soriasis, condiloma, verruga, hemangioma, queloide, cáncer de piel, dermatitis atópica, enfermedad de Behcet, enfermedad granulomatosa crónica, linfoma cutáneo de células T, ulceración, una condición patológica caracterizada por una lesión inicial inductora de inflamación y desregulación inmunológica que conduce a un remodelado crónico de los tejidos, incluyendo fibrosis y pérdida de función, lesión renal isquémica, fibrosis quística, sinusitis y rinitis o una enfermedad ortopédica.

15 El exosoma se ha descrito además para la utilización como ayuda en la cicatrización de heridas, la reducción de cicatrices, la formación de hueso, el injerto óseo o el trasplante de médula ósea en un individuo.

El exosoma se ha descrito además para la utilización (i) en la regulación de una ruta seleccionada de entre una o más cualesquiera de entre las siguientes: regulación citoesquelética por la GTPasa Rho, el ciclo celular, la ruta de señalización de integrina, la inflamación mediada por la ruta de señalización de quimiocinas y citocinas, la ruta de señalización del FCF, la ruta de señalización del receptor del FCE, la angiogénesis, la cascada activadora del plasminógeno, la coagulación sanguínea, la glucólisis, la ruta del ubiquitín-proteasoma, la biosíntesis *de novo* de purinas, el ciclo de los ATC, la biosíntesis de fenilalanina, la biosíntesis de hemo, (ii) en la regulación de procesos, incluyendo uno o más cualesquiera de entre los siguientes: estructura y motilidad celulares, estructura celular, comunicación celular, motilidad celular, adhesión celular, endocitosis, mitosis, exocitosis, citoquinesis, ciclo celular, inmunidad y defensa, inmunidad mediada por citocinas/quimiocinas, inmunidad mediada por macrófagos, inmunidad mediada por granulocitos, señalización mediada por ligandos, ruta de señalización mediada por citocinas y quimiocinas, transducción de señales, señalización mediada por proteínas de la matriz extracelular, homeostasis de factor de crecimiento, ruta de señalización de receptor de proteína tirosina cinasa, señalización mediada por adhesión celular, transducción de señales mediada por receptores de superficie celular, cascada JAK-STAT, antioxidación y eliminación de radicales libres, homeostasis, respuesta al estrés, coagulación sanguínea, procesos del desarrollo, desarrollo del mesodermo, desarrollo esquelético, angiogénesis, desarrollo muscular, contracción muscular, metabolismo y modificación de proteínas, proteólisis, pliegue de proteínas, ensamblaje de complejos proteicos, activación de aminoácidos, tráfico de proteínas intracelulares, reconocimiento y localización de otras proteínas, metabolismo de aminoácidos, biosíntesis de proteínas, reacción de proteína disulfuro isomerasa, metabolismo de carbohidratos, glucólisis, lanzadera de pentosas fosfato, metabolismo de otros polisacáridos, metabolismo de purinas, regulación del metabolismo de fosfatos, metabolismo de vitaminas, biosíntesis de aminoácidos, procesamiento pre-ARNm, regulación traduccional, procesamiento de ARNm, o (iii) en la provisión de funciones, incluyendo una o más cualesquiera de las siguientes: molécula de señalización, quimiocina, factor de crecimiento, citocina, interleucina, otra citocina, matriz extracelular, proteína estructural de matriz extracelular, otra matriz extracelular, glucoproteína de matriz extracelular, proteasa, metaloproteasa, otras proteasas, inhibidor de proteasa, inhibidor de metaloproteasa, inhibidor de serina proteasa, oxidorreductasa, deshidrogenasa, peroxidasa, chaperón, chaperonina, chaperón de la familia de Hsp70, otros chaperones, sintetasa, sintasa y sintetasa, proteína de unión a calcio seleccionada, aminoacil-ARNt, sintasa, liasa, isomerasa, otra isomerasa, ATP sintasa, hidratasa, transaminasa, otra liasa, otro regulador enzimático, molécula reguladora seleccionada, proteína citoesquelética de unión a actina, proteína citoesquelética, proteína de unión a actina no motora, actina y proteína relacionada con actina, anexina, tubulina, molécula de adhesión celular, proteína motora de unión a actina, filamento intermedio, ribonucleoproteína, proteína ribosómica, factor de traducción, otra proteína de unión a ARN, histona, proteína relacionada con calmodulina, proteína de cubierta vesicular.

50 En un sexto aspecto de la presente invención se proporciona un sistema de transporte dirigido para transportar un exosoma, que comprende un exosoma tal como se ha indicado anteriormente conjuntamente con un dispensador operable para transportar el exosoma a una diana.

55 Se describe además la utilización de dicho sistema de transporte dirigido en un procedimiento de transporte de una partícula a una diana.

La puesta en práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran comprendidas dentro de las capacidades de un experto ordinario en la materia. Dichas técnicas se explican en la literatura. Ver, por ejemplo, J. Sambrook E. F. Fritsch y T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, libros 1 a 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Ausubel F.M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons, 1996; J.M. Polak y James O'D. McGee, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, 1990; D.M.J. Lilley y J.E. Dahlberg, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic

Press, 1992; Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO. 1 por Edward Harlow, David Lane, Ed. Harlow (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, ISBN 0-87969-544-7); Antibodies: A Laboratory Manual de Ed Harlow (editor), David Lane (editor) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, ISBN 0-87969-314-2), 1855, editado por Jane Roskams y Linda Rodgers, Cold Spring Harbor Laboratory, 2002, ISBN 0-87969-630-3.

5 **Breve descripción de las figuras**

10 Figura 1. Tamaño de infarto de miocardio. Fotografías representativas de tinción con azul de Evans (azul) y TTC (rojo) de corazones de cerdos tratados con MNC (A), MC (B) o solución salina (C).

15 Se muestran cuantificaciones del tamaño del infarto de miocardio como porcentaje del ventrículo izquierdo (VI) y el área en riesgo (AER) en las figuras D y E, respectivamente. MNC, n=9; MC, n=9; solución salina, n=8.

20 Figura 2. Función sistólica local y global. Engrosamiento local de la pared sistólica evaluado mediante ecocardiografía del área infartada en cerdos tratados con MNC, MC o solución salina (A). En la figura B se muestra la función sistólica global, el acortamiento del área fraccional ecocardiográfica (AAF). MNC, n=9; MC, n=9; solución salina, n=8. \*p<0,05 vs. MNC y solución salina.

25 Figura 3. Estrés oxidativo. Viabilidad de células MMC en MC o MNC y tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (\*p<0,05, A). El medio condicionado protege a las células de la muerte inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para evaluar el estrés oxidativo *in vivo*, se tiñeron para 8-OHdG, un producto del estrés oxidativo nuclear, secciones de área infartada de cerdos tratados con MNC (B), MC (C) o solución salina (D). La cuantificación de los núcleos positivos para 8-OHdG se evaluó a una magnificación de 200x y se ilustra en la figura E. El MC también reduce el estrés oxidativo *in vivo*. MNC, n=9; MC, n=9; solución salina, n=8.

30 Figura 4. Señalización de FCT-β y apoptosis. inmunotransferencia para SMAD2 fosforilado (A, B) y caspasa 3 activa (C, D) en cerdos tratados con MNC, MC o solución salina. Se evaluó la beta-tubulina como control de carga y no se observaron diferencias en la expresión de beta-tubulina entre grupos (E). MNC, n=9; MC, n=9; solución salina, n=8.

35 Figura 5. Propiedades de cardioprotección de las fracciones de MC. Cuantificación del tamaño de infarto de miocardio en ratones tratados con solución salina, fracción <1.000 kD de MC o MC no fraccionado. El medio condicionado no fraccionado reduce significativamente el tamaño del infarto de miocardio en comparación con los animales tratados con solución salina. Sin embargo, la fracción <1.000 kDa no, lo que indica que el factor o factores cardioprotectores son de mayor tamaño que 1.000 kDa. Solución salina, n=10; <1.000 kD, n=8; no fraccionado, n=12. \*p<0,01 vs. solución salina.

40 Figura 6. Un medio químicamente definido que había sido condicionado con células CMM-CMEh HuES9.E1 (que no forman parte de la invención) durante tres días se filtró a través de un filtro de 0,22 μm. El medio condicionado (MC) se concentró 25 veces mediante filtración a través de una membrana con un valor de corte de PM de 10 kD. A continuación, el MD concentrado se centrifugó a través de una membrana con un valor de corte de PM de 100 kD o 300 kD en una proporción de filtrado a retenido de 4:1 (v:v). Se cargaron muestras de MC no fraccionado, filtrado y retenido en una proporción de volumen de 5:4:1.

45 Figura 7. Identidad de componentes en el filtrado tras la filtración a través de una membrana con un valor de corte de PM de 100 kD. a) Comparación entre componentes proteicos en filtrado vs. componentes proteicos en el medio no condicionado (MNC). El medio condicionado (MC), el filtrado tras filtrar el MC a través de una membrana con un valor de corte de PM de 100 kD (filtrado 100 kD) y el MNC se separaron en un SDS-PAGE. El gel se tiñó con plata para visualizar las bandas de proteínas; b) se filtró el MC a través de una membrana de valor de corte de PM de 100 kD para producir una proporción de retenido a filtrado de 4:1. El retenido, el filtrado y los diferentes complementos proteicos en el medio químicamente definido, es decir insulina-transferrina-selenoproteína, FCT2, FCE y FCDP AB se separaron en un SDS-PAGE. El retenido y el filtrado se cargaron en una proporción de volúmenes de 4:1.

50 Figura 8. Tamaños relativos de materiales biológicos y tamaños de poro en membranas. Reimpresión de Spectrum© Laboratory.

55 Figura 9. AER relativo en ratones tras isquemia/reperfusión. Se indujo infarto de miocardio mediante oclusión de la arteria coronaria izquierda (ACI) mediante ligación con sutura durante 30 minutos y se inició la reperfusión mediante retirada de la sutura. Cinco minutos antes de la reperfusión los ratones fueron tratados con una inyección en la vena de la cola de 20 μl de CMM-MC no fraccionado (10 a 220 nm), 20 μl de fracción <100 o 1.000 kD, 4 μl de retenido >1.000 kD o solución salina. 24 horas después se extirparon los corazones. Antes de la extirpación, se determinó el área en riesgo (AER) mediante religado de la ACI seguido de perfusión con azul de Evans por la aorta. Se definió la AER como el área no teñida por el pigmento y se expresa como porcentaje del área de pared de ventrículo izquierdo.

60 Figura 10. Efectos del medio condicionado y medio condicionado fraccionado sobre el tamaño relativo del infarto en ratones tras isquemia/reperfusión. Tras la extirpación del corazón, se evaluó el tamaño del infarto 24 horas después

utilizando TTC y se expresa como porcentaje del AER.

Figura 11. Se observaron mediante microscopía electrónica entidades físicas de 50 a 100 nm de diámetro.

5 Figura 12. Fraccionamiento según tamaño del MC tras el tratamiento con Triton X-100; el MC se trató con Triton X-100 al 0,5% ó 1,0% (v/v) final durante 30 minutos y después se fraccionó mediante filtración a través de una membrana con un valor de corte de PM de 100 kDa para generar una proporción en volumen de filtrado:retenido de 4:1.

10 Figura 13. Proteínas encontradas en el análisis EM/EM comunes a los exosomas de diferentes tipos celulares<sup>44</sup>.

Figura 14. Propiedades de cardioprotección de las fracciones de MC. Cuantificación del tamaño del infarto de miocardio en ratones tratados con solución salina, medio condicionado de HEK293, CMMh-MC no fraccionado, MC filtrado con valor de corte de peso molecular (VCPM) de 100 kDa, 300 kDa, 500 kDa y 1.000 kDa o MC concentrado 50 veces frente a VCPM de fracción de 100 kDa del MC o MC no fraccionado.

15 Figura 15. Inmunoprecipación. MC inmunoprecipitado con anti-CD81 o IgG de ratón a modo de control negativo. Se analizó el inmunoprecipitado y el sobrenadante mediante hibridación de inmunotransferencia utilizando anticuerpo contra CD9, Alix, Tsp-1, piruvato cinasa y SOD1.

20 Figura 16. Ultracentrifugación del MC. Se concentró el MC cinco veces mediante filtración a través de una membrana con un VCPM de 500 kDa. El retenido y MC no filtrado se ultracentrifugaron a 200.000g durante 2 horas. Se analizó el sobrenadante y el sedimento mediante inmunotransferencia para la presencia de CD9. Carriles 1 a 3: diferentes concentraciones de proteínas del MC. Carriles 4 y 5: el sedimento (P) y el sobrenadante (S) tras ultracentrifugación de MC no filtrado. Carril 6: retenido tras la filtración del MC a través de una membrana con VCPM de 500 kDa. Carriles 7 y 8: el sedimento (P) y el sobrenadante (S) tras la ultracentrifugación del retenido. Carril 9: filtrado tras la filtración de MC a través de una membrana con VCPM de 500 kDa.

25 Figura 17. Fraccionamiento en densidad de gradiente de sacarosa. Se preparó un gradiente de densidad de sacarosa superponiendo 14 capas de soluciones de sacarosa de concentraciones entre 22,8% y 60% (p/v) en un tubo de centrifuga SW60Ti con la solución más concentrada en el fondo del tubo de ultracentrifuga. La muestra se cargó en el tope del gradiente y se ultracentrifugó durante 16,5 horas a 200.000Xg, a 4°C en un rotor SW60Ti (Beckman Coulter Inc.). Se recogieron 13 fracciones de tope a fondo del gradiente de sacarosa. SE calculó la densidad de cada fracción pesando un volumen fijo de cada fracción. A continuación, se analizaron las fracciones mediante análisis de inmunotransferencia y se sondearon para piruvato cinasa, CD9, CD81 y SOD1. Se fraccionaron marcadores de peso molecular de estándares de proteína en un gradiente similar y se indica la distribución de los marcadores en las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa en la parte inferior de la figura. a) se fraccionó el MC, b) el MC se trató con tampón de lisis antes del fraccionamiento en el gradiente de sacarosa.

30 Figura 18. Tripsinización del MC. Se digirió el MC con tripsina durante 0, 0,5, 2, 10 y 20 minutos. El MC parcialmente digerido se analizó para la presencia de CD9 y SOD1.

35 Figura 19. Análisis del ARN en el MC. (a, b) Se extrajo el ARN de las CMM y del CMM-MC. El ARN purificado se desnaturalizó y se separó en un gel de agarosa de glioxal y urea-PAGE, respectivamente. (c) Se trató un volumen igual de MC con PBS, ciclodextrina, tampón de lisis o fosfolipasa A2. El MC no tratado y tratado se extrajo para el ARN. SE separó el ARN en urea-PAGE. (d) El ARN del MC se trató con ARNasas III y el ARN tratado se separó en paralelo con ARN no tratado en un urea-PAGE. El ARN en los geles se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio.

40 Figura 20. Densidad de ARN en el MC. Tras el fraccionamiento del MC, el MC pretratado con tampón de lisis y los estándares de PM de ARN en una centrifugación de equilibrio de gradiente de densidad de sacarosa tal como se ha descrito en la figura 4, se extrajo cada fracción para el ARN. a) El rendimiento relativo de ARN de cada fracción en cada muestra se dibujo frente al número de fracción. La concentración relativa se normalizó respecto a la concentración de ARN más alta en cada gradiente, que se fijó arbitrariamente como 100%. b) El ARN extraído de cada fracción se separó en un urea-PAGE.

45 Figura 21. El ARN no se encontraba en los exosomas CD81<sup>+</sup>. La inmunoprecipitación de CD81 que también precipitó CD9 se llevó tal como se ha descrito en la fig. 2. El inmunoprecipitado y el sobrenadante se extrajeron para ARN y los extractos se separaron en un urea-PAGE y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

50 Figura 22. Análisis de micromatrices de miARNen el MC. Las muestras de ARN de las MMC y el MC se hibridaron con los chips de micromatrices que contenían sondas para transcritos de miARNlistados en Sanger miRBase versión 10.1. La hibridación se llevó a cabo utilizando dos réplicas biológicas de cada muestra de ARN. a) Se detectaron 149 miARNen CMM y se detectaron 63 en el MC. De entre ellos, 47 se expresaban a niveles similares tanto en las CMM como en el CM. Dieciséis se expresaban a un nivel detectable en el MC pero no en las CMM, mientras que no se detectaron 47 en las CMM pero no en el MC. b) Nivel relativo de expresión de miARNguía respecto a su

miARNantigüa basado en la señal de hibridación en el chip micromatriz.

Figura 23. Fraccionamiento de HPLC de MC y MNC. Se fraccionaron el MC y el MNC en una HPLC utilizando una columna BioSep S4000 de 7,8 mm x 30 cm. Los componentes en el MC y el MNC se eluyeron con tampón fosfato 20 mM con NaCl 150 mM a pH 7,2. El modo de elución era isocrático y el tiempo de operación, de 40 minutos. Se realizó un seguimiento del eluyente con un detector de UV-visible fijo a 220 nm. Se integró el % de área bajo cada pico a partir del detector de UV-visible.

**Descripción detallada**

La presente invención se basa en la demostración de que las células troncales mesenquimatosas (CMM) derivadas de CME humanas median en efectos de cardioprotección mediante los complejos grandes secretados de ~50 a 100 nm de diámetro. Por lo tanto, dichos complejos o partículas pueden utilizarse con medios terapéuticos, incluyendo para la cardioprotección, en lugar de las células mismas.

Los Ejemplos describen el análisis proteómico de estos complejos, que revela la presencia de proteínas asociadas a exosomas, por ejemplo CD81, CD9 y Alix, que también coimmunoprecipitan, y de proteínas membranales y citosólicas que muestran una proteólisis sensible a detergentes consistente con proteínas unidas a membrana y encapsuladas en membranas, respectivamente.

Los Ejemplos demuestran además otras propiedades de estas partículas o complejos. Se demuestra que las proteínas de dichas partículas o complejos presentan densidades de sedimentación independientes del PM de entre 1,016 y 1,215 g/ml que revierten a densidades dependientes del PM con el tratamiento con un tampón de lisis de membranas. La secreción contiene además ARN (<300 nt) en vesículas lipídicas ricas en colesterol. El fraccionamiento mediante HPLC y los estudios de dispersión dinámica de la luz indican adicionalmente que las únicas partículas detectables en la secreción dentro del intervalo de radio hidrodinámico (rh) de 1 a 1.000 nm presentaban un rh de entre 45 y 55 nm.

Dichas observaciones, conjuntamente con la presencia de lípidos membranales, por ejemplo colesterol, esfingomielina y fosfatidilcolina, demuestran que los complejos cardioprotectores en la secreción son exosomas o vesículas lipídicas secretadas.

Dichas partículas, complejos o exosomas de células troncales mesenquimatosas, pueden utilizarse para una diversidad de fines, tales como el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiacas o del corazón, tales como isquemia, inflamación cardiaca o insuficiencia cardiaca. También pueden utilizarse para la reparación tras la lesión por reperfusión.

**Partícula**

Se describe una partícula que es derivable de una célula troncal mesenquimatosa (CMM).

La partícula puede obtenerse de la CMM mediante cualquiera de entre varios medios, por ejemplo mediante secreción, gemación o dispersión a partir de las CMM. Por ejemplo, la partícula puede ser producida, exudada, emitida o desprendida de la CMM. En el caso de que la CMM se encuentre en cultivo celular, la partícula puede secretarse en el medio de cultivo celular.

La partícula puede comprender en particular una vesícula. La partícula puede comprender un exosoma. Las partículas descritas en la presente memoria pueden comprender una o más cualesquiera de las propiedades de los exosomas indicadas en la presente memoria.

La partícula puede comprender vesículas o una esfera aplanada limitada por una bicapa lipídica. Las partículas pueden comprender diámetros de entre 40 y 100 nm. Las partículas pueden formarse mediante gemación interna de la membrana endosómica. Las partículas pueden presentar una densidad de entre ~1,13 y 1,19 g/ml y pueden flotar sobre gradientes de sacarosa. Las partículas pueden enriquecerse en colesterol y esfingomielina, y marcadores de balsa lipídica tales como GM1, GM3, flotilina y la src proteína cinasa Lyn. Las partículas pueden comprender una o más proteínas presentes en las células troncales mesenquimatosas o medio condicionado de células troncales mesenquimatosas (CMM-MC), tal como una proteína característica o específica para las CMM o CMM-MC. Pueden comprender ARN, por ejemplo miARN.

Se describe una partícula que comprende uno o más genes o productos génicos presentes en las CMM o en el medio que se condiciona mediante cultivo de las CMM. La partícula puede comprender moléculas secretadas por las CMM. Dicha partícula, y las combinaciones de cualesquiera de las moléculas comprendidas dentro de la misma, incluyendo en particular proteínas o polipéptidos, pueden utilizarse para complementar la actividad, o en sustitución de las CMM o el medio condicionado con las CMM con el fin de, por ejemplo, tratar o prevenir una enfermedad.

La partícula puede comprender una proteína citosólica presente en el citoesqueleto, por ejemplo la tubulina, la actina

5 y las proteínas de unión a actina, fusiones de membrana intracelular y proteínas de transporte, por ejemplo anexinas y proteínas rab, proteínas de transducción de señales, por ejemplo proteína cinasas, 14-3-3 y proteínas G heterotriméricas, enzimas metabólicos, por ejemplo peroxidasas, piruvato y lípido cinasas, y enolasa-1 y la familia de tetraspaninas, por ejemplo CD9, CD63, CD81 y CD82. En particular, la partícula puede comprender una o más tetraspaninas. Las partículas pueden comprender ARNm y/o microARN.

10 El término "partícula" tal como se utiliza en la presente memoria puede considerarse que se refiere a una entidad discreta. La partícula puede ser aislable a partir de una célula troncal mesenquimatosa (CMM) o medio condicionado de célula troncal mesenquimatosa (CMM-MC). La partícula puede ser responsable de por lo menos una actividad de la CMM o del CMM-MC. La partícula puede ser responsable y llevar a cabo sustancialmente la mayoría o la totalidad de las funciones de la CMM o del CMM-MC. Por ejemplo, la partícula puede ser un sustituto (o sustituto biológico) de la CMM o el CMM-MC.

15 La partícula puede utilizarse para cualquiera de los fines terapéuticos para los que pueden utilizarse las CMM o el CMM-MC.

20 La partícula preferentemente presenta por lo menos una propiedad de una célula troncal mesenquimatosa. La partícula puede presentar una propiedad biológica, tal como una actividad biológica. La partícula puede presentar cualquiera de las actividades biológicas de una CMM. La partícula puede presentar, por ejemplo una actividad terapéutica o restauradora de una CMM.

25 Los Ejemplos muestran que los medios condicionados con las CMM (tal como medio condicionado por células troncales mesenquimatosas o CMM-MC, tal como se describe posteriormente) comprende actividades biológicas de las CMM y son capaces de sustituir a las CMM mismas. Por lo tanto, la propiedad biológica o la actividad biológica de una CMM puede corresponder a una propiedad o actividad biológica de un medio condicionado de células troncales mesenquimatosas. De acuerdo con lo anterior, la partícula puede comprender una o más propiedades o actividades biológicas de un medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC).

30 Medio condicionado por célula troncal mesenquimatosa (CMM-MC)

El medio de cultivo celular condicionado puede obtenerse mediante el cultivo de una célula troncal mesenquimatosa (CMM), un descendiente de la misma o una línea celular derivada de la misma en un medio de cultivo celular, y aislar el medio de cultivo celular. La célula troncal mesenquimatosa puede producirse mediante un procedimiento que comprende obtener una célula mediante la dispersión de una colonia de células troncales embrionarias (CME). La célula, o un descendiente de la misma, puede propagarse en ausencia de cocultivo en un medio sin suero que comprende FCF2.

35 Partícula de célula troncal mesenquimatosa

40 La partícula puede producirse o aislarse de varias maneras. Dicho procedimiento puede comprender aislar la partícula a partir de una célula troncal mesenquimatosa (CMM). Dicho procedimiento puede comprender aislar la partícula a partir de un medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC).

45 La partícula puede aislarse, por ejemplo, separándola de componentes no asociados basándose en cualquier propiedad de la partícula. Por ejemplo, la partícula puede aislarse basándose en el peso molecular, el tamaño, la forma, la composición o la actividad biológica.

50 El medio condicionado puede filtrarse o concentrarse o ambos durante, antes o después de la separación. Por ejemplo, puede filtrarse a través de una membrana, por ejemplo una con un valor de corte de tamaño o peso molecular. Puede someterse a filtración de flujo tangencial o a ultrafiltración.

Por ejemplo, puede utilizarse la filtración con una membrana de un valor de corte adecuado de peso molecular o tamaño, tal como se indica en la sección titulada Ensayos de peso molecular, en el presente documento.

55 El medio condicionado, opcionalmente filtrado o concentrado, o ambos, puede someterse a medios de separación adicionales, tales como la cromatografía de columna. Por ejemplo, puede utilizarse la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con diversas columnas. Las columnas puede ser columnas de exclusión por tamaño o columnas de unión.

60 Puede utilizarse una o más propiedades o actividades biológicas de la partícula para seguir su actividad durante el fraccionamiento del medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC). A título de ejemplo, puede utilizarse la dispersión lumínica, el índice refractivo, la dispersión dinámica de la luz o los detectores de UV-visible, para el seguimiento de las partículas. Por ejemplo, puede utilizarse una actividad terapéutica, tal como la actividad de cardioprotección, para seguir la actividad durante el fraccionamiento.

65 Los párrafos siguientes proporcionan un ejemplo específico de cómo puede obtenerse una partícula de célula troncal

mesenquimatosa, tal como un exosoma.

Puede producirse una partícula de célula troncal mesenquimatosa mediante el cultivo de células troncales mesenquimatosas en un medio con el fin de condicionarlo. El medio puede comprender DMEM. El DMEM puede no incluir rojo fenol. El medio puede complementarse con insulina, transferrina o selenoproteína (ITS), o cualquier combinación de los mismos. Puede comprender FCF2. Puede comprender FCDP AB. La concentración de FCF2 puede ser de aproximadamente 5 ng/ml de FCF2. La concentración de FCDP AB puede ser de aproximadamente 5 ng/ml. El medio puede comprender glutamina-penicilina-estreptomicina o b-mercaptoetanol, o cualquier combinación de los mismos.

Las células pueden cultivarse durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días o más, por ejemplo 3 días. El medio condicionado puede obtenerse mediante la separación de las células respecto del medio. El medio condicionado puede centrifugarse, por ejemplo a 500xg, puede concentrarse mediante filtración a través de una membrana. La membrana puede comprender una membrana de >1.000 kDa. El medio condicionado puede concentrarse aproximadamente 50 veces o más.

El medio condicionado puede someterse a cromatografía líquida, tal como HPLC. El medio condicionado puede separarse mediante exclusión por tamaño. Puede utilizarse cualquier matriz de exclusión por tamaño, tal como sefarsa. A título de ejemplo, puede utilizarse una precolumna TSK SWXL de 6x40 mm o una columna TSK gel G4000 SWXL de 7,8x300 mm. El tampón eluyente puede comprender cualquier medio fisiológico, tal como solución salina. Puede comprender tampón fosfato 20 mM con NaCl 150 mM, pH 7,2. El sistema cromatográfico puede equilibrarse a un caudal de 0,5 ml/min. El modo de elución puede ser isocrático. Puede utilizarse la absorbancia de UV a 220 nm para realizar el seguimiento del avance de la elución. Las fracciones pueden examinarse para la dispersión dinámica de la luz (DDL) utilizando un detector de dispersión cuasi-elástica de la luz (DDCL).

Las fracciones en las que se observa dispersión dinámica de la luz pueden conservarse. Por ejemplo, una fracción que se produce mediante el procedimiento general descrito anteriormente y que eluye con un tiempo de retención de 11 a 13 minutos, tal como 12 minutos, se encuentra que muestra dispersión dinámica de la luz. El  $r_h$  de las partículas en este pico es de aproximadamente 45 a 55 nm. Dichas fracciones comprenden partículas de células troncales mesenquimatosas, tales como exosomas.

### Propiedades de las partículas

Las propiedades de una célula troncal mesenquimatosa pueden comprender una propiedad de un medio condicionado por una célula troncal mesenquimatosa (CMM-MC). Los procedimientos para producir dicho medio condicionado por células troncales mesenquimatosas se describen en la presente memoria y se ilustran en, por ejemplo, el Ejemplo 1, a continuación.

La propiedad puede comprender una propiedad biológica, tal como una actividad biológica. Entre los ejemplos de actividades biológicas se incluyen la cardioprotección, la reducción del estrés oxidativo y la reducción del tamaño del infarto.

### Cardioprotección

La partícula puede presentar una propiedad de las células troncales mesenquimatosas y/o del medio condicionado por las células troncales mesenquimatosas (CMM-MC) que comprende la cardioprotección. La cardioprotección puede comprender la restauración o el mantenimiento de la función cardíaca durante la isquemia y/o la reperfusión.

#### Ensayo de cardioprotección

La cardioprotección puede someterse a ensayo, por ejemplo, utilizando uno o más cualesquiera de los procedimientos descritos en los Ejemplos 5, 10, 14 y 20.

### Estrés oxidativo

La partícula puede presentar una propiedad de las células troncales mesenquimatosas y/o del medio condicionado por las células troncales mesenquimatosas (CMM-MC) que comprende la capacidad de reducir el estrés oxidativo (o citoprotección).

#### Ensayo de estrés oxidativo

La reducción del estrés oxidativo puede someterse a ensayo, por ejemplo, utilizando un ensayo *in vitro* de muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). En resumen, se indujo estrés oxidativo mediado por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en células CME leucémicas humanas y se realizó un seguimiento de la viabilidad celular mediante exclusión de azul Tripán. Se incubaron células CME leucémicas humanas con partículas, medio condicionado o células troncales mesenquimatosas (con solución salina como control) y se trataron con  $H_2O_2$  50  $\mu$ M para inducir

estrés oxidativo. Se evaluó la viabilidad celular utilizando exclusión de azul tripán 12, 24, 36 y 48 horas después del tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

5 La reducción del estrés oxidativo puede someterse a ensayo adicionalmente utilizando un ensayo *in vivo* de oxidación del ADN. El estrés oxidativo *in vivo* también puede someterse a ensayo de la manera siguiente. Se tratan cerdos con las partículas, medio condicionado o células troncales mesenquimatosas (con solución salina como control). Se obtiene secciones de tejido de corazón de cerdo. Se cuantificó el estrés oxidativo nuclear en las secciones de tejido de cerdos tratados y no tratados, mediante inmunotinción de 8-OHdG para ADN oxidado. Las secciones de tejido se sometieron a ensayo para tinción nuclear intensa, indicativa de oxidación del ADN y estrés oxidativo.

### **Tamaño del infarto**

15 Las partículas pueden presentar una propiedad de las células troncales mesenquimatosas y/o del medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC) que comprende la capacidad de reducir el tamaño del infarto.

#### Ensayo del tamaño de infarto

20 El tamaño del infarto puede someterse a ensayo, por ejemplo, utilizando uno o más cualesquiera de los procedimientos descritos en los Ejemplos 6 y 13.

### **Peso molecular de las partículas**

25 Las partículas pueden presentar un peso molecular superior a 100 kDa. Pueden presentar un peso molecular superior a 500 kDa. Por ejemplo pueden presentar un peso molecular superior a 1.000 kDa.

30 El peso molecular puede determinarse por diversos medios. En principio, el peso molecular puede determinarse mediante fraccionamiento por tamaño y filtración a través de una membrana con el valor de corte de peso molecular relevante. A continuación, puede determinarse el tamaño de partícula siguiendo la segregación de las proteínas componentes mediante SDS-PAGE o mediante un ensayo biológico.

#### Ensayo de peso molecular mediante SDS-PAGE

35 Las partículas pueden presentar un peso molecular superior a 100 kDa. Por ejemplo, las partículas pueden ser tales que la mayoría de proteínas de las partículas con peso molecular inferior a 100 kDa se segreguen en la fracción de retenido de peso molecular superior a 100 kDa al someterlas a filtración. De manera similar, al someterlas a filtración con una membrana de valor de corte de 500 kDa, la mayoría de proteínas de las partículas con un peso molecular inferior a 500 kDa pueden segregarse en la fracción de retenido de peso molecular superior a 500 kDa. Lo anterior indica que la partícula puede presentar un peso molecular superior a 500 kDa.

#### Ensayo de peso molecular a partir de la actividad biológica

45 Las partículas pueden presentar un peso molecular superior a 1.000 kDa. Por ejemplo, las partículas pueden ser tales que al someterlas a filtración con una membrana con un corte de peso molecular de 1.000 kDa, la actividad biológica relevante se mantenga sustancial o predominantemente en la fracción de retenido. Alternativamente o adicionalmente, la actividad biológica puede encontrarse ausente en la fracción de filtrado. La actividad biológica puede comprender cualquiera de las actividades biológicas de las partículas descritas en el presente documento.

#### Ensayo de peso molecular a partir del tamaño de infarto

50 Por ejemplo, la actividad biológica puede comprender la reducción del tamaño de infarto, sometida a ensayo en cualquier modelo adecuado de isquemia de miocardio y daño por reperfusión. Por ejemplo, la actividad biológica puede someterse a ensayo en un modelo de ratón o cerdo, tal como se describe en los Ejemplos.

55 En resumen, se induce isquemia miocárdica mediante oclusión durante 30 minutos de la arteria coronaria izquierda (ACI) mediante ligación con sutura y se inicia la reperfusión mediante retirada de la sutura. Se tratan los ratones con líquido que contiene las partículas (tal como CMM-MC no fraccionado), filtrado (tal como fracción <100 ó 1.000 kD), retenido (tal como retenido de >1.000 kD) o solución salina por vía intravenosa por la vena de la cola, 5 minutos antes de la reperfusión, 24 horas después, se extirpan los corazones. Antes de la extirpación, se determina el área en riesgo (AER) mediante religado de la ACI y se perfunde después azul de Evans por la aorta.

65 Se define el AER como el área no teñida por el pigmento y se expresa como porcentaje del área de la pared ventricular izquierda. Se evaluó el tamaño del infarto 24 horas después utilizando azul de Evans y TTC. En el caso de que el tamaño relativo de infarto se reduzca significativamente en los animales tratados con medio condicionado de células troncales mesenquimatosas (CMM-MC) y la fracción de retenido (tal como >1.000 kD) en comparación

con solución salina, ello indica que las partículas presentan un peso molecular que es superior al valor de corte relevante de la membrana (por ejemplo superior a 1.000 kDa).

### Tamaño de partícula

5 La partícula puede presentar un tamaño superior a 2 nm. La partícula puede presentar un tamaño superior a 5 nm, 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm ó 50 nm. La partícula puede presentar un tamaño superior a 100 nm, tal como superior a 150 nm. La partícula puede presentar un tamaño de sustancialmente 200 nm o superior.

10 La partícula o partículas pueden presentar un intervalo de tamaños, tal como de entre 2 y 20 nm, de entre 2 y 50 nm, de entre 2 y 100 nm, de entre 2 y 150 nm o de entre 2 y 200 nm. La partícula o partículas pueden presentar un tamaño de entre 20 y 50 nm, de entre 20 y 100 nm, de entre 20 y 150 nm o de entre 20 y 200 nm. La partícula o partículas pueden presentar un tamaño de entre 50 y 100 nm, de entre 50 y 150 nm o de entre 50 y 200 nm. La partícula o partículas pueden presentar un tamaño de entre 100 y 150 nm o de entre 100 y 200 nm. La partícula o partículas pueden presentar un tamaño de entre 150 y 200 nm.

15 El tamaño puede determinarse por diversos medios. En principio, el tamaño puede determinarse mediante fraccionamiento por tamaño y filtración a través de una membrana con el valor de corte por tamaño relevante. A continuación puede determinarse el tamaño de las partículas siguiendo la segregación de las proteínas componente mediante SDS-PAGE o mediante un ensayo biológico.

20 El tamaño también puede determinarse mediante microscopía electrónica, tal como se indica en el Ejemplo 21.

25 El tamaño puede comprender un radio hidrodinámico. El radio hidrodinámico de la partícula puede ser inferior a 100 nm. Puede ser de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 70 nm. El radio hidrodinámico puede ser de entre aproximadamente 40 nm y aproximadamente 60 nm, tal como de entre aproximadamente 45 nm y aproximadamente 55 nm. El radio hidrodinámico puede ser de aproximadamente 50 nm.

30 El radio hidrodinámico de la partícula puede determinarse por cualquier medio adecuado, por ejemplo difracción láser o dispersión dinámica de la luz. Un ejemplo de un procedimiento de dispersión dinámica de la luz para determinar el radio hidrodinámico se describe en el Ejemplo 33, posteriormente.

### Composición

35 La partícula puede comprender una o más proteínas secretadas por una célula troncal mesenquimatosa. La partícula puede comprender una o más proteínas presentes en medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC).

40 Por ejemplo, la partícula puede comprender 10% o más, 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 60% o más ó 70% o más de dichas proteínas. La partícula puede comprender sustancialmente aproximadamente 75% de dichas proteínas. Las proteínas pueden definirse haciendo referencia a una lista de proteínas o productos génicos de una lista de genes.

### Proteínas

45 Las proteínas pueden seleccionarse de entre las indicadas en la Tabla D1, a continuación. La Tabla D1 comprende las proteínas siguientes, numeradas de 1 a 250, así como las "proteínas con funciones no identificadas", en los párrafos a continuación:

- 50 1. IPI00021428 actina alfa, músculo esquelético, 2. IPI00414057, actina alfa 1, proteína del músculo esquelético; 3. IPI00008603, actina, músculo liso aórtico; 4. IPI00021439, actina, citoplasmática 1; 5. IPI00023006, actina, cardíaca alfa; 6. IPI00021440, actina, citoplasmática 2; 7. IPI00025416, actina, músculo liso gamma-entérico; 8. IPI00479925, agrina; 9. IPI00015102, precursor del antígeno CD166; 10. IPI00007423, miembro B de la familia 32 de fosfoproteína nuclear ácida rica en leucina; 11. IPI00413331, proteína de 36 kDa; 12. IPI00412577, proteína de 34 kDa; 13. IPI00413506, proteína de 33 kDa; 14. IPI00418169, proteína hipotética DKFZp686P03159; 15. IPI00003815 inhibidor 1 de disociación de GDP Rho; 16. IPI00004656 precursor de inmunoglobulina beta-2; 17. IPI00218042 isoforma de procesamiento BMP1-5 del precursor de la proteína morfogenética ósea 1; 18. IPI00009054 isoforma de procesamiento BMP1-3 del precursor de la proteína morfogenética ósea 1; 19. IPI00014021 isoforma de procesamiento BMP1-1 del precursor de la proteína morfogenética ósea 1; 20. IPI00218040 isoforma de procesamiento BMP1-4 del precursor de la proteína morfogenética ósea 1; 21. IPI00006980 proteína C14orf166; 22. IPI00296165 precursor de subcomponente C1r del complemento; 23. IPI00152540 OTTHUMP00000016748; 24. IPI00305064 isoforma de procesamiento CD44 del precursor del antígeno CD44; 25. IPI00297160 proteína hipotética DKFZp451K1918; 26. IPI00293539 isoforma de procesamiento 2 del precursor de la cadherina-11; 27. IPI00304227 forma de procesamiento 1 del precursor de la cadherina-11; 28. IPI00386476 cadherina-11, tipo 2, preproteína de isoforma 1; 29. IPI00024046 precursor

- de la cadherina-13; 30. IPI00290085 precursor de cadherina neural; 31. IPI00029739 isoforma de procesamiento 1 de precursor de factor H del complemento; 32. IPI00012011 cofilina, isoforma no muscular; 33. IPI00007257 calstentina 1 isoforma 2; 34. IPI00218539 isoforma de procesamiento B de precursor de la cadena alfa-1(XI) del colágeno; 35. IPI00477350 colágeno, tipo XI, alfa 1; 36. IPI00329573 isoforma de procesamiento larga de precursor de la cadena alfa-1(XII) del colágeno; 37. IPI00221384 isoforma de procesamiento corta del precursor de la cadena alfa-1(XII) del colágeno; 38. IPI00400935 precursor de la cadena alfa-I(XVI) del colágeno; 39. IPI00297646 precursor de la cadena alfa-1(I) del colágeno; 40. IPI00164755 precursor de prepro-alfa2(I) del colágeno; 41. IPI00304962 precursor de la cadena alfa-2(I) del colágeno; 42. IPI00021033 precursor de la cadena alfa-I(III) del colágeno; 43. IPI00167087 proteína COL3A1; 44. IPI0001034 precursor de la cadena alfa-1(IV) del colágeno; 45. IPI00479324 preproteína de colágeno alfa2 tipo IV; 46. IPI00306322 precursor de cadena alfa-2(IV) del colágeno; 47. IPI00303313 precursor de la cadena alfa-1(V) del colágeno; 48. IPI00477611 proteína de 184 kDa; 49. IPI00293881 proteína COL5A2; 50. IPI00018279 precursor de la cadena alfa-3(V) del colágeno; 51. IPI00291136 precursor de la cadena alfa-1(VI) del colágeno; 52. IPI00304840 isoforma de procesamiento 2C2 del precursor de la cadena alfa-2(VI) del colágeno; 53. IPI00220613 isoforma de procesamiento 2C2A del precursor de la cadena alfa-2(VI) del colágeno; 54. IPI00022200 precursor de alfa 3 de la isoforma del colágeno tipo VI; 55. IPI00072918 precursor de alfa 3 de la isoforma 4 del colágeno tipo VI; 56. IPI00072917 precursor de alfa 3 de la isoforma 3 del colágeno tipo VI; 58. IPI00021828 cistatina B; 59. IPI00007778 precursor de la di-N-acetilquitobiasa; 60. IPI00295741 precursor de la catepsina B;
61. IPI00299219 precursor de la proteína CYR61; 62. IPI00514900 proteína de 42 kDa; 63. IPI00333770 similar a Deducator de proteína 10 de citoquinesis; 64. IPI00478332 similar a Deducator de proteína 9 de citoquinesis; 65. IPI00000875 factor 1-gamma de alargamiento; 66. IPI00465248 alfa-enolasa; 67. IPI00013769 alfa-enolasa, específica pulmonar; 68. IPI00216171 gamma-enolasa; 69. IPI00218803 isoforma de procesamiento B del precursor de la fibulina-1; 70. IPI00296537 isoforma de procesamiento C del precursor de la fibulina-1; 71. IPI00328113 precursor de la fibrilina-1; 72. IPI00019439 precursor de la fibrilina-2; 73. IPI00385645 isoforma de procesamiento 2 del precursor del factor de crecimiento fibroblástico 17; 74. IPI00216602 isoforma de procesamiento 5 del precursor del receptor 2 de factor de crecimiento fibroblástico; 75. IPI00216604 isoforma de procesamiento 8 del precursor del receptor 2 de factor de crecimiento fibroblástico; 76. IPI00034099 proteína hipotética FLJ21918; 77. IPI00333541 filamina-A; 78. IPI00302592 filamina A, alfa; 79. IPI00339227 proteína hipotética DKFZp686O1166; 80. IPI00414283 precursor de fibronectina (FN) (globulina insoluble en frío) (GIF). Isoforma de procesamiento 3; 81. IPI00339225 isoforma de procesamiento 5 del precursor de la fibronectina; 82. IPI00339319 isoforma de procesamiento 11 del precursor de la fibronectina; 83. IPI00556632 isoforma de procesamiento 12 del precursor de la fibronectina; 84. IPI00411462 proteína hipotética DKFZp686B18150; 85. IPI00029723 precursor de proteína 1 relacionada con la folistatina; 86. IPI00005401 polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 5; 87. IPI00219025 glutarredoxina-1; 88. IPI00171411 fosfoproteína 2 del Golgi; 89. IPI00026314 precursor de la gelsolina;
90. IPI00219757 glutatión-S-transferasa P; 91. IPI00027569 ribonucleoproteína heterogénea nuclear 1 grupo C; 92. IPI00003881 proteína HNRPF; 93. IPI00442294 isoforma de procesamiento 1 del precursor de la neurotrimina; 94. IPI00003865 isoforma de procesamiento 1 de la proteína cognada de choque térmico de 71 kDa; 95. IPI00037070 isoforma de procesamiento 2 de la proteína cognada de choque térmico de 71 kDa; 96. IPI00220362 proteína de choque térmico de 10 kDa, mitocondrial; 97. IPI00024284 precursor de la proteína de núcleo proteoglicano heparán-sulfato específica de la membrana basal; 98. IPI00297284 precursor de la proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; 99. IPI00297284 precursor de la proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; 100. IPI00029236 precursor de la proteína de unión 5 del factor de crecimiento similar a la insulina; 101. IPI00029236 precursor de la proteína de unión 5 del factor de crecimiento similar a la insulina; 102. IPI00029235 precursor de la proteína de unión 6 del factor de crecimiento similar a la insulina; 103. IPI00029235 precursor de la proteína de unión 6 del factor de crecimiento similar a la insulina; 104. IPI00016915 precursor de la proteína de unión 7 del factor de crecimiento similar a la insulina; 105. IPI00016915 precursor de la proteína de unión 7 del factor de crecimiento similar a la insulina; 106. IPI00328163 proteína K-alfa-1; 107. IPI00021396 precursor del receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial; 108. IPI00298281 precursor de la cadena gamma-1 de la laminina; 109. IPI00219219 galectina-1; 110. IPI00023673 precursor de la proteína de unión a la galectina-3; 111. IPI00021405 isoforma de procesamiento A de la lamina-A/C; 112. IPI00216953 isoforma de procesamiento ADelta10 de la lamina-A/C; 113. IPI00180173 PREDICCIÓN: similar a la tropomiosina 4; 114. IPI00401614 PREDICCIÓN: similar a FKSG30; 115. IPI00374397 PREDICCIÓN: similar a la tropomiosina 14; 116. IPI00374732 PREDICCIÓN: similar a la proteína PPIA; 117. IPI00402104 PREDICCIÓN: similar a la isoforma 1 de la peptidilproil-isomerasa A; ciclofilina A; peptidil-pro; 118. IPI00455415 PREDICCIÓN: similar a la ribonucleoproteína heterogénea-nuclear de grupo C dJ845O24.4; 119. IPI00454722 PREDICCIÓN: similar a la proteína de unión a fosfatidiletanolamina; 120. IPI00454852 PREDICCIÓN: similar al factor 1 de crecimiento derivado de teratocarcinoma;
121. IPI00002802 precursor de la proteína lisina 6-oxidasa; 122. IPI00410152 isoforma LTBP-1L de la proteína de unión 1 del factor beta de crecimiento transformante latente; 123. IPI00220249 precursor de la isoforma

- 1L de la proteína de unión beta del factor de crecimiento transformante latente; 124. IPI00220249 precursor de isoforma 1L de la proteína de unión del factor beta de crecimiento transformante latente; 125. IPI00410152 isoforma LTBP-1L de la proteína 1 de unión del factor beta de crecimiento transformante latente; 126. IPI00020986 precursor del lumican; 127. IPI00291006 malato deshidrogenasa, precursor mitocondrial; 128. IPI00005707 precursor del receptor 2 de manosa de macrófagos; 129. IPI00020501 miosina-11; 130. IPI00019502 miosina-9; 131. IPI00604620 nucleolina; 132. IPI00220740 isoforma de procesamiento 2 de la nucleofosmina; 133. IPI00219446 proteína de unión a fosfatidiletanolamina; 134. IPI00299738 precursor del intensificador 1 de la procolágeno endopeptidasa C; 135. IPI00015902 precursor del receptor del factor de crecimiento beta derivado de plaquetas; 136. IPI00216691 profilina-1; 137. IPI00169383 fosfoglicerato-cinasa 1; 138. IPI00219568 fosfoglicerato-cinasa, específica de testículo; 139. IPI00296180 precursor del activador del plasminógeno de tipo urocinasa; 140. IPI00215943 isoforma de procesamiento 3 de la plectina 1; 141. IPI00215942 isoforma de procesamiento 2 de la plectina 1; 142. IPI00014898 isoforma de procesamiento 1 de la plectina 1; 143. IPI00398777 plectina 1 isoforma 8; 144. IPI00398776 plectina 1 isoforma 7; 145. IPI00186711 plectina 1 isoforma 6; 146. IPI00420096 plectina 1 isoforma 3; 147. IPI00398779 plectina 1 isoforma 11; 148. IPI00398778 plectina 1 isoforma 10; 149. IPI00398002 plectina 1 isoforma 1; 150. IPI00419585 peptidil-prolil cis-trans isomerasa A;
151. IPI00472718 isoforma 2 de la peptidil-prolil isomerasa A; 152. IPI00000874 peroxirredoxina-1; 153. IPI00024915 peroxirredoxina-5, precursor mitocondrial; 154. IPI00375306 precursor de la peroxirredoxina 5, isoforma b; 155. IPI00012503 isoforma de procesamiento Sapmu-0 del precursor del polipéptido proactivador; 156. IPI00374179 isoforma 2 de la subunidad 1 activadora del proteasoma; 157. IPI00030154 subunidad 1 del complejo activador del proteasoma; 158. IPI00168812 precursor de la isoforma d de la proteína tirosina cinasa 7 PTK7; 159. IPI00419941 precursor de la isoforma a de la proteína tirosina cinasa 7 PTK7; 160. IPI00003590 quiescina Q6, isoforma a; 161. IPI00015916 factor de crecimiento derivado de hueso (fragmento); 162. IPI00015916 factor de crecimiento derivado de hueso; 163. IPI00298289 isoforma de procesamiento 2 de Reticulon-4; 164. IPI00021766 isoforma de procesamiento 1 de Reticulon-4; 165. IPI00013894 calgizarina; 166. IPI00010402 proteína hipotética; 167. IPI00218733 superóxido dismutasa; 168. IPI00014572 precursor de SPARC; 169. IPI00005614 isoforma de procesamiento larga de cadena beta de la espectrina, cerebral 1; 170. IPI00008780 precursor de la estaniocalcina-2; 171. IPI00301288 proteína SEL-OB; 172. IPI00216138 transgelina; 173. IPI00018219 precursor de proteína ig-h3 inducida por factor beta de crecimiento transformante; 174. IPI00304865 factor de crecimiento transformante, receptor beta III; 175. IPI00296099 precursor de la trombospondina-1; 176. IPI00032292 precursor del inhibidor 1 de metaloproteinasas; 177. IPI00027166 precursor del inhibidor 2 de metaloproteinasas; 178. IPI00220828 timosina beta-4; 179. IPI00180240 proteína 3 similar a timosina;
180. IPI00299633 OTTHUMP00000031270 (fragmento); 181. IPI00465028 variante de triosafosfato isomerasa 1 (fragmento); 182. IPI00451401 isoforma de procesamiento 2 de la triosafosfato isomerasa; 183. IPI00010779 tropomiosina 4; 184. IPI00216975 isoforma de procesamiento 2 de la cadena alfa-4 de tropomiosina; 185. IPI00180675 cadena alfa-3 de la tubulina; 186. IPI00218343 cadena alfa-6 de la tubulina; 187. IPI00216298 tioredoxina; 188. IPI00472175 CDNA FLJ46672 fis, clon TRACH3009008, altamente similar a la tioredoxina reductasa; 189. IPI00450472 enzima E2I de conjugación con ubiquitina; 190. IPI00018352 isozima L1 de ubiquitin hidrolasa carboxilo-terminal; 191. IPI00010207 precursor del modificador 1 de pliegue de ubiquitina; 192. IPI00260630 URB; 193. IPI00021263 14-3-3 proteína zeta/delta; 194. IPI00642991 proteína hipotética DKFZp686F10164; 195. IPI00470919 proteína hipotética DKFZp686K08164; 196. IPI007198088 precursor alfa 1 del colágeno, tipo VI; 197. IPI00645849 proteína 1 de matriz extracelular; 200. IPI00554786 tioredoxina reductasa 1; 201. IPI00645018 activador del plasminógeno, urocinasa; 202. IPI00552339 inhibidor tisular de la metaloproteinasas-1; 203. IPI00642997 actina, citoplasmática 2; 204. IPI00719778 similar a la anexina A2; 205. IPI00647915 transgelina-2; 206. IPI00552815 colágeno, tipo V, alfa 1; 207. IPI00552981 CDNA PSEC0266 fis, clon NT2RP3003649, altamente similar al ARNm de la fibulina-1D de Homo sapiens; 208. IPI00180766 proteína de 29 kDa; 209. IPI00552416, cadena alfa de la filamina A;
210. IPI00640698 actina, músculo liso gamma-entérico; 211. IPI00514530 cadena alfa-1 de la actina, músculo esquelético; 212. IPI00556442 variante de la proteína de unión 2 del factor de crecimiento similar a la insulina (fragmento); 213. IPI00513782 gelsolina; 214. IPI00478731 proteína de 29 kDa; 215. IPI00396479 proteína de 24 kDa; 216. IPI00334627 proteína de 39 kDa; 217. IPI00555762 variante de isoforma a de la proteína tirosina cinasa 7 PTK7 (fragmento); 218. IPI00658202 proteína de 97 kDa; 219. IPI00006273 proteína CYR61; 220. IPI00719405 proteína TMSL6; 221. IPI00658096 timosina beta-4; 222. IPI00376163 proteína de 5 kDa; 223. IPI00556217 variante de la fibrilina 1 (fragmento); 224. IPI00514817 proteína similar a la lamina A/C; 225. IPI00644087 progerina; 226. IPI00655812 antígeno del rhabdomyosarcoma MU-RMS-40.12; 227. IPI00604517 proteína similar a la nucleolina; 228. IPI00444262 CDNA FLJ45706 fis, clon FEBRA2028457, altamente similar a la nucleolina; 229. IPI00412473 proteína; 230. IPI00414489 proteína; 231. IPI00411463 proteína; 232. IPI00556415 variante de la transgelina (fragmento); 233. IPI00718825 calmodulina; 234. IPI00478156 proteína de 17 kDa; 235. IPI00386621 proteína CALM3; 236. IPI00647001 proteína ácida; 237. IPI00642650 proteína similar al precursor de la estaniocalcina-2; 238. IPI00641471 proteína similar al colágeno; 239. IPI00514669 proteína 3 similar a la proteína rica en ácido glutámico de

unión al dominio SH3; 240. IPI00719422 triosafosfato isomerasa (fragmento); 241. IPI00003734 proteína putativa S100 de unión al calcio H\_NH0456N16.1; 242. IPI00029571 proteína de 11 kDa; 243. IPI00641047 gelsolina; 244. IPI00647556 gelsolina; 245. IPI00654821 proteína hipotética LOC54845, isoforma 1; 246. IPI00647572 precursor de la proteína-3 relacionada con Dickkopf; 247. IPI00639879 proteína similar a la proteína de citoquinesis sepA; 248. IPI00657746 proteína similar a Dedicador de proteína de citoquinesis 8; 249. IPI00555993 variante del receptor 3 del factor de crecimiento vascular endotelial; 250. IPI00552545 Dedicador de la proteína de citoquinesis 8.

Proteínas con funciones no identificadas: IPI00642991 proteína hipotética DKFZp686F10164; IPI00470919 proteína hipotética DKFZp686K08164; IPI00654685 similar al precursor de SPARC; IPI00719778 proteína similar a la anexina A2; IPI00552981 CDNA PSEC0266 fis, clon NT2RP3003649, altamente similar al ARNm de la fibulina-1D de Homo sapiens; IPI00180776 proteína de 29 kDa; IPI00478731 proteína de 29 kDa; IPI00396479 proteína de 24 kDa; IPI00334627 proteína de 39 kDa; IPI00658202 proteína de 97 kDa; IPI00376163 proteína de 5 kDa; IPI00514817 proteína similar a la lamina A/C; IPI00644087 progerina; IPI00655812 antígeno del rhabdomyosarcoma MU-RMS-40.12; IPI00604517 proteína similar a la nucleolina; IPI00444262 CDNA FLJ45706 fis, clon FEBRA2028457, altamente similar a la nucleolina; IPI00412473 proteína; IPI00414489 proteína; IPI00411463 proteína; IPI00478156 proteína de 17 kDa; IPI00386621 proteína CALM3; IPI00647001 proteína ácida; IPI00642650 precursor de proteína similar a la estaniocalcina-2; IPI00641471 proteína similar al colágeno; IPI00514669 proteína 3 similar a la proteína rica en ácido glutámico de unión al dominio SH3; IPI00003734 proteína putativa S100 de unión al calcio H\_NH0456N16.1; IPI00029574 proteína de 11 kDa; IPI00654821 proteína hipotética LOC54845 isoforma 1; IPI00647572 precursor de la proteína-3 relacionada con Dickkopf; IPI00639879 proteína similar a la proteína de citoquinesis sepA; IPI00657746 proteína similar a Dedicador de proteína de citoquinesis 8; IPI00555993 variante del receptor 3 del factor de crecimiento vascular endotelial.

25 Productos génicos

Las proteínas pueden seleccionarse de entre los productos génicos de los genes indicados en la Tabla D2, a continuación. La Tabla D2 comprende los genes siguientes en los párrafos indicados a continuación:

30 ACTA1, COL5A2, HSPA8, PSAP, ACTA2, COL5A3, HSPE1, PSME1, ACTB, COL6A1, HSPG2, PTK7, ACTC, COL6A2, IGFBP2, QSCN6, ACTG1, COL6A3, IGFBP5, RTN4, ACTG2, CSTB, IGFBP6, S100A1, AGRN, CTBS, IGFBP7, SH3BGRL3, ALCAM, CTSB, K-ALFA-1, SOD1, ANP32B, CY461, KDR, SPARC, ANXA2, DOCK10, LAMC1, SPTBN1, ARHGDI, DOCK8, LGALS1, STC2, B2M, ECM1, LGALS3BP, SVEP1, BMP1, EEF1G, LMNA, TAGLN, C14orf166, ENO1, LOX, TAGLN2, C1R, ENO1B, LTBP1, TGFB1, CALM1, ENO2, LUM, TGFB3, CD109, FBLN1, MDH2, THBS1, CD44, FBN1, MRC2, TIMP1, CDH11, FBN2, MYH11, TIMP2, CDH13, FGF17, MYH9, TMSB4X, CDH2, FGFR2, NCL, TMSL3, CFH/HF1, FLJ21918, NPM1, TMSL6, CFL1, FLNA, PBP, TPI1, CLSTN1, FN1, PCOLCE, TPM4, COL11A1, FSTL1, PDGFRB, TUBA3, COL12A1, GALNT5, PFN1, TUBA6, COL16A1, GLRX, PGK1, TXN, COL1A1, GOLPH2, PGK2, TXNRD1, COL1A2, GSN, PLAU, UBE2I, COL3A1, GSTP1, PLEC1, UCHL1, COL4A1, HNRPCL1, PPIA, UFM1, COL4A2, HNRPF, PRDX1, URB, COL5A1, HNT, PRDX5, YWHAZ.

40 201 Genes en 58 procesos biológicos

La partícula puede comprender adicionalmente, o alternativamente, cualquiera de los productos génicos de los 201 genes listados posteriormente, en la Tabla D3. Estos genes se caracterizan según un proceso biológico en el que participa el gen.

45 De acuerdo con lo anterior, la partícula puede utilizarse para influir, controlar o regular cualquiera de dichos 58 procesos biológicos.

<b>Metabolismo de alcoholes</b>	
GI_16507966-S ENO2	Enolasa 2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa 1, (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa 1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa 2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa 2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa 1

<b>Angiogénesis</b>	
GI_11321596-S KDR	receptor de dominio de inserción de cinasa (un receptor tirosina cinasa de tipo III)
GI_30172563-S VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_42716312-S ANG	Angiogenina, ribonucleasa, familia de la ARNasa A, 5
GI_10337586-S FGF6	Factor de crecimiento fibroblástico 6

50

<b>Formación de biominales</b>	
GI_27262662-A CDH11	Cadherina-11, tipo 2, cadherina-OB (osteoblástica)
GI_5902810-A BMP1	Proteína morfogenética ósea 1
GI_4507170-S SPARC	Proteína secretada, ácida, rica en cisteínas (osteonectina)

<b>Desarrollo de vasos sanguíneos</b>	
GI_11321596-S KDR	Receptor de dominio de inserción de cinasa (un receptor tirosina cinasa de tipo III)
GI_30172563-S VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_42716312-S ANG	Angiogenina, ribonucleasa, familia de la ARNasa A, 5
GI_10337586-S FGF6	Factor de crecimiento fibroblástico 6

<b>Morfogénesis de vasos sanguíneos</b>	
GI_11321596-S KDR	Receptor de dominio de inserción de cinasa (un receptor tirosina cinasa de tipo III)
GI_30172563-S VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_42716312-S ANG	Angiogenina, ribonucleasa, familia de la ARNasa A, 5
GI_10337586-S FGF6	Factor de crecimiento fibroblástico 6

<b>Remodelado óseo</b>	
GI_27262662-A CDH11	Cadherina-11, tipo 2, cadherina-OB (osteoblástica)
GI_5902810-A BMP1	Proteína morfogenética ósea 1
GI_4507170-S SPARC	Proteína secretada, ácida, rica en cisteínas (osteonectina)

<b>Metabolismo de carbohidratos</b>	
GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafofosfato isomerasa-1

<b>Catabolismo</b>	
GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafofosfato isomerasa-1

<b>Catabolismo celular de carbohidratos</b>	
GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafofosfato isomerasa-1

<b>Metabolismo celular de carbohidratos</b>	
GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafofosfato isomerasa-1

<b>Catabolismo celular</b>	
GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2

## ES 2 537 516 T3

GI_21735420-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1

### Catabolismo celular de macromoléculas

GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1

### Quimiotaxis

GI_27262654-A IL16	Interleucina-16 (factor quimioatrayente de linfocitos)
GI_22538807-A CCL23	Ligando de quimiocina 23 (motivo C-C)
GI_34335180-A CCL15	Ligando de quimiocina 15 (motivo C-C)
GI_40316922-I CXCL12	Ligando de quimiocina 12 (motivo C-X-C) (factor derivado de células estromales 1)
GI_41872613-S CXCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-X-C)
GI_22538812-S CCL2	Ligando de quimiocina 2 (motivo C-C)
GI_4504098-S CXCR3	Receptor de quimiocina 3 (motivo C-X-C)
GI_22538399-S CCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-X-C)
GI_5453576-S CXCL13	Ligando de quimiocina 13 (motivo C-X-C) (quimioatrayente de células B)
GI_22538815-S CCL8	Ligando de quimiocina 8 (motivo C-C)
GI_34222286-S CYR61	Inductor angiogénico rico en cisteínas 61
GI_4506832-S CCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-C)
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_22538800-S CCL16	Ligando de quimiocina 16 (motivo C-C)
GI_14790145-S CXCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-X-C)
GI_22165426-S CCL24	Ligando de quimiocina 24 (motivo C-C)
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-C)
GI_13435401-S CCL7	Ligando de quimiocina 7 (motivo C-C)
GI_4505862-S PLAU	Activador del plasminógeno, urocinasa
GI_4504152-S CXCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento del melanoma, alfa)
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa
GI_22547151-S CCL26	Ligando de quimiocina 26 (motivo C-C)
GI_4506852-S XCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C)

### Respuesta de defensa

GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa

### Desarrollo

GI_42716312-S ANG	Angiogenina, ribonucleasa, familia de la ARNasa, 5
GI_5902810-A BMP1	Proteína morfogenética ósea 1
GI_27262662-A CDH11	Cadherina-11, tipo 2, cadherina-OB (osteoblástica)
GI_27262662-A CSF1	Factor estimulador de colonias-1 (macrófagos)
GI_27437029-S CSF2	Factor estimulador de colonias-2 (granulocitos-macrófagos)
GI_27437048-A CSF3	Factor estimulador de colonias-3 (granulocitos)
GI_34222286-S CYR61	Inductor angiogénico rico en cisteínas, 61
GI_24430140-S FBN1	Fibrilina 1 (síndrome de Marfan)
GI_4755135-S FBN2	Fibrilina 2 (aracnodactilia contractural congénita)
GI_10337586-S FGF6	Factor de crecimiento fibroblástico 6
GI_24430216-S IL10	Interleucina-10
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_11321596-S KDR	Receptor de dominio de inserción de cinasa (un receptor tirosina cinasa de tipo III)
GI_4580419-A KITLG	Ligando KIT
GI_6006018-S LIF	Factor inhibidor de la leucemia (factor de diferenciación colinérgica)
GI_7262388-S PCOLCE	Intensificador de la procolágeno C-endopeptidasa
GI_4507170-S SPARC	Proteína secretada, ácida, rica en cisteínas (osteonectina)
GI_10863872-S TGFB1	Factor de crecimiento transformante, beta-1 (enfermedad de

	Camurati-Engelmann)
GI_4507470-S TGFBR3	Factor de crecimiento transformante, receptor beta III (betaglicano, 300 kDa)
GI_40317625-S THBS1	Trombospondina-1
GI_40805871-S THPO	Trombopoyetina (ligando del oncogén vírico de la leucemia mieloproliferativa, factor de crecimiento y desarrollo de los megacariocitos)
GI_4507508-S TIMP1	Inhibidor de metalopeptidasa TIMP 1
GI_30172563-S VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

**Derivación de energía mediante oxidación de compuestos orgánicos**

GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfogliceratocinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfogliceratocinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1

**Excitosis**

GI_22538815-S CCL8	Ligando de quimiocina-8 (motivo C-C)
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina-5 (motivo C-C)

**Fiebre**

GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa

**Generación de metabolitos precursores y energía**

GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alf)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1

**Catabolismo de la glucosa**

GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alf)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1

**Metabolismo de la glucosa**

GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alf)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543306-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1

**Glucólisis**

GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alf)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1

<b>Generación de calor</b>	
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa

<b>Hematopoyesis</b>	
GI_27262662-A CSF1	Factor estimulador de colonias-1 (macrófagos)
GI_4580419-A KITLG	Ligando de KIT
GI_24430216-S IL10	Interleucina-10

<b>Desarrollo de órganos hematopoyéticos o linfoides</b>	
GI_27262662-A CSF1	Factor estimulador de colonias-1 (macrófagos)
GI_4580419-A KITLG	Ligando de KIT
GI_24430216-S IL10	Interleucina-10

<b>Catabolismo de hexosas</b>	
GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfogliceratocinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfogliceratocinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafofosfato isomerasa-1

<b>Metabolismo de hexosas</b>	
GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfogliceratocinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfogliceratocinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafofosfato isomerasa-1

<b>Respuesta inmunológica</b>	
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-2, alfa

<b>Respuesta inflamatoria</b>	
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-2, alfa

<b>Metabolismo de macromoléculas</b>	
GI_5902810-A BMP1	Proteína morfogenética ósea-1
GI_31542249-S C1R	Componente del complemento 1, subcomponente r
GI_22538429-A CTSB	Catepsina-B
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_33859834-S HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos (hepatopoyetina A, factor de dispersión)
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_13027798-S MMP1	Metalopeptidasa de matriz-1 (colagenasa intersticial)
GI_4505204-S MMP10	Metalopeptidasa de matriz-10 (estromelina-2)
GI_13027796-S MMP13	Metalopeptidasa de matriz-13 (colagenasa-3)
GI_13027803-S MMP3	Metalopeptidasa de matriz-3 (estromelina-1, progelatinasa)
GI_4826835-S MMP9	Metalopeptidasa de matriz-9 (gelatinasa-B, gelatinasa de 92 kDa, colagenasa tipo IV de 92 kDa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2
GI_4505862-S PLAU	Activador del plasminógeno, urocinasa
GI_26024330-S TPI1	Triosafofosfato isomerasa-1

<b>Catabolismo de macromoléculas</b>	
GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfogliceratocinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfogliceratocinasa-2

## ES 2 537 516 T3

GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1

### Rutas principales del metabolismo de carbohidratos

GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfogliceratocinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfogliceratocinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1

### Catabolismo de monosacáridos

GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfogliceratocinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfogliceratocinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1

### Metabolismo de monosacáridos

GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_22095338-S PGK1	Fosfogliceratocinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfogliceratocinasa-2
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1

### Desarrollo de órganos

GI_27262662-A CSF1	Factor estimulador de colonias-1 (macrófagos)
GI_27262662-A CDH11	Cadherina-11, tipo 2, cadherina-OB (osteoblástica)
GI_4580419-A KITLG	Ligando de KIT
GI_5902810-A BMP1	Proteína morfogenética ósea-1
GI_11321596-S KDR	Receptor de dominio de inserción de cinasa (un receptor tirosina cinasa de tipo III)
GI_30172563-S VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_4507170-S SPARC	Proteína secretada, ácida, rica en cisteínas (osteonectina)
GI_42716312-S ANG	Angiogenina, ribonucleasa, familia de la ARNasa A, 5
GI_24430216-S IL10	Interleucina-10
GI_10337586-S FGF6	Factor de crecimiento fibroblástico-6

### Morfogénesis de órganos

GI_11321596-S KDR	Receptor de dominio de inserción de cinasa (un receptor tirosina cinasa de tipo III)
GI_30172563-S VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_42716312-S ANG	Angiogenina, ribonucleasa, familia de la ARNasa A, 5
GI_10337586-S FGF6	Factor de crecimiento fibroblástico-6

### Osificación

GI_27262662-A CDH11	Cadherina-11, tipo 2, cadherina-OB (osteoblástica)
GI_5902810-A BMP1	Proteína morfogenética ósea-1
GI_4507170-S SPARC	Proteína secretada, ácida, rica en cisteínas (osteonectina)

### Metabolismo del fosfato

GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2

### Metabolismo del fósforo

GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2

<b>Respuesta a estímulos abióticos</b>	
GI_27262654-A IL16	Interleucina-16 (factor quimioatrayente de linfocitos)
GI_22538807-A CCL23	Ligando de quimiocina 23 (motivo C-C)
GI_34335180-A CCL15	Ligando de quimiocina 15 (motivo C-C)
GI_40316922-I CXCL12	Ligando de quimiocina 12 (motivo C-X-C) (factor derivado de células estromales 1)
GI_41872613-S CXCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-X-C)
GI_22538812-S CCL2	Ligando de quimiocina 2 (motivo C-C)
GI_4504098-S CXCR3	Receptor de quimiocina 3 (motivo C-X-C)
GI_22538399-S CCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-C)
GI_5453576-S CXCL13	Ligando de quimiocina 13 (motivo C-X-C) (quimioatrayente de células B)
GI_22538815-S CCL8	Ligando de quimiocina 8 (motivo C-C)
GI_34222286-S CYR61	Inductor angiogénico rico en cisteínas 61
GI_4506832-S CCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-C)
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_22538800-S CCL16	Ligando de quimiocina 16 (motivo C-C)
GI_14790145-S CXCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-X-C)
GI_22165426-S CCL24	Ligando de quimiocina 24 (motivo C-C)
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-C)
GI_13435401-S CCL7	Ligando de quimiocina 7 (motivo C-C)
GI_4505862-S PLAU	Activador del plasminógeno, urocinasa
GI_4504152-S CXCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento del melanoma, alfa)
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa
GI_22547151-S CCL26	Ligando de quimiocina 26 (motivo C-C)
GI_4506852-S XCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C)

<b>Respuesta a estímulos bióticos</b>	
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa

<b>Respuesta a estímulos químicos</b>	
GI_27262654-A IL16	Interleucina-16 (factor quimioatrayente de linfocitos)
GI_22538807-A CCL23	Ligando de quimiocina 23 (motivo C-C)
GI_34335180-A CCL15	Ligando de quimiocina 15 (motivo C-C)
GI_40316922-I CXCL12	Ligando de quimiocina 12 (motivo C-X-C) (factor derivado de células estromales 1)
GI_41872613-S CXCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-X-C)
GI_22538812-S CCL2	Ligando de quimiocina 2 (motivo C-C)
GI_4504098-S CXCR3	Receptor de quimiocina 3 (motivo C-X-C)
GI_22538399-S CCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-C)
GI_5453576-S CXCL13	Ligando de quimiocina 13 (motivo C-X-C) (quimioatrayente de células B)
GI_22538815-S CCL8	Ligando de quimiocina 8 (motivo C-C)
GI_34222286-S CYR61	Inductor angiogénico rico en cisteínas 61
GI_4506832-S CCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-C)
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_22538800-S CCL16	Ligando de quimiocina 16 (motivo C-C)
GI_14790145-S CXCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-X-C)
GI_22165426-S CCL24	Ligando de quimiocina 24 (motivo C-C)
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-C)
GI_13435401-S CCL7	Ligando de quimiocina 7 (motivo C-C)
GI_4505862-S PLAU	Activador del plasminógeno, urocinasa
GI_4504152-S CXCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento del melanoma, alfa)
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa
GI_22547151-S CCL26	Ligando de quimiocina 26 (motivo C-C)
GI_4506852-S XCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C)

<b>Respuesta a estímulos bióticos externos</b>	
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa

<b>Respuesta a estímulos externos</b>	
GI_27262654-A IL16	Interleucina-16 (factor quimioatrayente de linfocitos)
GI_22538807-A CCL23	Ligando de quimiocina 23 (motivo C-C)
GI_34335180-A CCL15	Ligando de quimiocina 15 (motivo C-C)
GI_40316922-I CXCL12	Ligando de quimiocina 12 (motivo C-X-C) (factor derivado de células estromales 1)
GI_41872613-S CXCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-X-C)
GI_22538812-S CCL2	Ligando de quimiocina 2 (motivo C-C)
GI_4504098-S CXCR3	Receptor de quimiocina 3 (motivo C-X-C)
GI_22538399-S CCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-C)
GI_5453576-S CXCL13	Ligando de quimiocina 13 (motivo C-X-C) (quimioatrayente de células B)
GI_22538815-S CCL8	Ligando de quimiocina 8 (motivo C-C)
GI_34222286-S CYR61	Inductor angiogénico rico en cisteínas 61
GI_4506832-S CCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-C)
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_22538800-S CCL16	Ligando de quimiocina 16 (motivo C-C)
GI_14790145-S CXCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-X-C)
GI_22165426-S CCL24	Ligando de quimiocina 24 (motivo C-C)
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-C)
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_13435401-S CCL7	Ligando de quimiocina 7 (motivo C-C)
GI_4505862-S PLAU	Activador del plasminógeno, urocinasa
GI_4504152-S CXCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento del melanoma, alfa)
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa
GI_22547151-S CCL26	Ligando de quimiocina 26 (motivo C-C)
GI_4506852-S XCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C)

<b>Respuesta a plagas, patógenos o parásitos</b>	
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa

<b>Respuesta a estímulos</b>	
GI_27262654-A IL16	Interleucina-16 (factor quimioatrayente de linfocitos)
GI_22538807-A CCL23	Ligando de quimiocina 23 (motivo C-C)
GI_34335180-A CCL15	Ligando de quimiocina 15 (motivo C-C)
GI_40316922-I CXCL12	Ligando de quimiocina 12 (motivo C-X-C) (factor derivado de células estromales 1)
GI_41872613-S CXCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-X-C)
GI_22538812-S CCL2	Ligando de quimiocina 2 (motivo C-C)
GI_4504098-SCXCR3	Receptor de quimiocina 3 (motivo C-X-C)
GI_22538399-S CCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-X-C)
GI_5453576-S CXCL13	Ligando de quimiocina 13 (motivo C-X-C) (quimioatrayente de células B)
GI_22538815-S CCL8	Ligando de quimiocina 8 (motivo C-C)
GI_34222286-S CYR61	Inductor angiogénico rico en cisteínas 61
GI_4506832-S CCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-C)
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_22538800-S CCL16	Ligando de quimiocina 16 (motivo C-C)
GI_14790145-S CXCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-X-C)
GI_22165426-S CCL24	Ligando de quimiocina 24 (motivo C-C)
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-C)
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_13435401-S CCL7	Ligando de quimiocina 7 (motivo C-C)
GI_4505862-S PLAU	Activador del plasminógeno, urocinasa
GI_4504152-S CXCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento del melanoma, alfa)
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa
GI_22547151-S CCL26	Ligando de quimiocina 26 (motivo C-C)
GI_4506852-S XCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C)

<b>Respuesta al estrés</b>	
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_4505862-S PLAU	Activador del plasminógeno, urocinasa
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa

<b>Respuesta a heridas</b>	
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_4505862-S PLAU	Activador del plasminógeno, urocinasa
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa

<b>Secreción</b>	
GI_22538815-S CCL8	Ligando de quimiocina-8 (motivo C-C)
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina-5 (motivo C-C)

<b>Ruta secretora</b>	
GI_22538815-S CCL8	Ligando de quimiocina-8 (motivo C-C)
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina-5 (motivo C-C)

<b>Desarrollo esquelético</b>	
GI_22762662-A CDH11	Cadherina-11, tipo 2, cadherina-OB (osteoblástica)
GI_5902810-A BMP1	Proteína morfogenética ósea-1
GI_4507170-S SPARC	Proteína secretada, ácida, rica en cisteínas (osteonectina)

<b>Taxis</b>	
GI_27262654-A IL16	Interleucina-16 (factor quimioatrayente de linfocitos)
GI_22538807-A CCL23	Ligando de quimiocina 23 (motivo C-C)
GI_34335180-A CCL15	Ligando de quimiocina 15 (motivo C-C)
GI_40316922-I CXCL12	Ligando de quimiocina 12 (motivo C-X-C) (factor derivado de células estromales 1)
GI_41872613-S CXCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-X-C)
GI_22538812-S CCL2	Ligando de quimiocina 2 (motivo C-C)
GI_4504098-S CXCR3	Receptor de quimiocina 3 (motivo C-X-C)
GI_22538399-S CCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-X-C)
GI_5453576-S CXCL13	Ligando de quimiocina 13 (motivo C-X-C) (quimioatrayente de células B)
GI_22538815-S CCL8	Ligando de quimiocina 8 (motivo C-C)
GI_34222286-S CYR61	Inductor angiogénico rico en cisteínas 61
GI_4506832-S CCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-C)
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_22538800-S CCL16	Ligando de quimiocina 16 (motivo C-C)
GI_14790145-S CXCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-X-C)
GI_22165426-S CCL24	Ligando de quimiocina 24 (motivo C-C)
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-C)
GI_13435401-S CCL7	Ligando de quimiocina 7 (motivo C-C)
GI_4505862-S PLAU	Activador del plasminógeno, urocinasa
GI_4504152-S CXCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento del melanoma, alfa)
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa
GI_22547151-S CCL26	Ligando de quimiocina 26 (motivo C-C)
GI_4506852-S XCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C)

<b>Termorregulación</b>	
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa

<b>Desarrollo de tejidos</b>	
GI_27262662-A CDH11	Cadherina-11, tipo 2, cadherina-OB (osteoblástica)
GI_5902810-A BMP1	Proteína morfogenética ósea-1
GI_4507170-S SPARC	Proteína secretada, ácida, rica en cisteínas (osteonectina)

<b>Vasculogénesis</b>	
GI_30172563-S VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

<b>Desarrollo de la vasculatura</b>	
GI_11321596-S KDR	Receptor de dominio de inserción de cinasa (un receptor tirosina cinasa de tipo III)
GI_30172563-S VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_42716312-S ANG	Angiogenina, ribonucleasa, familia de la ARNasa A, 5
GI_10337586-S FGF6	Factor de crecimiento fibroblástico-6

Tabla D3. Listado de 201 genes en cada uno de los 58 procesos biológicos (genes de medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC))

5 201 genes en 30 rutas

La partícula puede comprender adicionalmente, o alternativamente, cualquiera de los productos génicos de los 201 genes listados posteriormente, en la Tabla D4. Estos genes se caracterizan según una ruta en la que participa el gen.

10

De acuerdo con lo anterior, la partícula puede utilizarse para influir, controlar o regular cualquiera de dichas 30 rutas.

<b>Procesamiento y presentación de antígenos - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_22538429-A CTSB	Catepsina B
GI_37704380-S B2M	Beta-2-microglobulina
GI_24234685-A HSPA8	Proteína 8 de choque térmico de 70 kDa
GI_30581139-A PSME1	Subunidad 1 del activador del proteasoma (prosome, macropaina) (PA28 alfa)
<b>Apoptosis - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_41281560-S CLSTN1	Calsintena 1
GI_28416914-S IL3	Interleucina 3 (factor estimulante de colonias, múltiple)
GI_27894329-S IL1A	Interleucina 1, alfa
GI_27894305-S IL1B	Interleucina 1, beta
GI_2592110-S TNF	Factor de necrosis tumoral (superfamilia de TNF, miembro 2)
<b>Fijación del carbono - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa 2, NAD (mitocondrial)
GI_26024330-S TPI1	Triosafofato isomerasa 1
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa 1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa 2
<b>Comunicación celular - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_27436944-A LMNA	Lamina A/C
GI_5016088-S ACTB	Actina, beta
GI_10938011-S ACTB	Actina, alfa, músculo cardiaco
GI_11038618-S ACTG1	Actina, gamma 1
GI_14719826-S COL1A1	Colágeno, tipo 1, alfa 1
GI_21536289-S COL1A2	Colágeno, tipo 1, alfa 2
GI_15149480-S COL3A1	Colágeno, tipo III, alfa 1 (síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV, autosómico dominante)
GI_45580690-S COL4A1	Colágeno, tipo IV, alfa 1
GI_17986276-S COL4A2	Colágeno, tipo IV, alfa 2
GI_16554578-S COL5A1	Colágeno, tipo V, alfa 1
GI_16554580-S COL5A2	Colágeno, tipo V, alfa 2
GI_15011912-S COL6A1	Colágeno, tipo VI, alfa 1
GI_17402876-A COL6A2	Colágeno, tipo VI, alfa 2
GI_17149810-A COL6A3	Colágeno, tipo VI, alfa 3
GI_18375521-A COL11A1	Colágeno, tipo XI, alfa 1
GI_16933543-A FN1	Fibronectina 1
GI_9845497-S LAMC1	Laminina, gamma 1 (antes LAMB2)
GI_16554581-S COL5A3	Colágeno, tipo V, alfa 3
GI_40317625-S THBS1	Trombospondina 1
<b>Ciclo del citrato (ciclo de los ATC) - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_4504374-S CFH1/HF1	Factor del complemento H
GI_21735620-S MDH2	Malato deshidrogenasa-2, NAD (mitocondrial)

<b>Cascadas del complemento y de coagulación - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_4505862-S PLAU	Activador del plasminógeno, urocinasa
GI_4504374-S CFH1/HF1	Factor del complemento H
GI_31542249-S C1R	Componente del complemento 1, subcomponente r
<b>Interacción citocina-receptor de citocina - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_4506832-S CCL1	Ligando de quimiocina-1 (motivo C-C)
GI_22538399-S CCL11	Ligando de quimiocina-11 (motivo C-C)
GI_34335180-A CCL15	Ligando de quimiocina-15 (motivo C-C)
GI_22538800-S CCL16	Ligando de quimiocina-16 (motivo C-C)
GI_22538812-S CCL2	Ligando de quimiocina-2 (motivo C-C)
GI_22538807-A CCL23	Ligando de quimiocina-23 (motivo C-C)
GI_22165426-S CCL24	Ligando de quimiocina-24 (motivo C-C)
GI_22547151-S CCL26	Ligando de quimiocina-26 (motivo C-C)
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina-5 (motivo C-C)
GI_13435401-S CCL7	Ligando de quimiocina-7 (motivo C-C)
GI_22538815-S CCL8	Ligando de quimiocina-8 (motivo C-C)
GI_27262662-A CSF1	Factor estimulador de colonias-1 (macrófagos)
GI_27437029-S CSF2	Factor estimulador de colonias-2 (granulocitos-macrófagos)
GI_27437048-A CSF3	Factor estimulador de colonias-3 (granulocitos)
GI_4506856-S CX3CL1	Ligando de quimiocina-1 (motivo C-X3-C)
GI_4504152-S CXCL1	Ligando de quimiocina-1 (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento del melanoma, alfa)
GI_14790145-S CXCL11	Ligando de quimiocina-11 (motivo C-X-C)
GI_4316922-I CXCL12	Ligando de quimiocina-12 (motivo C-X-C) (factor derivado de células estromales 1)
GI_5453576-S CXCL13	Ligando de quimiocina-13 (motivo C-X-C) (quimioatrayente de células B)
GI_41872613-S CXCL5	Ligando de quimiocina-5 (motivo C-X-C)
GI_4504098-S CXCR3	Receptor de quimiocina-3 (motivo C-X-C)
GI_6031163-S EGF	Factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona)
GI_38455415-S FLT3LG	Ligando de tirosina cinasa-3 relacionada con fms
GI_33859834-S HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos (hepatopoyetina A, factor de dispersión)
GI_10835170-S IFNG	Interferón, gamma
GI_24430216-S IL10	Interleucina-10
GI_24497437-S IL12B	Interleucina-12B (factor estimulador de células asesinas naturales 2, factor de maduración de linfocitos citotóxicos 2, p40)
GI_26787977-S IL13	Interleucina-13
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_28178860-S IL2	Interleucina-2
GI_28416914-S IL3	Interleucina-3 (factor estimulador de colonias, múltiple)
GI_10834983-S IL6	Interleucina-6 (interferón, beta 2)
GI_28610152-S IL7	Interleucina-7
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_11321596-S KDR	Receptor de dominio de inserción de cinasa (un receptor tirosina cinasa de tipo III)
GI_4580419-A KITLG	Ligando de KIT
GI_4557714-S LEP	Leptina (homólogo de ratón, obesidad)
GI_6006018-S LIF	Factor inhibidor de la leucemia (factor de diferenciación colinérgica)
GI_15451785-A PDGFB	Polipéptido factor beta de crecimiento derivado de plaquetas (homólogo de oncogén <i>v-sis</i> vírico del sarcoma de simio)
GI_15451788-S PDGFRB	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido beta
GI_10863872-S TGFB1	Factor de crecimiento transformante, beta 1 (enfermedad de Camurati-Engelmann)
GI_4507462-S TGFB2	Factor de crecimiento transformante, beta 2
GI_40805871-S THPO	Trombopoyetina (ligando del oncogén del virus de la leucemia mieloproliferativa, factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos)
GI_4507508-S TIMP1	Inhibidor de metalopeptidasa TIMP 1
GI_25952110-S TNF	Factor de necrosis tumoral (superfamilia de TNF, elemento 2)
GI_22547122-S TNFRSF11B	Superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, elemento 11b (osteoprotegerina)
GI_30172563-S VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

GI_4506852-S XCL1	Ligando de quimiocina-1 (motivo C)
<b>Interacción MEC-receptor - Homo sapiens (ser humano)</b>	
GI_9845497-S LAMC1	Laminina, gamma-1 (anteriormente LAMB2)
GI_14719826-S COL1A1	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_21536289-S COL1A2	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_15149480-S COL3A1	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_45580690-S COL4A1	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_17986276-S COL4A2	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_16554578-S COL5A1	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_16554580-S COL5A2	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_15011912-S COL6A1	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_17402876-A COL6A2	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_17149810-A COL6A3	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_18375521-A COL11A1	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_16554581-S COL5A3	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_16933543-A FN1	Fibronectina-1
GI_40317625-S THBS1	Trombospondina-1
GI_7427516-S HSPG2	Proteoglicano-2 heparán-sulfato (perlecan)
GI_21361192-S CD44	Antígeno CD44 (función de migración y sistema de grupos sanguíneos en indios)
<b>Señalización de células epiteliales en la infección por Helicobacter pylori - Homo sapiens (ser humano)</b>	
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-C)
GI_4504152-S CXCL1	Ligando de quimiocina 1 (motivo C-X-C) (actividad estimuladora del crecimiento del melanoma, alfa)
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
<b>Ruta de señalización de Fc epsilon RI - Homo sapiens (ser humano)</b>	
GI_25952110-S TNF	Factor de necrosis tumoral (superfamilia del TNF, elemento 2)
GI_26787977-S IL13	Interleucina-13
GI_27437029-S CSF2	Factor estimulador de colonias-2 (granulocitos-macrófagos)
GI_41281560-S CLSTN1	Calsintena-1
GI_28416914-S IL3	Interleucina-3 (factor estimulador de colonias, múltiple)
<b>Adhesión focal - Homo sapiens (ser humano)</b>	
GI_5016088-S ACTB	Actina, beta
GI_10938011-S ACTC	Actina, alfa, músculo cardíaco
GI_11038618-S ACTG1	Actina, gamma-1
GI_41281560-S CLSTN1	Calsintena-1
GI_18375521-A COL11A1	Colágeno, tipo XI, alfa-1
GI_14719826-S COL1A1	Colágeno, tipo I, alfa-1
GI_21536289-S COL1A2	Colágeno, tipo I, alfa-2
GI_1514980-S COL3A1	Colágeno, tipo III, alfa-1 (síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV, autosómico dominante)
GI_45580690-S COL4A1	Colágeno, tipo IV, alfa-1
GI_17986276-S COL4A2	Colágeno, tipo IV, alfa-2
GI_16554578-S COL5A1	Colágeno, tipo V, alfa-1
GI_16554580-S COL5A2	Colágeno, tipo V, alfa-2
GI_16554581-S COL5A3	Colágeno, tipo V, alfa-3
GI_15011912-S COL6A1	Colágeno, tipo VI, alfa-1
GI_17402876-A COL6A2	Colágeno, tipo VI, alfa-2
GI_17149810-A COL6A3	Colágeno, tipo VI, alfa-3
GI_6031163-S EGF	Factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona)
GI_4503744-S FLNA	Filamina A, alfa (proteína de unión a actina 280)
GI_16933543-A FN1	Fibronectina-1
GI_33859834-S HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos (hepatopoyetina A, factor de dispersión)
GI_19923111-S IGF1	Factor de crecimiento similar a insulina 1 (somatomedina C)
GI_10834983-S IL6	Interleucina-6 (interferón, beta 2)
GI_11321596-S KDR	Receptor de dominio de inserción de cinasa (un receptor tirosina cinasa de tipo III)
GI_9845497-S LAMC1	Laminina, gamma-1 (anteriormente LAMB2)
GI_15451785-A PDGFB	Polipéptido factor beta de crecimiento derivado de plaquetas (homólogo del

	oncogén (v-sis) vírico del sarcoma del simio)
GI_15451788-S PDGFRB	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido beta
GI_40317625-S THBS1	Trombospondina-1
GI_30172563-S VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
<b>Unión hendida - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_5174476-S K-ALFA-1	Tubulina, alfa, ubicua
GI_17986282-S TUBA3	Tubulina, alfa-3
GI_31880337-S TUBA6	Tubulina, alfa-6
GI_15451788-S PDGFRB	Receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido beta
GI_6031163-S EGF	Factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona)
GI_15451785-A PDGFB	Polipéptido beta de factor de crecimiento derivado de plaquetas (homólogo del oncogén (v-sis) vírico del sarcoma del simio)
<b>Glucólisis o gluconeogénesis - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1
GI_22095338-S PGK1	Fosfoglicerato cinasa-1
GI_31543396-S PGK2	Fosfoglicerato cinasa-2
<b>Linaje celular hematopoyético - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_21361192-S CD44	Antígeno CD44 (función de migración y sistema de grupos sanguíneos en indios)
GI_4503744-S FLNA	Filamina A, alfa (proteína de unión a actina 280)
GI_40805871-S THPO	Trombopoyetina (ligando del oncogén vírico de la leucemia mieloproliferativa, factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos)
GI_4507508-S TIMP1	Inhibidor de metalopeptidasa TIMP 1
GI_25952110-S TNF	Factor de necrosis tumoral (superfamilia del TNF, elemento 2)
GI_27262662-A CSF1	Factor estimulador de colonias-1 (macrófagos)
GI_27437048-A CSF3	Factor estimulador de colonias-3 (granulocitos)
GI_38455415-S FLT3LG	Ligando de tirosina cinasa 3 relacionada con fms
GI_10834983-S IL6	Interleucina-6 (interferón, beta 2)
GI_27437029-S CSF2	Factor estimulador de colonias-2 (granulocitos-macrófagos)
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_28416914-S IL3	Interleucina-3 (factor estimulador de colonias, múltiple)
GI_28610152-S IL7	Interleucina-7
GI_4580419-A KITLG	Ligando de KIT
<b>Metabolismo del inositol - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_26024330-S TPI1	Triosafosfato isomerasa-1
<b>Ruta de señalización de la insulina - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_31377794-S CALM1	Calmodulina-1 (fosforilasa cinasa, delta)
GI_41281560-S CLSTN1	Calsinténina-1
<b>Ruta de señalización de Jak-STAT - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_41281560-S CLSTN1	Calsinténina-1
GI_27437029-S CSF2	Factor estimulador de colonias-2 (granulocitos-macrófagos)
GI_27437048-A CSF3	Factor estimulador de colonias-3 (granulocitos)
GI_10835170-S IFNG	Interferón, gamma
GI_24430216-S IL10	Interleucina-10
GI_24497437-S IL12B	Interleucina-12B (factor estimulador de células asesinas naturales 2, factor de maduración de linfocitos citotóxicos 2, p40)
GI_26787977-S IL13	Interleucina-13
GI_28178860-S IL2	Interleucina-2
GI_28416914-S IL3	Interleucina-3 (factor estimulador de colonias, múltiple)
GI_10834983-S IL6	Interleucina-6 (interferón, beta 2)
GI_28610152-S IL7	Interleucina-7
GI_4557714-S LEP	Leptina (homólogo de ratón, obesidad)
GI_6006018-S LIF	Factor inhibidor de la leucemia (factor de diferenciación colinérgica)
GI_40805871-S THPO	Trombopoyetina (ligando del oncogén vírico de la leucemia mieloproliferativa,

	factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos)
GI_4507508-S TIMP1	Inhibidor de metalopeptidasa TIMP 1
<b>Migración transendotelial de leucocitos - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_4826835-S MMP9	Metalopeptidasa de matriz 9 (gelatinasa B, gelatinasa de 92 kDa, colagenasa de tipo IV de 92 kDa)
GI_5453576-S CXCL13	Ligando de quimiocina 13 (motivo C-X-C) (quimioatrayente de células B)
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_40316922-I CXCL12	Ligando de quimiocina 12 (motivo C-X-C) (factor derivado de células estromales 1)
GI_41281560-S CLSTN1	Calsintena-1
GI_5016088-S ACTB	Actina, beta
GI_10938011-S ACTC	Actina, alfa, músculo cardíaco
GI_11038618-S ACTG1	Actina, gamma-1
<b>Ruta de señalización de MPAK - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_34106709-A BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
GI_6031163-S EGF	Factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona)
GI_4503692-S FGF17	Factor de crecimiento fibroblástico-17
GI_4503700-S FGF4	Factor de crecimiento fibroblástico-4 (proteína transformante secretora de heparina 1, oncogén del sarcoma de Kaposi)
GI_10337586-S FGF6	Factor de crecimiento fibroblástico-6
GI_15147344-S FGF7	Factor de crecimiento fibroblástico-7 (factor de crecimiento de queratinocitos)
GI_4503706-S FGF9	Factor de crecimiento fibroblástico-9 (factor activador de la glia)
GI_13186266-A FGFR2	Receptor de factor de crecimiento fibroblástico 2 (cinasa expresada en bacterias, receptor de factor de crecimiento de queratinocitos, disostosis craneofacial 1, síndrome de Crouzon, síndrome de Pfeiffer, síndrome de Jackson-Weiss)
GI_4503744-S FLNA	Filamina A, alfa (proteína de unión a actina 280)
GI_40549401-A GDNF	Factor neurotrófico derivado de células gliales
GI_24234685-A HSPA8	Proteína de choque térmico 8 de 70 kDa
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_15451785-A PDGFB	Polipéptido factor beta de crecimiento derivado de plaquetas (homólogo del oncogén (v-sis) vírico del sarcoma del simio)
GI_15451788-S PDGFRB	Receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido beta
GI_10863872-S TGFB1	Factor de crecimiento transformante, beta-1 (enfermedad de Camurati-Engelmann)
GI_4507462-S TGFB2	Factor de crecimiento transformante, beta-2
GI_25952110-S TNF	Factor de necrosis tumoral (superfamilia del TNF, elemento 2)
<b>Metabolismo del metano - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_40805871-S THPO	Trombopoyetina (ligando del oncogén vírico de la leucemia mieloproliferativa, factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos)
GI_32455261-A PRDX5	Peroxisredoxina-5
<b>Ruta de señalización de mTOR - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_30172563-S VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
GI_41281560-S CLSTN1	Calsintena-1
GI_19923111-S IGF1	Factor de crecimiento similar a insulina 1 (somatomedina C)
<b>Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_16507965-S ENO1	Enolasa-1 (alfa)
GI_16507966-S ENO2	Enolasa-2 (gamma, neuronal)
<b>Metabolismo de la fenilalanina - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_4505184-S MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos (factor inhibidor de la glucosilación)
GI_40805871-S THPO	Trombopoyetina (ligando del oncogén vírico de la leucemia mieloproliferativa, factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos)
GI_32455261-A PRDX5	Peroxisredoxina-5
<b>Regulación del citoesqueleto de actina - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	

GI_5016088-S ACTB	Actina, beta
GI_10938011-S ACTC	Actina, alfa, músculo cardiaco
GI_11038618-S ACTG1	Actina, gamma-1
GI_5031634-S CFL1	Cofilina-1 (no muscular)
GI_41281560-S CLSTN1	Calsintenina-1
GI_6031163-S EGF	Factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona)
GI_4503692-S FGF17	Factor de crecimiento fibroblástico-17
GI_4503700-S FGF4	Factor de crecimiento fibroblástico-4 (proteína transformante secretora de heparina 1, oncogén del sarcoma de Kaposi)
GI_10337586-S FGF6	Factor de crecimiento fibroblástico-6
GI_15147344-S FGF7	Factor de crecimiento fibroblástico-7 (factor de crecimiento de queratinocitos)
GI_4503706-S FGF9	Factor de crecimiento fibroblástico-9 (factor activador de la glia)
GI_13186266-A FGFR2	Receptor de factor de crecimiento fibroblástico 2 (cinasa expresada en bacterias, receptor de factor de crecimiento de queratinocitos, disostosis craneofacial 1, síndrome de Crozon, síndrome de Pfeiffer, síndrome de Jackson-Weiss)
GI_16933543-A FN1	Fibronectina-1
GI_38044287-A GSN	Gelsolina (amiloidosis, tipo finés)
GI_22507396-S MYH9	Miosina, polipéptido pesado 9, no muscular
GI_15451785-A PDGFB	Polipéptido factor beta de crecimiento derivado de plaquetas (homólogo del oncogén vírico (v-sis) del sarcoma del simio)
GI_15451788-S PDGFRB	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido beta
GI_16753213-S PFN1	Profilina-1
GI_34328943-S TMSB4X	Timosina, beta-4, ligada a X
GI_34013529-S TMSL3	Similar a timosina-3
<b>Biosíntesis de estilbeno, cumarina y lignina - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_40805871-S THPO	Trombopoyetina (ligando del oncogén vírico de la leucemia mieloproliferativa, factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos)
GI_32455261-A PRDX5	Peroxiirredoxina-5
<b>Ruta de señalización de receptor de células T - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_25952110-S TNF	Factor de necrosis tumoral (superfamilia del TNF, elemento 2)
GI_27437029-S CSF2	Factor estimulador de colonias 2 (granulocitos-macrófagos)
GI_10835170-S IFNG	Interferón, gamma
GI_24430216-S IL10	Interleucina-10
GI_28178860-S IL2	Interleucina-2
GI_41281560-S CLSTN1	Calsintenina-1
<b>Ruta de señalización de TGF-beta - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_4557730-S LTBP1	Proteína latente 1 de unión al factor beta de crecimiento transformante
GI_40317625-S THBS1	Trombospondina-1
GI_10863872-S TGFB1	Factor de crecimiento transformante, beta 1 (enfermedad de Camurati-Engelmann)
GI_4507462-S TGFB2	Factor de crecimiento transformante, beta 2
GI_25952110-S TNF	Factor de necrosis tumoral (superfamilia del TNF, elemento 2)
GI_10835170-S IFNG	Interferón, gamma
<b>Unión fuerte - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_5016088-S ACTB	Actina, beta
GI_10938011-S ACTC	Actina, alfa, músculo cardiaco
GI_11038618-S ACTG1	Actina, gamma-1
GI_22507396-S MYH9	Miosina, polipéptido pesado 9, no muscular
<b>Ruta de señalización de receptor de tipo Toll - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_14790145-S CXCL11	Ligando de quimiocina 11 (motivo C-X-C)
GI_28610153-S IL8	Interleucina-8
GI_24497437-S IL12B	Interleucina-12B (factor estimulador de células asesinas naturales 2, factor de maduración de linfocitos citotóxicos 2, p40)
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_41281560-S CLSTN1	Calsintenina-1
GI_10834983-S IL6	Interleucina-6 (interferón, beta-2)
GI_22538813-S CCL5	Ligando de quimiocina 5 (motivo C-C)

GI_25952110-S TNF	Factor de necrosis tumoral (superfamilia del TNF, elemento 2)
<b>Diabetes mellitus de tipo I - <i>Homo sapiens</i> (ser humano)</b>	
GI_24497437-S IL12B	Interleucina-12B (factor estimulador de células asesinas naturales 2, factor de maduración de linfocitos citotóxicos 2, p40)
GI_28178860-S IL2	Interleucina-2
GI_10835170-S IFNG	Interferón, gamma
GI_27894329-S IL1A	Interleucina-1, alfa
GI_27894305-S IL1B	Interleucina-1, beta
GI_25952110-S TNF	Factor de necrosis tumoral (superfamilia del TNF, elemento 2)

Tabla D4. Listado de 201 genes en cada una de 30 rutas (genes de medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC))

5 593 genes y 794 productos génicos

La partícula puede comprender adicionalmente, o alternativamente, cualquiera de los productos génicos de los 593 genes y/o 794 productos génicos listados posteriormente, en la Tabla D5.

10 De acuerdo con lo anterior, la partícula puede utilizarse para influir, controlar o regular cualquiera de los procesos o rutas biológicas en los que participan los genes o los productos génicos.

Total de 593 productos génicos únicos: juego 1 a 4 (3 de 4 y 4 de 4) sin genes comunes en lista de 201							
02-Sep	CAND1	DDX17	H2AFY	KRTHB4	PCBP2	QARS	STC1
07-Sep	CAP1	DES	HADH	LAMA4	PCDH18	QPCT	STIP1
AARS	CAP2	DLD	HARS	LAMB1	PCDHGB6	RAB11B	SULF1
ACAA2	CAPG	DNAJC3	HARS2	LANCL1	PCK2	RAB1A	SYNCRIP
ACAT2	CAPN1	DPP3	hCG 1641617	LAP3	PCMT1	RAB6A	TALDO1
ACO1	CAPN2	DPYSL2	hCG 2023776	LASP1	PCNA	RAC1	TARS
ACTN1	CAPZA1	DPYSL3	HEXA	LDHA	PDCD6IP	RAN	TCN2
ACTN2	CAPZA2	DSTN	HEXB	LDHAL6B	PDGFC	RANBP5	TCP1
ACTN3	CAPZB	DYNLL1	HIBCH	LDHB	PDIA3	RARRES2	TFPI
ACTN4	CARS	ECHS1	HINT1	LEPRE1	PDIA4	RARS	THBS2
ACTR1A	CBR1	EEF1A1	HIST1H4	LGALS3	PDIA6	RBMX	THOP1
ACTR1B	CBR3	EEF1A2	HIST1H4A	LOC196463	PDLIM1	RHOA	THY1
ACTR2	CCBL2	EEF1B2	HIST1H4B	LOC283523	PDLIM5	RNASE4	TKT
ACTR3	CCDC19	EEF2	HIST1H4C	LOC347701	PDLIM7	RNH1	TLN1
ACTR3B	CCT2	EFEMP2	HIST1H4D	LOC646821	PEPD	RNPEP	TMOD2
ADAM9	CCT3	EIF2S3	HIST1H4E	LOC649125	PFN2	RPL10A	TMOD3
ADSL	CCT4	EIF3S9	HIST1H4F	LOC653214	PGCP	RPL11	TNC
ADSS	CCT5	EIF4A1	HIST1H4H	LOC654188	PGD	RPL12	TNPO1
AEBP1	CCT6A	EIF4A2	HIST1H4I	LOC728378	PGLS	RPL14	TP53I3
AGA	CCT7	EMILIN1	HIST1H4J	LOXL2	PGM1	RPL18	TPM1
AHCY	CCT8	ENO3	HIST1H4K	LRP1	PGRMC2	RPL22	TPM2
AK1	CD248	EPPK1	HIST1H4L	LTA4H	PHGDH	RPL30	TPM3
AK2	CD59	EPRS	HIST2H2AA3	LTB4DH	PHPT1	RPL5	TRAP1
AKR1A1	CD81	ESD	HIST2H2AA4	LTBP2	PICALM	RPL7	TRHDE
AKR1B1	CD9	ETF1	HIST2H4A	M6PRBP1	PKM2	RPLP0	TROVE2
ALDH2	CDC37	ETFB	HIST2H4B	MACF1	PLEKHC1	RPLP1	TSKU
ALDH7A1	CDC42	ETHE1	HIST4H4	MAP1B	PLOD1	RPLP2	TUBA1A
ALDOA	CFL2	EXT1	HLA-A	MAPK1	PLOD2	RPS10	TUBA8
ALDOC	CHID1	FAH	HLA-B	MAPRE1	PLOD3	RPS15A	TUBB
ANXA1	CLEC11A	FAHD1	HMX1	MAT2A	PLS1	RPS16	TUBB2C
ANXA5	CLIC1	FAM129B	HNRPA1	MAT2B	PLS3	RPS19	TUBB3
ANXA6	CLIC4	FAM3C	HNRPA1L-2	MCTS1	PLSCR3	RPS2	TUBB4
APIB1	CLTC	FAM49B	HNRPA2B1	MDH1	POSTN	RPS20	TUBB6
APIS1	CLTCL1	FAM62A	HNRPC	MFAP4	PPCS	RPS23	TUBB8
AP2A1	CLU	FBLN5	HNRPD	MGAT5	PPIB	RPS3	TWF1
AP2A2	CMPK	FDPS	HNRPDL	MMP14	PPP2R1A	RPS4X	TXNL5
AP2B1	CNDP2	FH	HNRPH2	MMP2	PPP2R4	RPS5	UBE1

AP3B1	CNN2	FKBP10	HNRPK	MRLC2	PPP5C	RPS7	UBE2L3
APEX1	CNN3	FKBP1A	HNRPL	MSN	PPP6C	RPS8	UBE2N
API5	COL18A1	FKBP3	HNRPR	MTAP	PRDX2	RPS9	UBE2V1
APOA1BP	COL2A1	FLNB	HNRPU	MTPN	PRDX3	RPSA	UBE3B
APOE	COL4A2	FLNC	HSP90AB1	MVP	PRDX4	RSU1	UCHL3
APP	COL5A1	FLRT2	HSP90B1	MXRA5	PRDX6	S100A16	UGDH
APRT	COL5A2	FLT1	HSPA1A	MXRA8	PRG1	SARS	UGP2
ARCNI	COL6A2	FSCN1	HSPA1B	MYH14	PRKACA	SDC4	UROD
ARHGAP1	COL7A1	FSTL5	HSPA1L	MYL6	PRKCSH	SDCBP	USP14
ARPC1A	COL7A1	FTL	HSPA4	NAGK	PRNP	SEC22B	USP5
ARPC1B	COL7A1	G6PD	HSPA5	NANS	PROCR	SEC23A	VARS
ARPC2	COL7A1	GALNT2	HSPA6	NARS	PROSC	SEC31A	VASN
ARPC3	COPA	GANAB	HSPB1	NEDD8	PRSS23	SEMA3C	VAT1
ARPC4	COPG	GAPDH	HSPD1	NEFM	PRSS3	SEMA7A	VCL
ARTS-1	COPS3	GARS	HSPH1	NIT2	PSAT1	SERPINB1	VCP
ATIC	COPS4	GAS6	HTRA1	NME1	PSMA1	SERPINB6	VIL2
ATP5B	COPS8	GBA	IDH1	NPC2	PSMA2	SERPINE1	VIM
ATP6AP1	CORO1B	GBE1	IGFBP3	NPEPPS	PSMA3	SERPINE2	VPS26A
CORO1C	GDF15	IGKC	NQO1	PSMA6	SERPINF1	VTN	VPS35
COTL1	GDI1	ILF2	NRP1	PSMA7	SERPINH1	WARS	VTN
CRIP2	GDI2	ILF3	NRP2	PSMB1	SERPINI2	WDR1	WARS
CS	GLO1	INHBA	NT5E	PSMB2	SFRP1	WNT5A	WDR1
BASP1	CSE1L	GLT8D3	IQGAP1	NUCB1	PSMB3	SIL1	WNT5A
BAT1	CSRPI	GLUD1	ISOC1	OLFML3	PSMB4	SLC1A5	WNT5B
BBS1	CSRPI	GM2A	ITGA2	P4HA1	PSMB5	SLC3A2	XPO1
BCAT1	CST3	GNPDA1	ITGB4BP	P4HB	PSMD11	SND1	YKT6
BGN	CTGF	GNPNAT1	KPNB1	PABPC1	PSMD13	SNRPD1	YWHAB
BLVRA	CTHRC1	GOT1	KRT1	PABPC4	PSMD5	SNRPE	YWHAE
BPNT1	CTSD	GOT2	KRT14	PAFAH1B1	PSMD6	SPOCK	YWHAG
BTD	CTSZ	GPC1	KRT2	PAFAH1B2	PSMD7	SPTAN1	YWHAH
C14orf141	CYCS	GPI	KRT27	PAFAH1B3	PSME2	SPTBN4	YWHAQ
C19orf10	D4ST1	GREM1	KRT4	PAICS	PTBP1	SRP9	
C1orf58	DAG1	GRHPR	KRT5	PAM	PTPRCAP	SRPX	
C1orf78	DCI	GSR	KRT6L	PAPPA	PTX3	SRPX2	
C1QBP	DCN	GSS	KRT7	PARK7	PURA	SSB	
C1S	DDAH2	GSTK1	KRT75	PARP1	PXDN	ST13	
C21orf33	DDB1	GSTO1	KRT77	PARVA	PYCR1	ST6GAL2	
CALR	DDT	GTPBP9	KRT9	PCBP1	PYGB	STAT1	

Tabla D5. 593 proteínas adicionales en medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC)

5 **Exosoma**

La partícula puede comprender en particular una vesícula. La partícula puede comprender un exosoma.

10 Los Ejemplos describen el aislamiento del componente activo en la secreción que confiere cardioprotección frente al daño por reperfusión. El componente activo puede comprender un exosoma secretado por las células troncales mesenquimatosas (CMM).

15 Los exosomas son vesículas membranosas pequeñas formadas en compartimientos endocíticos tardíos (cuerpos multivesiculares) descritos por primera vez como secreciones de los reticulocitos, en 1983<sup>21</sup>, y posteriormente se ha encontrado que son secretados por muchos tipos celulares, incluyendo diversas células hematopoyéticas, tumores de origen hematopoyético o no hematopoyético y células epiteliales<sup>22</sup>. Son entidades diferentes del más recientemente descrito "complejo de ribonucleasa", también denominado exosoma<sup>23</sup>.

20 Los exosomas pueden definirse mediante parámetros morfológicos y bioquímicos (ver revisiones<sup>22,24-35</sup>). De acuerdo con ello, las partículas descritas en la presente memoria pueden comprender uno o más de dichos parámetros morfológicos o bioquímicos.

25 Los exosomas se definen clásicamente como vesículas "plateliformes" o una esfera aplanada que se encuentra limitada por una bicapa lipídica con diámetros de entre 40 y 100 nm y se forman por gemación hacia el interior de la membrana endosómica. Al igual que todas las vesículas lipídicas y al contrario que los agregados de proteínas o los fragmentos nucleosómicos que son liberados por las células apoptóticas, los exosomas presentan una densidad de entre ~1,13 y 1,19 g/ml y flotan en los gradientes de sacarosa. Los exosomas se encuentran enriquecidos en colesterol y esfingomielina, y marcadores de balsa lipídica tales como GM1, GM3, flotilina y la src proteína cinasa

Lyn sugieren que sus membranas se encuentran enriquecidas en balsas lipídicas.

Se ha examinado la composición molecular de los exosomas de diferentes tipos celulares y de diferentes especies. En general, los exosomas contienen proteínas ubicuas que aparentemente son comunes a todos los exosomas y proteínas que son específicas de tipo celular. Además, las proteínas en los exosomas del mismo tipo celular pero de diferente especie se encuentran altamente conservadas. Entre las proteínas ubicuas asociadas a exosomas se incluyen proteínas citosólicas observadas en el citoesqueleto, por ejemplo tubulina, actina y proteínas de unión a actina; fusiones y transporte de membranas intracelulares, por ejemplo anexinas y proteínas rab; proteínas de transducción de señales, por ejemplo proteína cinasas, 14-3-3 y proteínas G heterotriméricas; enzimas metabólicas, por ejemplo peroxidasas, piruvato y lípido cinasas, y enolasa-1 y la familia de las tetraspaninas, por ejemplo CD9, CD63, CD81 y CD82. Las tetraspaninas se encuentran altamente enriquecidas en exosomas y es conocido que participan en la organización de grandes complejos moleculares y subdominios membranales.

Son ejemplos de proteínas específicas de tipo celular en los exosomas, las moléculas del CMH de clase II en los exosomas de las células que expresan CMH de clase II, CD86 en exosomas derivadas de células dendríticas, receptores de células T sobre exosomas derivadas de células T, etc. Notablemente los exosomas no contienen proteínas de origen nuclear, mitocondrial, del retículo endoplasmático o del aparato de Golgi. Además, las altamente abundantes proteínas de membrana plasmática se encuentran ausentes en los exosomas que sugieren que no son simplemente fragmentos de la membrana plasmática. Muchas de las ubicuas proteínas asociadas a exosomas que se han informado también se encuentran presentes en el perfil proteómico de la secreción de las CMM-CMEh.

También es conocido que los exosomas contienen ARNm y microARN, que pueden derivarse de otra célula y pueden ser funcionales en esta nueva localización<sup>36</sup>. Las funciones fisiológicas del exosoma siguen pobremente definidas. Se cree que ayudan a erradicar las proteínas obsoletas, a reciclar proteínas, median en la transmisión de partículas infecciosas tales como priones y virus, inducen resistencia del complemento, facilitan la comunicación célula-célula inmunológica y transmiten señalización celular<sup>1,22,25-28,37-40</sup>. Los exosomas han sido utilizados en inmunoterapia para el tratamiento del cáncer<sup>34</sup>.

**Usos de partículas procedentes de células troncales mesenquimatosas**

La partícula puede utilizarse como sustituto de una CMM o CMM-MC, tal como se ha indicado anteriormente. En particular, la partícula puede utilizarse para cualquiera de los fines terapéuticos en los que se están utilizando actualmente las CMM o CMM-MC, o para los que se podrán utilizar en el futuro.

Resulta evidente que los procedimientos y las composiciones descritas en la presente memoria permiten la producción de partículas de células troncales mesenquimatosas. De esta manera, cualesquiera usos de las células troncales mesenquimatosas se aplicarán igualmente a partículas de las células troncales mesenquimatosas.

Las células troncales mesenquimatosas y las células diferenciadas producidas mediante los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria pueden utilizarse para, o para la preparación de una composición farmacéutica destinada a, el tratamiento de una enfermedad. Esta enfermedad puede comprender una enfermedad tratable mediante terapia regenerativa, incluyendo la insuficiencia cardíaca, enfermedades de la médula ósea, enfermedades de la piel, quemaduras, enfermedades degenerativas tales como la diabetes, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, etc. y el cáncer. De acuerdo con lo anterior, las partículas de las CMM pueden utilizarse para tratar dichas enfermedades.

Las partículas de las células troncales mesenquimatosas tales como las preparadas según los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria puede utilizarse para una diversidad de fines comercialmente importantes de investigación, diagnósticos y terapéuticos.

Las partículas de las células troncales mesenquimatosas pueden utilizarse en particular para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad. Dicha enfermedad puede comprender una enfermedad tratable mediante terapia regenerativa, incluyendo la insuficiencia cardíaca, enfermedades de la médula ósea, enfermedades de la piel, quemaduras, enfermedades degenerativas tales como la diabetes, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, etc. y el cáncer.

Las células troncales mesenquimatosas preparadas mediante los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria presentan propiedades similares o idénticas a las de las células troncales mesenquimatosas derivadas de la médula ósea (CMM-MO). Por lo tanto, las células troncales mesenquimatosas y cualesquiera células diferenciadas preparadas a partir de ellas, así como las partículas derivadas a partir de ellas, pueden utilizarse en cualquiera de las aplicaciones para las que es conocida la utilización de CMM-MO, o para las que resulta posible la utilización de las mismas.

**Enfermedades tratables con partículas de células troncales mesenquimatosas**

El análisis del proteoma de las CMM demuestra que las proteínas expresadas participan en tres procesos biológicos:

el metabolismo, la respuesta de defensa y la diferenciación de tejidos, incluyendo la vascularización, la hematopoyesis y el desarrollo esquelético. De acuerdo con lo anterior, las partículas de las CMM descritas en la presente memoria pueden utilizarse para tratar enfermedades en las que estas funciones podrían participar, o cuya reparación o tratamiento implique una o más cualesquiera de estos procesos biológicos. De manera similar, las proteínas expresadas por las CMM, individualmente o en combinación, preferentemente en forma de partículas tal como se indica en la presente memoria, pueden utilizarse para complementar, o sustituir, la actividad de las CMM o de medios condicionados por las CMM, con el fin de, por ejemplo, el tratamiento o la prevención de dichas enfermedades.

Los 201 productos génicos expresados por las CMM se demuestra que activan importantes rutas de señalización en biología cardiovascular, desarrollo óseo y hematopoyesis, tales como las rutas de Jak-STAT, MAPK, receptor de tipo Toll, señalización de TGF-beta y señalización de mTOR. De acuerdo con lo anterior, las partículas de las CMM, etc., pueden utilizarse para prevenir o tratar una enfermedad en la que participe cualquiera de dichas rutas de señalización, o cuya etiología implique uno o más defectos en una o más cualesquiera de dichas rutas de señalización.

De acuerdo con lo anterior, dichas partículas pueden utilizarse para tratar la insuficiencia cardiaca, enfermedades de la médula ósea, enfermedades de la piel, quemaduras y enfermedades degenerativas tales como la diabetes, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y el cáncer.

Dichas partículas también pueden utilizarse para tratar el infarto de miocardio, una herida cutánea, un trastorno dermatológico, una lesión dermatológica, dermatitis, soriasis, condiloma, verrugas, hemangiomas, queloides, cáncer de piel, dermatitis atópica, enfermedad de Behcet, enfermedad granulomatosa crónica, linfoma cutáneo de células T, ulceraciones, una condición patológica caracterizada por una lesión inicial que induce inflamación y desregulación inmunológica que conduce al remodelado crónico de tejidos, incluyendo la fibrosis y la pérdida de función, insuficiencia renal isquémica, fibrosis quística, sinusitis y rinitis o una enfermedad ortopédica.

Las partículas pueden utilizarse para ayudar a la cicatrización de heridas, la reducción de cicatrices, la formación de hueso, un injerto óseo o trasplante de médula ósea en un individuo.

A menos que el contexto indique lo contrario, la expresión "medio condicionado" debe considerarse que incluye no sólo medio de cultivo celular expuesto a CMM, así como una composición que comprende uno o más, preferentemente sustancialmente la totalidad de los polipéptidos que se encuentran presentes en el medio condicionado.

Las partículas también pueden utilizarse como fuentes para cualquiera de las proteínas secretadas o expresadas por las CMM. Por lo tanto, es descrito un procedimiento para producir un polipéptido, tal como se muestra en cualquiera de las Tablas D1 a D5, comprendiendo el procedimiento la obtención de una partícula tal como se describe, y el aislamiento del polipéptido a partir de la partícula.

### **Enfermedad cardiaca**

Los procedimientos y las composiciones de partícula de célula troncal mesenquimatosa descritos en la presente memoria pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención de una enfermedad cardiaca.

La enfermedad cardiaca es una expresión general que cubre una diversidad de diferentes enfermedades que afectan al corazón. En 2007 era la causa principal de muerte en los Estados Unidos, Inglaterra, Canadá y Gales, matando una persona cada 34 segundos sólo en los Estados Unidos. La enfermedad cardiaca incluye cualquiera de las siguientes.

#### Enfermedad cardiaca coronaria

La enfermedad arterial coronaria es una enfermedad de las arterias causada por la acumulación de placas ateromatosas dentro de las paredes de las arterias que suministran al miocardio. La angina de pecho (dolor torácico) y el infarto de miocardio (ataque al corazón) son síntomas y condiciones causadas por enfermedad cardiaca coronaria. Más de 459.000 estadounidenses mueren de enfermedad cardiaca coronaria cada año. En el Reino Unido, se producen 101.000 muertes al año debido a la enfermedad cardiaca coronaria.

#### Cardiomiopatía

La cardiomiopatía es el deterioro de la función del miocardio (es decir, el músculo cardiaco mismo) por cualquier motivo. Las personas que presentan cardiomiopatía con frecuencia se encuentran en riesgo de arritmias y/o muerte cardiaca súbita. Las cardiomiopatías extrínsecas, cardiomiopatías en las que la patología primaria es exterior al miocardio mismo, comprenden la mayoría de las cardiomiopatías. De lejos la causa más frecuente de cardiomiopatía es la isquemia.

La Organización Mundial de la Salud cita como cardiomiopatías específicas: cardiomiopatía alcohólica, enfermedad arterial coronaria, enfermedad cardíaca congénita, enfermedades nutricionales que afectan al corazón, cardiomiopatía isquémica, cardiomiopatía hipertensiva, cardiomiopatía valvular y cardiomiopatía inflamatoria.

5 También se incluyen:

cardiomiopatía secundaria a una enfermedad metabólica sistémica.

10 Cardiomiopatías intrínsecas (debilidad del músculo del corazón que no se debe a una causa externa identificable)

Cardiomiopatía dilatada (CMD, la forma más común y una de las indicaciones principales de trasplante de corazón). En la CMD, el corazón (especialmente el ventrículo izquierdo) se encuentra agrandado y la función de bombeo se encuentra disminuida.

15 Cardiomiopatía hipertrófica (CMH, un trastorno genético causado por diversas mutaciones en genes codificantes de proteínas sarcoméricas). En la CMH, el músculo del corazón se encuentra engrosado, lo que puede obstruir el flujo de sangre e impedir que el corazón funcione correctamente.

20 Cardiomiopatía ventricular derecha arritmogénica (CVDA, que aparece por una perturbación eléctrica del corazón en la que el músculo cardíaco es sustituido por tejido cicatricial fibroso. El ventrículo derecho generalmente es el más afectado).

25 Cardiomiopatía restrictiva (CMR, que es la cardiomiopatía más común. Las paredes de los ventrículos son rígidas, aunque pueden no estar engrosadas, y resisten el llenado normal del corazón con la sangre).

Cardiomiopatía no compactada: el ventrículo izquierdo no ha crecido correctamente desde el nacimiento y presenta una apariencia esponjosa según se aprecia en un ecocardiograma.

30 Enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular es cualquiera de entre varias enfermedades específica que afectan al corazón mismo y/o al sistema de vasos sanguíneos, especialmente a las venas y arterias que llevan al corazón y salen del mismo. La investigación sobre el dimorfismo de la enfermedad sugiere que las mujeres que sufren enfermedad cardiovascular habitualmente sufren de formas que afectan a los vasos sanguíneos, mientras los hombres habitualmente sufren de formas que afectan al músculo del corazón mismo. Entre las causas conocidas o asociadas a enfermedad cardiovascular se incluyen la diabetes mellitus, la hipertensión, la hiperhomocisteinemia y la hipercolesterolemia.

Entre los tipos de enfermedad cardiovascular se incluyen la aterosclerosis.

40 Enfermedad cardíaca isquémica

45 La enfermedad cardíaca isquémica es una enfermedad del corazón mismo, caracterizada por un suministro reducido de oxígeno a los órganos. Ello se produce cuando las arterias que suministran el oxígeno y los nutrientes se atoran y el corazón no recibe suficiente oxígeno y nutrientes y finalmente acaba dejando de latir.

Insuficiencia cardíaca

50 La insuficiencia cardíaca, también denominada insuficiencia del corazón congestiva (o ICC) e insuficiencia cardíaca congestiva, es una condición que puede resultar de cualquier trastorno cardíaco estructural o funcional que altera la capacidad del corazón para llenarse o bombear una cantidad suficiente de sangre por el cuerpo. El *cor pulmonale* es una insuficiencia del lado derecho del corazón.

55 Enfermedad cardíaca hipertensiva

La enfermedad cardíaca hipertensiva es una enfermedad cardíaca causada por una presión sanguínea elevada, especialmente presión sanguínea elevada localizada. Entre las condiciones que pueden estar causadas por enfermedad cardíaca hipertensiva se incluyen la hipertrofia ventricular izquierda, la enfermedad cardíaca congestiva, la insuficiencia cardíaca (congestiva), la cardiomiopatía hipertensiva, las arritmias cardíacas, la enfermedad cardíaca inflamatoria, etc.

60 La enfermedad cardíaca inflamatoria implica la inflamación del músculo del corazón y/o del tejido circundante. La endocarditis comprende la inflamación de la capa interna del corazón, el endocardio. Las estructuras más comunes implicadas son las válvulas cardíacas.

65 Cardiomegalia inflamatoria. La miocarditis comprende la inflamación del miocardio, la parte muscular del corazón.

Enfermedad cardiaca valvular

5 La enfermedad cardiaca valvular es un proceso de enfermedad que afecta a una o más válvulas del corazón. Las válvulas en el lado derecho del corazón son la válvula tricúspide y la válvula pulmonica. Las válvulas en el lado izquierdo del corazón son la válvula mitral y la válvula aórtica. Se encuentran incluidas la estenosis de la válvula aórtica, el prolapso de la válvula mitral y la cardiomiopatía valvular.

10 [El texto anteriormente indicado ha sido adaptado de Heart Disease (3 de febrero, 2009), en Wikipedia, The Free Encyclopedia. Extraído 06:33, 20 de febrero de 2009, de [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Heart\\_disease&oldid=268290924](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Heart_disease&oldid=268290924)].

**Administración de partículas**

15 Las partículas tal como se describen en el presente documento pueden administrarse en el cuerpo humano o animal mediante cualesquiera medios adecuados.

20 Por lo tanto, los presentes inventores describen un sistema de administración para la administración de partículas tal como se describen en el presente documento en una célula diana, tejido, órgano, cuerpo animal o cuerpo humano, y a procedimientos de utilización del sistema de administración para administrar partículas en una diana.

25 El sistema de administración puede comprender una fuente de partículas, tal como un recipiente que contiene las partículas. El sistema de administración puede comprender un dispensador para dispensar las partículas en una diana.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los presentes inventores proporcionan un sistema de administración para administrar una partícula, que comprende una fuente de partículas tal como se describe en el presente documento conjuntamente con un dispensador operable para administrar las partículas en una diana.

30 Los presentes inventores describen adicionalmente la utilización de dicho sistema de administración en un método de administración de una partícula en una diana.

35 Los sistemas de administración para administrar fluidos en el cuerpo son conocidos en la técnica, y entre ellos se incluyen la inyección, el goteo quirúrgico, catéteres (incluyendo catéteres de perfusión), tales como los descritos en la patente estadounidense nº 6.139.524, por ejemplo catéteres de administración de fármaco tales como los descritos en la patente estadounidense nº 7.122.019.

40 La administración en los pulmones o vías nasales, incluyendo la administración intranasal, puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, un spray nasal, inhaladores, etc., tales como los conocidos en la técnica (por ejemplo tal como se muestra en la patente de diseño estadounidense nº D544.957).

La administración en los riñones puede llevarse a cabo utilizando un catéter de administración renal intraaórtica, tal como el descrito en la patente estadounidense nº 7.241.273.

45 Resultará evidente que la administración particular debería ser configurable para administrar la cantidad requerida de partículas en el intervalo apropiado, con el fin de conseguir el tratamiento óptimo.

50 Las partículas pueden utilizarse, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de la aterosclerosis. En ésta, la perfusión de partículas puede llevarse a cabo por vía intravenosa para estabilizar las placas ateroscleróticas o reducir la inflamación en las placas. Las partículas pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención del choque séptico mediante perfusión intravenosa.

55 Las partículas pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención de la insuficiencia cardiaca. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante perfusión crónica intracoronaria o intramiocárdica de partículas para retrasar el remodelado o retrasar la insuficiencia cardiaca. Las partículas pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención de la inflamación pulmonar mediante la administración intranasal.

60 Las partículas pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención de condiciones dermatológicas, por ejemplo la soriasis. Puede utilizarse la administración a largo plazo de partículas utilizando agujas de microinyección transdérmica hasta la resolución de la condición.

Resultará evidente que el método de administración dependerá del órgano particular en el que deben administrarse las partículas y el experto en la materia será capaz de determinar qué medios utilizar de acuerdo con ello.

65 A título de ejemplo, en el tratamiento de la inflamación cardiaca, las partículas pueden administrarse en, por ejemplo, el tejido cardiaco (es decir, el miocardio, el pericardio o el endocardio) mediante inyección intracoronaria directa a

través de la pared torácica o utilizando procedimientos basados en un catéter percutáneo estándar bajo guía fluoroscópica para la inyección directa en un tejido tal como el miocardio o la infusión de un inhibidor a partir de un stent o catéter que se inserta en una luz corporal.

- 5 Puede utilizarse cualquiera de entre una diversidad de catéteres coronarios, o catéteres de perfusión, para administrar el compuesto. Alternativamente, puede recubrirse o impregnarse con las partículas un stent que se introduce en un vaso coronario.

### Regeneración de tejidos

- 10 Las células troncales mesenquimatosas y las células diferenciadas preparadas según los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria y las partículas derivadas de las mismas también pueden utilizarse para la reconstitución o la regeneración de tejidos en un paciente humano que lo requiere. Las células se administran de una manera que les permita injertarse en el sitio de tejido pretendido y reconstituyan o regeneren el
- 15 área funcionalmente deficiente.

- Por ejemplo, los procedimientos y las composiciones descritas en la presente memoria pueden utilizarse para modular la diferenciación de las células troncales. Las células troncales mesenquimatosas y las células diferenciadas y partículas derivadas de las mismas pueden utilizarse para la ingeniería de tejidos, tal como para el
- 20 crecimiento de injertos en la piel. La modulación de la diferenciación de las células troncales puede utilizarse para la bioingeniería de órganos o tejidos artificiales, o para prótesis, tal como stents.

### Cáncer

- 25 Las células troncales mesenquimatosas y células diferenciadas preparadas mediante los procedimientos y las composiciones descritas en la presente memoria y las partículas derivadas de los mismos pueden utilizarse para el tratamiento del cáncer.

- 30 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia.

- Entre los ejemplos más particulares de dichos cánceres se incluyen el cáncer de células escamosas, el cáncer pulmonar de células pequeñas, el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el cáncer gástrico, el cáncer pancreático, los tumores de células gliales tales como el glioblastoma y la neurofibromatosis, el cáncer cervical, el
- 35 cáncer ovárico, el cáncer hepático, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial, el carcinoma de glándulas salivares, el cáncer de riñón, el cáncer renal, el cáncer de próstata, el cáncer vulvar, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. Son ejemplos adicionales de cáncer de tumor sólido, el cáncer de colon, el cáncer de mama, el
- 40 cáncer de pulmón y el cáncer de próstata, los tumores hematopoyéticos malignos, incluyendo las leucemias y los linfomas, la enfermedad de Hodgkin, la anemia aplásica, el cáncer de piel y la poliposis adenomatosa familiar. Entre los ejemplos adicionales se incluyen los neoplasmas cerebrales, los neoplasmas colorrectales, los neoplasmas de mama, los neoplasmas de cervix, los neoplasmas oculares, los neoplasmas hepáticos, los neoplasmas de pulmón, los neoplasmas pancreáticos, los neoplasmas ováricos, los neoplasmas prostáticos, los neoplasmas de piel, los
- 45 neoplasmas testiculares, los neoplasmas, los neoplasmas de hueso, los neoplasmas trofoblásticos, los neoplasmas de tubo de Falopio, los neoplasmas rectales, los neoplasmas colónicos, los neoplasmas de riñón, los neoplasmas de estómago y los neoplasmas paratiroides. También se encuentran incluidos el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer pancreático, el cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón, el melanoma maligno, la leucemia, el linfoma, el cáncer ovárico, el cáncer cervical y el carcinoma del tracto biliar.

- 50 Las células troncales mesenquimatosas y las células diferenciadas preparadas según los procedimientos y las composiciones descritas en la presente memoria también pueden utilizarse en combinación con agentes anticáncer tales como la endostatina y la angiostatina o agentes citotóxicos o agente quimioterapéutico. Por ejemplo, fármacos tales como la adriamicina, la daunomicina, el cis-platino, el etopósido, el taxol, el taxotere y los alcaloides, tales
- 55 como vincristina, y antimetabolitos tales como el metotrexato. La expresión "agente citotóxico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo I, Y y Pr), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

- 60 Además, la expresión incluye productos oncogénicos/inhibidores de tirosina cinasa, tales como las ansamicinas bicíclicas dadas a conocer en el documento nº WO 94/22867; derivados de ácido 1,2-bis(arilamino)benzoico dados a conocer en la patente nº EP 600832; derivados de 6,7-diamino-ftalazín-1-ona dados a conocer en la patente nº EP 600831; derivados 4,5-bis(arilamino)-ftalimida dados a conocer en la patente nº EP 516598, o péptidos que inhiben
- 65 la unión de una tirosina cinasa a una proteína de sustrato que contiene SH2 (ver el documento nº WO 94/07913, por ejemplo). Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los

ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen adriamicina, doxorrubicina, 5-fluorouracilo (5-FU), citosina arabinósido (Ara-C), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, VP-16, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, nicotinamida, esperamicinas (ver la patente US nº 4.675.185), melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas, y terapias endocrinas (tales como dietilestilbestrol (DES), tamoxifeno, fármacos antagonistas de LHRH, progestinas, antiprogestinas, etc.).

#### **Obtención de células troncales mesenquimatosas (CMM)**

Las partículas descritas en la presente memoria pueden aislarse o producirse a partir de medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC). Las CMM adecuadas para la utilización en la producción de medio condicionado y partículas pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica.

En particular, las CMM pueden prepararse mediante la propagación de una célula obtenida mediante dispersión de una colonia de células troncales embrionarias (CME) o un descendiente de las mismas, en ausencia de cocultivo en un medio sin suero que comprende FCF2. Lo anterior se describe en detalle en las secciones posteriores.

Los procedimientos de la técnica anterior para obtener células troncales mesenquimatosas (CMM) o células similares a CMM a partir de CMEh implica la transfección de un gen de telomerasa transcriptasa inversa humana (TTIh) en CMEh en diferenciación (Xu *et al.*, 2004) o el cocultivo con una línea celular de ratón OP9 (Barberi *et al.*, 2005). La utilización de material genético exógeno y células de ratón en estos protocolos de derivación plantea riesgos inaceptables de tumorigenicidad o infección por agentes infecciosos xenozoóticos.

Por lo tanto, las partículas pueden prepararse a partir de CMM derivadas mediante la utilización de un protocolo clínicamente relevante y reproducible para aislar poblaciones de CMM similares o idénticas (tal como homogéneas) a partir de CMEh en diferenciación. En general, el procedimiento comprende dispersar una colonia de células troncales embrionarias (CE) en las células. A continuación, las células se siembran en placa y se propagan. Las células se propagan en ausencia de cocultivo en un medio sin suero que comprende factor de crecimiento fibroblástico 2 (FCF2) con el fin de obtener células troncales mesenquimatosas (CMM).

De esta manera, el protocolo no requiere suero, la utilización de células de ratón o manipulaciones genéticas, y requiere menos manipulaciones y tiempo y, por lo tanto, es altamente escalable.

El protocolo puede utilizarse para el aislamiento de CMM a partir de diferentes líneas de CMEh. Las CMM derivadas de células ME humanas (CMM-CMEh) obtenidas mediante los procedimientos y las composiciones descritas en la presente memoria son notablemente similares a las CMM derivadas de médula ósea (CMM-MO).

El cultivo de células troncales embrionarias puede comprender un cultivo de células troncales embrionarias humanas (CMEh).

Un procedimiento para generar células troncales mesenquimatosas (CMM) puede comprender la tripsinización y propagación de CMEh sin apoyo de células nodriza en medios complementados con FCF2 y opcionalmente FCDP AB antes de la separación de células CD105<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>.

El procedimiento puede comprender la separación de las células CD105<sup>+</sup>, CD24<sup>-</sup> a partir de CMEh tripsinizadas una semana después de la propagación sin células nodriza en un medio complementado con FCF2 y opcionalmente FCDP AB, generando un cultivo de células CMM-CMEh en el que por lo menos algunas, tal como sustancialmente todas, o todas las células son similares o idénticas (tal como homogéneas) entre sí.

Las CMM producidas mediante este procedimiento pueden utilizarse para producir medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC), a partir del cual pueden aislarse las partículas.

#### Desagregación de colonias de células troncales embrionarias

Un procedimiento para producir células troncales mesenquimatosas puede comprender dispersar o desagregar una colonia de células troncales embrionarias en células.

Los ejemplos de colonias de células troncales embrionarias que no se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención comprenden una colonia de ES9hu (Cowan CA, Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J. *et al.*, Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts, N. Engl. J. Med. 350:1353-1356, 2004) o una colonia de CME H1 (Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J. *et al.*, Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts, Science 282:1145-1147, 1998).

Las células en la colonia pueden desagregarse o dispersarse en grado sustancial, es decir, por lo menos en grupos. La colonia puede desagregarse o dispersarse hasta el punto en que todas las células en la colonia están separadas, es decir, la colonia se encuentra completamente desagregada.

La desagregación puede llevarse a cabo con un agente dispersante.

5 El agente dispersante puede ser cualquier especie capaz de separar mutuamente por lo menos algunas células troncales embrionarias en una colonia. El agente dispersante puede comprender un reactivo que altere la adhesión entre células en una colonia, o entre células y un sustrato, o ambos. El agente dispersante puede comprender una proteasa.

10 El agente dispersante puede comprender tripsina. El tratamiento con tripsina puede durar, por ejemplo, aproximadamente 3 minutos a 37 grados C. A continuación, las células pueden neutralizarse, centrifugarse y resuspenderse en medio antes de sembrarlas en placa.

15 El procedimiento puede comprender dispersar una placa confluyente de células troncales embrionarias humanas con tripsina y sembrar en placa las células.

La desagregación puede comprender por lo menos algunas de la secuencia de etapas siguientes: aspiración, enjuague, tripsinización, incubación, desprendimiento, desactivación, resiembra y división en alícuotas. El protocolo siguiente ha sido adaptado de Hedrick Lab, UC San Diego (<http://hedricklab.ucsd.edu/Protocol/COSCell.html>).

20 En la etapa de aspiración, se aspira el medio o en general se elimina del recipiente, tal como un matraz. En la etapa de enjuague, las células se enjugan con un volumen, por ejemplo 5 a 10 ml, de un medio tamponado, que se encuentra libre de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Por ejemplo, las células pueden enjuagarse con PBS sin calcio ni magnesio. En la etapa de tripsinización se añade una cantidad de agente dispersante en tampón al recipiente y se hace rodar el recipiente para recubrir la superficie en crecimiento con la solución de agente dispersante. Por ejemplo puede  
25 añadirse a un matraz 1 ml de tripsina en BSS de Hank.

30 En la etapa de incubación, las células se dejan durante algún tiempo a una temperatura constante. Por ejemplo, las células pueden dejarse a 37°C durante unos cuantos minutos (por ejemplo 2 a 5 minutos). En la etapa de desprendimiento, las células pueden desprenderse mediante acción mecánica, por ejemplo raspando o golpeando el lado del recipiente con una mano. Las células deberían desprenderse en láminas y caer deslizándose por la superficie.

35 En la etapa de desactivación, se añade al matraz un volumen de medio. El medio puede comprender un agente neutralizador para detener la acción del agente dispersante. Por ejemplo, en el caso de que el agente dispersante sea una proteasa, tal como tripsina, el medio puede contener una proteína, tal como una proteína del suero, que reducirá la actividad de la proteasa. En un ejemplo particular, se añaden al matraz 3 ml de medio de cultivo celular que contiene suero hasta alcanzar un total de 4 ml. Las células pueden pipetarse para desprenderlas o dispersarlas.

40 En la etapa de resiembra, las células son nuevamente sembradas en recipientes de cultivo nuevos y se añade medio fresco. Pueden prepararse varias resiembras a diferentes proporciones de división. Por ejemplo, las células pueden sembrarse nuevamente a una dilución 1/15 y a una dilución 1/5. En un ejemplo particular, las células pueden  
45 resembrarse mediante la adición de 1 gota de células a un matraz de 25 cm<sup>2</sup> y 3 gotas en otro para resembrar el cultivo y después añadirse 7 a 8 ml de medio a cada uno hasta alcanzar la dilución 1/15 y la dilución 1/5 en por ejemplo un matraz de 75 cm<sup>2</sup>. En la etapa de división en alícuotas, las células pueden dividirse en alícuotas en nuevas placas o en la proporción de división deseada, y añadirse medio.

50 El procedimiento puede incluir las etapas siguientes: en primer lugar se cultivan células ME humanas suspendidas de manera no adherente para formar cuerpos embrionarios (CE). A continuación, se tripsinizan CE de 5 a 10 días de edad antes de sembrarlos como células adherentes sobre placas de cultivo de tejidos recubiertas con gelatina.

Mantenimiento como cultivo celular

55 Las células desagregadas pueden sembrarse en placa y mantenerse en forma de cultivo celular.

Las células pueden sembrarse en un recipiente o sustrato de cultivo, tal como una placa gelatinizada. Resulta crucial que las células crezcan y se propaguen en ausencia de cocultivo, por ejemplo en ausencia de células nodriza.

60 Las células en el cultivo celular pueden cultivarse en medio sin suero que se complementa con uno o más factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento fibroblástico 2 (FCF2) y opcionalmente factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (FCDP AB), por ejemplo a una concentración de 5 ng/ml. Las células en el cultivo celular pueden dividirse o subcultivarse 1:5 al llegar a la confluencia, mediante tratamiento con tripsina, lavarse y sembrarse nuevamente.

Ausencia de cocultivo

Las células pueden cultivarse en ausencia de cocultivo. El término "cocultivo" se refiere a una mezcla de dos o más tipos diferentes de células que se cultivan conjuntamente, por ejemplo células nodriza estromales.

5 De esta manera, en un cultivo celular de CE típico, la superficie interna de la placa de cultivo habitualmente se recubre con una capa nodriza de células de piel embrionarias de ratón que han sido tratadas de manera que no se dividan. La capa nodriza proporciona una superficie adherente que permite que se adhieran y crezcan las células ME. Además, las células nodriza liberan nutrientes al medio de cultivo que son necesarios para el crecimiento celular de las ME. En los procedimientos y las composiciones descritos en la presente memoria, las células CE y CMM pueden cultivarse en ausencia de dicho cocultivo.

15 Las células pueden cultivarse en forma de monocapa o en ausencia de células nodriza. Las células troncales embrionarias pueden cultivarse en ausencia de células nodriza para establecer células troncales mesenquimatosas (CMM).

20 Las células troncales embrionarias disociadas o desagregadas pueden sembrarse directamente sobre un sustrato de cultivo. El sustrato de cultivo puede comprender un recipiente de cultivo de tejidos, tal como una placa de Petri. El recipiente puede pretratarse. Las células pueden sembrarse sobre, y crecer en, una placa de cultivo de tejidos gelatinizada.

25 A continuación se proporciona un protocolo de ejemplo para el recubrimiento con gelatina de las placas. Se prepara una solución de gelatina al 0,1% en agua destilada y se autoclava. Puede almacenarse a temperatura ambiente. El fondo de la placa de cultivo de tejidos se cubre con la solución de gelatina y se incuba durante 5 a 15 minutos. Se retira la gelatina y las placas están listas para utilizar. Debería añadirse medio antes de añadir las células para evitar la lisis hipotónica.

Medio sin suero

30 Las células troncales embrionarias disociadas o desagregadas pueden cultivarse en un medio que puede comprender un medio sin suero.

35 La expresión "medio sin suero" puede comprender medio de cultivo celular sin proteínas séricas, por ejemplo suero de feto bovino. Los medios sin suero son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 5.631.159 y nº 5.661.034. Los medios sin suero se encuentran disponibles comercialmente de, por ejemplo, Gibco-BRL (Invitrogen).

40 Los medios sin suero pueden encontrarse libres de proteínas, en el aspecto de que no presenten proteínas, hidrolizados y componentes de composición desconocida. Los medios sin suero pueden comprender medios definidos químicamente en los que todos los componentes presentan una estructura química conocida. Los medios sin suero definidos químicamente resultan ventajosos ya que proporcionan un sistema completamente definido que elimina la variabilidad, permite una mejor reproducibilidad y un rendimiento más consistente, y reduce la posibilidad de contaminación por agentes adventicios.

45 Los medios sin suero pueden comprender medio DMEM Knockout (Invitrogen-Gibco, Grand Island, New York).

50 Los medios sin suero pueden complementarse con uno o más componentes, tales como medios de sustitución del suero, a una concentración de, por ejemplo, 5%, 10%, 15%, etc. Los medios sin suero pueden comprender o complementarse con medio de sustitución de suero al 10% de Invitrogen-Gibco (Grand Island, New York).

Factor de crecimiento

55 El medio sin suero en el que se cultivan las células embrionarias disociadas o desagregadas puede comprender uno o más factores de crecimiento. Se conocen de la técnica varios factores de crecimiento, incluyendo FCDP, FCE, FCT- $\alpha$ , FCF, FCN, eritropoyetina, FCT- $\beta$ , FCI-I y FCI-II.

60 El factor de crecimiento puede comprender factor de crecimiento fibroblástico 2 (FCF2). El medio puede contener además otros factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (FCDP AB). Estos dos factores de crecimiento son conocidos en la técnica. El procedimiento puede comprender el cultivo de células en un medio que comprende tanto FCF2 como FCDP AB.

65 Alternativamente, o adicionalmente, el medio puede comprender o comprender además factor de crecimiento epidérmico (FCE). La utilización de FCE puede incrementar el crecimiento de las CMM. El FCE puede utilizarse a cualquier concentración adecuada, por ejemplo 5 a 10 ng/ml de FCE. El FCE puede utilizarse en sustitución de FCDP. El FCE es una proteína bien conocida de la técnica y se hace referencia al mismo como FCE, URG, Entrez 1950, HUGO 3229, OMIM 131530, RefSeq NM\_001963, UniProt P01133.

De esta manera, se da a conocer la utilización de medios que comprenden: (i) FCF2, (ii) FCF2 y FCDP, e (iii) FCF2 y FCE y otras combinaciones.

5 El factor FCF2 es un factor mitogénico, angiogénico y neurotrófico de amplio espectro que se expresa a nivel bajo en muchos tejidos y tipos celulares y alcanza concentraciones elevadas en el cerebro y la pituitaria. Se ha implicado el factor FCF2 en una multitud de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo el desarrollo de extremidades, la angiogénesis, la cicatrización de heridas y el crecimiento de tumores. El factor FCF2 puede obtenerse comercialmente, por ejemplo de Invitrogen-Gibco (Grand Island, New York).

10 El factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP) es un potente mitógeno para un amplio abanico de tipos celulares, incluyendo fibroblastos, músculo liso y tejido conectivo. El factor FCDP, que está compuesto de un dímero de dos cadenas denominadas cadena A y cadena B, puede encontrarse presente en forma de homodímeros AA o BB o como heterodímero AB. El factor FCDP AB humano es una proteína homodimérica de 25,5 kDa que consiste de una cadena A de 13,3 kDa y una cadena B de 12,2 kDa. El factor FCDP AB puede obtenerse comercialmente, por ejemplo de Preprotech (Rocky Hill, New Jersey).

15 El factor o los factores de crecimiento, tales como FCF2 y opcionalmente FCDP AB, pueden encontrarse presentes en el medio a concentraciones de aproximadamente 100 pg/ml, al como aproximadamente 500 pg/ml, tal como aproximadamente 1 ng/ml, tal como aproximadamente 2 ng/ml, tal como aproximadamente 3 ng/ml, tal como aproximadamente 4 ng/ml, tal como aproximadamente 5 ng/ml. El medio puede contener FCF a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml. El medio puede contener además FCDP AB, tal como a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml.

25 División de células

Las células en cultivo generalmente continuarán creciendo hasta la confluencia, cuando la inhibición por contacto provocará el cese de la división y crecimiento celulares. Dichas células a continuación pueden disociarse del sustrato o matraz y "dividirse" o subcultivarse, mediante dilución en medio de cultivo de tejidos y sembrarse nuevamente.

30 Por lo tanto, los procedimientos y las composiciones descritas en la presente memoria comprenden la división o subcultivo durante el cultivo. Las células en el cultivo celular pueden dividirse en una proporción de 1:2 ó más, tal como 1:3, tal como 1:4, 1:5 ó más. El término "pase" se refiere al procedimiento que consiste en extraer una alícuota de un cultivo confluyente de una línea celular, inocular en medio fresco y cultivar la línea hasta alcanzar la confluencia o la saturación.

35 Etapa de selección, cribado o separación

40 El procedimiento puede comprender además una etapa de selección o separación, para aislar o seleccionar adicionalmente las células troncales mesenquimatosas.

45 La etapa de selección o separación puede comprender la selección de células troncales mesenquimatosas (CMM) del cultivo celular mediante uno o más marcadores antigénicos de superficie. La utilización de una etapa de selección o separación incrementa adicionalmente la astringencia de la separación y la especificidad de la selección para CMM y además reduce potencialmente la posible contaminación por células troncales embrionarias tales como CMEh y otros derivados de CMEh del material de partida. Lo anterior reduciría el riesgo de formación de teratomas e incrementaría adicionalmente la relevancia clínica del protocolo descrito por los presentes inventores.

50 Se conocen varios procedimientos para la selección o separación basada en la expresión de antígenos, y puede utilizarse cualquiera de ellos en la etapa de selección o separación descrita en la presente memoria. La selección o separación puede llevarse a cabo mediante separación celular activada por fluorescencia (SCAF). De esta manera, tal como es conocido en la técnica, la SCAF implica exponer las células a un informador, tal como un anticuerpo marcado, que se une y marca los antígenos expresados por la célula. Los procedimientos de producción de anticuerpos y el marcaje de los mismos para formar informadores son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Harlow y Lane. A continuación, las células se pasan por un aparato de FACS, que separa las células unas de otras basándose en el marcaje. Alternativamente, o adicionalmente, puede utilizarse la separación celular magnética (SCM) para separar las células.

60 Se ha comprobado que, aunque es conocido que varios antígenos de superficie candidatos se encuentran asociados a las CMM, por ejemplo CD105, CD73, ANPEP, ITGA4 (CD49d), PDGFRA, algunos de los antígenos de superficie asociados a CMM, por ejemplo CD29 y CD49e también se expresan a nivel elevado en células ME tales como las CMEh y su expresión ha sido verificada mediante análisis de SCAF. La asociación de un antígeno de superficie y CMM puede no ser suficiente para que el antígeno se considere un marcador seleccionable para el aislamiento de CMM respecto de células ME tales como las CMEh. De acuerdo con lo anterior, la etapa de selección o separación puede utilizarse antígenos que se expresan diferencialmente en células CMM y en células ME.

La etapa de selección o separación del procedimiento de los presentes inventores puede seleccionar positivamente las células troncales mesenquimatosas basándose en la expresión de antígenos. Estos antígenos pueden identificarse mediante, por ejemplo, la comparación de los perfiles de expresión génica de las CMEh y las CMM-CMEh. La selección o separación puede utilizar específicamente cualquiera de los antígenos mostrados en las Tablas E1A y E1B, posteriormente.

La etapa de selección o separación del procedimiento de los presentes inventores puede seleccionar positivamente las células troncales mesenquimatosas basándose en la expresión de antígenos que se identifican como expresados sobre las CMM pero no expresados sobre células ME tales como las CMEh.

CD73 se expresa a nivel elevado sobre las CMM, mientras que no se expresa a nivel elevado sobre las CMEh. Tanto CD73 como CD105 son antígenos de superficie expresados a nivel elevado en las CMM y son de entre los 20 antígenos de superficie con un nivel de expresión más elevado en las CMEh-CMM en comparación con las CMEh; la utilización de CD73 ó CD105 (o ambos) como marcador seleccionable para las CMM putativas resultará igualmente eficaz en la selección de las CMM putativas generadas mediante la diferenciación de las CMEh.

Alternativamente, o adicionalmente, la etapa de selección o separación puede seleccionar negativamente antígenos basándose en los antígenos de superficie que se expresan a nivel elevado sobre las células troncales embrionarias (células ME) tales como las CMEh pero no sobre las células troncales mesenquimatosas, por ejemplo las CMM-CMEh. La selección o la separación puede basarse en antígenos de superficie específicos de CMEh conocidos o previamente identificados, tales como MIBP, ITGB1BP3 y PODXL, y CD24.

El análisis de SCAF confirma la expresión de CD24 sobre CMEh pero no sobre las CMM-CMEh. Por lo tanto, CD24 puede utilizarse como marcador de selección o separación negativa, solo o conjuntamente con CD105 como marcador seleccionable positivo para el aislamiento de CMM putativas respecto de los cultivos de CMEh.

### Ejemplos

Las células troncales mesenquimatosas (CMM) procedentes de médula ósea humana han emergido como uno de los tipos de célula madre más prometedores para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (Pittenger y Martin, 2004). Aunque los efectos terapéuticos de las CMM autólogos se han atribuido a su potencial para diferenciarse en muchos tipos celulares reparadores o de sustitución diferentes, tales como cardiomiocitos, células endoteliales y células lisas vasculares (Minguell y Erices, 2006; Zimmet y Hare, 2005), todavía no se ha establecido cuál es la eficiencia de diferenciación de las CMM trasplantadas en un número terapéuticamente relevante de células reparativas funcionales en tejidos lesionados.

Algunos informes recipientes sugieren que algunos de dichos efectos reparadores se encuentran mediados por factores paracrinos secretados por las CMM (Caplan y Dennis, 2006a; Gnechi *et al.*, 2005; Gnechi *et al.*, 2006; Schafer y Northoff, 2008). Esta hipótesis paracrina introduce una dimensión radicalmente diferente a la utilización de las células troncales, en particular de las CMM, en medicina regenerativa. Entre los potenciales mecanismos de las acciones paracrinas de las CMM se incluyen la capacidad regenerativa endógena, la angiogénesis y arteriogénesis, la atenuación del remodelado y la reducción de la apoptosis. En el caso de que los efectos terapéuticos de las CMM se encuentren mediados parcialmente por sus secreciones, el repertorio de las terapias basadas en células troncales podría extenderse mediante la aplicación de los factores secretados por las mismas. Dicho enfoque potencialmente podría proporcionar una opción terapéutica basada en CMM lista para utilizar, lo que es un requisito para la protección rápida frente al daño por reperfusión en pacientes con IM agudo, a un coste económico y con excelente control de la calidad y consistencia.

En apoyo de la hipótesis paracrina, muchos estudios han identificado la presencia de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que potencialmente podrían reparar los tejidos cardíacos lesionados, principalmente mediante el crecimiento y regeneración de tejidos cardíacos y vasculares (Caplan y Dennis, 2006b; Liu y Hwang, 2005). Los presentes inventores apoyaron adicionalmente esta hipótesis mediante la realización del primer análisis proteómico en profundidad de la secreción paracrina de las CMM (Sze *et al.*, 2007). Lo anterior resultó facilitado por la derivación de los presentes inventores de cultivos de CMM altamente expandibles e idénticos a partir de CME humanas (Lian *et al.*, 2007) y la utilización de un medio definido químicamente para cultivar las células y recolectar la secreción en el medio condicionado (MC).

Inesperadamente, muchas de las proteínas secretadas eran proteínas intracelulares y no es conocido que sean secretadas o transportadas a través de la membrana plasmática. El análisis computacional del secretoma predijo que colectivamente el secretoma presenta el potencial de reparar tejidos dañados, tales como el daño por isquemia miocárdica/reperfusión (IM/R) (Sze *et al.*, 2007).

Para someter a ensayo la predicción computacional, se administró la secreción en forma de MC en un modelo de cerdo del daño por IM/R (Timmers *et al.*, 2008). Durante la isquemia miocárdica causada por oclusión de una arteria coronaria, la terapia de reperfusión es actualmente la modalidad de tratamiento más eficaz. Sin embargo, la

reperusión que implica la apertura de la arteria bloqueada para restaurar el flujo sanguíneo o reperusión también induce el daño a los tejidos isquémicos recién perfundidos (Saraste *et al.*, 1997). Por lo tanto, la efectividad de la terapia de reperusión podría mejorarse en gran medida si el daño por reperusión pudiese neutralizarse inmediatamente en el punto de reperusión. Al administrar el MC por vía intracoronaria en el modelo de cerdo de 5  
daño por IM/R inmediatamente después de la reperusión, se produjo una reducción de 60% del infarto de miocardio, conservación de la función cardíaca y estrés oxidativo reducida incluso tan sólo 4 horas después de la reperusión. Lo anterior confirmó que la secreción paracrina de las CMM puede mejorar el daño por IM/R en un modelo animal clínicamente relevante (Timmers *et al.*, 2008).

10 Sin embargo, el mecanismo por el que la secreción media en este efecto inmediato sobre el daño por IM/R no está claro. Resulta evidente que la inmediatez de este efecto protector excluye el proceso relativamente prolongado de regeneración de los tejidos como parte del mecanismo. Además, muchas de las proteínas secretadas son proteínas intracelulares y no es conocido que crucen las membranas plasmáticas con facilidad. Para entender mejor los efectos paracrinos de las CMM, se fraccionó sistemáticamente el MC utilizando membranas con diferentes valores de corte de peso molecular (VCPM) con el fin de identificar y obtener un perfil de la composición de la fracción activa. 15  
Se ha demostrado anteriormente que el MC que filtraba a través de una membrana de 0,2 µm pero no una con un VCPM de 1.000 kDa era cardioprotector (Timmers *et al.*, 2008). Sin embargo, el MC parcialmente concentrado a través de una membrana con VCPM de 1.000 kDa era cardioprotector. Lo anterior sugiere que el efecto cardioprotector está mediado por complejos de gran tamaño, con diámetros de entre 50 y 100 nm.

20 En la presente memoria se extiende la lista de la que se informa anteriormente de proteínas en la secreción a proteínas >700 y entre estas proteínas se incluyen muchas proteínas observadas comúnmente en los exosomas. Se ha identificado además la presencia de ARN (<300 nt) en la secreción. Además, las proteínas y el ARN se encontraban encapsulados en vesículas fosfolipídicas y las únicas partículas detectables en la secreción dentro del intervalo de radios hidrodinámicos ( $r_h$ ) de 1 a 1.000 nm eran de  $r_h=45$  a 55 nm. Estas partículas eluyeron como un 25  
único pico en el fraccionamiento de HPLC. Conjuntamente, estos estudios demuestran que el complejo cardioprotector de gran tamaño en la secreción presenta muchas de las características distintivas de un exosoma, conduciendo a la hipótesis de los presentes inventores de que el componente cardioprotector que es activo en la secreción es un exosoma.

### 30 **Ejemplo comparativo 1. Materiales y métodos: preparación de CMM-MC**

Los protocolos para la generación de CMM y la preparación de MC han sido descritos anteriormente<sup>15, 16</sup>.

35 Brevemente, un medio de cultivo sin suero definido químicamente se condicionó con CMM derivadas de células troncales embrionarias humanas (CMEh) utilizando un protocolo clínicamente aceptado. Se generaron tres cultivos fenotípicamente similares a CMM policlonales cariotípicamente estables, que no expresan marcadores asociados a pluripotencia pero que mostraban antígenos de superficie similares a CMM (CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD49a<sup>+</sup>/e<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD166<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>) y perfil de expresión génica, se generan mediante tripsinización y propagación de CMEh de la línea CMEh HuES9 o la línea CMEh H1 en medio de selección nodriza y sin suero<sup>15</sup>. 40

Uno de estos cultivos, HuES9.E1, puede expandirse establemente durante por lo menos 80 duplicaciones poblacionales. Para recolectar la secreción de CMM, se transfirieron cultivos de CMM derivados de CMEh a un medio de cultivo definido químicamente sin suero con el fin de condicionar el medio durante tres días antes de 45  
recoger el medio que contenía secreciones de CMM, se clarificaron mediante centrifugación, se concentraron 25 veces utilizando membranas de ultrafiltración de valor de corte de 10 kDa de PM y se esterilizaron mediante filtración a través de un filtro de 220 nm.

El proteoma secretorio se analizó mediante tecnología multidimensional de identificación de proteínas (TMuIP) y análisis de matriz de anticuerpos de citocinas y reveló la presencia de 201 productos génicos únicos. Los análisis computacionales dieron a conocer que dicho MC posee potenciales propiedades citoprotectoras<sup>16</sup>. 50

### 55 **Ejemplo 2. Materiales y métodos: animales**

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la "Guide for the Care and Use of Laboratory Pigs" preparada por el Institute of Laboratory Animal Resources y con la autorización previa del Animal Experimentation Committee de la Facultad de Medicina, Universidad de Utrecht, Países Bajos.

### 60 **Ejemplo 3. Materiales y métodos: diseño del estudio**

Treinta cerdos Daland Landrace hembra (60 a 70 kg; IDDLO, Lelystad, Países Bajos), la totalidad tratados con 75 mg/día de clopidogrel durante 3 días y 400 mg/día de amiodarona durante 10 días, se asignaron aleatoriamente a tratamiento con CMM-MC, no MC o solución salina.

65 Se añadió el grupo de solución salina para evaluar un potencial efecto del medio de cultivo no condicionado fresco. En todos los cerdos se indujo IM mediante una ligación de la arteria coronaria circunfleja izquierda proximal (ACxCI)

durante 75 minutos y 4 horas de posterior reperfusión. Se seleccionó un periodo isquémico de 75 minutos para producir una lesión miocárdica grave sin inducir un infarto de miocardio completamente transmural. Se utilizó un periodo de reperfusión de 4 horas debido a que la medición del tamaño del infarto utilizando la tinción con TTC es la más fiable tras 3 horas de reperfusión<sup>17</sup>. Tras periodos más largos de reperfusión resulta más difícil evaluar el estado de estrés oxidativo y los mecanismos apoptóticos.

Se inició el tratamiento 5 minutos antes del inicio de la reperfusión mediante infusión intravenosa de CMM-MC (1,0 ml, 2,0 mg de proteína), no MC o solución salina. Inmediatamente después de la reperfusión se administró un bolo intracoronario adicional de CMM-MC (4,0 ml, 8,0 mg de proteína), no MC o solución salina. Se evaluó el tamaño del infarto de miocardio y la función miocárdica 4 horas después de la reperfusión.

#### **Ejemplo 4. Materiales y métodos: IM y procedimiento operativo**

Durante toda la operación se realizó un seguimiento continuo de ECG, presión arterial sistémica y capnograma. Bajo anestesia general, tal como se ha descrito con anterioridad<sup>18</sup>, se llevó a cabo una esternotomía mediana y se insertaron dos mallas en las arterias carótidas para un catéter guía de 6 Fr y un catéter de conductancia de 8 Fr (CD Leycom, Zoetermeer, Países Bajos).

Se introdujo la punta distal de un catéter Swan Ganz en la arteria pulmonar por la vena yugular interna. Se introdujeron sondas de flujo transónicas (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY) en torno a la aorta proximal y ACxCI para medir el gasto cardiaco y el flujo coronario y se colocó un alambre en torno a la vena cava inferior para permitir la realización de mediciones funcionales bajo condiciones de carga variables para los bucles de PV.

Tras las mediciones funcionales, se administraron 10.000 UI de heparina por vía intravenosa y se aprietan las suturas para ocluir la ACxCI proximal. Se utilizó la desfibrilación interna con 50 J al producirse fibrilación ventricular. Tras 75 minutos de isquemia, se reabrió la ACxCI mediante liberación de la sutura. Inmediatamente después de la reperfusión, se infundió nitroglicerina (0,1 mg para evitar el fenómeno de no reflujo) a través de la ACxCI a través del catéter guía, tras el tratamiento intracoronario con CMM-MC, no MC y solución salina. Tras 4 horas de reperfusión, se llevaron a cabo mediciones funcionales finales y se extirpó el corazón para el análisis del tamaño del infarto.

#### **Ejemplo 5. Materiales y métodos: mediciones funcionales**

Se midió la presión y volumen del ventrículo izquierdo (VI) utilizando el procedimiento del catéter de conductancia, tal como se ha descrito con anterioridad<sup>18</sup>. Las señales de presión y volumen del VI derivadas del catéter de conductancia se visualizan y se captan a una tasa de muestreo de 250 Hz con un Leycom CFL-512 (CD Leycom).

Los datos se captaron durante el estado estable y durante la oclusión temporal de la vena cava, en ambos casos con el ventilador desactivado al final de la espiración. El análisis de los bucles de presión-volumen se llevó a cabo con software personalizado, tal como se ha descrito con anterioridad<sup>19</sup>. Además, se obtuvieron imágenes por ultrasonido epicárdico de eje corto (Prosound SSD-5000, sonda de 5 MHz UST-5280-5, Aloka Holding Europe AG, Zug, Suiza) al nivel del músculo medio-papilar. Se midió el grosor de pared (GP) del área de infarto, área remota (septo) y área interna del VI (Vlai) al final de la diástole (FD) y al final de la sístole (FS). Se calculó el engrosamiento de la pared sistólica (EPS) como  $[(GP(FS)-GP(FD))/GP(FD)]*100\%$ , el acortamiento del área fraccional (AAF) como  $[(Vlai(FS)-Vlai(FD))/Vlai(FD)]*100\%$  y la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) como  $[(VFS-VFD)/VFS]*100\%$ .

Se cuantificó la rigidez de la cámara al final de la diástole mediante regresión lineal de la relación de presión-volumen al final de la diástole. Se realizó ecocardiografía y bucles de PV antes del IM, 1 hora después de la isquemia y 4 horas después de la reperfusión. Para retar el miocardio aturdido, se llevaron a cabo mediciones adicionales durante el estrés inducido farmacéuticamente mediante infusión intravenosa de dobutamina (2,5 µg/kg/min y 5,0 µg/kg/min).

#### **Ejemplo 6. Materiales y métodos: tamaño del infarto**

Inmediatamente antes de la extirpación del corazón, se religaron las ACxCI (cerdos) o ACI (ratones) en exactamente el mismo punto que para la inducción de IM. Se infundió pigmento de azul de Evans a través del sistema coronario para delinear el área en riesgo (AER).

A continuación, se extirpó el corazón, se aisló el VI y se cortó en 5 secciones de ápex a base. Se incubaron las secciones en cloruro de trifeniltetrazolio al 1% (TTC, Sigma-Aldrich Chemicals, Zwijndrecht, Países Bajos) en tampón de Sørensen a 37°C (13,6 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 17,8 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 7,4) durante 15 minutos para discriminar el tejido infartado del miocardio viable.

Se escanearon todas las secciones en ambas caras, y en cada portaobjetos se comparó el área de infarto con el área en riesgo y el área total mediante la utilización de software de planimetría digital (Image J). Tras la corrección

para el peso de las secciones, se calculó el tamaño de infarto como porcentaje del AER y del VI.

**Ejemplo 7. Materiales y métodos: ensayo de muerte celular inducida por oxidación**

5 Se incubaron células CME leucémicas humanas en MC o no MC y se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM para inducir estrés oxidativo. Se evaluó la viabilidad celular utilizando exclusión de azul de tripán 12, 24, 36 y 48 horas después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Ejemplo 8. Materiales y métodos: inmunotinción**

10 Se evaluó el estrés oxidativo nuclear en las áreas isquémica y de reperfusión mediante inmunotinción para 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), un producto del estrés oxidativo del ADN. Se fijaron muestras de tejidos en formalina al 4% antes de incluirlas en parafina.

15 Tras la recuperación de los antígenos en ácido cítrico 10 mM, se incubaron las secciones de tejidos con suero de caballo normal al 10% durante 30 minutos, anti-8-OHdG de ratón (OXIS International, Foster City, CA, USA) 1:20 en PBSA al 0,1% durante la noche a 4°C, anticuerpo de caballo antiratón marcado con biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 1:500 durante 1 hora y con estreptavidina-PRP 1:1.000 durante 1 hora.

20 Finalmente, las secciones se incubaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-diaminobencidina durante 10 minutos. Se cuantificó la cantidad de núcleos positivos para 8-OHdG en 4 campos seleccionaron al azar para cada sección utilizando software de análisis de imágenes digitales de microscopía (Olympus, Münster, Alemania) a una magnificación de 200x.

**Ejemplo 9. Materiales y métodos: inmunotransferencia**

25 Se aislaron proteínas a partir de muestras de tejido congelado recogidas del área de isquemia/reperfusión de cerdos utilizando 1 ml de reactivo de aislamiento Tripure (Boehringer Mannheim, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. Para la inmunotransferencia se separaron 8 µg de proteínas totales en un gel de SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa C (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) y se bloquearon utilizando solución salina tamponada con fosfato (PBS)-Tween al 0,1%-Protifar al 5% (Nutricia, Países Bajos).

30 Se incubó la membrana con un anticuerpo de conejo de fosfoSMAD2 1:1.000 (Cell Signalling Technology) para caspasa activa 3 1:100 (Chemicon, Alemania) o para beta-tubulina 1:5.000 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y posteriormente con anticuerpo de cabra anticonejo PRP 1:2.000 (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Se utilizó sustrato de quimioluminiscencia (NENk Life Science Products) para la detección; las bandas se analizaron utilizando el sistema Gel Doc 1000 (Biorad, Veenendaal, Países Bajos).

**Ejemplo 10. Materiales y métodos: fraccionamiento de CMM-MC**

40 Se preparó CMM-MC mediante filtración estéril a través de un filtro de 220 nm y se concentró a través de un filtro de 10 nm y por lo tanto contenía componentes de entre 10 y 220 nm. Seguidamente se preparó una fracción <1.000 kDa mediante filtración de las CMM-IM a través de una membrana de corte de PM de 1.000 kDa con un tamaño de poro nominal de 100 nm (Pall Corporation, Singapore), generando una fracción que contenía productos de entre 10 y 100 nm.

45 Para identificar la fracción que contenía el factor o factores en el medio que confería cardioprotección (10 a 100 nm ó 100 a 220 nm), se utilizó un modelo de ratón o de cerdo de isquemia y reperfusión. Se indujo IM mediante oclusión de la arteria coronaria izquierda (ACI) durante 30 minutos y posterior reperfusión. Los ratones se trataron con 20 µl de CMM-MC no fraccionadas (10 a 220 nm), fracción de <1.000 kDa (10 a 100 nm) o solución salina, por vía intravenosa por la vena de la cola, 5 minutos antes de la reperfusión. Se evaluó el tamaño del infarto 24 horas después utilizando azul de Evans y TTC, tal como se ha indicado anteriormente.

**Ejemplo 11. Materiales y métodos: análisis de los datos**

55 Se presentan los datos como medias ± SEM. Se recogieron los valores de manera ciega y se compararon utilizando un ANOVA unidireccional con pruebas post-hoc de Bonferroni en SPSS 11.5. Se consideró significativo un valor de p<0,05.

**Ejemplo 12. Resultados: mortalidad**

60 Cuatro cerdos murieron debido a fibrilación ventricular refractaria durante la isquemia, antes del tratamiento, y por lo tanto fueron excluidos del estudio. Todos los cerdos que fueron tratados con MC (n=9), no MC (n=9) o solución salina (n=8) también sobrevivieron durante el periodo de seguimiento.

**Ejemplo 13. Resultados: tamaño de infarto**

5 El tamaño de infarto, en comparación con el área en riesgo (AER), así como en comparación con el VI, se encontraba marcadamente reducido en cerdos tratados con CMM-MC en comparación con los tratados con no MC y solución salina (figura 1). El tratamiento de CMM-MC resultó en una reducción de aproximadamente 60% del tamaño de infarto. Resulta importante que el AER era similar en todos los cerdos, lo que indica que la lesión isquémica inicial era similar en todos los cerdos (Tabla E1, posteriormente).

Parámetro	Línea base			Infarto de miocardio		
	No MC	MC	Solución salina	No MC	MC	Solución salina
AER	-	-	-	35,1 ± 2,9	30,7 ± 1,6	32,4 ± 2,3
TI (% de AER)	-	-	-	62,2 ± 5,0	25,4 ± 4,8 ††	62,5 ± 8,4
TI (% de VI)	-	-	-	22,3 ± 2,9	7,6 ± 1,4 ††	20,5 ± 3,1
				111,6 ± 6,3		
PC, lpm	83,5 ± 5,5	76,4 ± 5,7	77,6 ± 8,1	*	86 ± 7,5 †	97 ± 5,5
	93,7 ±		100,9 ±	70,8 ± 9,1		68,5 ± 7,3
MAP, mmHg	10,2	94,0 ± 5,4	4,9	*	95,8 ± 4,3 †	*
ACxCI, ml/min.	31,9 ± 2,8	28,7 ± 2,9	28,4 ± 4,1	29,9 ± 2,6	25,1 ± 2,6	25,6 ± 3,3
	3,60 ±	3,25 ±	3,79 ±	2,61 ± 0,35	3,15 ± 0,27	2,04 ± 0,20
GC, l/min.	0,14	0,17	0,23	*	‡	*
	0,71 ±	0,64 ±	0,71 ±	1,23 ± 0,09	0,93 ± 0,09	1,30 ± 0,09
Infarto GP, cm	0,04	0,04	0,03	*	*‡	*
				-6,1 ± 1,4	18,7 ± 4,1	-7,0 ± 1,5
Infarto EPS, %	56,3 ± 5,6	56,9 ± 4,8	61,8 ± 4,3	*	*††	*
EPS Remoto, %	43,1 ± 3,3	43,0 ± 3,0	40,9 ± 4,2	43,7 ± 7,4	41,4 ± 6,1	37,8 ± 4,4
				24,7 ± 2,6		21,7 ± 1,2
AAF, %	42,7 ± 2,9	38,8 ± 2,9	41,3 ± 2,7	*	36,5 ± 2,0 ††	*
			101,5 ±			
VFS, ml	90,3 ± 8,2	86,2 ± 9,1	7,1	70,2 ± 8,3	69,7 ± 5,2 *	69,1 ± 11,6
VFD, ml	47,8 ± 8,2	43,9 ± 6,2	53,0 ± 4,7	44,2 ± 6,0	31,4 ± 1,4 *	47,5 ± 9,6
				24,5 ± 4,0		21,9 ± 2,7
VE, ml	44,5 ± 3,2	43,3 ± 5,0	49,6 ± 3,6	*	38,5 ± 4,2 ††	*
				38,8 ± 3,5		34,7 ± 4,4
FE, % dp/dtmax,	52,5 ± 5,0	51,7 ± 3,1	49,0 ± 2,7	*	54,2 ± 2,6 ††	*
mmHg/s	1290 ±			1592 ±		1075 ± 68
dP/dtmin, mmHg/s	118	1093 ± 83	1299 ± 76	226	1528 ± 130	*
Rigidez, mmHg/ml	-1614 ±	-1329 ±	-1650 ±	-983 ± 130	-1031 ± 116	-910 ± 102
	143	113	89	*	*	*
	0,13 ±	0,15 ±	0,14 ±	0,29 ± 0,06	0,13 ± 0,01	0,29 ± 0,05
	0,03	0,03	0,01	*	††	*

10 Tabla E1. Parámetros hemodinámicos y funcionales. Valores de línea base y valores de infarto de miocardio de cerdos tratados con no MC, MC o solución salina, determinados mediante ecocardiografía y catéteres de conductancia basados en mediciones de presión y volumen del VI. AER indica área en riesgo; TI, tamaño de infarto; VI, ventrículo izquierdo; PC, pulso cardíaco; ACxCI, arteria coronaria circunfleja izquierda proximal; GC, gasto cardíaco; GP, grosor de pared; EPS, engrosamiento de pared sistólica; AAF, acortamiento de área fraccional; VFD, volumen al final de la diástole; VFS, volumen al final de la sístole; VE, volumen eyectado; EFS, elastancia al final de la sístole. No MC, n=9; MC, n=9; solución salina, n=8. \*p<0,05 frente a línea base; † p<0,05 vs. no MC; ‡ p<0,05 vs. solución salina.

**Ejemplo 14. Resultados: función cardíaca**

20 Los parámetros de línea base eran similares en todos los grupos (Tabla E1, anteriormente). Durante la isquemia, la pared posterolateral se volvió completamente disquinética en todos los grupos, tal como se observa a partir de los valores negativos ecocardiográficos de engrosamiento de la pared sistólica (EPS, figura 2A). Cuatro horas después de la reperusión, la pared posterolateral perfundida de los grupos tanto de no MC como de solución salina de control todavía eran disquinéticos. Sin embargo, en los cerdos tratados con CMM-MC, se recuperó parcialmente el EPS (figura 2A).

25 La infusión intravenosa del agonista de receptor β1-adrenérgico dobutamina incrementó adicionalmente el engrosamiento de la pared sistólica en los cerdos tratados con CMM-MC, mientras que no se observaron mejoras en los grupos de control. Además, se redujo la función global sistólica del ventrículo izquierdo debido a la isquemia (figura 2B). En los cerdos tratados con MC, el acortamiento del área fraccional se incrementó tras la reperusión, prácticamente hasta volver al nivel de línea base y se incrementó a niveles superiores a la línea base durante la infusión de dobutamina.

En los cerdos de control, la función sistólica global siguió alterada. También se puso de manifiesto una mejora de la función cardíaca a partir de los índices derivados del bucle de PV (Tabla E1). La FE ventricular y el volumen eyectado eran significativamente más elevados en los cerdos tratados con MC. Lo anterior se tradujo en parámetros hemodinámicos mejorados, tales como el gasto cardíaco, la presión arterial media y el pulso cardíaco.

5 Se redujo la función diastólica en los grupos de control tras el daño de isquemia y reperfusión, tal como se observa a partir de la rigidez miocárdica al final de la diástole incrementada. Sin embargo, en los cerdos tratados con MC, la función diastólica no resultó afectada.

10 **Ejemplo 15. Resultados: estrés oxidativo**

Tras la demostración de la reducción del tamaño de infarto y la mejora de la función, se utilizó un ensayo *in vitro* de muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para determinar los efectos de MC y no M sobre el estrés oxidativo, una causa mayor de daño por isquemia-reperfusión.

15 Se indujo estrés oxidativo mediado por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en células CME leucémicas humanas en presencia de MC o no MC y realizaron un seguimiento de la viabilidad celular mediante exclusión de azul tripán. Los resultados demostraron que el MC protegió significativamente frente a la pérdida de viabilidad celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con no MC (p<0,05) (figura 3A).

20 Para determinar si el MC también reducía el estrés oxidativo en los corazones de cerdos tratados con MC, se cuantificó el estrés oxidativo nuclear en secciones de tejido de cerdos tratados con MC, no MC o solución salina mediante inmunotinción con 8-OHdG para ADN oxidado. Se observó tinción nuclear intensa indicativa de oxidación del ADN en secciones de cerdos tratados con no MC o solución salina en comparación con cerdos tratados con MC (figuras 3B-D). Además, también se observaron significativamente más núcleos positivos en cerdos tratados con no MC o solución salina (figura 3E).

25 Por lo tanto, el MC puede conferir citoprotección frente al estrés oxidativo *in vitro* e *in vivo*.

30 **Ejemplo 16. Resultados: señalización de FCT-β**

Las secreciones de las CMM contenían muchas proteínas que participan en la señalización del FCT-β 16. Para evaluar la influencia del tratamiento de MC sobre la señalización de FCT-β *in vivo*, se cuantificó el SMAD-2 fosforilado en muestras de tejido miocárdico de cerdos tratados con MC y cerdos de control mediante inmunotransferencia. El tratamiento de MC resultó en una expresión reducida de pSMAD2, indicando que la señalización de FCT-β mediante ALK-5 se encuentra reducida (figuras 4A, B).

35 **Ejemplo 17. Resultados: apoptosis**

40 El daño por reperfusión causa la muerte celular por apoptosis y no necrosis<sup>20-22</sup>. Para verificar que el tratamiento de MC reduce la apoptosis durante la reperfusión, los presentes inventores cuantificaron el nivel de caspasa-3 activa, un mediador clave de la apoptosis, mediante inmunotransferencia. En los cerdos tratados con CMM-MC, los niveles de caspasa-3 activa eran más bajos que en el control de no MC y que en el control de solución salina, sugiriendo que MC inhibe la apoptosis *in vivo* (figuras 4C, D).

45 **Ejemplo 18. Resultados: fraccionamiento de las CMM-MC**

50 Las CMM-MC no fraccionadas contienen productos de entre 10 y 220 nm. Con el fin de acercarse a la identificación del factor o factores cardioprotectores presentes en las CMM-MC, se generó una fracción <1.000 kDa que contenía productos de tamaños de entre 10 y 100 nm. El CMM-MC no fraccionado confiere cardioprotección, mientras que la fracción de <1.000 kDa, no confiere (figura 5), indicando que el factor o factores cardioprotectores se encuentran en la fracción de >1.000 kDa, con tamaños de entre 100 y 220 nm.

55 **Ejemplo 19. Resultados: el fraccionamiento por tamaño no segregó las proteínas secretadas según peso molecular**

Con el fin de identificar el componente activo en el medio condicionado, se intentó fraccionar por tamaño el medio condicionado en diferentes fracciones de PM mediante la filtración del medio condicionado a través de membranas con diferentes valores de corte por PM.

60 Al filtrar el medio condicionado a través de una membrana con corte de PM de 100 kD para generar una proporción en volumen de retenido a filtrado de 4:1, la mayoría de las proteínas de <100 kD se segregaron en la fracción de >100 kD y no en la fracción esperada de <100 kD (figura 6). Las proporciones de las bandas de proteínas individuales tanto en medio condicionado no fraccionado como en la fracción de >100 kD eran similares.

65 La mayoría de proteínas con PM<300 kDa tampoco pasó a través de una membrana con un corte de PM de 300 kD

(figura 6). Los tamaños de PM de algunas de las bandas de proteínas principales en el filtrado eran similares a las del medio no condicionado (MNC) y a las de los complementos de proteínas añadidos exógenamente al medio de cultivo: complemento de insulina-transferrina-selenoproteína (ITS), FCF2, FCE y FCDF AB (figura 7).

5 Conjuntamente, estas observaciones sugieren que las proteínas secretadas por las células se encuentran dentro de complejos y que estos complejos de secreción presentan un tamaño superior a las proteínas de 100 kDa añadidas exógenamente al medio de cultivo como complementos y que las inferiores a 100 kD son fácilmente filtradas a través de membranas con un corte de PM de 100 kD.

10 **Ejemplo 20. Resultados: actividad biológica de medio condicionado fraccionado por tamaño con PM>1.000 kD o diámetro de entre 50 y 150 nm**

15 Para determinar los límites de tamaño superior e inferior del complejo de secreción putativo, se llevó a cabo un fraccionamiento por tamaño del medio condicionado y sometieron a ensayo la actividad biológica en un ratón del daño por isquemia-reperusión. Debido a que el medio condicionado pasó través del filtro de 0,2 µm y se concentró en una membrana con un corte de PM de 10 kD, estos resultados colocaron efectivamente el complejo de secreción putativo en el intervalo de tamaño de entre 2 y 200 nm (figura 8).

20 Para concretar adicionalmente este intervalo de tamaño, los presentes inventores determinaron la actividad biológica en el filtrado obtenido de la filtración completa del medio condicionado a través de la membrana con corte de PM de 100 kD ó 1.000 kD y en el retenido obtenido de la filtración del medio condicionado a través de una membrana con un corte de PM de 1.000 kD. El volumen de retenido era 1/5 del volumen de entrada. Se sometieron a ensayo las fracciones en un modelo de ratón o de cerdo de isquemia de miocardio (IM) y de daño por reperusión.

25 En dicho modelo, se indujo IM mediante oclusión de la arteria coronaria izquierda (ACI) durante 30 minutos mediante ligación con sutura y se inició la reperusión mediante retirada de la sutura. Se trataron los ratones con 20 µl de CMM-MC no fraccionado (10 a 220 nm), 20 µl de fracción de <100 kD ó de 1.000 kD, 4 µl de retenido de >1.000 kD o solución salina, por vía intravenosa por la vena de la cola, 5 minutos antes de la reperusión. Se extirparon los corazones 24 horas después. Antes de la extirpación se determinó el área en riesgo (AER) mediante religado de la ACI seguida de perfusión de azul de Evans por la aorta. Se definió la AER como el área no teñida por el pigmento y se expresó como porcentaje del área de pared de ventrículo izquierdo. Se evaluó el tamaño del infarto 24 horas después utilizando azul de Evans y TTC, tal como se ha indicado anteriormente.

35 El AER relativa en todos los animales no era significativamente diferente (figura 9). Sin embargo, el tamaño relativo de infarto se redujo significativamente en los animales tratados con medio condicionado y con la fracción de >1.000 kD en comparación con solución salina (p=0,01 y 0,05, respectivamente) (figura 10). Las fracciones de <100 kD y de <1.000 kD no eran biológicamente activas, sugiriendo que el putativo complejo activo era de >1.000 kD. Sin embargo, todavía resulta posible que el complejo sea de <1.000 kD y que el paso del medio condicionado a través de los filtros inactive el complejo.

40 **Ejemplo 21. Resultados: la microscopía electrónica del medio condicionado reveló la presencia de partículas de 50 a 200 nm.**

45 El análisis de microscopía electrónica del medio condicionado se llevó a cabo utilizando una metodología estándar. Brevemente se cargó medio condicionado en PBS sobre rejillas recubiertas con Formvar-carbono (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA; nº de cat. 01800N-F), se fijaron en glutaraldehído al 2,5%, se lavaron, se contrastaron en acetato de uranilo al 2%, se incluyeron en una mezcla de acetato de uranilo (al 0,8%) y metilcelulosa (al 0,13%) y se examinaron bajo un microscopio electrónico. En consistencia con los estudios de fraccionamiento por tamaño anteriores, se observó la presencia de numerosas vesículas de ~50 a 150 nm, que sugiere que estas vesículas son los complejos activos putativos en la secreción (figura 11).

50 La hipótesis se ve apoyada por la observación de que, al ultracentrifugar a 200.000xg durante una hora el medio condicionado, el sedimento analizado mediante CL/CL-EM tal como se ha descrito con anterioridad 20 contiene por lo menos 70% de las proteínas observadas en la secreción.

55 **Ejemplo 22. Resultados: composición de lípidos del medio condicionado**

60 Con el fin de analizar la composición de lípidos del medio condicionado, se extrajeron mediante el procedimiento de Folch los componentes hidrofóbicos de lípidos/esteroides del medio condicionado y el MNC. Brevemente, se mezclaron vigorosamente 50 ml de medio condicionado o MNC con 5 ml de cloroformo y 2 ml de metanol. Se dejó que se separasen las fases orgánica y acuosa. Se separó la capa de cloroformo del fondo y se evaporó a sequedad mediante SpeedVac.

65 El residuo se reconstituyó en metanol para el análisis de LC-EM/EM. A continuación, la muestra se inyectó en una columna de HPLC de fase normal (fase de sílice) con fase móvil de diclorometano/metanol/agua/etilamina. Seguidamente el eluido se ionizó en línea mediante nanopulverización a LTQ-FTMS/Orbitrap. Se operó el LTQ-

FTMS/Orbitrap en modos alternativos positivo y negativo para la detección de lípidos/esteroides con diferentes propiedades químicas. Los 5 iones precursores principales de cada escaneo de EM se analizaron adicionalmente mediante escaneo de EM/EM.

5 Por lo tanto, las moléculas se caracterizaron mediante una combinación de FTMS y LTQ. La masa del precursor de cada espectro de masas en tándem en primer lugar se emparejó con un candidato en una base de datos de lípidos y metabólica. Los espectros de EM/EM de los iones que presentaban un error de masa <5 ppm respecto a cualquier molécula en la base de datos seguidamente se comparaban con espectros estándares conocidos o espectros predichos por el programa Mass Frontier.

10 El análisis de espectrometría de masas del extracto de cloroformo del medio condicionado reveló la presencia de lípidos observados comúnmente en la membrana plasmática, es decir fosfolípidos, glucolípidos y esteroides y también en exosomas<sup>35</sup>. Entre los fosfolípidos se incluían fosfatidil-serina y fosfatidil-inositol, fosfatidil-colina, shingomielina, ceramidas, glucolípidos, tal como cerebrósido y esteroides tales como el colesterol.

15 Se ha observado que los exosomas presentan microdominios conocidos como balsas lipídicas en sus membranas plasmáticas<sup>22,24-35,41,42</sup>. Los exosomas son ricos en colesterol y su proporción de colesterol-fosfolípido generalmente excede la proporción de 0,3 a 0,4 (moles/mol) observada en la membrana plasmática<sup>35</sup>. Estas balsas se caracterizan por su resistencia a la disolución con detergentes no iónicos tales como Triton X-100 ó Brij-98 a temperaturas bajas y su sensibilidad a la ciclodextrina que se une al colesterol. Generalmente insoluble en detergentes tales como Triton X-100, la insolubilidad en detergentes con frecuencia se utiliza para identificar la presencia de balsas lipídicas.

20 Al tratar el medio condicionado con Triton X-100, las proteínas secretadas continuaban segregándose en forma de complejo independientemente de sus experimentos de fraccionamiento con filtración a través de membrana (figura 12), lo que sugiere que el complejo putativo es resistente a la disolución en Triton X-100, consistentemente con la presencia de balsas lipídicas<sup>43</sup>.

25 Se determinó si el complejo era sensible a la disolución en presencia de ciclodextrina 20 mM. En el caso de que el complejo putativo presentase balsas lipídicas en la membrana, la extracción del colesterol con ciclodextrina causaba la disolución y la liberación de las proteínas, que seguidamente se fraccionaron por tamaño según sus tamaños moleculares. La composición cuantitativa relativa de los lípidos en el complejo putativo se estimó utilizando técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas, tal como se ha indicado de manera general anteriormente<sup>35</sup>. Lo anterior determina si la composición de los lípidos puede sugerir la presencia de balsas lipídicas.

### 35 **Ejemplo 23. Resultados: composición de ARN del medio condicionado**

La extracción con trizol del medio condicionado, seguido de la precipitación con isopropanol tal como se utiliza comúnmente en la extracción del ARN de células produce un sedimento que en agua presenta una proporción de absorbancias 260:280 nm de 1:9, sugiriendo que podría ser ARN.

40 Lo anterior es consistente con un informe anterior de que los exosomas contienen ARNm y microARN<sup>36</sup>. Este sedimento se sometió a ensayo para sensibilidad a la actividad de ARNasa. También se trató el medio condicionado con ARNasas antes de la extracción con trizol. Estos ensayos determinaron si el sedimento era de ARN y si el ARN resulta secuestrado en vesículas lipídicas, tales como los exosomas.

45 En caso de ser así, se sometió a ensayo el ARN mediante ensayos genéricos de expresión génica, tales como las micromatrices, la secuenciación, RT-PCR y los ensayos de traducción *in vitro* para determinar la composición y las funciones del ARN. Los ARN se traducen *in vitro* utilizando un sistema de lisado de reticulocitos estándar disponible comercialmente con y sin <sup>15</sup>N-leucina. Los productos proteicos traducidos se identifican mediante espectrometría de masas.

### 50 **Ejemplo 24. Resultados: perfil proteómico**

55 Entre las ~700 proteínas que se describe que se encuentran presentes en la secreción (solicitud provisional de patente US nº 60/878.222 y solicitud internacional de patente PCT nº SG2006/000232. Medio condicionado de células troncales mesenquimatosas), se encuentran muchas proteínas que se observa que se encuentran presentes comúnmente en el proteoma de otros exosomas (figura 13)<sup>44</sup>. También existen muchas proteínas en la lista de ~700 proteínas que no se ha descrito que se encuentren presentes en los exosomas. Algunos ejemplos notables, aunque no exhaustivos, son Thy1, Wnt 5a, Wnt 5b, inhibina A (o activina A).

### 60 **Ejemplo 25. Resultados: perfil de antígenos de superficie**

65 El perfil proteómico del medio condicionado describe además la presencia de proteínas que es conocido que se encuentran unidas a membrana. Entre algunos ejemplos notables, aunque no exhaustivos, se incluyen CD9, CD109, thy-1<sup>20</sup>. Otro antígeno de superficie conocido de los exosomas, tal como CD24, que se encuentra sobre la superficie de los exosomas secretados en la orina<sup>45</sup> no se expresa en las CMM<sup>19</sup> o en sus secreciones<sup>20</sup>.

Además, muchos de dichos antígenos de superficie se expresan de manera específica de tipo celular. Conjuntamente, estas observaciones sugieren que el perfil de antígenos de superficie definirá y distinguirá los exosomas de diferentes fuentes celulares. Para caracterizar el perfil de antígenos superficiales de dicho complejo de secreción putativo, el medio condicionado se biotiniló utilizando kits de biotinilación estándares disponibles comercialmente. Se separaron las proteínas en SDS-PAGE estándar, se transfirieron a nilón o nitrocelulosa y se sondearon con avidina-peroxidasa utilizando protocolos estándares en el análisis de inmunotransferencia. En este protocolo, sólo las proteínas que se encuentran sobre las superficies de los complejos y que son físicamente accesibles a la biotina resultan biotiniladas. Todas las proteínas que se encuentran dentro del complejo y que, por lo tanto, no son físicamente accesibles no se encuentran biotiniladas. Las proteínas biotiniladas también se aislaron utilizando cromatografía de afinidad para avidina y se identificaron mediante CL/EM. La identidad de estas proteínas se confirmó mediante análisis de inmunotransferencia, microscopía inmunoelectrónica y expresión génica de las CMM.

### 15 **Ejemplo 26. Exosomas**

Basándose en las observaciones anteriormente proporcionadas, se planteó la hipótesis de que la unidad cardioprotectora activa más pequeña en el medio condicionado es un exosoma.

20 Para demostrar dicha hipótesis, los presentes inventores se concentraron en el medio condicionado utilizando tecnología de filtración de membranas con membranas de corte de PM de 100 kD. A continuación el medio condicionado concentrado se ultracentrifugó a ~150-200.000 g durante 1 a 2 horas. El sedimento se resuspendió en PBS, se analizó mediante microscopía electrónica para confirmar la presencia de partículas en un intervalo de tamaños de 50 a 150 nm y se sometieron a ensayo para su contenido de proteínas, lípidos y ARN.

25 La suspensión se sometió a ensayo para las actividades biológicas predichas computacionalmente para el medio condicionado<sup>20</sup> y se sometió a ensayo para los efectos cardioprotectores en los modelos de ratón y de cerdo tal como se ha indicado anteriormente o se indica posteriormente, respectivamente.

### 30 **Ejemplo 27. Diseño de estudio para el estudio con cerdos**

Se asignaron aleatoriamente a tratamiento con CMM-MC, no MC o solución salina treinta cerdos Daland Landrace hembra (60 a 70 kg, IDDLO, Lelystad, Países Bajos), todos pretratados con clopidogrel 75 mg/día durante 3 días y amiodarona 400 mg/día durante 10 días.

35 Se añadió el grupo de solución salina para evaluar un potencial efecto de medio de cultivo no condicionado fresco. En todos los cerdos se indujo IM mediante 75 minutos de ligación de la arteria coronaria circunfleja izquierda proximal (ACxCI) y 4 horas de reperfusión posteriormente. Se seleccionó un periodo de isquemia de 75 minutos para provocar una lesión miocárdica grave sin inducir un infarto de miocardio completamente transmural. Se utilizó un periodo de reperfusión de 4 horas porque la medición del tamaño de infarto utilizando la tinción de TTC es más fiable tras 3 horas de reperfusión<sup>46</sup>.

45 Tras periodos de reperfusión más prolongados, resulta más difícil evaluar el estado de estrés oxidativo y los mecanismos apoptóticos. Se inició el tratamiento 5 minutos antes del inicio de la reperfusión mediante infusión intravenosa de CMM-MC (1,0 ml, 2,0 mg de proteína), no MC o solución salina. Inmediatamente después de la reperfusión, se administró un bolo intracoronario adicional de CMM-MC (4,0 ml, 8,0 mg de proteína), no MC o solución salina. Se evaluó el tamaño del infarto y función del miocardio 4 horas después de la reperfusión.

50 Para identificar el factor o factores en el medio que conferirían cardioprotección, los presentes inventores utilizaron un modelo de ratón o de cerdo de isquemia y daño por reperfusión. Se indujo IM mediante 30 minutos de oclusión de la arteria coronaria izquierda (ACI) y posterior reperfusión. Se trataron los ratones con medio condicionado no fraccionado, fracción de <1.000 kDa, fracción de <500 kD, fracción de <300 kD, fracción de <100 kD o solución salina por vía intravenosa por la vena de la cola, 5 minutos antes de la reperfusión. Se evaluó el tamaño de infarto al día siguiente (24 horas después de la reperfusión).

### 55 **Ejemplo 28. IM y procedimiento operativo**

60 Durante toda la operación se realizó un seguimiento continuo de ECG, presión arterial sistémica y capnograma. Bajo anestesia general tal como se ha indicado con anterioridad<sup>47</sup> se llevó a cabo una esternotomía media y se insertaron dos mallas en las arterias carótidas para un catéter guía de 6 Fr y un catéter de conductancia de 8 Fr (CD Leycom, Zoetermeer, Países Bajos).

65 Se introdujo la punta distal de un catéter de Swan Ganz en la arteria pulmonar a través de la vena yugular interna. Se colocaron sondas de flujo transónicas (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY) en torno a la aorta proximal y ACxCI para medir el gasto cardíaco y el flujo coronario y se colocó un alambre en torno a la vena cava inferior para permitir la realización de mediciones funcionales bajo condiciones de carga variables para los bucles de PV. Tras las

mediciones funcionales, se administraron por vía intravenosa 10.000 IU de heparina y se apretaron las suturas para ocluir la ACxCI proximal. Se aplicó desfibrilación interna con 50 J al producirse fibrilación ventricular. Tras 75 minutos de isquemia, se reabrió la ACxCI mediante liberación de la sutura. Inmediatamente después de la reperfusión, se infundió nitroglicerina (0,1 mg para evitar el fenómeno de no reflujo) a través de la ACxCI mediante el catéter guía, seguido del tratamiento intracoronario de CMM-MC, no MC o solución salina. Tras 4 horas de reperfusión se llevaron a cabo las mediciones funcionales finales y se extirpó el corazón para el análisis del tamaño del infarto.

Los ratones fueron anestesiados con fentanilo (0,05 mg/kg), Dormicum (5 mg/kg) y Domitor (0,5 mg/kg), y se intubaron utilizando un catéter intravenoso de calibre 24 de punta roma. Los ratones recibieron ventilación artificial a una tasa de 105 respiraciones/min. utilizando un ventilador para roedores con una mezcla de O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O (1:2 v/v) al que se había añadido isoflurano (al 2,5-3,0% v/v). El ratón se colocó sobre una almohadilla calefactora para mantener la temperatura corporal a 37°C. Se abrió el tórax por el tercer espacio intercostal y se utilizó una sutura de proleno 8-0 para ocluir la arteria coronaria izquierda (ACI) durante 30 minutos. Se cerró el tórax y al día siguiente (24 horas después), se extirpó el corazón para el análisis del tamaño de infarto.

### Ejemplo 29. Mediciones funcionales

Se digitalizaron la ECG, la presión arterial y el gasto cardiaco a una tasa de muestreo de 250 Hz y se almacenaron para el análisis fuera de línea (Leycom CFL-512, CD Leycom). Se midió la presión y volumen del ventrículo izquierdo (VI) utilizando el procedimiento del catéter de conductancia, tal como se ha descrito con anterioridad<sup>47</sup>. Las señales de presión y volumen del VI derivados del catéter de conductancia se visualizaron y captaron a una tasa de muestreo de 250 Hz utilizando un Leycom CFL-512 (CD Leycom).

Los datos se captaron durante el estado estable y durante la oclusión temporal de la vena cava, en todos los casos con el ventilador desactivado al final de la espiración. Se llevó a cabo el análisis de los bucles de presión-volumen con software personalizado tal como se ha descrito con anterioridad<sup>48</sup>. Además, se obtuvieron imágenes de ultrasonidos epicárdicos del eje corto (Prosound SSD-5000, sonda de 5 MHz UST-5280-5, Aloka Holding Europe AG, Zug, Suiza) al nivel del musculo medio-papilar. Se midió el grosor de pared (GP) del área infartada, el área remota (septo) y el área interna de VI (Vlai) al final de la diástole (FD) y al final de la sístole (FS).

Se calculó el engrosamiento de la pared sistólica (EPS) como  $[(GP(FS)-GP(FD))/GP(FD)]*100\%$ , el acortamiento del área fraccional (AAF) como  $[(Vlai(FS)-Vlai(FD))/Vlai(FD)]*100\%$  y la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) como  $[(VFS-VFD)/VFS]*100\%$ . La rigidez de la cámara al final de la diástole se cuantificó mediante regresión lineal de la relación presión-volumen al final de la diástole. Se midió la ecocardiografía y los bucles de PV antes del IM, 1 hora después de la isquemia y 4 horas después de la reperfusión. Para retar el miocardio aturcido, se llevaron a cabo mediciones adicionales durante el estrés inducido farmacéuticamente mediante infusión intravenosa de dobutamina (2,5 µg/kg/min. y 5,0 µg/kg/min.).

### Ejemplo 30. Tamaño del infarto

Inmediatamente antes de la extirpación del corazón, se religó el ACxCI (cerdos) o la ACI (ratones) en exactamente el mismo punto que para la inducción de IM. Se infundió pigmento azul de Evans por el sistema coronario para delinear el área en riesgo (AER). A continuación se extirpó el corazón, se aisló el VI y se cortó en 5 secciones de ápex a base.

Las secciones se incubaron en cloruro de trifeniltetrazolio al 1% (TTC, Sigma-Aldrich Chemicals, Zwijndrecht, Países Bajos) en tampón de Sörensen a 37°C (13,6 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 17,8 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 7,4) durante 15 minutos para discriminar el tejido infartado del miocardio viable.

Todas las secciones se escanearon en ambas caras, y en cada portaobjetos se comparó el área infartada con el área en riesgo y el área total mediante la utilización de software de planimetría digital (Image J). Tras corregir para el peso de las secciones, se calculó el tamaño del infarto como porcentaje del AER y del VI.

### Ejemplo comparativo 31. Materiales y métodos: preparación de medio condicionado

Se cultivaron células HuES9.E1 tal como se ha descrito anteriormente (Lian *et al.*, 2007; Sze *et al.*, 2007).

Brevemente, se lavaron tres veces con PBS cultivos celulares confluyentes de HuES9.E1 y se cultivaron durante la noche en un medio definido químicamente que consistía de DMEM sin rojo fenol (número de catálogo 31053, Invitrogen) y complementado con insulina, transferrina y selenoproteína (ITS) (Invitrogen), 5 ng/ml de FCF2 (Invitrogen), 5 ng/ml de FCDP AB (Preprotech, Rocky Hill, NJ), glutamina-penicilina-estreptomocina y b-mercaptoetanol. A continuación, los cultivos se enjuagaron tres veces con PBS y después se añadió medio definido fresco.

Tras 3 días, se recogió el medio, se centrifugó a 500xg y se concentró. Se preparó muestra de MC de >100 kDa

concentrando el MC 50x utilizando la filtración de fuerza tangencial (FFT) con un VCPM de 100 kDa. Todas las demás concentraciones se llevaron a cabo utilizando una membrana de ultrafiltración. Todos los MC y otros MC procesados de manera diferente se filtraron a través de 0,2 micrómetros después de todos los procedimientos y antes de almacenarse o utilizarse.

5

### **Ejemplo 32. Materiales y métodos: análisis de CL EM/EM**

Las proteínas contenidas en dos ml de medio condicionado (MC) o no condicionado (MNC) dializado se redujeron, se alquilaron y se digirieron con tripsina tal como se ha descrito anteriormente (Sze *et al.*, 2007). A continuación, las muestras se desalaron pasando la mezcla digerida a través de un cartucho condicionado Sep-Pak C-18 SPE (Waters, Milford, MA, USA), se lavaron dos veces con un tampón de acetonitrilo (ACN) al 3% (JT Baker, Phillipsburg, NJ) y ácido fórmico (AF) al 0,1%, y se eluyeron con un tampón de ACN al 70% y AF al 0,1%. Seguidamente las muestras eluidas se secaron a aproximadamente 10% de sus volúmenes iniciales eliminando el solvente orgánico en una centrifuga de vacío.

10

15

Para reducir la complejidad de la muestra, se llevó a cabo un fraccionamiento peptídico fuera de línea con un sistema de HPLC (Shimadzu, Japón) por una columna de polisulfato SCX (200 mm x 4,6 mm) (PolyLC, USA). Fase móvil A (KH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM + acetonitrilo al 30%) y fase móvil B (KH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM + acetonitrilo al 30% + KCl 350 mM) a un caudal de 1 ml/min. Se recogieron ocho fracciones y se secaron con una centrifuga de vacío. Se cargaron las muestras fraccionadas en el automuestreador de un sistema de HPLC de fase inversa Shimadzu DGU-20A3 C18 acoplado en línea con un espectrómetro de masas con trampa de iones LTQ-FT ultra lineal (Thermo Electron, San Jose, CA) dotado de una fuente de nanopulverización. Los péptidos inyectados se atraparon en una columna de enriquecimiento Zorvax 300SB-C18 (5 mm x 3 mm, Agilent Technologies, Alemania) y se eluyeron en una columna empaqueta C18 nanoporada (75 µm x 100 Å, Michrom Bioresources, Auburn, CA).

20

25

Se utilizó un gradiente de 90 minutos a un caudal de 200 nl/min. para eluir los péptidos en el espectrómetro de masas. Se operó el LTQ en modo dependiente de datos llevando a cabo escaneos de EM/EM en 8 de los picos más intensos de cada escaneo de EM en el EMTF. Para cada experimento, se agruparon los espectros de EM/EM (dta) de las ocho fracciones de SCX en un único archivo genérico Mascot con un programa escrito en el propio laboratorio. Se llevó a cabo la identificación de las proteínas mediante búsqueda de los datos agrupados frente a la base de datos de proteínas humanas del IPI (versión 3.34, 67.758 secuencias) utilizando un servidor Mascot del propio laboratorio (versión 2.2, Matrix Science, Reino Unido). Los parámetros de la búsqueda fueron: un máximo de 2 dianas no cortadas utilizando tripsina; la modificación fija era la carbaminometilación de cisteína y las modificaciones variables eran la oxidación de la metionina.

30

35

Se fijaron las tolerancias de masas en 20 ppm y 0,8 Da para el precursor peptídico y fragmentos iónicos, respectivamente. Las identificaciones de proteínas se aceptan como positivos verdaderos en caso de que se encuentren dos péptidos diferentes con puntuaciones superiores a las puntuaciones de homología.

40

### **Ejemplo 33. Materiales y métodos: fraccionamiento mediante HPLC y dispersión dinámica de la luz utilizando un detector cuasi-elástico de dispersión de la luz (DCDL)**

La configuración del instrumento consistía de un sistema de cromatografía líquida con una bomba binaria, un autoinyector, un horno de columna termostatazada y un detector de UV-visible operado por el software de clase VP de Shimadzu Corporation (Kyoto, Japón). Las columnas de cromatografía utilizadas eran una precolumna TSK SWXL de 6x40 mm y TSK gel G4000 SWXL, 7,8x300 mm de Tosoh Corporation (Tokyo, Japón). Se conectaron en serie los detectores siguientes: Dawn 8 (dispersión de la luz), Optilab (índice de refracción) y DLD (dispersión dinámica de la luz) después del detector de UV-visible. Los últimos tres detectores eran de Wyatt Technology Corporation (California, USA) y se operaron utilizando el software ASTRA.

45

50

Los componentes de la muestra se separaron mediante exclusión por tamaño, es decir, las moléculas más grandes se eluyeron antes que las moléculas más pequeñas. El tampón de elución utilizado era tampón fosfato 20 mM con NaCl 150 mM a pH 7,2. Este tampón se filtró a través de un tamaño de poro de 0,1 µm y se desgasificó durante 15 minutos antes de la utilización. El sistema de cromatografía se equilibró a un caudal de 0,5 ml/min. hasta que la señal en Dawn 8 se estabilizó en torno a 0,3 unidades de voltaje del detector. El detector de UV-visible se fijó en 220 nm y la columna se equilibró en el horno a 25°C. El modo de elución era isocrático y el tiempo de operación es de 40 minutos. El volumen de muestra inyectado era de entre 50 y 100 µl. El % de área del pico del exosoma frente a todos los demás picos se integró a partir del detector de UV-visible. El radio hidrodinámico, Rh, se computó con los detectores de DDL y Dawn 8. La tasa de pulsos más alta (Hz) en el ápex del pico se consideró el Rh.

55

60

Se recogieron los picos de los componentes separados visualizados a 220 nm como fracciones para estudios de caracterización adicionales.

65

### **Ejemplo 34. Materiales y métodos: centrifugación de equilibrio en gradiente de densidad de sacarosa**

Para la centrifugación de equilibrio en gradiente de densidad de sacarosa, se prepararon 14 soluciones de sacarosa

con concentraciones de entre 22,8% y 60% (p/v). La solución más concentrada se aplicó en capas en el fondo de un tubo de ultracentrífuga SW60Ti (Beckman Coulter Inc., Fullerton CA, USA), seguido de la siguiente concentración más alta de sacarosa. Se cargó cuidadosamente el MC en el tope antes de ultracentrifugar durante 16,5 horas a 200.000xg, a 4°C en un rotor SW60Ti (Beckman Coulter Inc.). Se recogieron 16 fracciones de tope a fondo del gradiente de sacarosa. Se calcularon las densidades de todas las fracciones de sacarosa utilizando una microbalanza y se consolidaron en 13 fracciones. Para algunas MC, el MC se pretrató con un tampón de lisis celular (tampón de extracción celular, Biovision, www.BioVision.com) antes de la carga en una centrifugación de equilibrio en gradiente de densidad de sacarosa. Se añadió el tampón de lisis a MC en una proporción de volúmenes 1:1 con cóctel de inhibidores de proteasa (cóctel inhibidor de proteasa Halt, sin EDTA, Thermo Scientific, www.thermofisher.com). La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.

#### **Ejemplo 35. Materiales y métodos: cuantificación de proteínas**

Se cuantificó la concentración de proteínas del MC utilizando el kit de cuantificación de proteínas NanoOrange (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **Ejemplo 36. Materiales y métodos: análisis de SDS-PAGE y de inmunotransferencia**

Se separaron las proteínas totales en el MC en geles de poliacrilamida antes de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Se bloqueó la membrana, se incubó con anticuerpos de ratón contra CD9, CD81, SOD-1, piruvato cinasa, Alix, Tsp-1 humanos, seguido de anticuerpos secundarios acoplados con peroxidasa de rábano picante contra el anticuerpo primario de ratón. A continuación, la membrana se incubó con un sustrato HRP quimioluminiscente para detectar el anticuerpo primario unido y por lo tanto la presencia del antígeno.

#### **Ejemplo 37. Materiales y métodos: esfingomiélna, fosfatidilcolina y ensayo de colesterol**

Se midieron las concentraciones de colesterol, esfingomiélna y fosfatidilcolina en dos preparaciones independientes del MC y el sedimento de la ultracentrifugación del MC a 100.000xg durante 2 horas a 4°C utilizando kits de ensayo disponibles comercialmente. Se midió el colesterol utilizando el kit de ensayo de colesterol Amplex<sup>®</sup> rojo (Molecular Probes, USA), la esfingomiélna con el kit de ensayo de esfingomiélna (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) y la fosfatidilcolina se midió utilizando el kit de ensayo de fosfatidilcolina (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

#### **Ejemplo 38. Materiales y métodos: tripsinización limitada del medio condicionado**

Se trató el MC con/sin Triton X o tampón de lisis durante 30 minutos a 4°C bajo agitación suave. Se dejó que se produjese la digestión proteolítica mediante la adición de tripsina al MC tratado durante 3 segundos a 20 minutos a temperatura ambiente bajo agitación suave. La digestión se detuvo utilizando un inhibidor de tripsina, PMSF.

#### **Ejemplo 39. Materiales y métodos: análisis de micromatrices de miARN**

Se analizaron dos réplicas biológicas de ARN celular total de las CMM y dos réplicas biológicas de ARN secretado procedente del MC mediante micromatrices de miARN. El análisis de hibridación y de los datos fue realizado por LC Sciences, LLC (www.LCsciences.com). El chip contenía sondas de transcritos de miARN listados en Sanger miRBase versión 10.1 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/>).

#### **Ejemplo 40. Resultados: la secreción cardioprotectora contiene proteínas asociadas a exosomas que forman complejos multiproteicos**

Para identificar el componente activo, los presentes inventores fraccionaron anteriormente el MC mediante ultrafiltración a través de membranas con diferente VCPM. Se demuestra que al filtrar el MC a través de una membrana con un VCPM de 1.000 kDa, el filtrado no es protector. Sin embargo, el MC concentrado ~125 veces frente a una membrana similar era cardioprotectora en un modelo de ratón de daño por isquemia/reperfusión. En resumen, la filtración a través de filtros con un VCPM inferior a 0,2 µm, tal como 100 kDa, 300 kDa, 500 kDa ó 1.000 kDa, no son cardioprotectores (figura 14) pero el MC que se concentra con una membrana de 1.000 kDa (Timmers *et al.*, 2008) o una membrana de 100 kDa es cardioprotector (figura 14). Estas observaciones sugieren que la fracción activa consistía de complejos grandes, de >1.000 kDa o con un diámetro de entre 50 y 100 nm. Basándose en el intervalo de tamaños de las partículas, los presentes inventores plantearon que las partículas en el MC eran exosomas. Los exosomas están formados de cuerpos multivesiculares (Fevrier y Raposo, 2004; Keller *et al.*, 2006) con una membrana lipídica que presenta la misma orientación que la membrana plasmática. Es conocido que son producidos por muchos tipos celulares y se cree que son importantes en las comunicaciones intercelulares. Los exosomas presentan diámetros de entre 40 y 100 nm. Se ha demostrado que los exosomas son secretados por muchos tipos celulares y la composición de proteínas de estos exosomas aparentemente eran específicos de tipos celulares. Sin embargo, algunas proteínas tales como CD9, piruvato cinasa y Alix aparentemente se expresan comúnmente en los exosomas (Sze *et al.*, 2007). Los presentes inventores identificaron anteriormente

aproximadamente 201 proteínas en la secreción (Sze *et al.*, 2007).

5 En la presente memoria se extiende la lista a 793 proteínas (Tabla E2) realizando modificaciones a la metodología previamente descrita en el análisis proteómico tal como se detalla en la sección de Materiales y métodos. Las 793  
 10 contenían muchas proteínas asociadas a exosomas, tales como CD9, CD81, Alix, TSP-1, SOD-1 y piruvato cinasa (Olver y Vidal, 2007). Se confirmó la presencia de dichas proteínas en la secreción mediante análisis de inmunotransferencia (carril 1, figura 15). La coinmunoprecipitación de CD81, CD9 y Alix corrobora su asociación con un exosoma y la presencia del exosoma en la secreción. TSP-1, SOD-1 y piruvato cinasa no coinmunoprecipitaron con CD81, sugiriendo que estas proteínas no se encuentran presentes en exosomas CD81<sup>+</sup> o no se encuentran presentes en los exosomas en absoluto (figura 15).

Tabla E2 (a continuación). Lista alfabética de 739 productos génicos únicos identificados mediante CL-EM/EM y matriz de anticuerpos

02-Sep	BPNT1	COL5A3	FAM3C	HINT1	ITGB4BP	MYH9	PPIA	RPLP2	THBS2	
07-Sep	BTD	COL6A1	FAM49B	HIST1H4	K-ALPHA-1	MYL6	PIIB	RPS10	THOP1	
	AARS	C14orf141	COL6A2	FAM62A	HIST1H4A	KPNB1	NAGK	PPP2R1A	RPS15A	THY1
	ACAA2	C19orf10	COL6A3	FBLN1	HIST1H4B	KRT1	NANS	PPP2R4	RPS16	TIMP1
	ACAT2	C1orf58	COL7A1	FBLN5	HIST1H4C	KRT14	NARS	PPP5C	RPS19	TIMP2
	ACO1	C1orf78	COPA	FBN1	HIST1H4D	KRT2	NEDD8	PPP6C	RPS2	TIMP3
	ACTB	C1QBP	COPG	FBN2	HIST1H4E	KRT27	NEFM	PRDX1	RPS20	TKT
	ACTC1	C1R	COPS3	FDPS	HIST1H4F	KRT4	NIT2	PRDX2	RPS23	TLN1
	ACTN1	C1S	COPS4	FGF16	HIST1H4H	KRT5	NME1	PRDX3	RPS3	TMOD2
	ACTN2	C21orf33	COPS8	FGFRL1	HIST1H4I	KRT6L	NPC2	PRDX4	RPS4X	TMOD3
	ACTN3	CALR	CORO1B	FH	HIST1H4J	KRT7	NPEPPS	PRDX5	RPS5	TNC
	ACTN4	CAND1	CORO1C	FKBP10	HIST1H4K	KRT75	NPM1	PRDX6	RPS7	TNFRSF11B
	ACTR1A	CAP1	COTL1	FKBP1A	HIST1H4L	KRT77	NQO1	PRG1	RPS8	TNFRSF12A
	ACTR1B	CAP2	CRIP2	FKBP3	HIST2H2AA3	KRT9	NRP1	PRKACA	RPS9	TNFSF12
	ACTR2	CAPG	CS	FLNA	HIST2H2AA4	KRTHB4	NRP2	PRKCSH	RPSA	TNPO1
	ACTR3	CAPN1	CSE1L	FLNB	HIST2H4A	LAMA4	NT5E	PRNP	RSU1	TP53I3
	ACTR3B	CAPN2	CSR1	FLNC	HIST2H4B	LAMB1	NUCB1	PROCR	RTN4	TP11
	ADAM9	CAPZA1	CSR2	FLRT2	HIST4H4	LAMC1	OLFML3	PROSC	S100A11	TPM1
	ADSL	CAPZA2	CST3	FLT1	HLA-A	LANCL1	P4HA1	PRSS23	S100A16	TPM2
	ADSS	CAPZB	CTGF	FN1	HLA-B	LAP3	P4HB	PRSS3	SARS	TPM3
	AEBP1	CARS	CTHRC1	FSCN1	HMX1	LASP1	PABPC1	PSAP	SDC4	TPM4
	AGA	CBR1	CTSB	FSTL1	HNRPA1	LDHA	PABPC4	PSAT1	SDCBP	TRAP1
	AGRN	CBR3	CTSD	FSTL5	HNRPA1L-2	LDHAL6B	PFAFAH1	PSMA1	SEC22B	TRHDE
	AHCY	CCBL2	CTSZ	FTL	HNRPA2B1	LDHB	PFAFAH1	PSMA2	SEC23A	TROVE2
	AK1	CCDC19	CXCL1	G6PD	HNRPC	LEPRE1	PFAFAH1	PSMA3	SEC31A	TSKU
	AK2	CCL18	CXCL12	GALNT2	HNRPCL1	LGALS1	B3	PSMA6	SEMA3C	TUBA1A
	AKR1A1	CCL2	CXCL16	GALNT5	HNRPD	LGALS3	PAICS	PSMA7	SEMA7A	TUBA6
	AKR1B1	CCL7	CXCL2	GANAB	HNRPDL	LGALS3BP	PAM	PSMA7	SERPINB1	TUBA8
	ALCAM	CCN4	CXCL9	GAPDH	HNRPH2	LMNA	PAPPA	PSMB1	SERPINB6	TUBB
	ALDH2	CCR4	CYCS	GARS	HNRPK	LOC196463	PARK7	PSMB2	SERPINE1	TUBB2C
	ALDH7A1	CCR5	D4ST1	GAS6	HNRPL	LOC283523	PARP1	PSMB3	SERPINE2	TUBB3
	ALDOA	CCT2	DAG1	GBA	HNRPR	LOC347701	PARVA	PSMB4	SERPINF	TUBB4
							PCBP1	PSMB5		

15

ALDOC	CCT3	DCI	GBE1	HNRPU	LOC646821	PCBP2	PSMD11	1	SERPINH	TUBB6
ANGPT4	CCT4	DCN	GDF1	HNT	LOC649125	PCDH18 PCDHG	PSMD13	1	SERPINI2	TUBB8
ANP32B	CCT5	DDAH2	GDF11	HSP90AB1	LOC653214	B6	PSMD5	SFRP1	TWF1	
ANXA1	CCT6A	DDB1	GDF15	HSP90B1	LOC654188	PCK2	PSMD6	SFRP4 SH3BGR	TXN	
ANXA2	CCT7	DDT	GDF3	HSPA1A	LOC728378	PCMT1	PSMD7	L3	TXNL5	
ANXA5	CCT8	DDX17	GDF5	HSPA1B	LOXL2	PCNA	PSME1	SIL1	TXNRD1	
ANXA6	CD109	DES	GDF8	HSPA1L	LRP1	PCOLCE PDCD6I P	PSME2	SLC1A5	UBE1	
AP1B1	CD248	DKK1	GDI1	HSPA4	LTA		PTBP1	SLC3A2	UBE2L3	
AP1S1	CD44	DLD	GDI2	HSPA5	LTA4H	PDGFA	PTK7 PTPRCA P	SND1	UBE2N	
AP2A1	CD59	DNAJC3	GLO1	HSPA6	LTB	PDGFC PDGFR B	PTX3	SNRPD1	UBE2V1	
AP2A2	CD81	DPP3	GLRX	HSPA8	LTB4DH		PTX3	SNRPE	UBE3B	
AP2B1	CD9	DPYSL2	GLT8D3	HSPB1	LTBP1	PDIA3	PURA	SOD1	UCHL1	
AP3B1	CDC37	DPYSL3	GLUD1	HSPD1	LTBP2	PDIA4	PXDN	SPARC	UCHL3	
APEX1	CDC42	DSTN	GM2A GNPDA 1	HSPE1	LUM	PDIA6	PYCR1	SPOCK	UGDH	
API5	CDH11	DYNLL1	GNPNA T1	HSPG2	M6PRBP1	PDLIM1	PYGB	SPTAN1	UGP2	
APOA1B P	CDH13	ECHS1		HSPH1	MACF1	PDLIM5	QARS	SPTBN1	UROD	
APOE	CDH2	ECM1	GOT1	HTRA1	MADH4	PDLIM7	QPCT	SPTBN4	USP14	
APP	CFL1	EEF1A1	GOT2	IDH1	MAP1B	PEPD	QSCN6	SRP9	USP5	
APRT	CFL2	EEF1A2	GPC1	IFNG...	MAPK1	PFN1	RAB11B	SRPX	VARS	
ARCN1 ARHGA P1	CHID1	EEF1B2	GPC5	IGF2R	MAPRE1	PFN2	RAB1A	SRPX2	VASN	
ARHGDI A	CHRDL1	EEF1G	GPI	IGFBP2	MAT2A	PGCP	RAB6A	SSB	VAT1	
	CLEC11A	EEF2	GREM1	IGFBP3	MAT2B	PGD	RAC1	ST13	VCL	
ARPC1A	CLIC1	EFEMP2	GRHPR	IGFBP4	MCTS1	PGK1	RAN	ST6GAL2	VCP	
ARPC1B	CLIC4	EIF2S3	GRN	IGFBP5	MDH1	PGK2	RANBP5 RARRES 2	STAT1	VEGFC	
ARPC2	CLSTN1	EIF3S9	GSN	IGFBP7	MDH2	PGLS		STC1	VIL2	
ARPC3	CLTC	EIF4A1	GSR	IGKC	MFAP4	PGM1 PGRMC 2	RARS	STC2	VIM	
ARPC4	CLTCL1	EIF4A2	GSS	IL13	MGAT5		RBMX	STIP1	VPS26A	
ARTS-1	CLU	EMILIN1	GSTK1	IL15	MIF	PHGDH	RHOA	SULF1	VPS35	
ATIC	CMPK	EML2	GSTO1	IL15RA	MMP1	PHPT1	RNASE4	SVEP1	VTN	
ATP5B ATP6AP 1	CNDP2	ENO1	GSTP1	IL1RAP	MMP10	PICALM	RNH1	SYNCRIP	WARS	
ATP6AP 2	CNN2	ENO2	GTPBP9	IL2	MMP14	PKM2	RNPEP	TAGLN	WDR1	
ATP6V1 B2	CNN3	ENO3	GZMA	IL21R	MMP2	PLAU	RPL10A	TAGLN2	WNT5A	
ATP6V1 G2	COL12A1	EPPK1	H2AFY	IL3	MRC2	PLEC1 PLEKHC 1	RPL11	TALDO1	WNT5B	
B2M B4GALT 1	COL18A1	EPRS	HADH	IL6	MRLC2		RPL12	TARS	XPO1	
	COL1A1	ESD	HARS	IL6ST	MSN	PLOD1	RPL14	TCN2	YKT6	
	COL1A2	ETF1	HARS2 hCG_16 41617 hCG_20	IL8	MTAP	PLOD2	RPL18	TCP1	YWHAB	
BASP1	COL2A1	ETFB	41617 hCG_20	ILF2	MTPN	PLOD3	RPL22	TFPI	YWHAE	
BAT1	COL3A1	ETHE1	23776	ILF3	MVP	PLS1	RPL30	TGFB1	YWHAG	
BBS1	COL4A1	EXT1	HEXA	INHBA	MXRA5	PLS3	RPL5	TGFB2	YWHAH	
BCAT1	COL4A2	FAH	HEXB	IQGAP1	MXRA8	PLSCR3	RPL7	TGFBI	YWHAQ	
BGN	COL5A1	FAHD1	HGF	ISOC1	MYH11	POSTN	RPLP0	THBS	YWHAZ	
BLVRA	COL5A2	FAM129	HIBCH	ITGA2	MYH14	PPCS	RPLP1	THBS1		

Tabla E2. Perfil proteómico de MC determinado mediante CL EM/EM y matrices de anticuerpos. Se analizaron cuatro muestras independientes. Se detectó cada proteína en la tabla en por lo menos 3 de 4 muestras.

5 De las proteínas anteriormente indicadas en la Tabla E2, se identificaron mediante CL EM/EM y matrices de anticuerpos, TIMP1, TIMP2, TNFRSF11B, LGALS3, ALCAM, DCN, SFRP1, GDF15, PDGFC, PTX3, LTBP1, IGFBP2, GREM1, IGFBP7, MIF, MMP1, PLAU, INHBA y THBS1. PPIA, HIST1H4, PPIB, HIST1H4A, HIST1H4B,

HIST1H4C, HIST1H4D, HIST1H4E, HIST1H4F, HIST1H4H, HIST1HRI, HIST1H4J, HIST1H4K, HIST1H4L, HIST2H2AA3, HIST2H2AA4, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST4H4, HLA-A, HLA-B, SDCBP, TUBA1A, TUBA6, TUBA8, GAPDH, TUBB, TUBB2C, TUBB3, TUBB4, TUBB6, TUBB8, HSP90AB1, ANXA1, HSP90B1, ANXA2, ANXA5, ANXA6, PDCD6IP, CD9, CFL1, CLTC, ENO1, PKM2, MSN e YWHAG fueron identificados mediante CL EM/EM y por lo menos 4 estudios sobre exosomas secretados por las células en cultivo. FGF16, FGFRL1, TNFRSF12A, TNFSF12, CXCL1, CCL18, CXCL12, CCL2, CXCL16, CCL7, CXCL2, CCN4, CXCL9, CCR4, CCR5, ANGPT4, GDF1, GDF11, SFRP4, GDF3, GDF4, GDF8, DKK1, LTA, PDGFA, LTB, MADH4, IFNG, GPC5, IGF2R, CHRDL1, GRN, VEGFC, IL13, IL15, EML2, IL15R1, IL1RAP, MMP10, IL2, GZMA, IL21R, IL3, IL6, IL6ST, IL8, HGF y THBS fueron identificados mediante una matriz de anticuerpos. Las proteínas restantes se identificaron mediante CL EM/EM.

**Ejemplo 41. Resultados: las proteínas asociadas a exosomas se localizan en vesículas fosfolipídicas**

Para verificar la presencia de exosomas en el MC, el MC se ultracentrifugó a 200.000g durante dos horas. Se produjo un enriquecimiento de >200 veces de CD9, una proteína asociada a exosomas, en el sedimento, sin nivel detectable de CD9 en el sobrenadante (figura 16). La ultracentrifugación a 100.000g durante una hora no resultó suficiente para sedimentar la totalidad de CD9 (figura 16). La filtración del MC a través de un filtro con un VCPM de 500 kDa, seguido de centrifugación del filtrado o el retenido a 200.000g durante 2 horas generó un sedimento en la fracción de retenido (figura 16). Se encontró que este sedimento se encontraba enriquecido en CD9 que presentaba un PM de 19 kDa. Sin embargo, este sedimento no confirió ninguna cardioprotección en un modelo de ratón de daños por isquemia/reperfusión y los presentes inventores considerado que ello se debe a la necesidad de agitación con vórtex vigorosa y pipeteado para resuspender el sedimento. Se observó que sólo una fracción de CD9 sedimentaba a 100.000g y a 200.000 g durante una hora y que la mayor parte sedimentaba a 200.000g durante dos horas. Una pequeña fracción sedimentaba a 200.000g durante cuatro horas. Conjuntamente, estas observaciones apoyan la hipótesis de los presentes inventores de que el componente activo es un complejo relativamente grande que puede sedimentarse mediante ultracentrifugación.

Para confirmar que las proteínas asociadas a exosomas se encuentran en efecto en los exosomas, es decir vesículas fosfolipídicas, se fraccionó el MC en un gradiente de densidad de sacarosa mediante ultracentrifugación de equilibrio. Al igual que las vesículas lipídicas, la densidad de los exosomas se encontraba comprendida entre 1,13 g m<sup>-1</sup> y 1,19 g m<sup>-1</sup> y flotaban en los gradientes de sacarosa. La flotación en gradientes de sacarosa puede separar fácilmente los exosomas del material contaminante, tal como agregados de proteínas o fragmentos nucleosómicos (Thery *et al.*, 2002). A continuación se analizaron las fracciones del gradiente de sacarosa para la presencia de CD9, CD81, Tsp1, SOD-1 y piruvato cinasa a lo largo del gradiente (figura 17A). Una característica notable es que las proteínas no sedimentaron en la densidad esperada de las proteínas que se correlaciona con su peso molecular. Para determinar si estas densidades aparentes se deben a que las proteínas se encuentran contenidas en vesículas lipídicas, se trató el MC con un tampón de lisis celular (figura 17B) antes de fraccionarlas en un gradiente de densidad de sacarosa. Este pretratamiento con un reactivo de solubilización de membranas plasmáticas restaura cada una de las densidades aparentes a la densidad esperada de las proteínas que se correlaciona con su peso molecular. Por lo tanto, las proteínas asociadas a exosomas se localizan en vesículas lipídicas, lo que es consistente con la hipótesis de exosomas de los presentes inventores.

Para confirmar que existen vesículas lipídicas en el MC, se determinó la concentración de esfingomielina y fosfatidilcolina, los fosfolípidos principales de la membrana plasmática, y de colesterol (figura 17C). Tal como se esperaba, la concentración relativa de estos lípidos por cada µg de proteína era más alta en el MC que en el medio no condicionado. Además, la ultracentrifugación del MC a 200.000g durante 2 horas incrementó significativamente la concentración de los lípidos (figura 17C).

**Ejemplo 42. Resultados: las proteínas exosómicas se encuentran unidas a membrana o encapsuladas**

Debido a que las proteínas asociadas a exosomas incluyen muchas proteínas de membrana conocidas, tales como CD9 y proteínas citosólicas tales como SOD1, los presentes inventores determinaron si estas proteínas se localizaban igualmente sobre la membrana lipídica y el lumen de las vesículas. Se sometió el MC a tripsinización limitada durante el tiempo (figura 18A). CD9, que presenta un PM similar al de SOD1 es relativamente más susceptible a la digestión con tripsina que SOD1. La digestión de SOD1 se observa únicamente después de la digestión de más de 50% de CD9 (figura 18A). Al contrario que la digestión triptica de SOD1, que no generó intermediarios detectables, la digestión triptica de CD9 generó tres intermediarios peptídicos tripticos, sugiriendo que CD9 presenta dominios con diferente sensibilidad a la tripsina. Basándose en la longitud de los intermediarios peptídicos y los sitios tripticos conocidos de CD9, se localizaron tres intermediarios peptídicos tripticos susceptibles en los dominios transmembranales o citoplasmáticos. Lo anterior sugiere que el dominio extracitoplasmático conocido del CD9 celular se encuentra expuesto de manera similar al CD9 secretado y que por lo tanto es sensible a la tripsina, mientras que los dominios transmembranal y citoplasmático no se encuentran expuestos y por lo tanto son relativamente resistentes a la digestión triptica. Conjuntamente, estas observaciones sugieren que CD9, una proteína membranal conocida también se encuentra unida a membrana en el exosoma y se encuentra orientada en la misma dirección que CD9 en la membrana plasmática, mientras que SOD-1 citosólico se localiza en el lumen y podría resultar digerido únicamente en caso de compromiso de la integridad de la membrana por la digestión de

proteínas membranales.

**Ejemplo 43. Resultados: presencia de ARN encapsulado en vesículas lipídicas en la secreción de las CMM**

5 Se ha informado anteriormente que las células secretan ARN en exosomas (Smalheiser, 2007; Taylor y Gercel-Taylor, 2008; Valadi *et al.*, 2007). Para determinar si el ARN se encuentra presente en la secreción cardioprotectora, se extrajo el MC para el ARN mediante Trizol, rindiendo 5 a 6 µg de ARN por cada mg de proteína. Al separarlo en un gel de glioxal-agarosa (figura 19A) o en un urea-PAGE (figura 19B), el ARN contenía niveles indetectables de ARN ribosómico 18S y 28S, siendo la mayor parte del ARN <300 nt. Para determinar si la estabilidad del ARN en la  
10 secreción se debía a su encapsulado dentro de una vesícula fosfolipídica tal como se observa para las proteínas, se trató el MC con ARNasa antes de extraer el ARN. El rendimiento y distribución de tamaños del ARN eran similares a los de MC no tratado (figura 19C), sugiriendo que los ARN secretados se encuentran protegidos frente a la degradación por ARNasa. A continuación, los presentes inventores sometieron a ensayo la posibilidad de que los ARN se encuentran protegidos por una membrana lipídica, de manera similar a una membrana celular, mediante  
15 tratamiento del MC con un tampón de lisis celular basado en SDS, ciclodextrina o fosfolipasa A2. Tras el tratamiento con uno de los cuatro reactivos, se expuso el MC a ARNasa y después se extrajo el ARN. El pretratamiento con un tampón de lisis celular basado en SDS resultó en una pérdida completa de los ARN, mientras que el tratamiento con ciclodextrina o fosfolipasa A2 condujo a una degradación y pérdida parciales de los ARN. Estas observaciones sugieren que el ARN se encuentra protegido de la actividad de ARNasa por una membrana fosfolipídica rica en  
20 colesterol, de manera que la membrana es fácilmente disuelta o comprometida por un tampón de lisis celular basado en SDS, un detergente tal como TritonX-100 que disuelve los lípidos, ciclodextrina que quela y extrae el colesterol, o la degradación por fosfolipasa D. Los presentes inventores observaron además que los ARN de ~70 a 100 nt son más sensibles a la actividad de la ARNasa III que los de menor PM, sugiriendo que los ARN de mayor tamaño son de doble cadena (figura 19D).

25

**Ejemplo 44. Resultados: los ARN secretados son secuestrados en vesículas**

Debido a que se ha demostrado que los ARN se encuentra en vesículas lipídicas, los presentes inventores determinaron seguidamente la densidad de flotación de estas vesículas utilizando la ultracentrifugación de equilibrio  
30 en gradiente de sacarosa. Se cargó MC, MC pretratado con tampón de lisis o un grupo de marcadores de PM del ARN en un gradiente de densidad de sacarosa y se ultracentrifugó, tal como se indica en la figura 4a, b. A continuación se extrajeron los gradientes en trece fracciones y seguidamente se extrajo cada fracción para el ARN. Los ARN secretados se equilibraron a una densidad de entre 1,074 y 1,1170 g/ml (figura 20). En contraste, los marcadores de PM de ARN mostraron una densidad de flotación de entre 1,115 y 1,1170 g/ml y el pretratamiento del  
35 MC con tampón de lisis antes de la centrifugación causó un incremento de la densidad del ARN secretado hasta la de los marcadores de PM de ARN, es decir, 1,115 a 1,145 g/ml (figura 20C). Por lo tanto, estas observaciones son consistentes con que los ARN se encuentren encapsulados en una vesícula lipídica y de esta manera presentan una densidad aparente que es muy inferior a la del ARN soluble. El pretratamiento del MC con tampón de lisis liberó el ARN y resultó en la sedimentación del ARN a la densidad de los marcadores de ARN.

40

**Ejemplo 45. Resultados: las vesículas que contienen ARN no se encuentran en exosomas que contienen CD81**

Tal como se ha mostrado anteriormente, CD9, CD81 y Alix coinmunoprecipitaron con anticuerpos anti-CD81. En la  
45 presente memoria se sometió a ensayo si el ARN también inmunoprecipitaba con CD81. Tras la inmunoprecipitación, el ARN no se encontraba presente en el precipitado sino que se mantenía en el sobrenadante (figura 21). Por lo tanto, los ARN secretados no resultan secuestrados en las vesículas CD81<sup>+</sup>, CD81<sup>+</sup> CD9<sup>+</sup> o CD81<sup>+</sup> CD9<sup>+</sup> Alix<sup>+</sup>.

50

**Ejemplo 46. Resultados: los ARN secretados contienen microARN que incluyen pre-ARNip**

Se ha informado de que los exosomas contienen microARN (Smalheiser, 2007; Taylor y Gercel-Taylor, 2008; Valadi  
55 *et al.*, 2007) y debido a que la mayor parte de los ARN en el MC son menores de 300 nt, los presentes inventores sometieron a ensayo el ARN de las CMM y de su MC para la presencia de microARN (ARNip) llevando a cabo una hibridación de micromatrices. Se detectaron 149 miARNen las CMM y 63 fueron detectadas en el MC (figura 22A, Tabla E3, a continuación).

hsa-let-7a	hsa-miR-24-2*	hsa-miR-98	hsa-miR-149*	hsa-miR-214	hsa-miR-484
hsa-let-7b	hsa-miR-25	hsa-miR-99a	hsa-miR-151-3p	hsa-miR-221	hsa-miR-491-5p
hsa-let-7c	hsa-miR-26a	hsa-miR-99b	hsa-miR-151-5p	hsa-miR-222	hsa-miR-503
hsa-let-7d	hsa-miR-26b	hsa-miR-100	hsa-miR-152	hsa-miR-320	hsa-miR-505*
hsa-let-7e	hsa-miR-27a	hsa-miR-103	hsa-miR-155	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-532-5p
hsa-let-7f	hsa-miR-27b	hsa-miR-106a	hsa-miR-181a	hsa-miR-328	hsa-miR-574-3p
hsa-let-7g	hsa-miR-27b*	hsa-miR-106b	hsa-miR-181a*	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-574-5p
hsa-let-7i	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-107	hsa-miR-181a-2*	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-575
hsa-miR-10a	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-181b	hsa-miR-335	hsa-miR-584
hsa-miR-15a	hsa-miR-29a	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-181c	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-612
hsa-miR-15b	hsa-miR-29c	hsa-miR-125b	hsa-miR-181d	hsa-miR-345	hsa-miR-625
hsa-miR-16	hsa-miR-30a	hsa-miR-126	hsa-miR-185	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-629
hsa-miR-17	hsa-miR-30a*	hsa-miR-128	hsa-miR-186	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-638
hsa-miR-18a	hsa-miR-30b	hsa-miR-130a	hsa-miR-187*	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-663
hsa-miR-18b	hsa-miR-30c	hsa-miR-130b	hsa-miR-191	hsa-miR-365	hsa-miR-671-5p
hsa-miR-19b	hsa-miR-30d	hsa-miR-132	hsa-miR-191*	hsa-miR-374b	hsa-miR-708
hsa-miR-20a	hsa-miR-30e	hsa-miR-137	hsa-miR-192	hsa-miR-421	hsa-miR-744
hsa-miR-20b	hsa-miR-30e*	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-766
hsa-miR-21	hsa-miR-31	hsa-miR-143	hsa-miR-195	hsa-miR-424	hsa-miR-768-3p
hsa-miR-22	hsa-miR-31*	hsa-miR-145	hsa-miR-197	hsa-miR-424*	hsa-miR-768-5p
hsa-miR-22*	hsa-miR-34a	hsa-miR-145*	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-425	hsa-miR-769-5p
hsa-miR-23a	hsa-miR-34a*	hsa-miR-146a	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-425*	hsa-miR-877
hsa-miR-	hsa-miR-	hsa-miR-	hsa-miR-	hsa-miR-	hsa-miR-923

23a*	92a	146b-5p	199b-5p	454	
hsa-miR-23b	hsa-miR-92b	hsa-miR-148b	hsa-miR-210	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-940
hsa-miR-24	hsa-miR-93	hsa-miR-149	hsa-miR-212	hsa-miR-483-5p	
hsa-let-7b*	hsa-miR-124	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-765	hsa-miR-1228	hsa-miR-1238
hsa-let-7d*	hsa-miR-150*	hsa-miR-493*	hsa-miR-933	hsa-miR-1234	
hsa-miR-122	hsa-miR-198	hsa-miR-572	hsa-miR-1224-5p	hsa-miR-1237	

Tabla E3. Lista de miARNen CMM y MC determinado mediante hibridación de micromatrices.

5 Se encontraban presentes 47 miARNtanto en CMM como MC. Estos eran: hsa-let-7a, hsa-miR-149\*, hsa-miR-214, hsa-let-7b, hsa-miR-221, hsa-let-7c, hsa-miR-26a, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-222, hsa-let-7d, hsa-miR-100, hsa-miR-320, hsa-let-7e, hsa-miR-103, hsa-let-7f, hsa-miR-181a, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-let-7i, hsa-miR-107, hsa-miR-575, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-638, hsa-miR-663, hsa-miR-191, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-132, hsa-miR-191\*, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-21, hsa-miR-31, hsa-miR-143, hsa-miR-22, hsa-miR-145, hsa-miR-23a, hsa-miR-146a, hsa-miR-425\*, hsa-miR-92a, hsa-miR-923, hsa-miR-23b, hsa-miR-940, hsa-miR-24, hsa-miR-149 y hsa-miR-483-5p.

10 Eran detectables 16 miARNen el MC pero se encontraban presentes a niveles inferiores al nivel de detección en las CMM. Estos eran: hsa-let-7b\*, hsa-miR-124, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-765, hsa-miR-1228, hsa-miR-1238, hsa-let-7d\*, hsa-miR-150\*, hsa-miR-493\*, hsa-miR-933, hsa-miR-1234, hsa-miR-122, hsa-miR-198, hsa-miR-572, hsa-miR-1224-5p y hsa-miR-1237.

15 Los miARNsiguientes se encuentran presentes únicamente en CMM: hsa-miR-24-2\*, hsa-miR-98, hsa-miR-484, hsa-miR-25, hsa-miR-99a, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-99b, hsa-miR-503, hsa-miR-26b, hsa-miR-152, hsa-miR-505\*, hsa-miR-27a, hsa-miR-155, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-27b, hsa-miR-106a, hsa-miR-328, hsa-let-7g, hsa-miR-27b\*, hsa-miR-106b, hsa-miR-181a\*, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-181a-2\*, hsa-miR-331,3p, hsa-miR-10a, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-181, hsa-miR-335, hsa-miR-584, hsa-miR-15a, hsa-miR-29a, hsa-miR-181c, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-612, hsa-miR-15b, hsa-miR-29c, hsa-miR-181d, hsa-miR-345, hsa-miR-625, hsa-miR-16, hsa-miR-30a, hsa-miR-126, hsa-miR-185, hsa-miR-629, hsa-miR-17, hsa-miR-30a\*, hsa-miR-128, hsa-miR-186, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-18a, hsa-miR-30b, hsa-miR-130a, hsa-miR-187\*, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-18b, hsa-miR-30c, hsa-miR-130b, hsa-miR-365, hsa-miR-19b, hsa-miR-30d, hsa-miR-374b, hsa-miR-708, hsa-miR-20a, hsa-miR-30e, hsa-miR-137, hsa-miR-192, hsa-miR-421, hsa-miR-744, hsa-miR-20b, hsa-miR-30e\*, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-766, hsa-miR-195, hsa-miR-424, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-31\*, hsa-miR-197, hsa-miR-424\*, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-22\*, hsa-miR-34a, hsa-miR-145\*, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-425, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-34a\*, hsa-miR-199-5p, hsa-miR-877, hsa-miR-23a\*, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-454, hsa-miR-92b, hsa-miR-148b, hsa-miR-210, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-93 y hsa-miR-212.

20 El análisis de micromatrices indicó además que el MC contenía niveles significativos de miARNanti-guía (indicado con un asterisco). Por ejemplo, las proporciones relativas de let7b a let7b\*, de let7d a let7d\* y de miR-191 a miR-191\* en el MC son mucho menores que en las CMM (figura 22B). En las células el corte del pre-ARNip tallo-bucle genera el miARNguía maduro y el miARN\* antiguía. Este último habitualmente resulta degradado en la célula. Una posible explicación para la baja proporción de miARNguía a miARNanti-guía es que los microARN en la secreción son pre-ARNip y no ARN maduros. Resulta consistente con esta posibilidad las observaciones de los presentes inventores de que los ARN de 70 a 100 nt de ARN son de doble cadena (figura 19D). Para confirmar este resultado, se llevó a cabo análisis de PCR de ARN transcrito inversamente utilizando cebadores específicos para ARNm guía y pre-ARNip con o sin tratamiento previo de ARNasa III. El tratamiento de ARNasa III confirma la presencia de pre-ARNip mediante degradación del pre-ARNip, haciendo que resulte indetectable mediante RT-PCR.

35 **Ejemplo 47. Resultados: la secreción cardioprotectora contiene únicamente partículas con un radio hidrodinámico de 45 a 55 nm en el intervalo detectable de 1 a 1.000 nm**

45 Para confirmar que la secreción contenía complejos grandes, en primer lugar se separó MC y MNC mediante exclusión por tamaño en una HPLC (figura 13) y cada pico eluido medio a partir de la absorbancia a 220 nm seguidamente se examinó para dispersión dinámica de la luz (DDL) utilizando un detector cuasi-elástico de dispersión de la luz (DDLDC).

Sólo un pico eluido con un tiempo de retención de 11 a 13 minutos mostró una dispersión dinámica de la luz y el  $r_h$  de las partículas en este pico era de aproximadamente 45 a 55 nm. Los otros picos eluidos con un tiempo de retención de 13 a 16 y 17 a 19 minutos no mostraron dispersión dinámica de la luz. Debido a que el intervalo de detección de  $r_h$  de la DDL es de 1 a 1.000 nm y el diámetro de una alfa-hélice de ADN es de 2 nm, las proteínas globulares son de 1 a 10 nm, el poro nuclear (50 nm), los virus grandes (100 nm) y las mitocondrias son de 3  $\mu$ m, la DDL es por lo tanto capaz de detectar la mayoría de las partículas biológicas.

Basándose en la observación de los presentes inventores de que la cardioprotección se asocia a una fracción que presenta un PM de >1.000 kDa, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que el pico de elución en un tiempo de retención de 12 minutos era el componente activo.

Para confirmar lo anterior, se recolectó dicho pico eluido y se sometió a ensayo en un modelo de ratón de isquemia miocárdica/daño por reperfusión tal como se ha descrito con anterioridad (Timmers *et al.*, 2008).

**Referencias (incluyendo para los Ejemplos 1 a 18)**

1. Lewis EF, Moye LA, Rouleau JL, et al. Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *J Am Coll Cardiol.* Oct 15 2003;42(8):1446-1453.
2. Kleiman NS, White HD, Ohman EM, et al. Mortality within 24 hours of thrombolysis for myocardial infarction. The importance of early reperfusion. The GUSTO Investigators, Global Utilization of Streptokinase and Tissue Plasminogen Activator for Occluded Coronary Arteries. *Circulation.* Dec 1994;90(6):2658-2665.
3. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation.* Jan 21 1997;95(2):320-323.
4. Smits AM, van Vliet P, Hassink RJ, et al. The role of stem cells in cardiac regeneration. *J Cell Mol Med.* Jan-Mar 2005;9(1):25-36.
5. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* Apr 2 2003;41(7):1078-1083.
6. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation.* May 13 2003;107(18):2294-2302.
7. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* Jun 2002;73(6):1919-1925; discussion 1926.
8. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* Oct 8 2002;106(15):1913-1918.
9. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* Jul 9 2004;95(1):9-20.
10. Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood).* Jan 2006;231(1):39-49.
11. Zimmet JM, Hare JM. Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy. *Basic Res Cardiol.* Nov 2005;100(6):471-481.
12. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* Aug 1 2006;98(5):1076-1084.
13. Gnecci M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* Apr 2005;11(4):367-368.
14. Gnecci M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J.* Apr 2006;20(6):661-669.
15. Lian Q, Lye E, Suan Yeo K, et al. Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24- differentiated human ESCs. *Stem Cells.* Feb 2007;25(2):425-436.
16. Sze SK, de Kleijn DP, Lai RC, et al. Elucidating the secretion proteome of human ESC-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics.* Jun 11 2007.

- 5
17. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Differences in reperfusion length following 30 minutes of ischemia in the rabbit influence infarct size, as measured by triphenyltetrazolium chloride staining. *J Mol Cell Cardiol.* Feb 1997;29(2):657-666.
18. Timmers L, Sluijter JP, Verlaan CW, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition increases mortality, enhances left ventricular remodeling, and impairs systolic function after myocardial infarction in the pig. *Circulation.* Jan 23 2007;115(3):326-332.
- 10
19. Steendijk P, Baan J, Jr., Van der Velde ET, et al. Effects of critical coronary stenosis on global systolic left ventricular function quantified by pressure-volume relations during dobutamine stress in the canine heart. *J Am Coll Cardiol.* Sep 1998;32(3):816-826.
- 15
20. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res.* Feb 15 2004;61(3):448-460.
- 20
21. Dumont EA, Reutelingsperger CP, Smits JF, et al. Real-time imaging of apoptotic cell-membrane changes at the single-cell level in the beating murine heart. *Nat Med.* Dec 2001;7(12):1352-1355.
22. Eefting F, Rensing B, Wigman J, et al. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* Feb 15 2004;61(3):414-426.
- 25
23. Mirosou M, Zhang Z, Deb A, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* Jan 30 2007;104(5):1643-1648.
24. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* Aug 18 2000;47(3):446-456.
- 30
25. Redondo S, Ruiz E, Santos-Gallego CG, et al. Pioglitazone induces vascular smooth muscle cell apoptosis through a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, transforming growth factor-beta1, and a Smad2-dependent mechanism. *Diabetes.* Mar 2005;54(3):811-817.
- 35
26. Bolli R, Zughbaib M, Li XY, et al. Recurrent ischemia in the canine heart causes recurrent bursts of free radical production that have a cumulative effect on contractile function. A pathophysiological basis for chronic myocardial "stunning". *J Clin Invest.* Aug 1995;96(2):1066-1084.
- 40
27. Dai W, Hale SL, Kloner RA. Role of a paracrine action of mesenchymal stem cells in the improvement of left ventricular function after coronary artery occlusion in rats. *Regen Med.* Jan 2007;2(1):63-68.
28. Bolli R, Becker L, Gross G, et al. Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ Res.* Jul 23 2004;95(2):125-134.

45 **Referencias (incluyendo para los Ejemplos 19 a 30)**

1. Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy.* 2005;7(1):36-45.
- 50
2. Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2005;5(12):1571-1584.
- 55
3. Hui JH, Ouyang HW, Hutmacher DW, Goh JC, Lee EH. Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering: a review of recent advances in National University of Singapore. *Ann Acad Med Singapore.* 2005;34(2):206-212.
4. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 2005;11(7-8):1198-1211.
- 60
5. Menasche P. The potential of embryonic stem cells to treat heart disease. *Curr Opin Mol Ther.* 2005;7(4):293-299.
6. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol.* 2005;23(7):845-856.
- 65
7. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006.

8. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Epstein SE. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res.* 2004;95(4):354-363.
- 5 9. Leedham SJ, Brittan M, McDonald SA, Wright NA. Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med.* 2005;9(1):11-24.
10. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(1):F31-42.
- 10 11. Patschan D, Plotkin M, Goligorsky MS. Therapeutic use of stem and endothelial progenitor cells in acute renal injury: ca ira. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6(2):176-183.
- 15 12. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med.* 2006;12(4):459-465.
- 20 13. Gnecchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J.* 2006;20(6):661-669.
14. Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005;11 (4):367-368.
- 25 15. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem.* 2005;95(4):827-839.
- 30 16. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(12):2542-2547.
- 35 17. Van Overstraeten-Schlogel N, Beguin Y, Gothot A. Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *Eur J Haematol.* 2006.
18. Cheng L, Qasba P, Vanguri P, Thiede MA. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and proplatelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol.* 2000;184(1):58-69.
- 40 19. Lian Q, Lye E, Suan Yeo K, Khia Way Tan E, Salto-Tellez M, Liu TM, Palanisamy N, El Oakley RM, Lee EH, Lim B, Lim SK. Derivation of Clinically Compliant MSCs from CD105+, CD24- Differentiated Human ESCs. *Stem Cells.* 2007;25(2):425-436.
- 45 20. Sze SK, de Kleijn DP, Lai RC, Khia Way Tan E, Zhao H, Yeo KS, Low TY, Lian Q, Lee CN, Mitchell W, El Oakley RM, Lim SK. Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6(10):1680-1689.
21. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983;33(3):967-978.
- 50 22. Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(4):415-421.
23. Shen V, Kiledjian M. A view to a kill: structure of the RNA exosome. *Cell.* 2006; 127(6):1093-1095.
- 55 24. Johnstone RM. The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. *Biochem Cell Biol.* 1992;70(3-4):179-190.
25. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci.* 2000;113 Pt 19:3365-3374.
- 60 26. de Gassart A, Geminard C, Hoekstra D, Vidal M. Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? *Traffic (Copenhagen, Denmark).* 2004;5(11):896-903.
- 65 27. Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol.* 2004;12(7):310-316.

28. Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol.* 2005;27(3):375-387.
- 5 29. Aoki N. Regulation and functional relevance of milk fat globules and their components in the mammary gland. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70(9):2019-2027.
30. Delcayre A, Le Pecq JB. Exosomes as novel therapeutic nanodevices. *Curr Opin Mol Ther.* 2006;8(1):31-38.
- 10 31. Johnstone RM. Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36(2):315-321.
32. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett.* 2006;107(2):102-108.
- 15 33. van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem (Tokyo).* 2006;140(1):13-21.
34. Hao S, Moyana T, Xiang J. Review: cancer immunotherapy by exosome-based vaccines. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals.* 2007;22(5):692-703.
- 20 35. Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie.* 2007;89(2):205-212.
36. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-659.
- 25 37. Fevrier B, Vilette D, Laude H, Raposo G. Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic (Copenhagen, Denmark).* 2005;6(1):10-17.
38. Mallegol J, van Niel G, Heyman M. Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;35(1):11-16.
- 30 39. Porto-Carreiro I, Fevrier B, Paquet S, Vilette D, Raposo G. Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;35(2): 143-148.
- 35 40. Soderberg A, Barral AM, Soderstrom M, Sander B, Rosen A. Redox-signaling transmitted in trans to neighboring cells by melanoma-derived TNF-containing exosomes. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(1):90-99.
41. Calzolari A, Raggi C, Deaglio S, Sposi NM, Stafsnes M, Fecchi K, Parolini I, Malavasi F, Peschle C, Sargiacomo M, Testa U. Tlr2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 21):4486-4498.
- 40 42. de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood.* 2003;102(13):4336-4344.
- 45 43. London E, Brown DA. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta.* 2000;1508(1-2):182-195.
44. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101 (26):9683-9688.
- 50 45. Keller S, Rupp C, Stoeck A, Runz S, Fogel M, Lugert S, Hager HD, Abdel-Bakky MS, Gutwein P, Altevogt P. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int.* 2007;72(9):1095-1102.
46. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Differences in reperfusion length following 30 minutes of ischemia in the rabbit influence infarct size, as measured by triphenyltetrazolium chloride staining. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(2):657-666.
- 55 47. Timmers L, Sluijter JP, Verlaan CW, Steendijk P, Cramer MJ, Emons M, Strijder C, Grundeman PF, Sze SK, Hua L, Piek JJ, Borst C, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Cyclooxygenase-2 inhibition increases mortality, enhances left ventricular remodeling, and impairs systolic function after myocardial infarction in the pig. *Circulation.* 2007;115(3):326-332.
- 60 48. Steendijk P, Baan J, Jr., Van der Velde ET, Baan J. Effects of critical coronary stenosis on global systolic left ventricular function quantified by pressure-volume relations during dobutamine stress in the canine heart. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(3):816-826.
- 65

**Referencias (incluyendo para los Ejemplos 31 a 47)**

- 5 Caplan, A.I., and Dennis, J.E. (2006a). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98, 1076-1084.
- Caplan, A.I., and Dennis, J.E. (2006b). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*.
- 10 Fevrier, B., and Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16, 415-421.
- Gnecchi, M., He, H., Liang, O.D., Melo, L.G., Morello, F., Mu, H., Noiseux, N., Zhang, L., Pratt, R.E., Ingwall, J.S., et al. (2005). Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 11, 367-368.
- 15 Gnecchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O.D., Zhang, L., Morello, F., Mu, H., Melo, L.G., Pratt, R.E., Ingwall, J.S., et al. (2006). Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J* 20, 661-669.
- 20 Keller, S., Sanderson, M.P., Stoeck, A., and Altevogt, P. (2006). Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* 107, 102-108.
- Lian, Q., Lye, E., Suan Yeo, K., Khia Way Tan, E., Salto-Tellez, M., Liu, T.M., Palanisamy, N., El Oakley, R.M., Lee, E.H., Lim, B., et al. (2007). Derivation of Clinically Compliant MSCs from CD105+, CD24- Differentiated Human ESCs. *Stem Cells* 25, 425-436.
- 25 Liu, C.H., and Hwang, S.M. (2005). Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine* 32, 270-279.
- 30 Minguell, J.J., and Erices, A. (2006). Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 39-49.
- Olver, C., and Vidal, M. (2007). Proteomic analysis of secreted exosomes. *Subcellular biochemistry* 43, 99-131.
- 35 Pittenger, M.F., and Martin, B.J. (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95, 9-20.
- Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Henriksen, K., Parvinen, M., and Voipio-Pulkki, L.M. (1997). Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 95, 320-323.
- 40 Schafer, R., and Northoff, H. (2008). Cardioprotection and cardiac regeneration by mesenchymal stem cells. *Panminerva medica* 50, 31-39.
- Smalheiser, N.R. (2007). Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biology direct* 2, 35.
- 45 Sze, S.K., de Kleijn, D.P., Lai, R.C., Khia Way Tan, E., Zhao, H., Yeo, K.S., Low, T.Y., Lian, Q., Lee, C.N., Mitchell, W., et al. (2007). Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics* 6, 1680-1689.
- 50 Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 110, 13-21.
- Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569-579.
- 55 Timmers, L., Lim, S.-K., Arslan, F., Armstrong, J.S., Hoefler, I.E., Doevendans, P.A., Piek, J.J., El Oakley, R.M., Choo, A., Lee, C.N., et al. (2008). Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Research* 1, 129-137.
- 60 Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654-659.
- Zimmet, J.M., and Hare, J.M. (2005). Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy. *Basic Res Cardiol* 100, 471-481.
- 65

Diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos descritos y sistema de la invención resultarán evidentes para el experto en la materia sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la invención ha sido descrita haciendo referencia a formas de realización preferidas específicas, debe apreciarse que la invención según las reivindicaciones no debe considerarse indebidamente limitada a dichas formas de realización específicas y que pueden introducirse muchas modificaciones y adiciones a las mismas comprendidas dentro del alcance de la invención. En efecto, diversas modificaciones de los modos descritos de poner en práctica la invención que resultan evidentes para el experto en biología molecular o campos relacionados se pretende que se encuentren comprendidas dentro del alcance según las reivindicaciones. Además, pueden realizarse diversas combinaciones de las características de las reivindicaciones dependientes siguientes con las características de las reivindicaciones independientes sin apartarse del alcance de la presente invención.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Exosoma aislado a partir de una célula troncal mesenquimatosa y que presenta un tamaño de entre 50 nm y 100 nm según se determina mediante microscopía electrónica, comprendiendo el exosoma por lo menos una propiedad biológica de una célula troncal mesenquimatosa, tal como una actividad biológica de un medio condicionado por una célula troncal mesenquimatosa (CMM-MC).
2. Exosoma según la reivindicación 1, en el que la actividad biológica comprende la cardioprotección.
- 10 3. Exosoma según la reivindicación 1 o 2, que puede reducir el tamaño del infarto por ejemplo tal como se somete a ensayo en un modelo de ratón o cerdo de isquemia miocárdica y daño por reperfusión, o que puede reducir el estrés oxidativo, por ejemplo tal como se somete a ensayo en un ensayo *in vitro* de muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- 15 4. Exosoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el exosoma comprende por lo menos 70% de proteínas en un medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC), tal como las seleccionadas de la lista representada en la Tabla D1 o E2 o son productos génicos de los genes representados en la Tabla D2 o que comprenden uno o más miARN como los representados en la Tabla E3.
- 20 5. Exosoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el exosoma comprende: (a) un complejo de peso molecular >100 kDa, por ejemplo que comprende proteínas de <100 kDa; (b) un complejo de peso molecular >300 kDa, por ejemplo que comprende proteínas de <300 kDa; o (c) un complejo de peso molecular >1.000 kDa.
- 25 6. Exosoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el exosoma presenta un tamaño de entre 50 nm y 100 nm según se determina mediante filtración con un filtro de 0,2 µm y concentración con una membrana con un valor de corte de peso molecular de 10 kDa, o un radio hidrodinámico inferior a 100 nm, tal como entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 70 nm, entre aproximadamente 40 nm y aproximadamente 60 nm, tal como entre aproximadamente 45 nm y aproximadamente 55 nm, tal como aproximadamente 50 nm, por ejemplo tal como se determina mediante difracción láser o dispersión dinámica de la luz.
- 30 7. Exosoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el exosoma comprende un lípido seleccionado de entre el grupo que consiste en: fosfolípido, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, esfingomielina, ceramidas, glucolípido, cerebrosido, esteroides, colesterol, por ejemplo en el que la proporción de colesterol-fosfolípido es superior a 0,3-0,4 (moles/moles).
- 35 8. Exosoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el exosoma comprende una balsa lipídica, o en el que el exosoma es insoluble en detergente no iónico, preferentemente Triton-X100 o en el que el exosoma es tal que las proteínas de los pesos moleculares especificados en la reivindicación 4 permanecen sustancialmente en los complejos de los pesos moleculares especificados en dichas reivindicaciones cuando el exosoma es tratado con un detergente no iónico, o en el que el exosoma es sensible a la ciclodextrina, preferentemente ciclodextrina 20 mM, de manera que por ejemplo el tratamiento con ciclodextrina causa una disolución sustancial de los complejos especificados en la reivindicación 5.
- 40 9. Exosoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el exosoma comprende ácido ribonucleico (ARN), preferentemente en el que el exosoma presenta una proporción de absorbancia de 1,9 (260:280 nm), o en el que el exosoma comprende un antígeno de superficie seleccionado de entre el grupo que consiste en: CD9, CD109 y thy-1.
- 45 10. Procedimiento para producir un exosoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el procedimiento: (a) obtener un medio condicionado por células troncales mesenquimatosas (CMM-MC); (b) concentrar el medio condicionado por células troncales mesenquimatosas; (c) someter el medio condicionado por células troncales mesenquimatosas concentrado a una cromatografía de exclusión por tamaño; y (d) seleccionar las fracciones absorbentes de UV.
- 50 11. Composición farmacéutica que comprende un exosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 conjuntamente con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 12. Exosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o composición farmacéutica según la reivindicación 11 para la utilización en un método de tratamiento de una enfermedad.
- 60 13. Utilización de un exosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de una enfermedad, en la que la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en: insuficiencia cardíaca, enfermedad de la médula ósea, enfermedad de la piel, quemaduras y enfermedades degenerativas tales como la diabetes, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el cáncer, el infarto de miocardio, una herida cutánea, un trastorno dermatológico, una lesión
- 65

5 dermatológica, la dermatitis, la soriasis, el condiloma, las verrugas, el hemangioma, los queloides, el cáncer de piel, la dermatitis atópica, la enfermedad de Behcet, la enfermedad granulomatosa crónica, el linfoma cutáneo de linfocitos T, la ulceración, un estado patológico caracterizado por que presenta lesión inicial que induce inflamación y desregulación inmunológica que conduce al remodelado crónico de los tejidos, incluyendo fibrosis y pérdida de función, la lesión isquémica renal, la fibrosis quística, la sinusitis y la rinitis o una enfermedad ortopédica.

14. Sistema de administración para administrar un exosoma, que comprende un exosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 conjuntamente con un dispensador que puede hacerse funcionar para administrar el exosoma a una diana.

FIGURA 1A

**A**                      **No MC**

---



**FIGURA 1B**

**B**                      **CMM-MC**

---



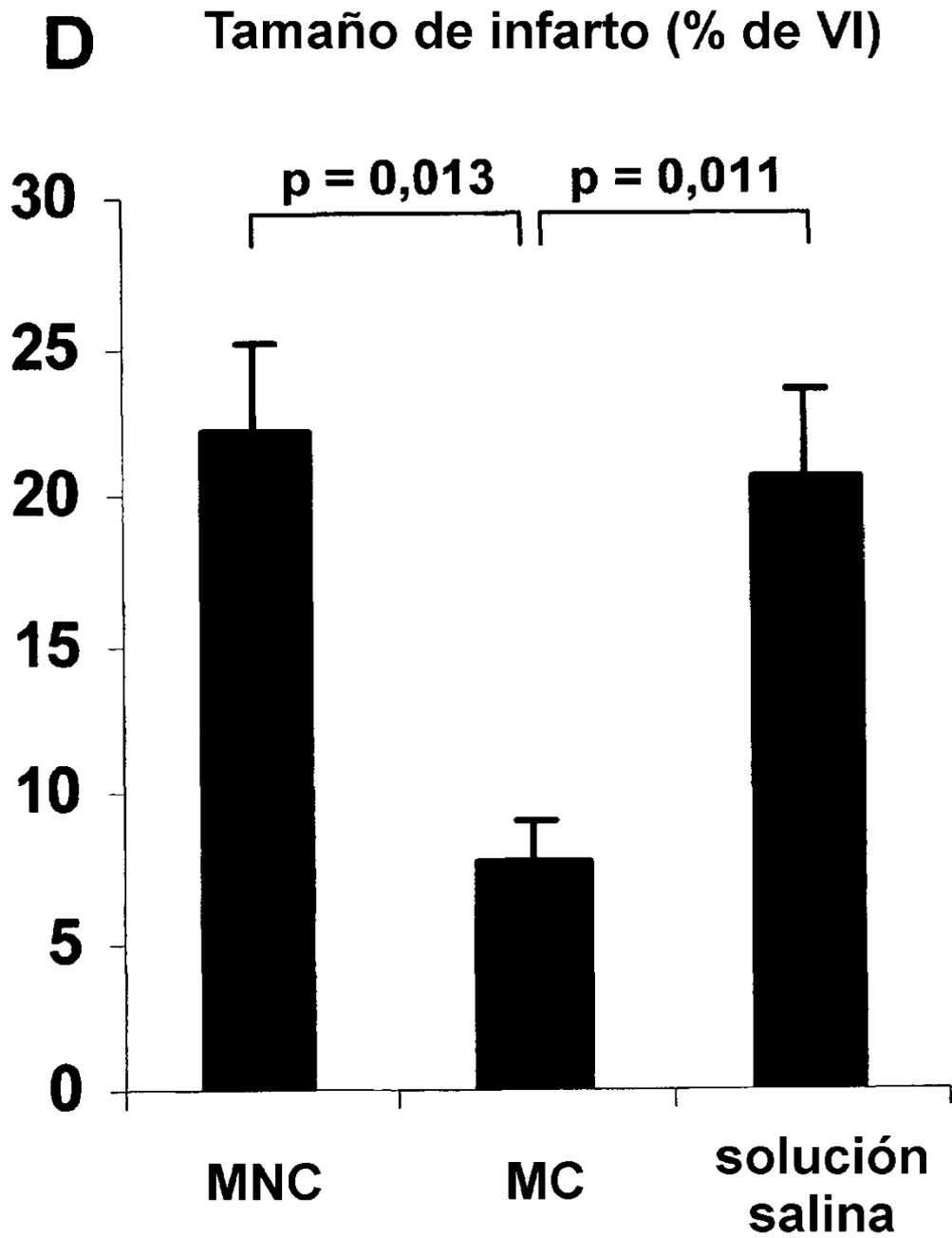
**FIGURA 1C**

**C Solución salina**

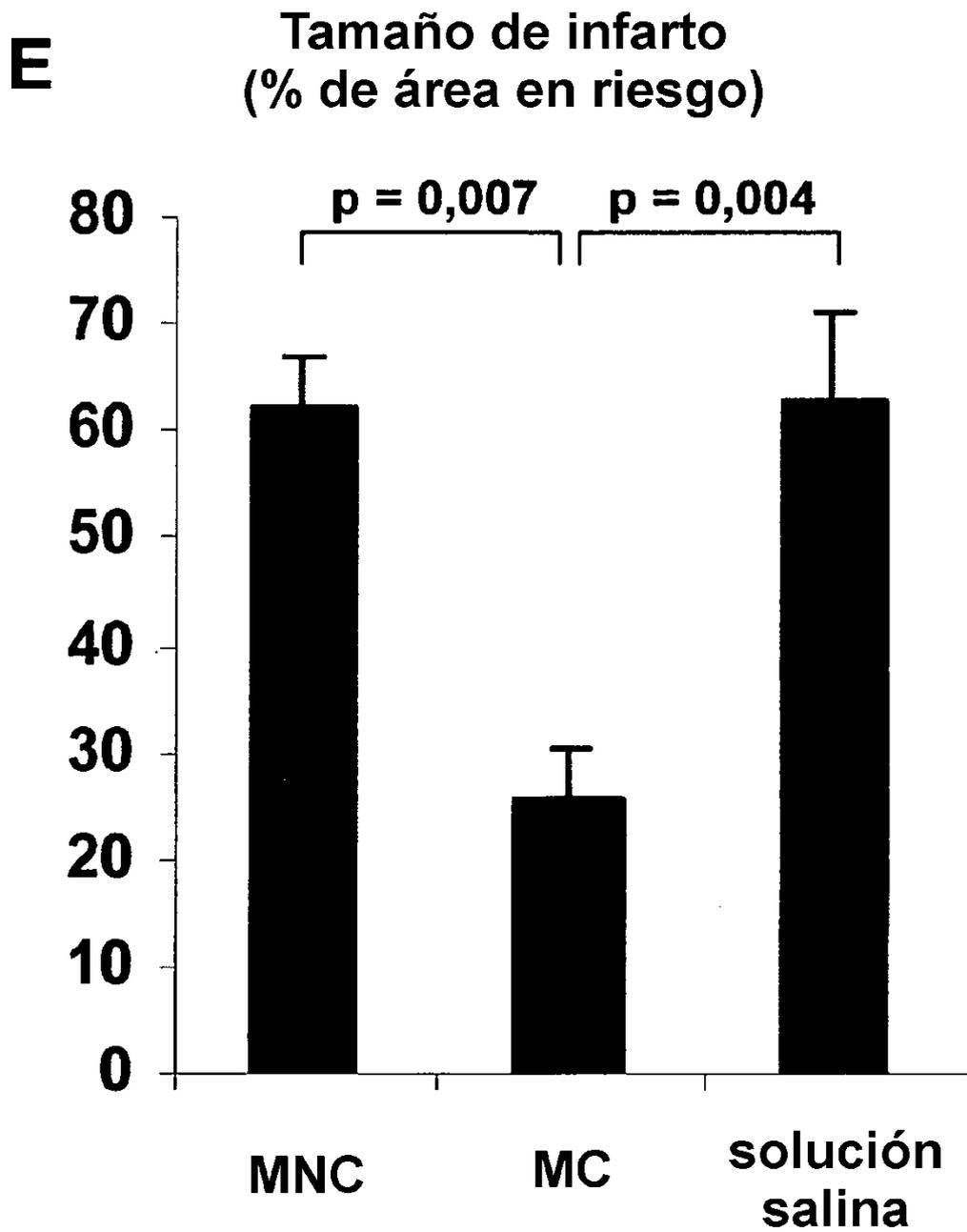
---



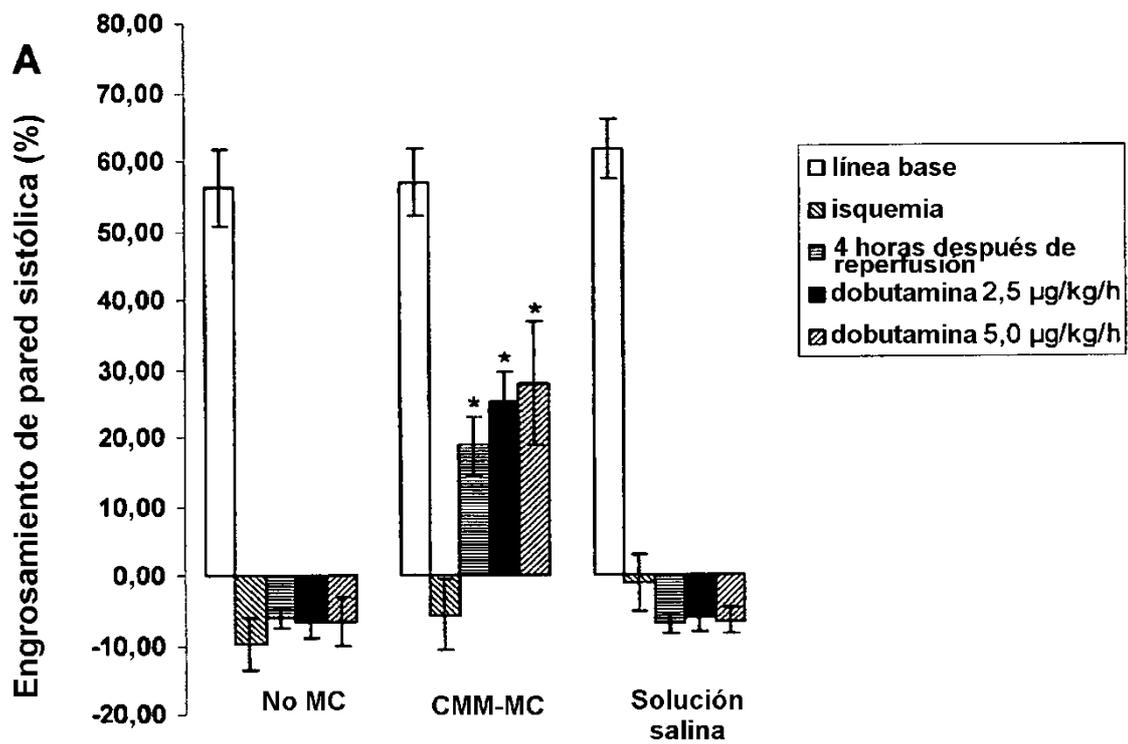
**FIGURA 1D**



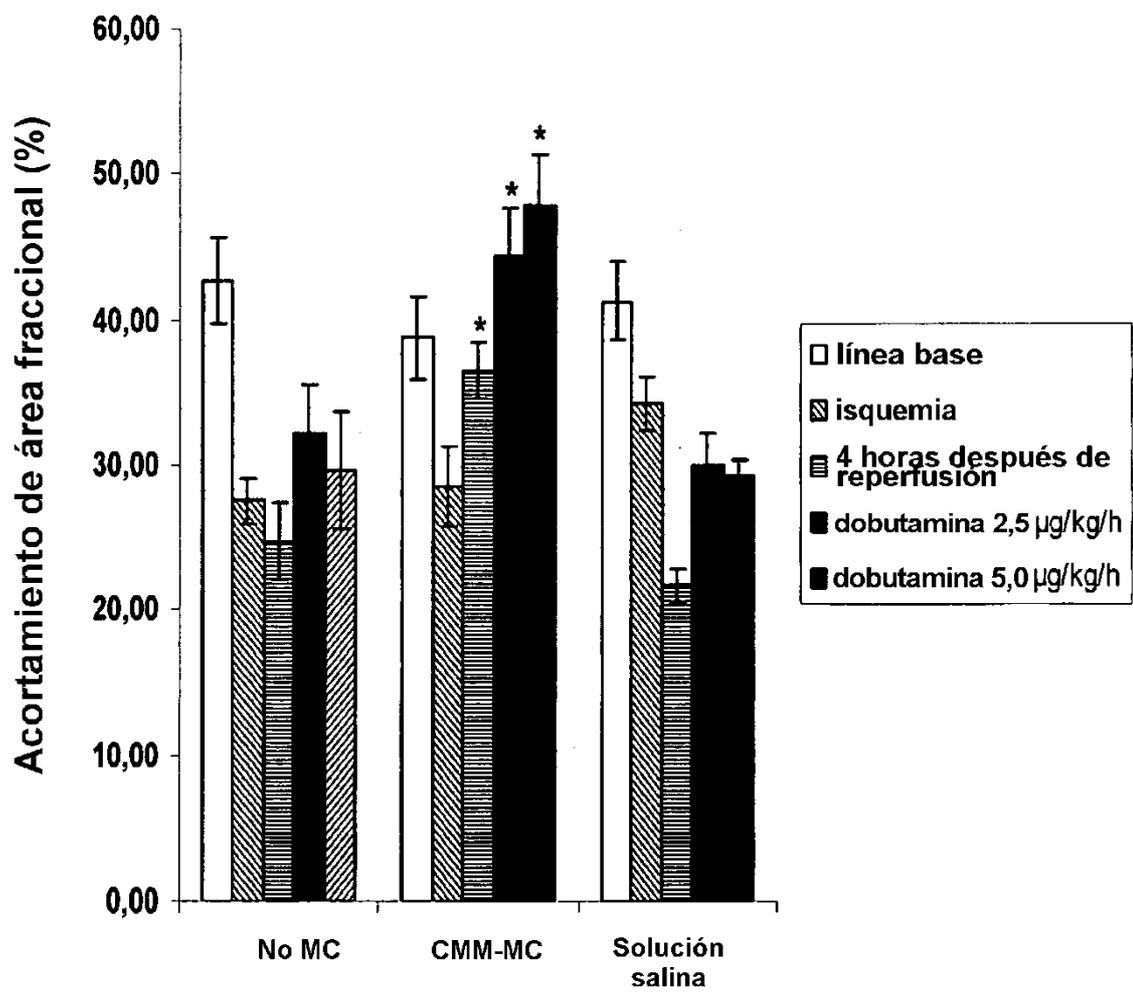
**FIGURA 1E**



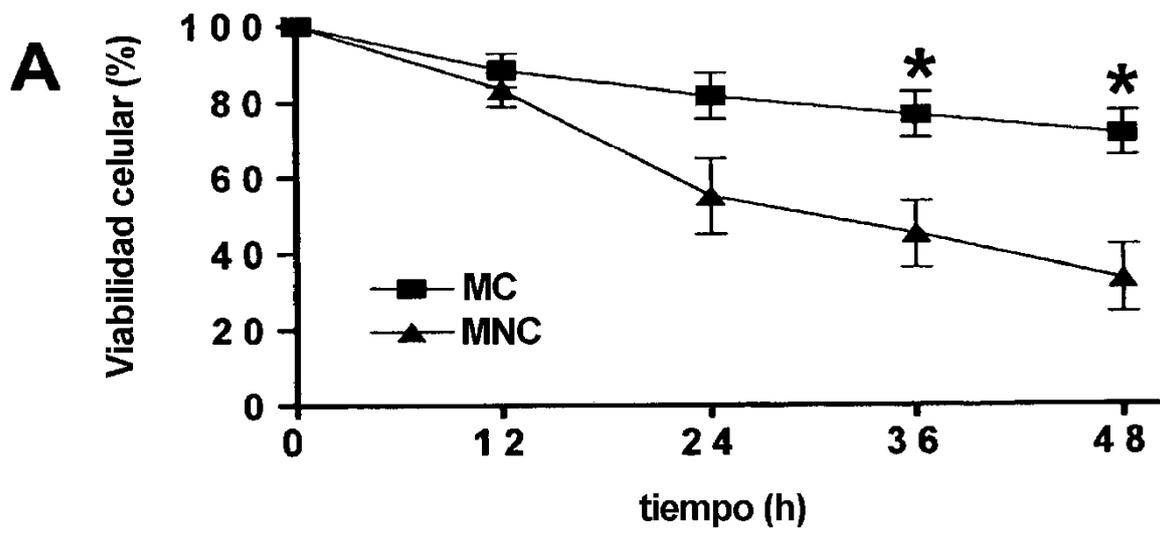
**FIGURA 2A**



**FIGURA 2B**



**FIGURA 3A**



**FIGURA 3B**

**No MC**  
**B**

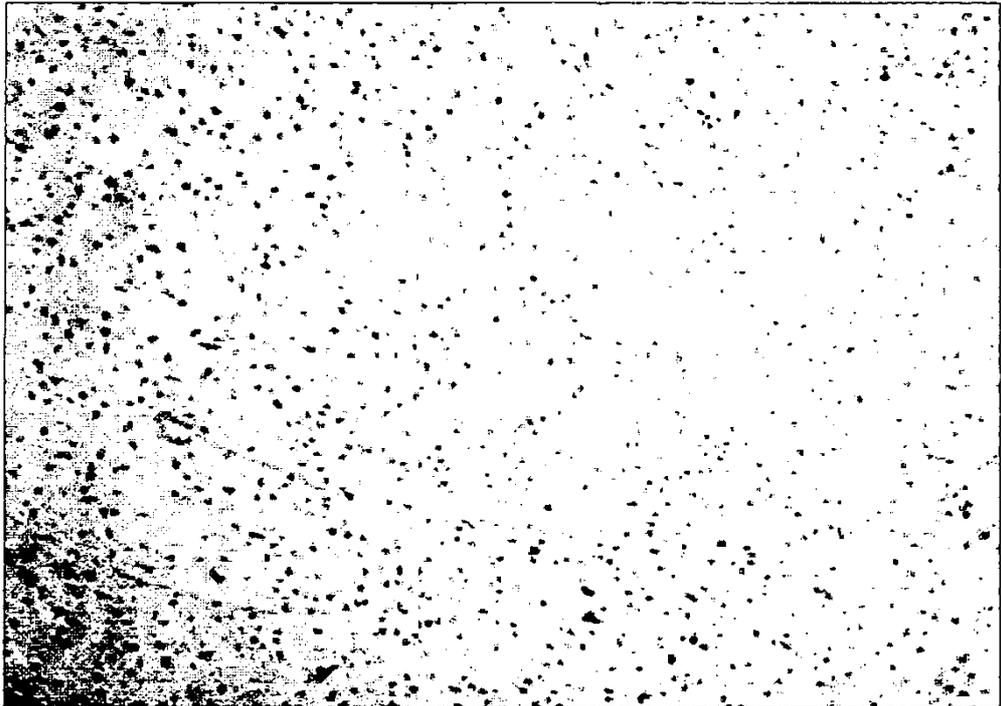
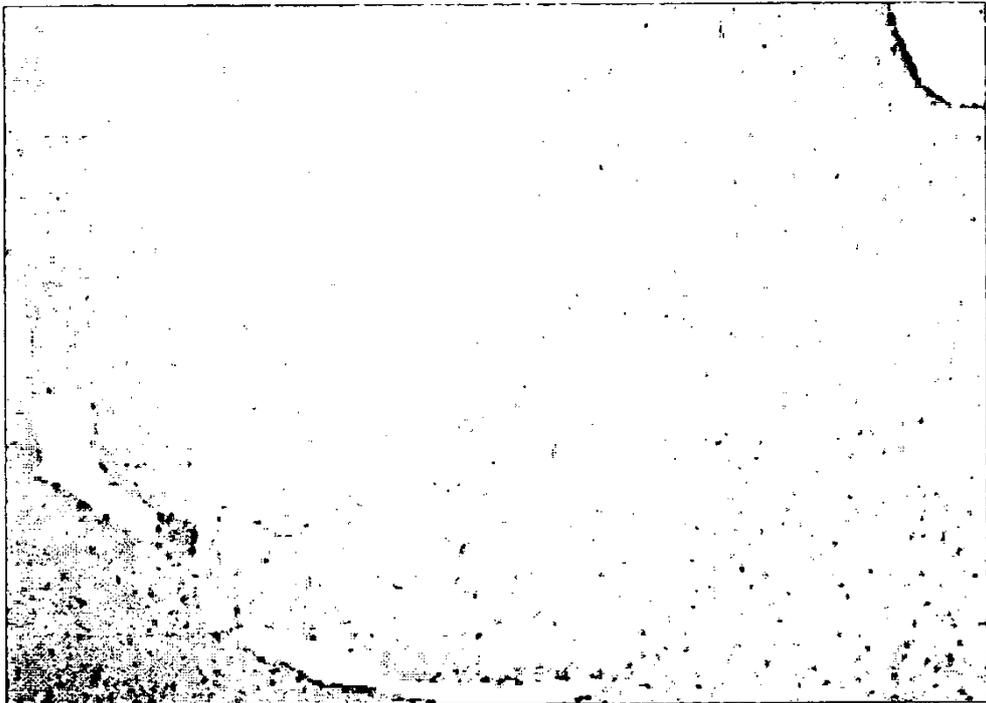


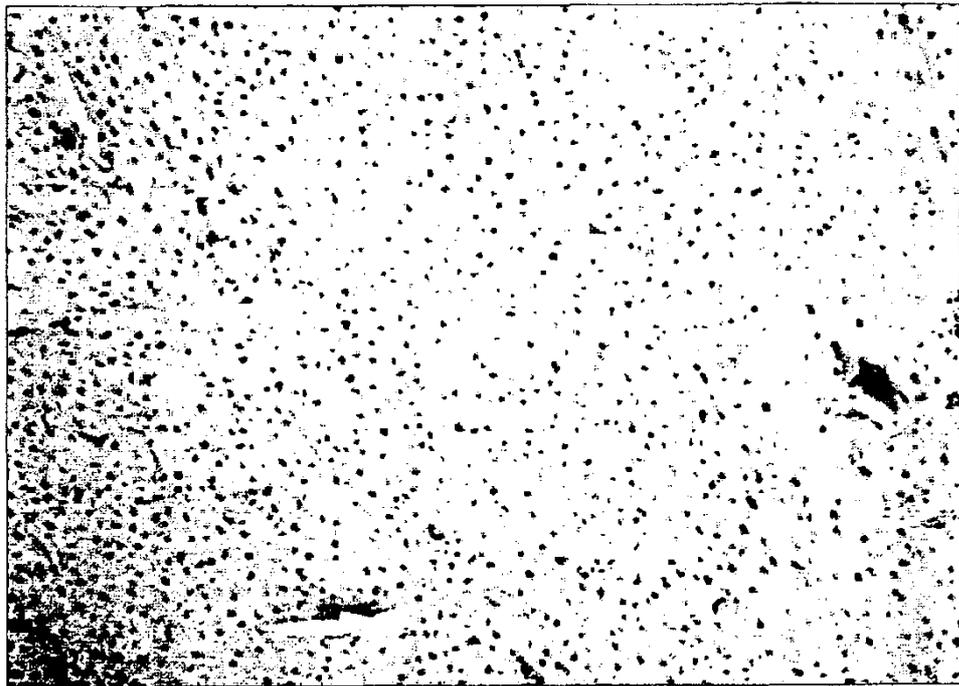
FIGURA 3C

**CMM-MC** **C**

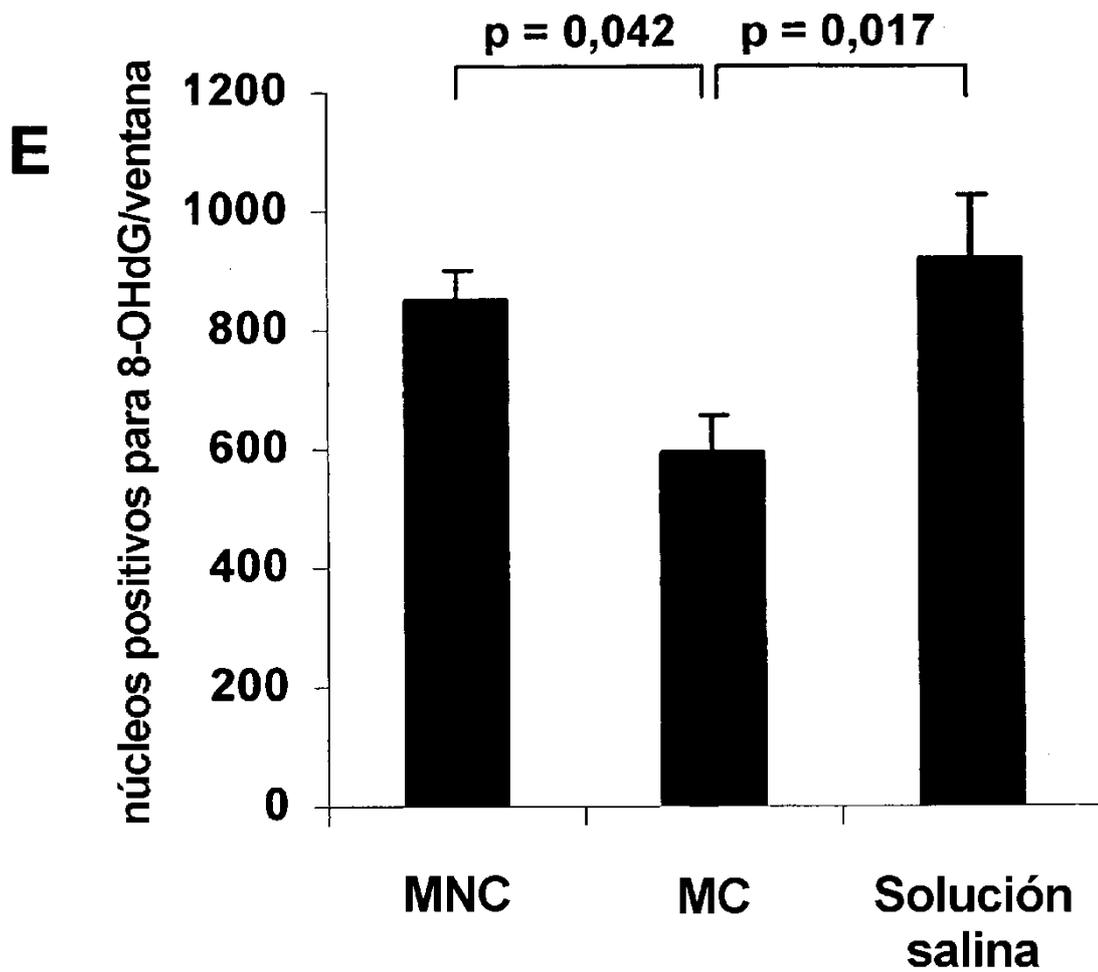


**FIGURA 3D**

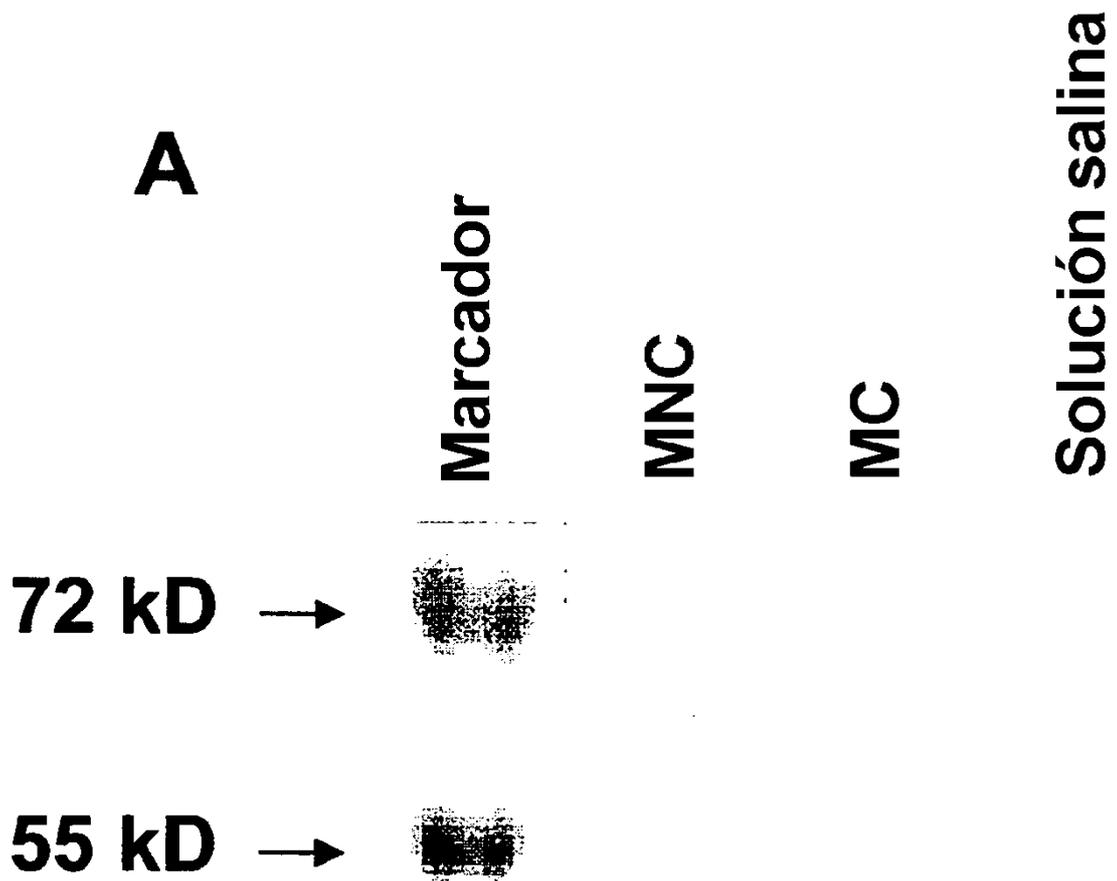
**Solución salina D**



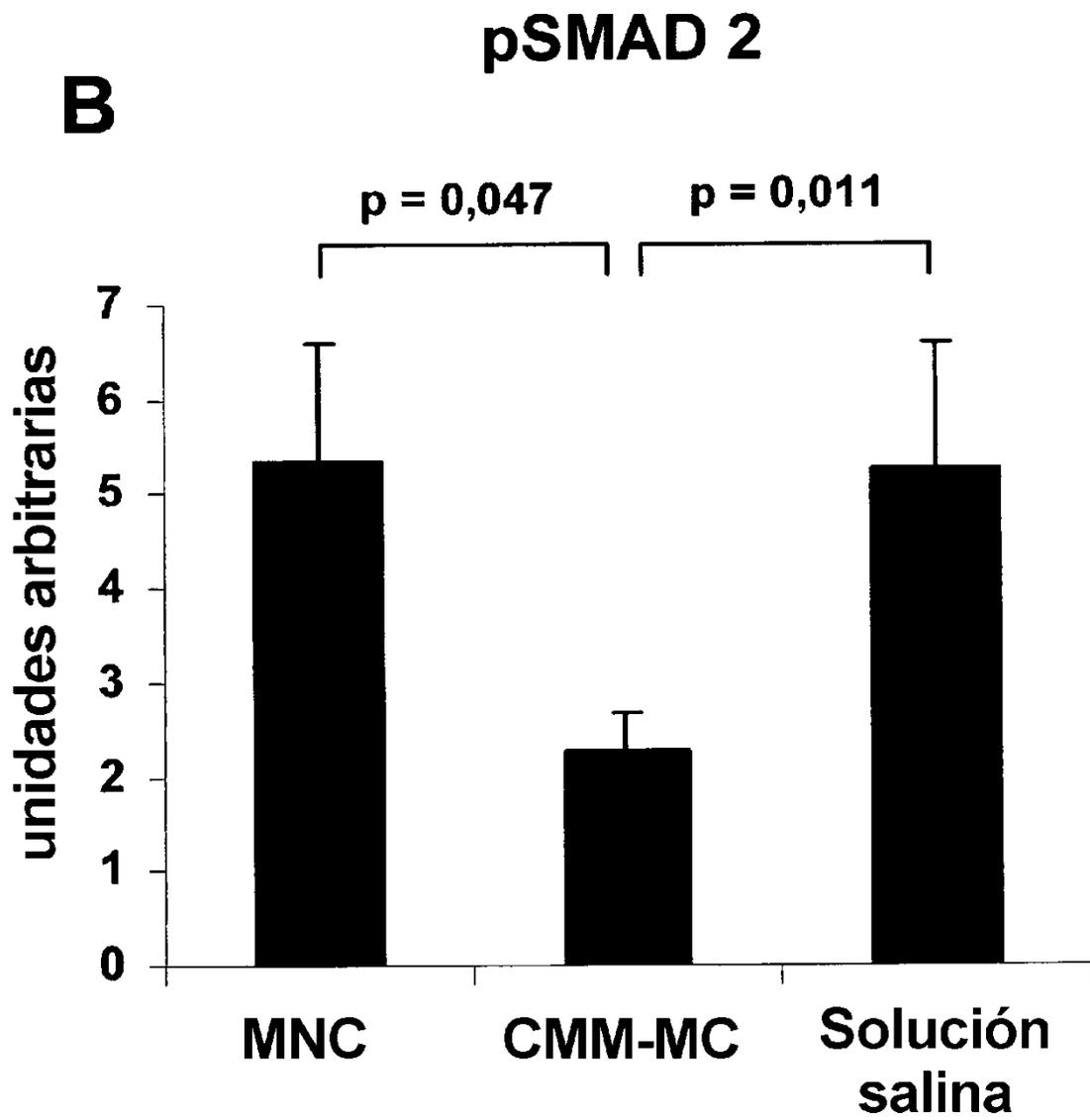
**FIGURA 3E**



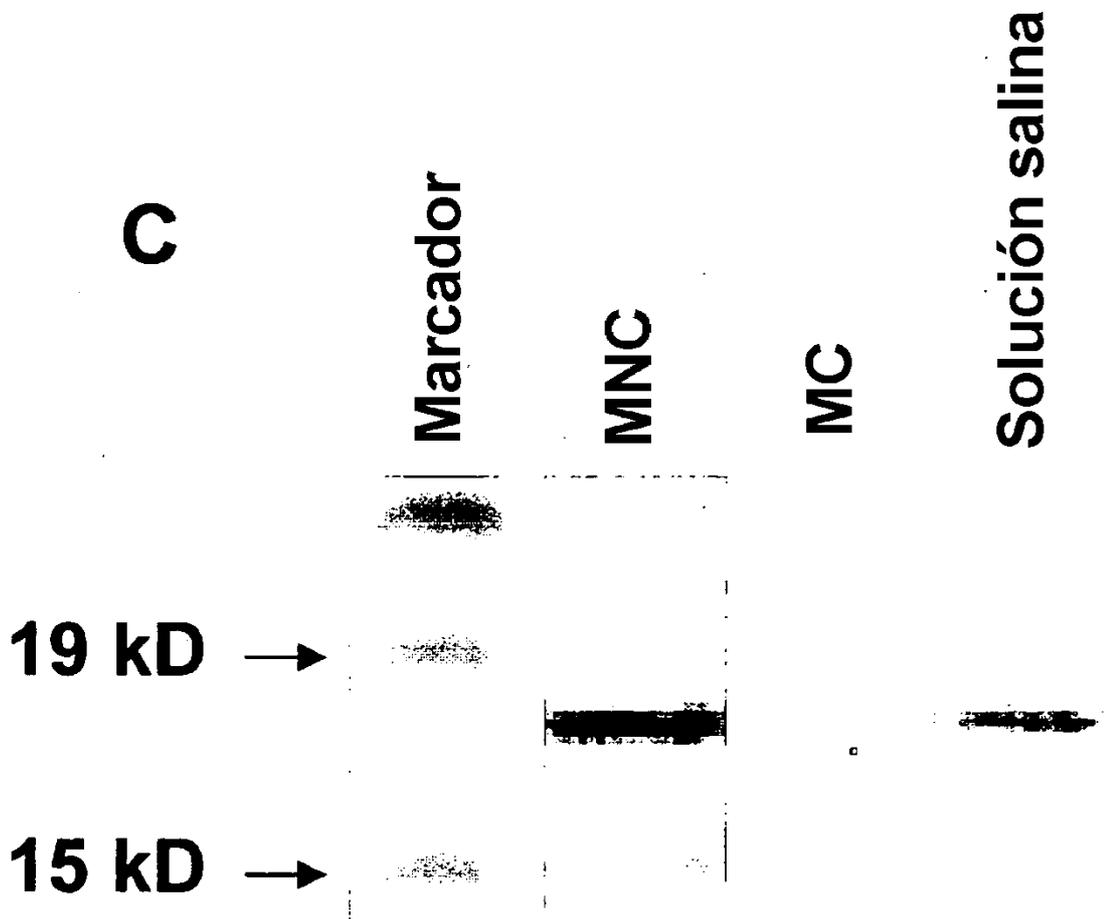
**FIGURA 4A**



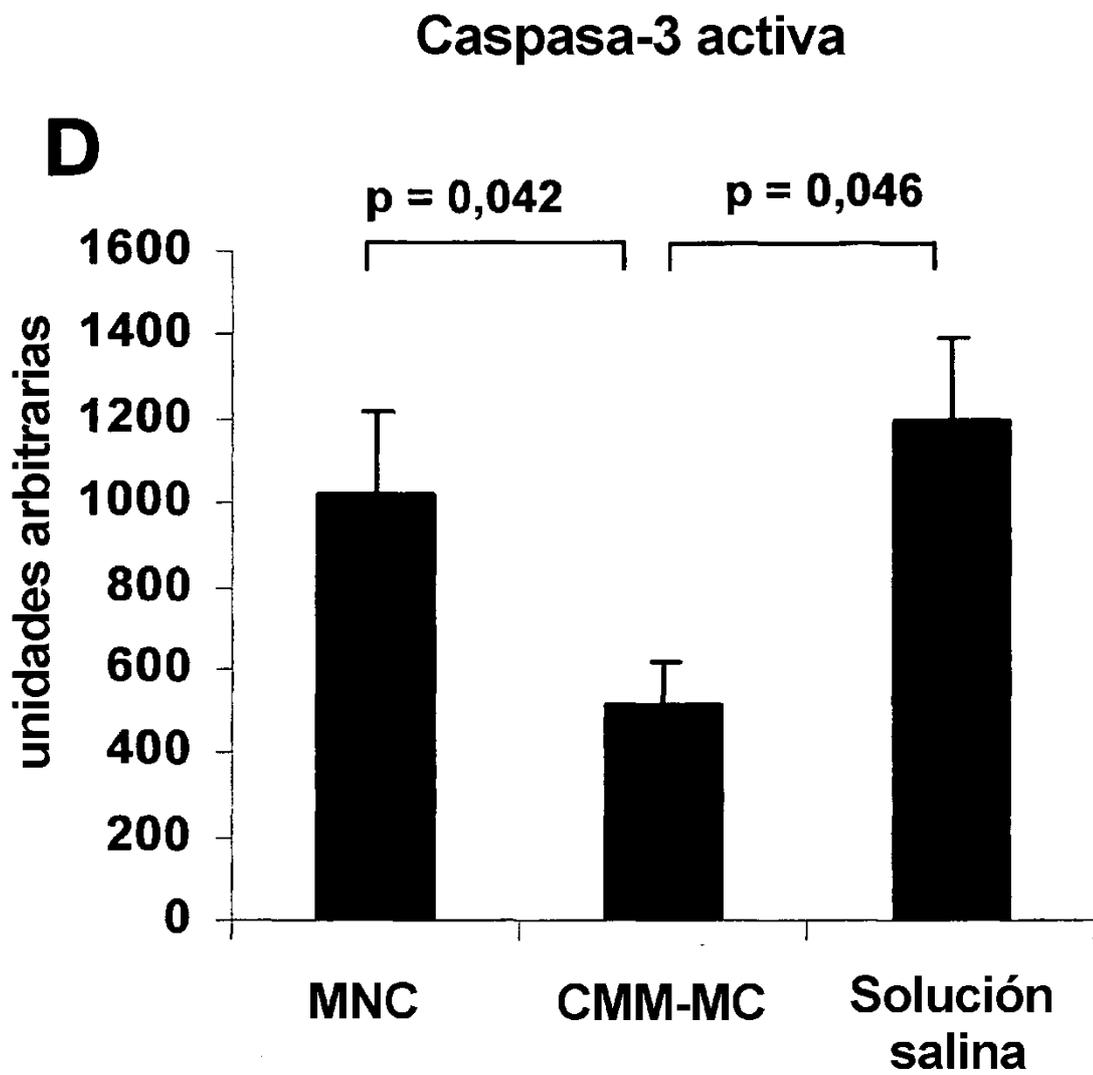
**FIGURA 4B**



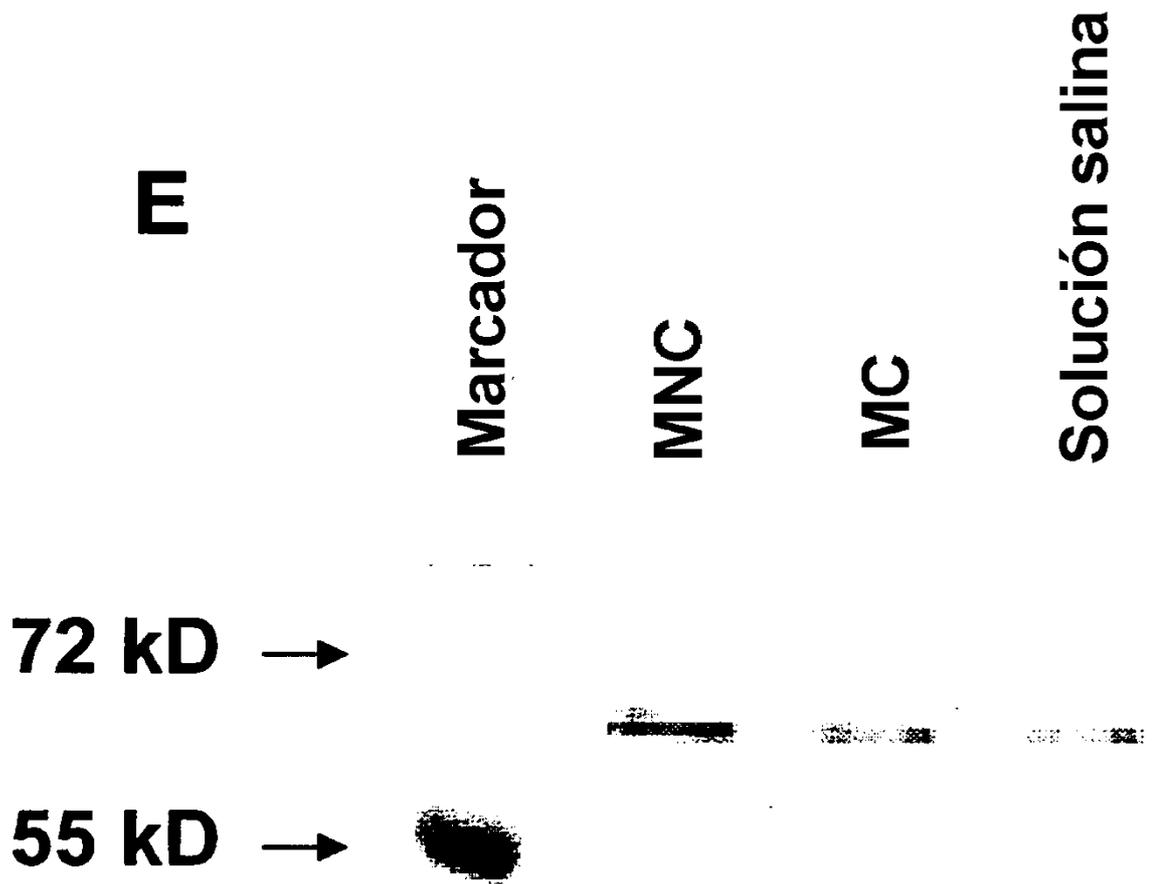
**FIGURA 4C**

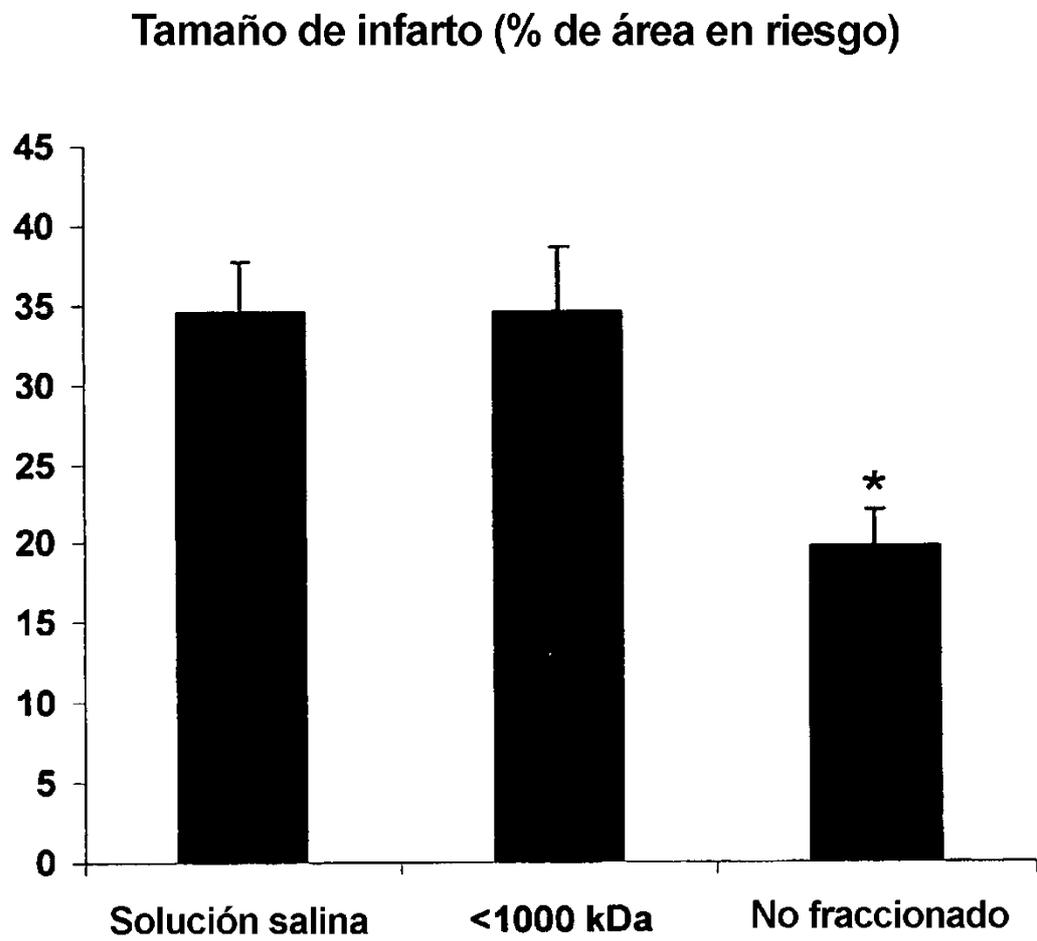


**FIGURA 4D**

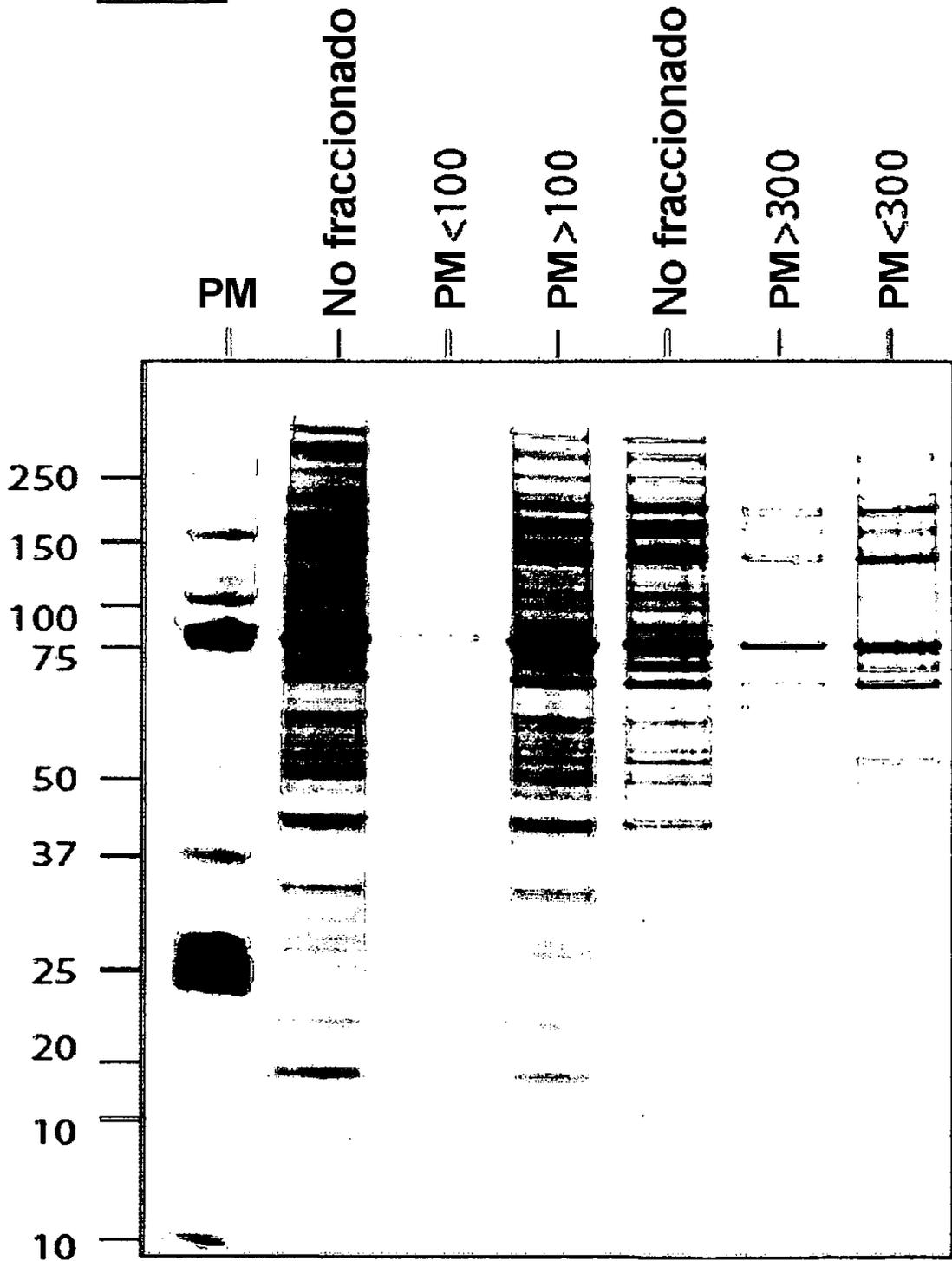


**FIGURA 4E**

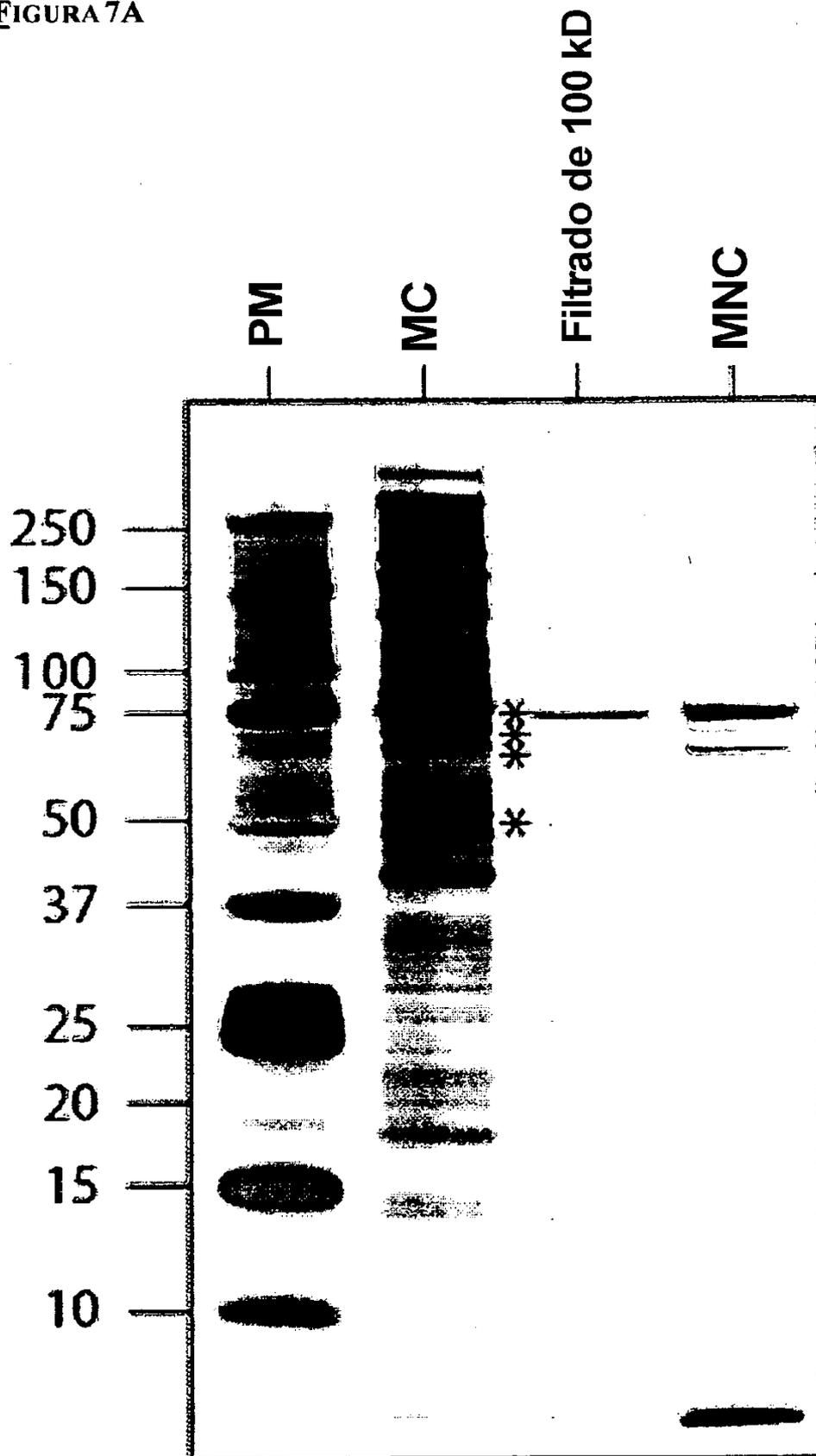


**FIGURA 5**

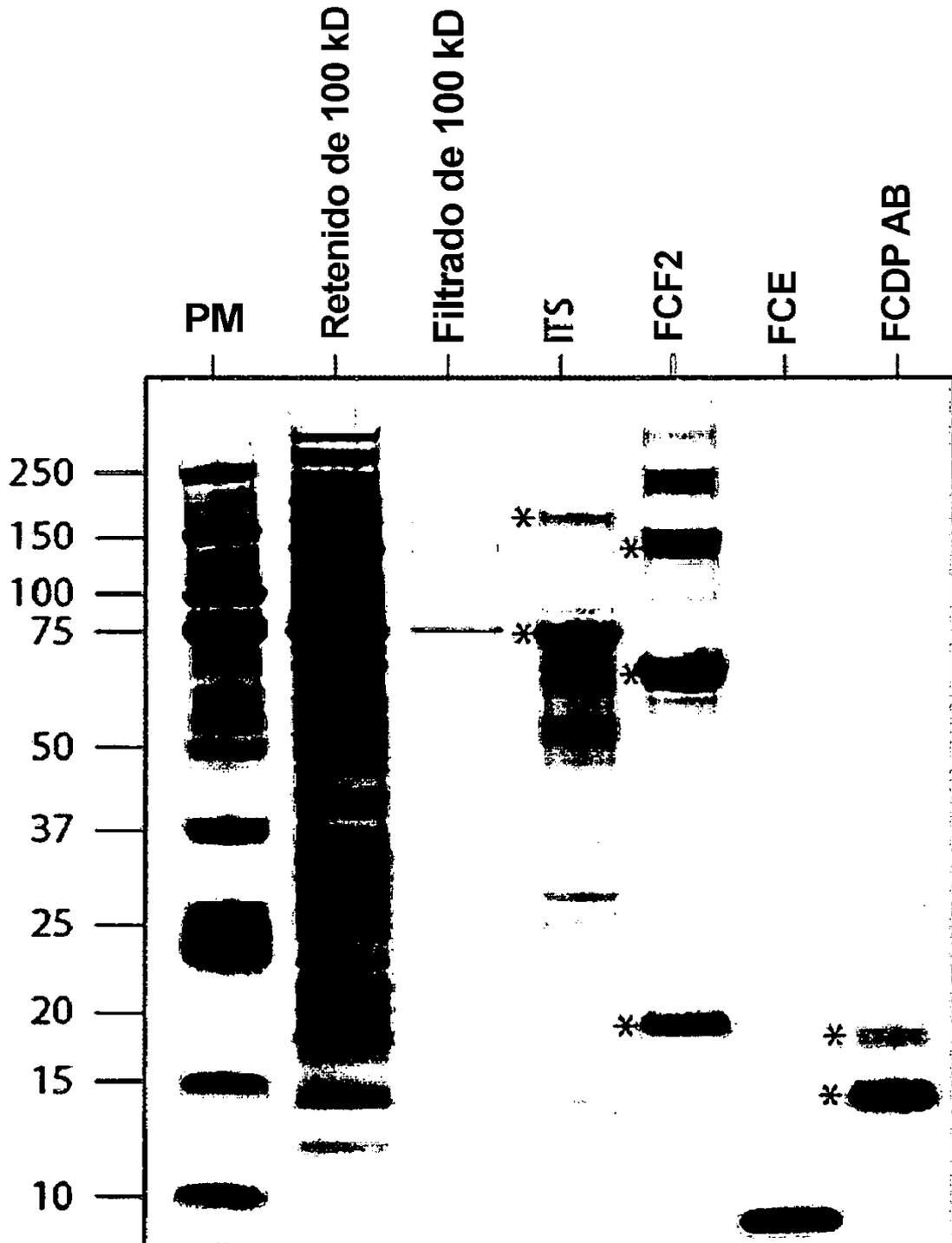
**FIGURA 6**



**FIGURA 7A**



**FIGURA 7B**



**FIGURA 8**

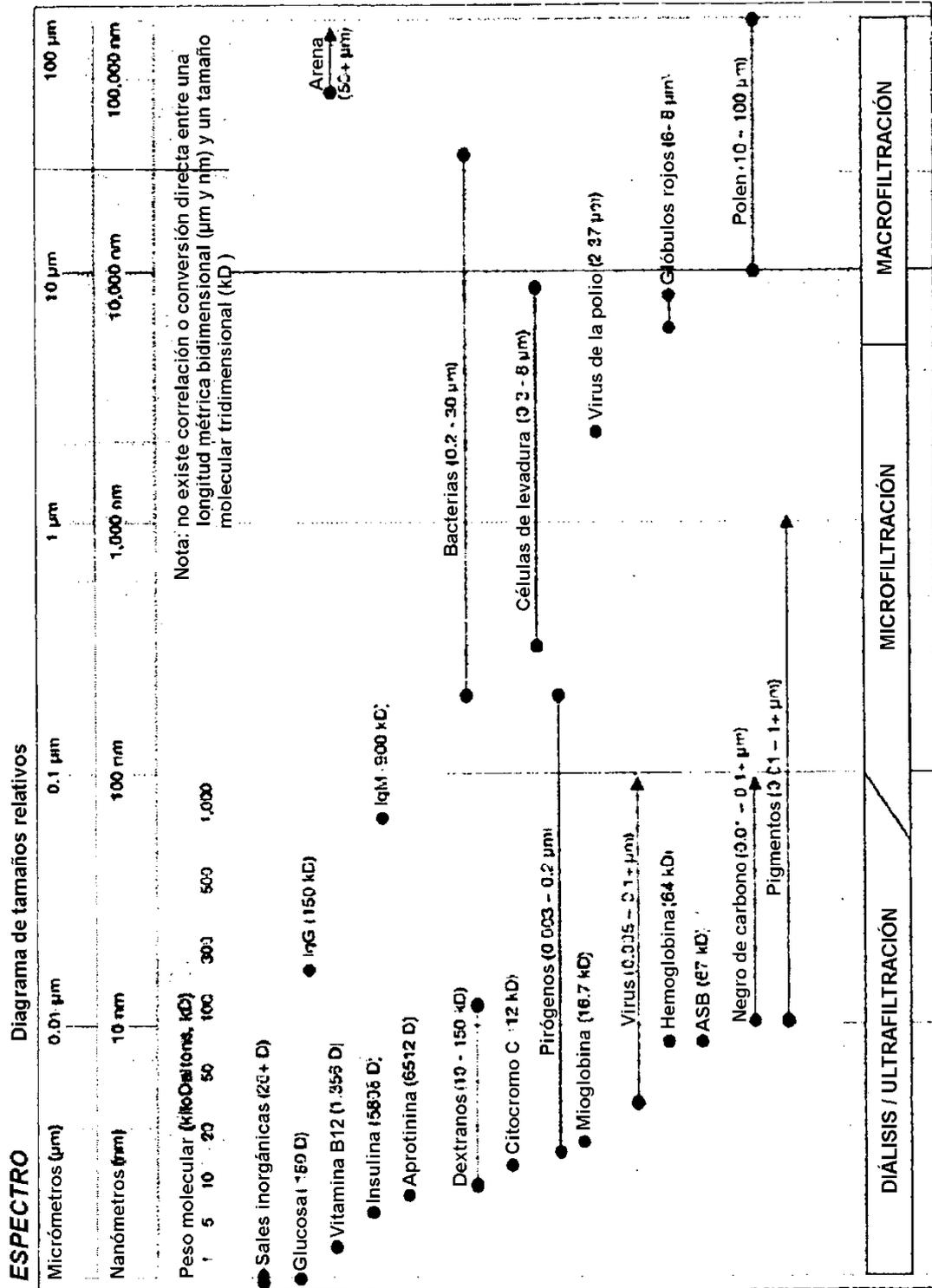
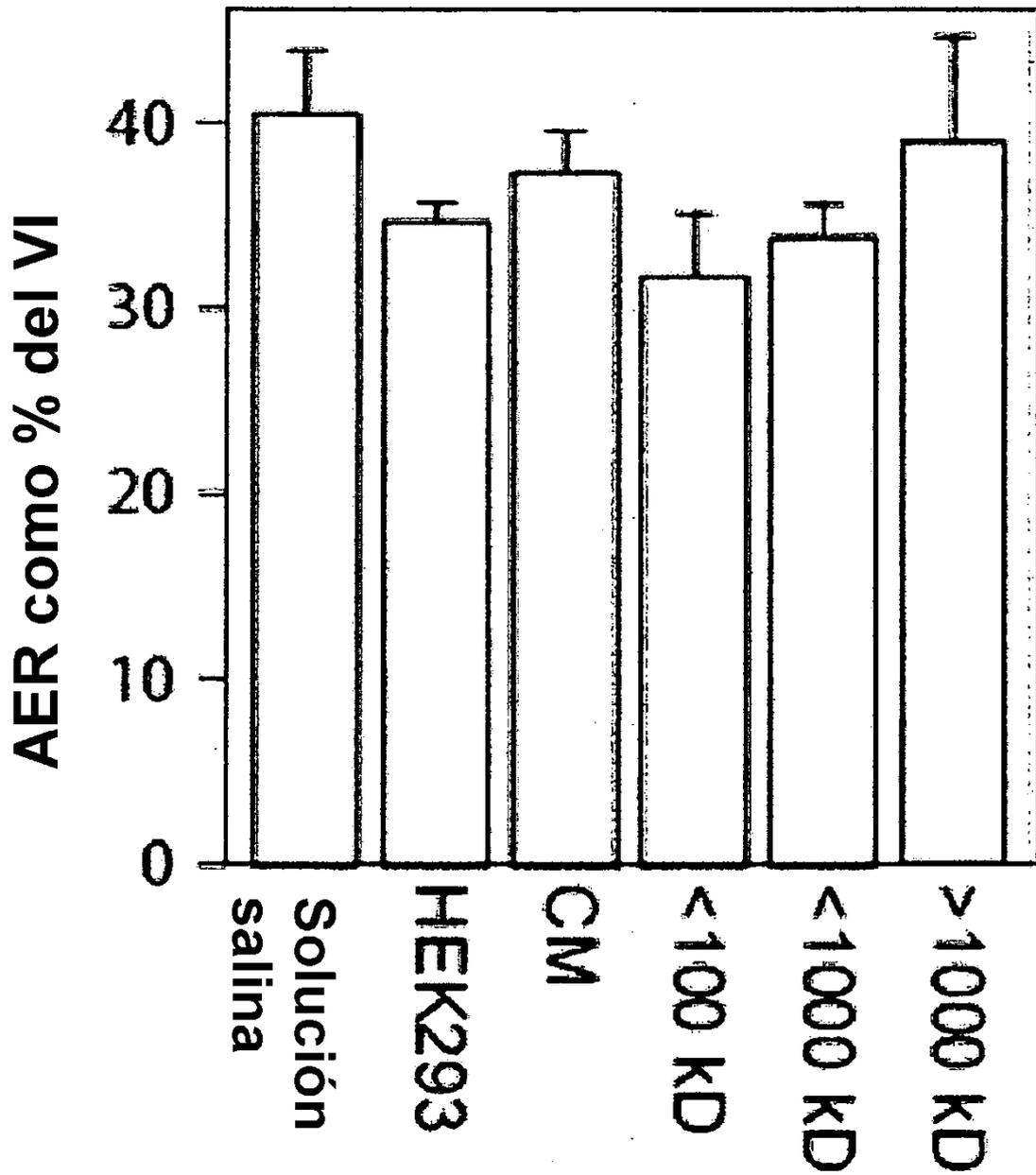
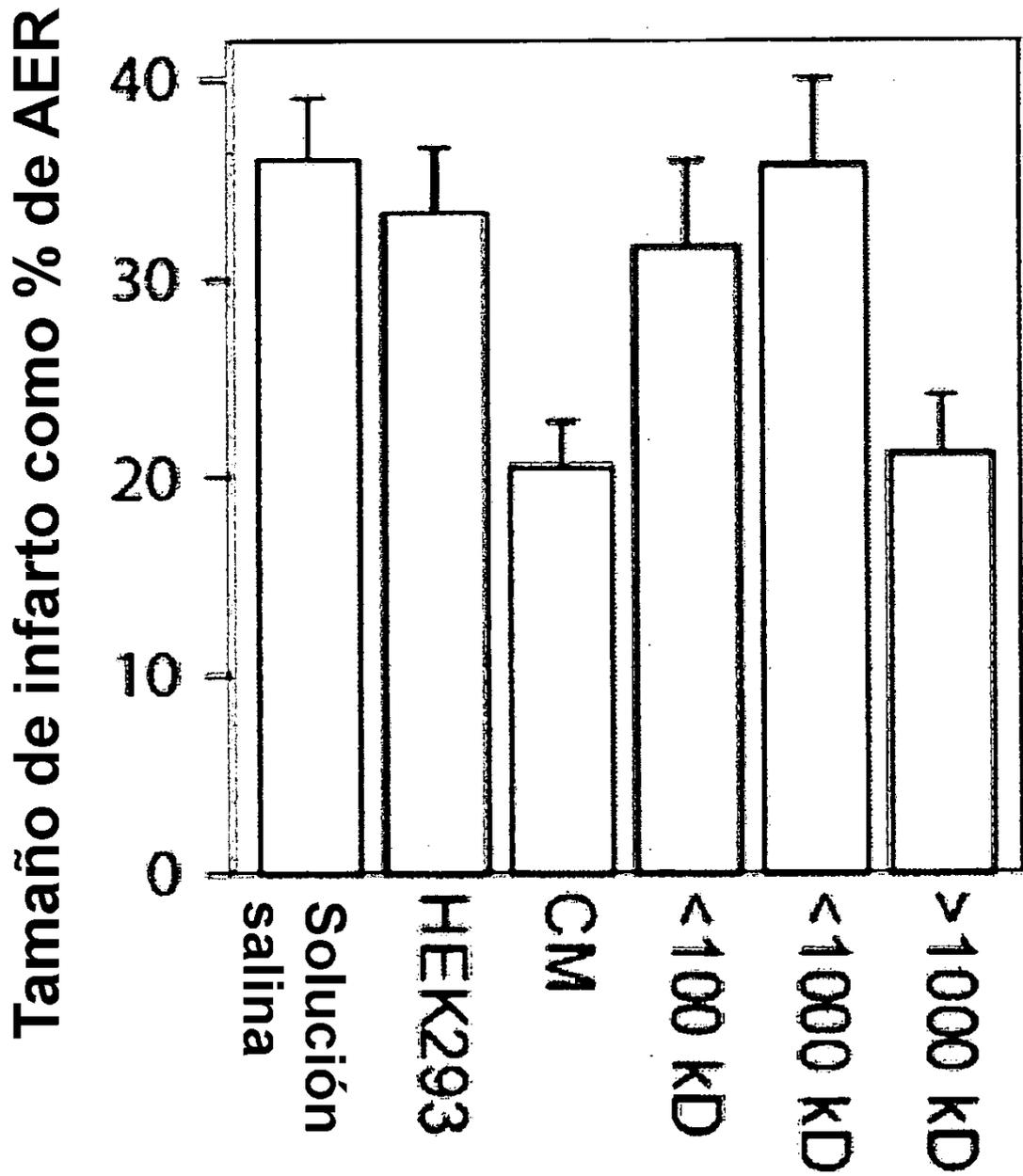


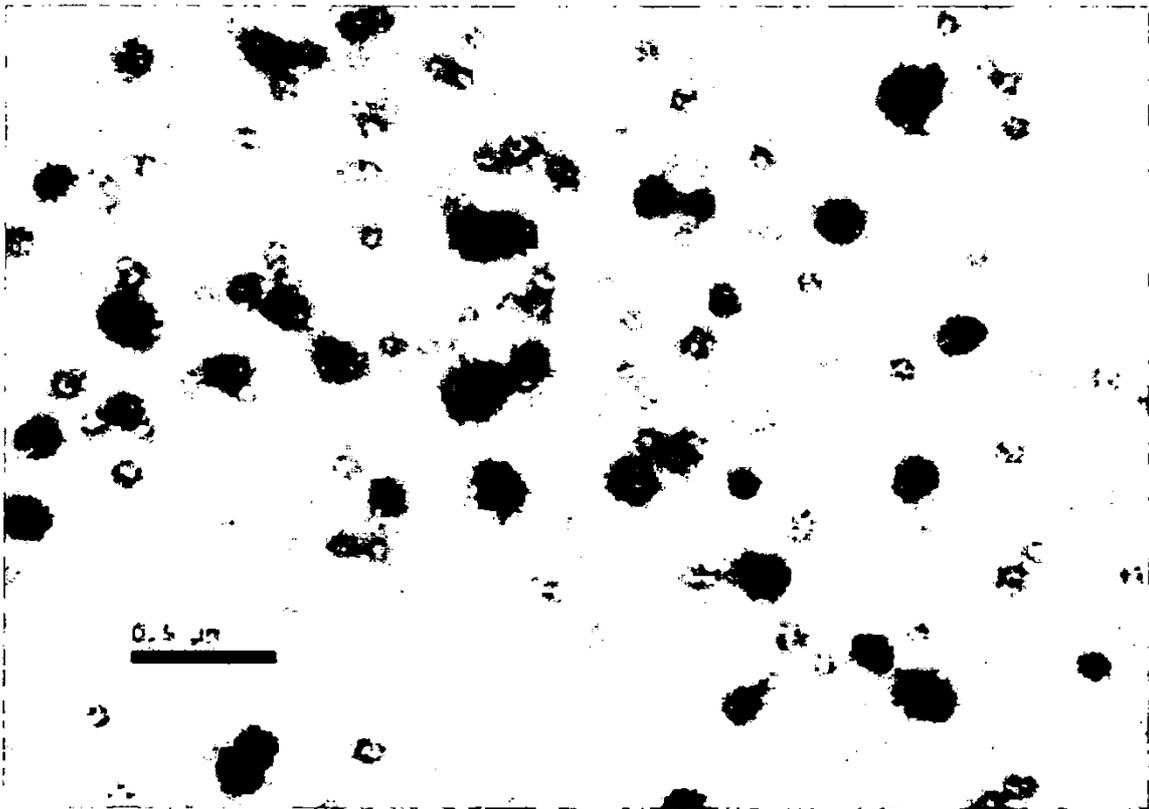
FIGURA 9



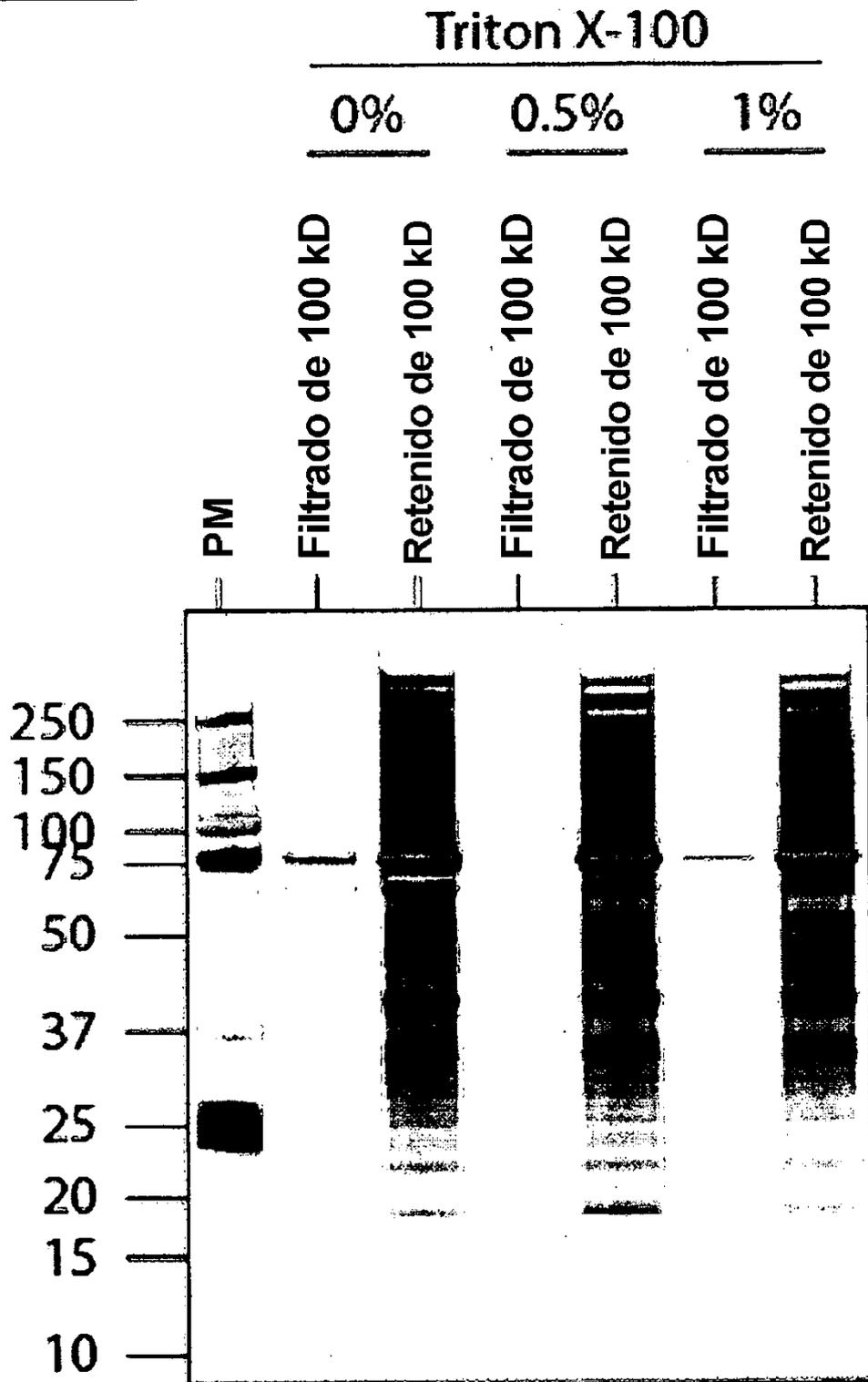
**FIGURA 10**



**FIGURA 11**

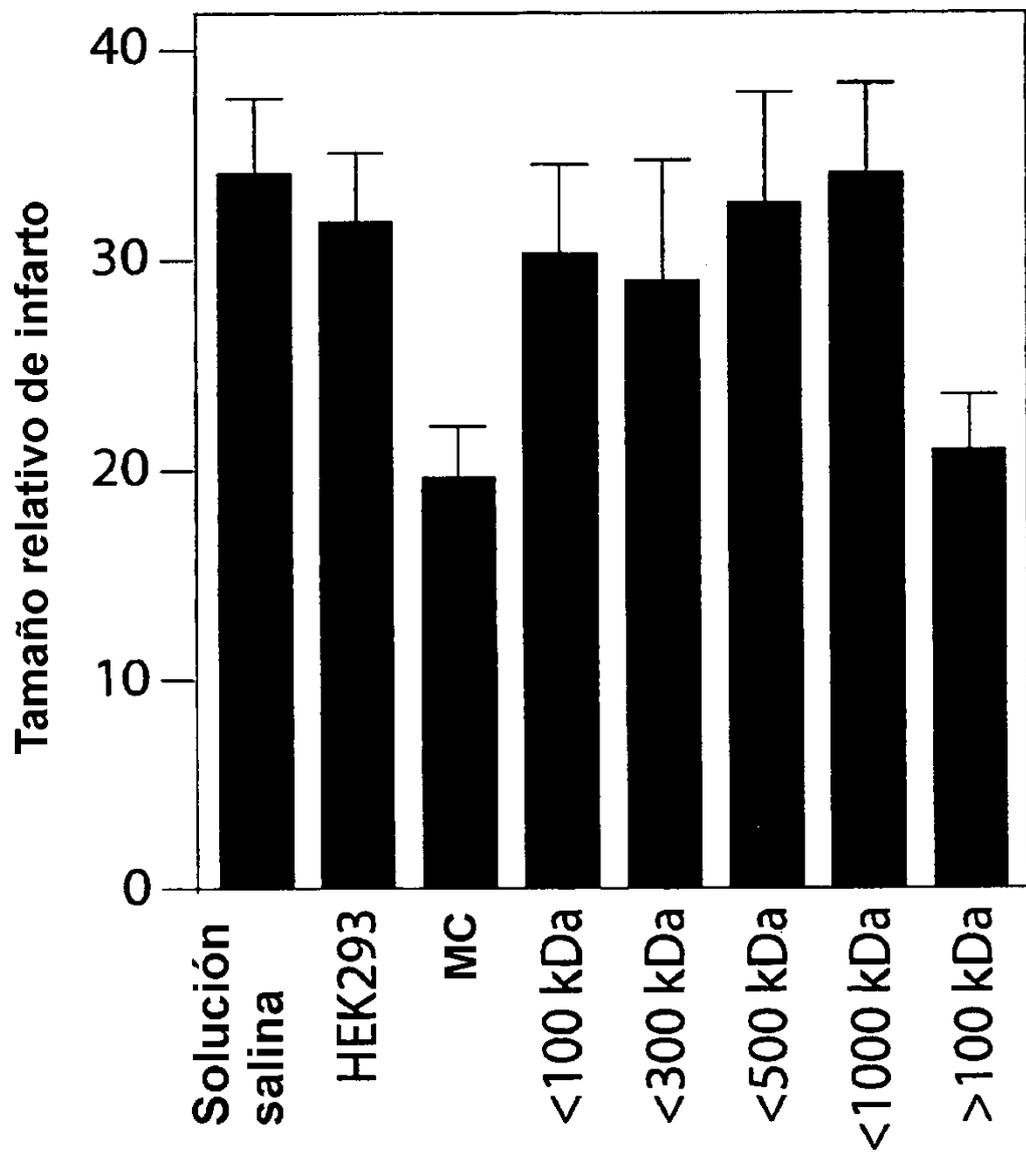


**FIGURA 12**

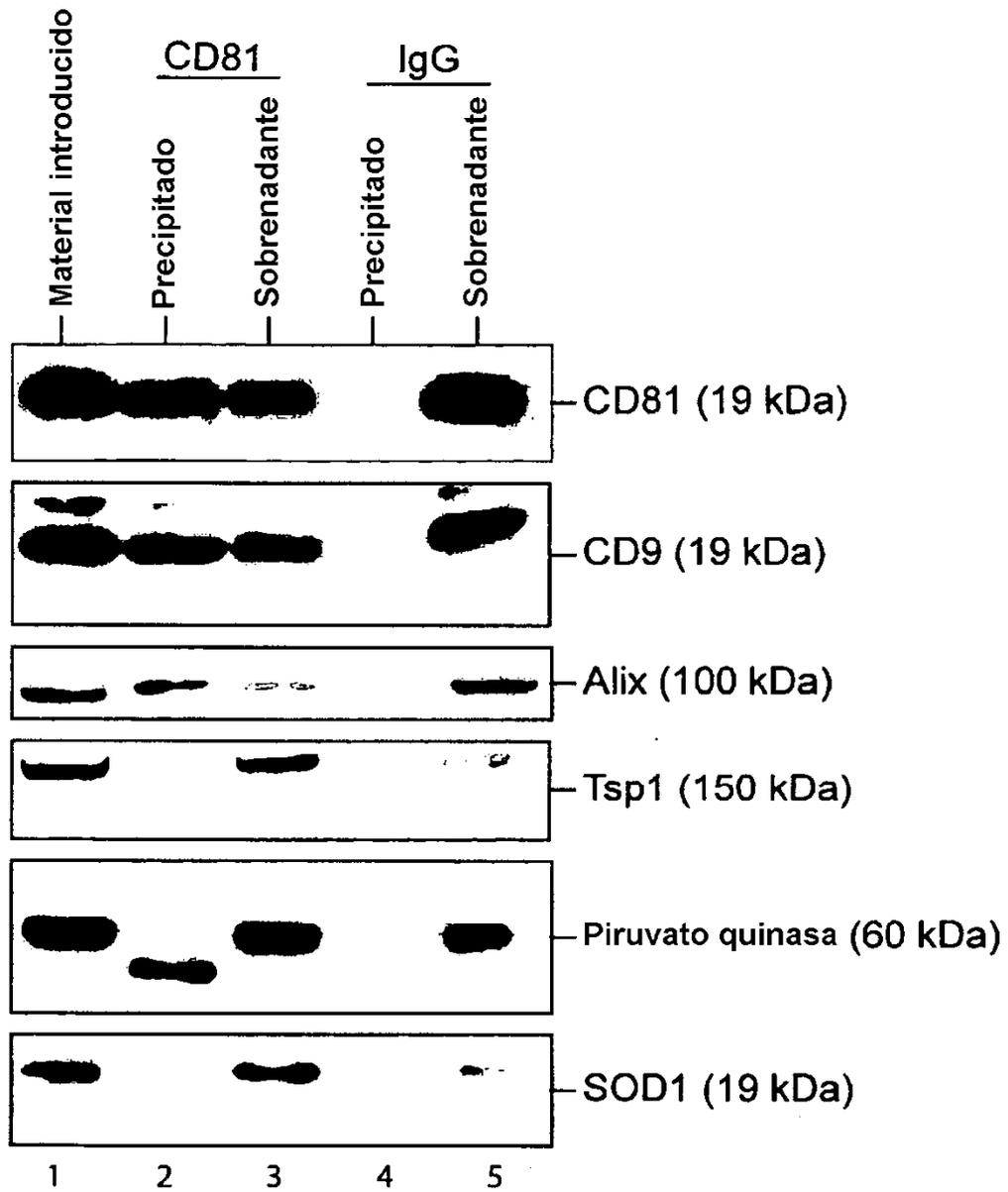


**FIGURA 13**

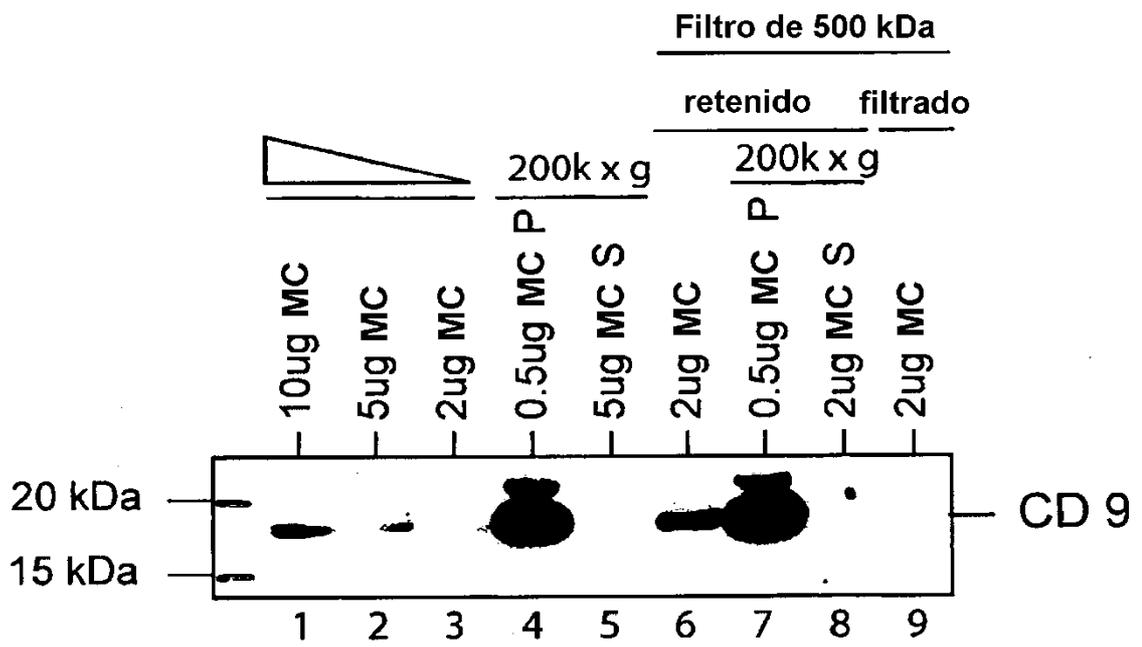
<b>Clases</b>	<b>Proteínas</b>
Transporte dirigido/ adhesión	Integrinas $\beta 1, \alpha 3, \alpha 7, \text{ y } \alpha V$ MFG-E2, lactadherina Chaperones hsc70 y hsp94
Fusión de membranas	Anexinas A1, A2, A3, A4, A5, A6, y A11 Arf3, Arf6, y Arf5 Rab5c, Rab7, y Rab10 Rab30 Rap1A y Rap2B
Citoesqueleto	Actina Cofilina 1 Moesina Tubulinas $\alpha 1, \alpha 2, \beta 5, \beta 3, \text{ y } \alpha 5$
Transducción de señales	14-3-3 $\xi, \eta, \text{ y } \epsilon$ G91 y G12a
Enzimas	Enolasa I GAPDH Piruvato quinasa
Histonas	H2E, H2A, y H4
Otros	Factor de elongación de la traducción eIF lamp2 C3

**FIGURA 14**

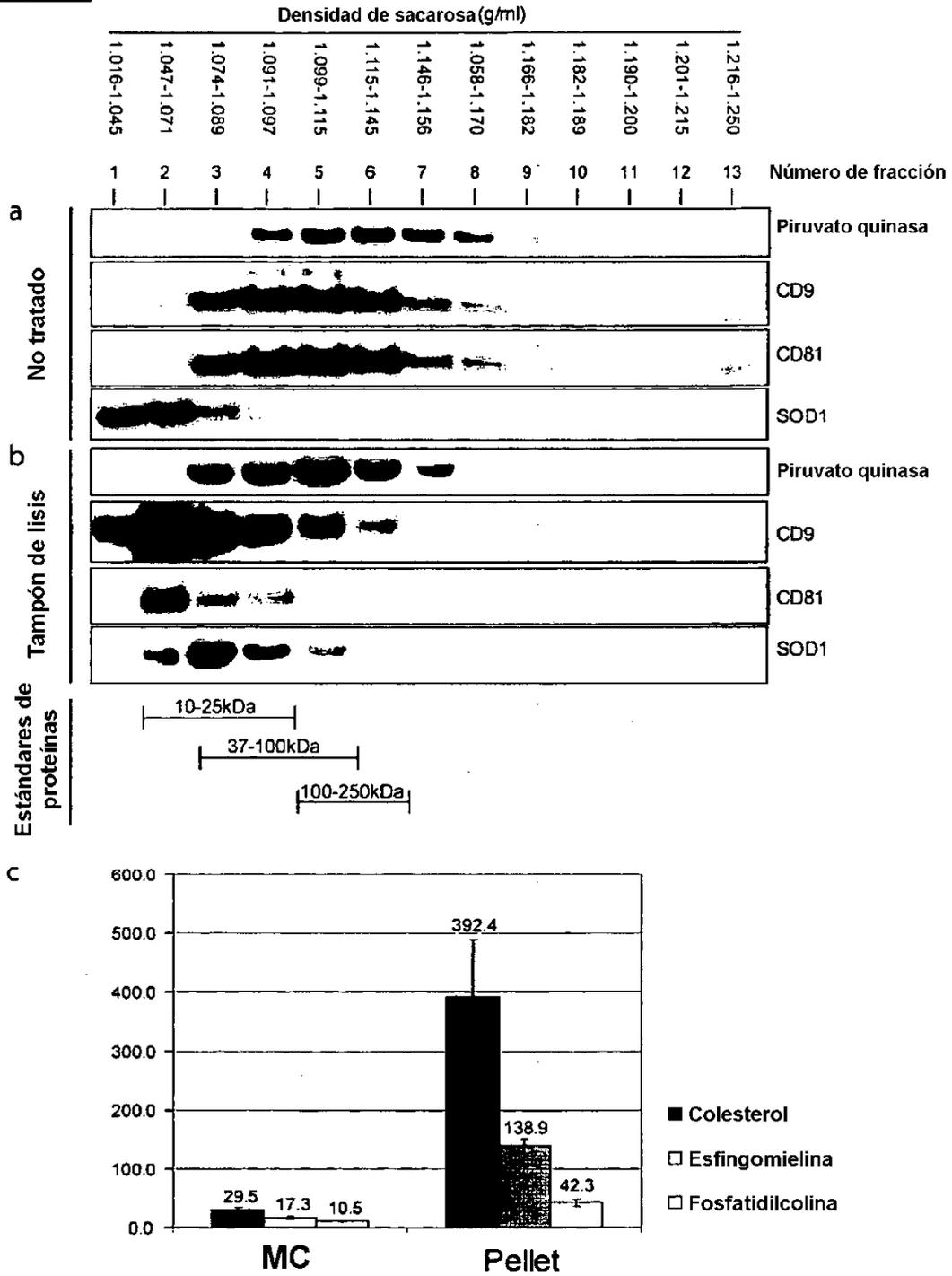
**FIGURA 15**



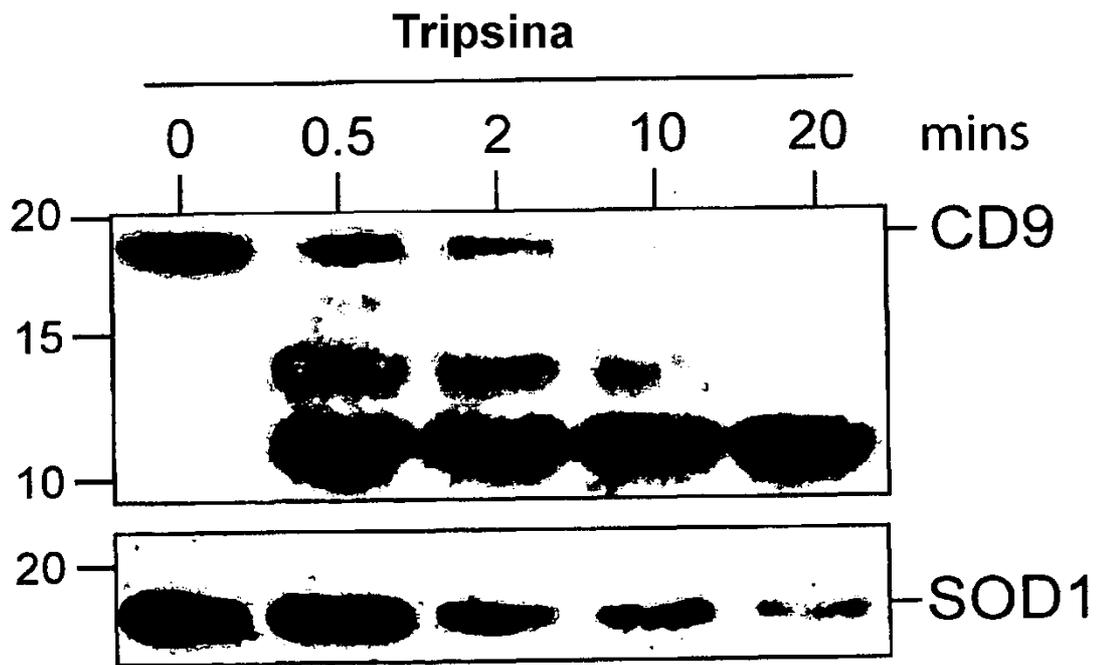
**FIGURA 16**



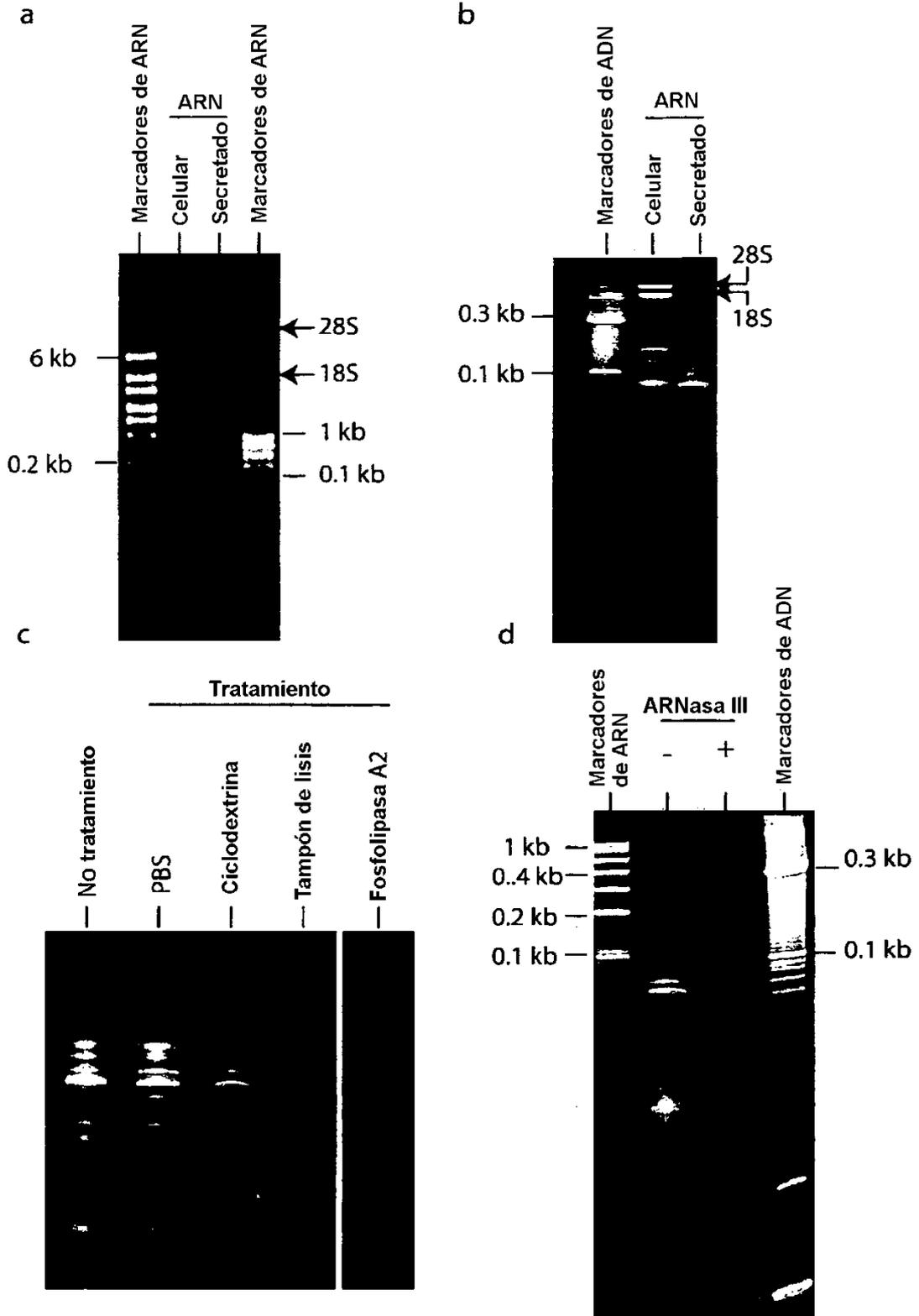
**FIGURA 17**



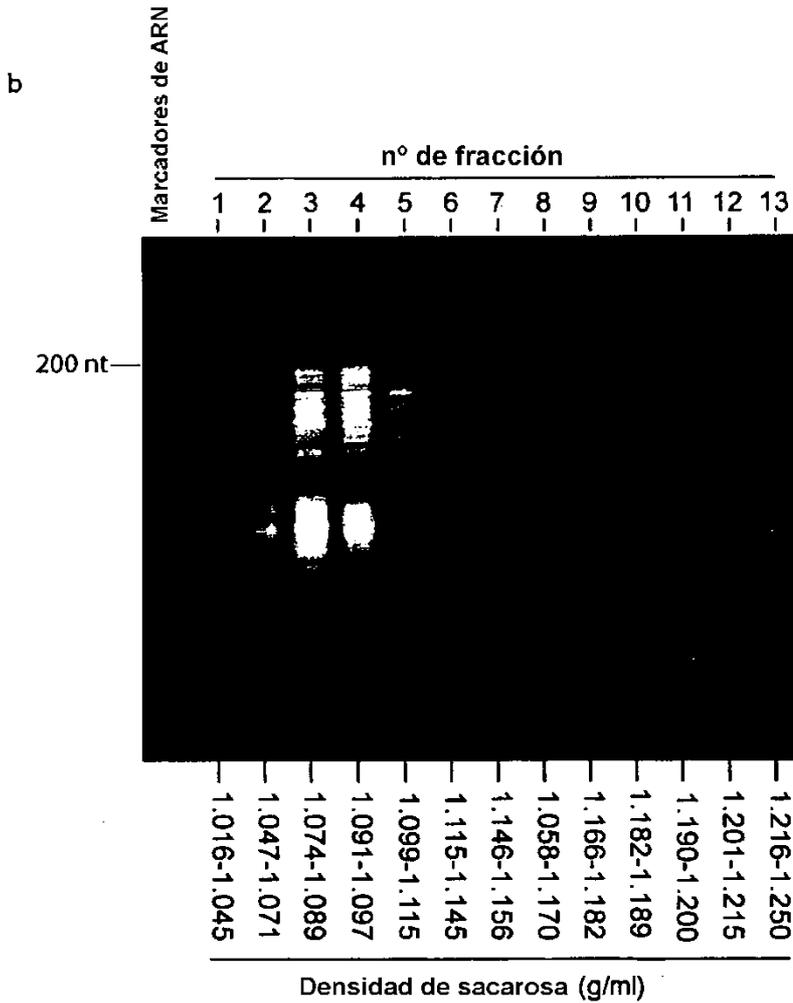
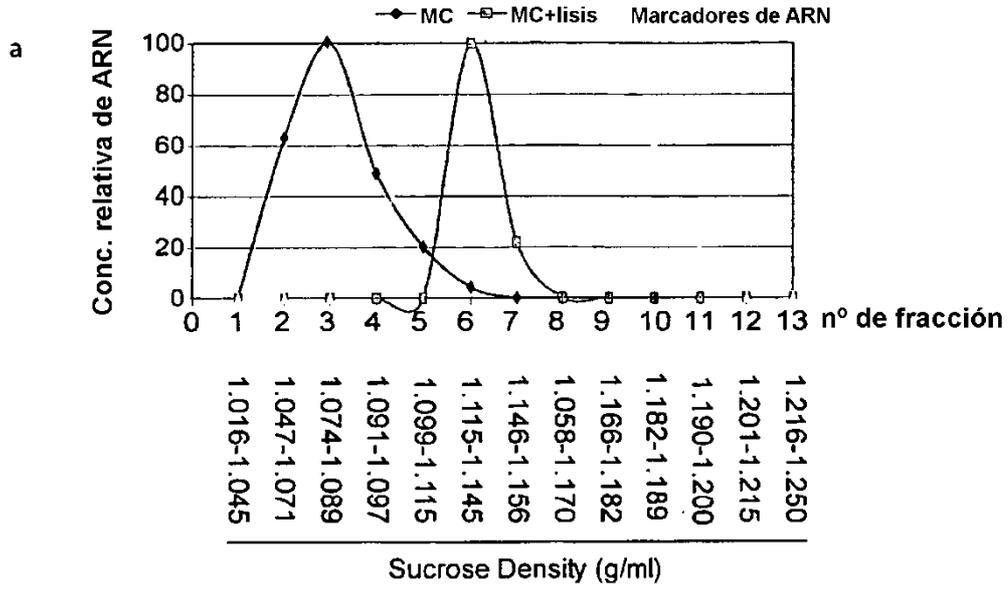
**FIGURA 18**



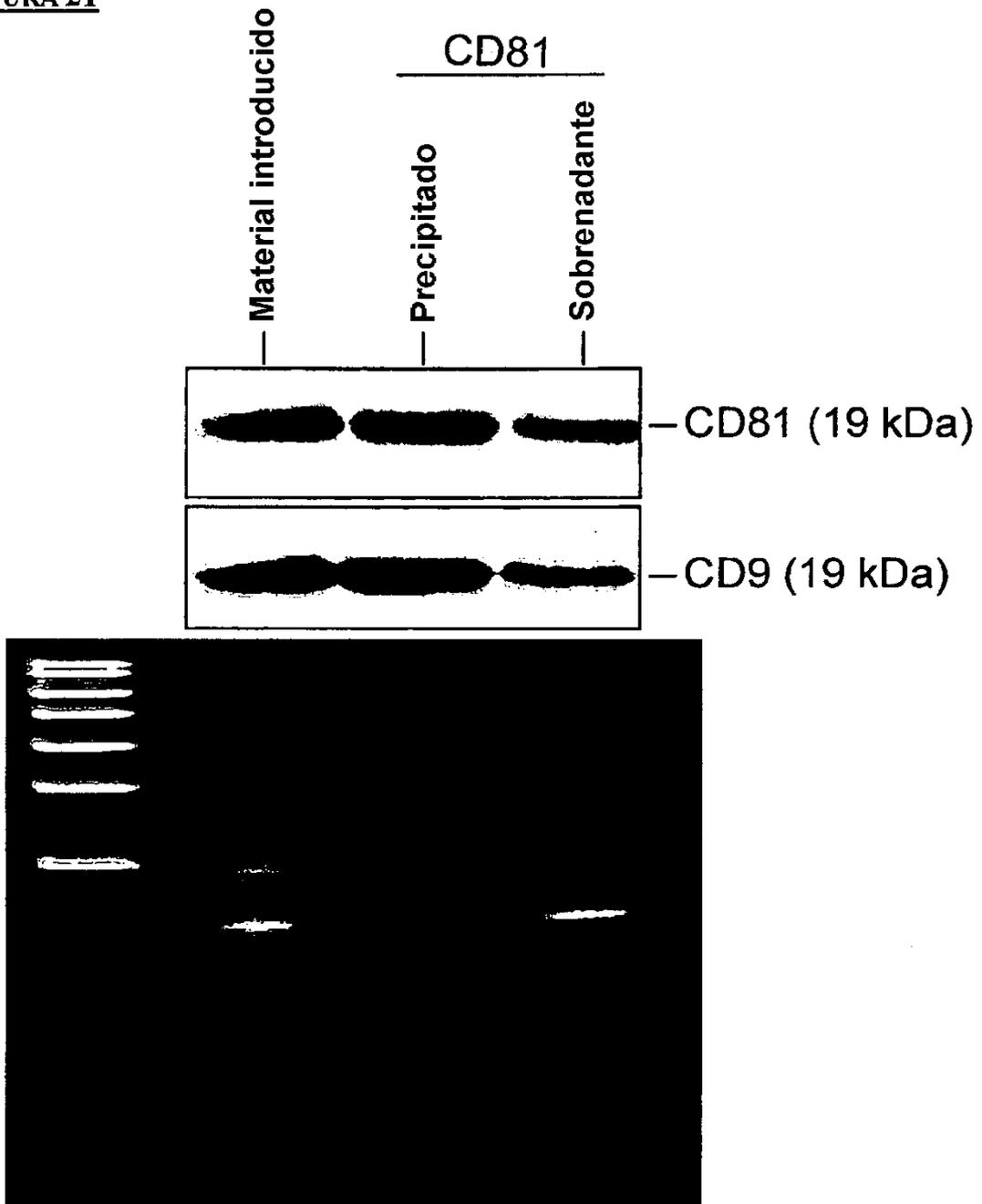
**FIGURA 19**



**FIGURA 20**

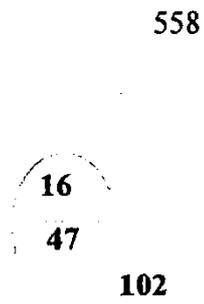


**FIGURA 21**

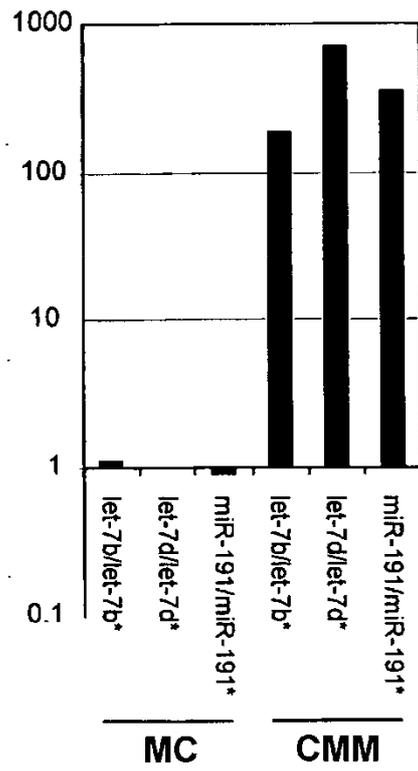


**FIGURA 22**

a

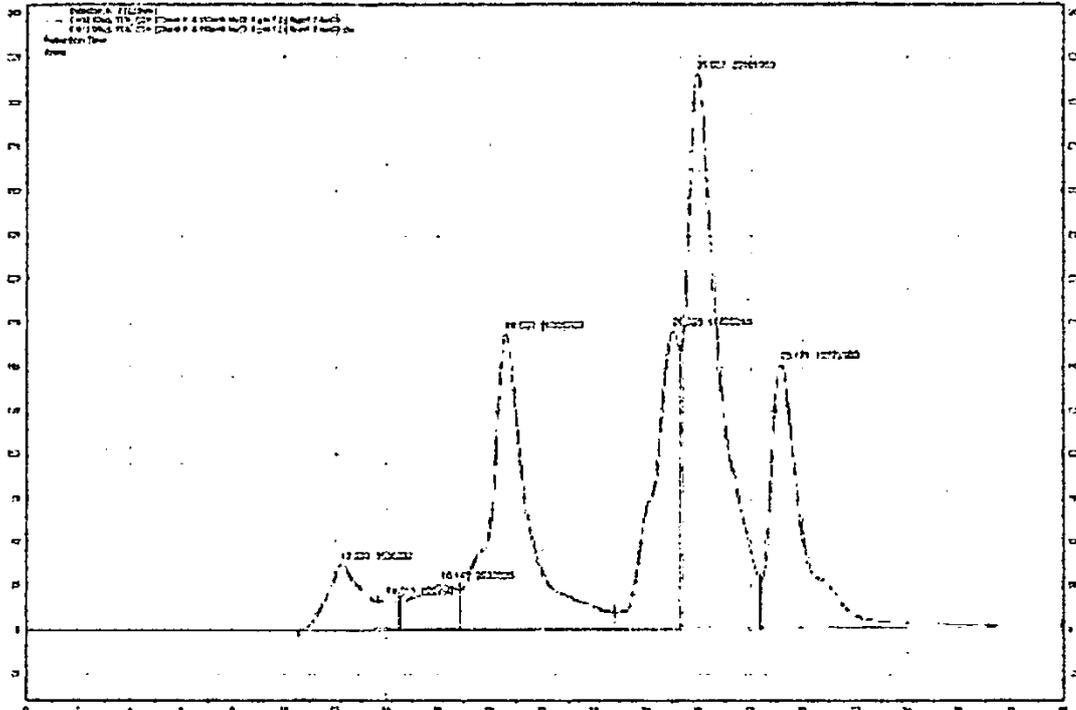


b



**FIGURA 23**

MC



MNC

