

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 760**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/87** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2007 E 07748459 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2010663**

54 Título: **Transferencia de exosomas de ácidos nucleicos a células**

30 Prioridad:

**03.05.2006 US 797149 P**  
**30.04.2007 US 799148**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.07.2015**

73 Titular/es:

**LÖTVALL, JAN OLOF (50.0%)**  
**Trädgårdsvägen 3A**  
**435 35 Mölnlycke, SE y**  
**VALADI, HADI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LÖTVALL, JAN OLOF y**  
**VALADI, HADI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 539 760 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

Transferencia de exosomas de ácidos nucleicos a células

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se basa en el inesperado hallazgo de que los exosomas liberados en el medio extracelular pueden portar un ARN selectivo de las células parentales. La invención se refiere a un método de producción de los exosomas que contienen un constructo de un ácido nucleico seleccionado. Esto puede usarse, de acuerdo con esta invención, para transferir material genético a células receptoras mediante exosomas. Mediante la transferencia de ácidos nucleicos a células receptoras, los exosomas afectan a la maquinaria proteica de otras células (las células receptoras) y por lo tanto al contenido en proteínas, y la invención demuestra por primera vez que los ácidos nucleicos, por ejemplo, ARN y ADN, pueden ser transferidos deliberadamente entre células u órganos mediante el uso de exosomas, y pueden utilizarse por tanto para la modulación y la terapia génica en células de mamífero.

**Descripción de la técnica relacionada**

20 Los exosomas son pequeñas vesículas membranales de origen endocítico que son liberadas en el entorno extracelular después de la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. El tamaño de los exosomas varía entre 30 y 100 nm de diámetro. Su superficie consiste en una bicapa lipídica de la membrana celular de la célula donante, y contienen el citosol de la célula que produjo el exosoma, y muestra las proteínas de membrana de la célula parental en la superficie.

25 Los exosomas muestran una composición y una función diferentes dependiendo del tipo celular del que deriven. No hay proteínas "específicas de exosomas"; sin embargo, varias de las proteínas identificadas en estas vesículas están asociadas a endosomas y a lisosomas, lo que es un reflejo de su origen. La mayoría de los exosomas son ricos en MHC I y II (complejo mayor de histocompatibilidad I y II; importantes para la presentación del antígeno a las células inmunocompetentes tales como los linfocitos T), tetraespaninas, diversas proteínas de choque térmico, componentes del citoesqueleto tales como actinas y tubulinas, proteínas implicadas en la fusión de la membrana intracelular, proteínas de traducción de señales y enzimas citosólicas.

35 Los exosomas son producidos por muchas células, incluyendo las células epiteliales y los linfocitos B y T, los mastocitos (MC) así como las células dendríticas (DC). En los seres humanos, se han encontrado exosomas en sangre, en orina, en el líquido de lavado broncoalveolar, en las células epiteliales intestinales y en los tejidos tumorales.

40 No se han determinado todas las funciones de los exosomas, pero los datos indican fuertemente que median en la comunicación entre las células. Esta comunicación podría tener lugar de diferentes formas. En primer lugar, podrían unirse los exosomas a un receptor de la superficie celular de una forma similar a la interacción entre células. En segundo lugar, los exosomas podrían adherirse a la membrana celular y proporcionar a las células nuevos receptores y propiedades. Por lo tanto, los exosomas también pueden fusionarse con células objetivo e intercambiar proteínas de membrana y citosol entre dos tipos celulares. El documento WO 2005/121369 describe el uso de diversas microvesículas como agentes terapéuticos, en los que, por ejemplo, el ARN o las proteínas encapsuladas o acopladas a las microvesículas, proporcionan un efecto terapéutico.

50 J. Ratajczak et al., *Leukemia* (2006) 20, 847 - 856 notifican que las vesículas derivadas de membrana de células madre embrionarias murinas mejoraban la supervivencia de las HPC murinas. Se averiguó que las vesículas estaban enriquecidas en la proteína Wnt-3 y en el ARNm del factor de transcripción. Sin embargo, estas microvesículas son relativamente grandes (100 nm - 1 µm) y por lo tanto son distintas de los exosomas tanto en tamaño como en origen.

55 El documento US 2004/0028692 describe un proceso para la sensibilización de las células presentadoras del antígeno usado en inmunoterapia. El proceso utiliza los exosomas derivados de células tumorales o de células dendríticas, respectivamente, que portan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de la clase I y/o de la clase II en su superficie. Los exosomas pueden usarse como vectores para la presentación del antígeno a las células.

60 El documento WO 01/36601 se refiere a un método para el aislamiento del virus de la hepatitis C (HCV). Los inventores del documento WO 01/36601 descubrieron que en los individuos infectados por el HCV, el virus se une a las partículas de exosomas del plasma sanguíneo y se concentra en las partículas de exosomas. El método propuesto comprende la separación de los exosomas del plasma sanguíneo de un individuo infectado por el HCV, y la extracción del ARN del virus a partir de las partículas de exosomas. El método puede usarse en un método de diagnóstico de la infección de un paciente por el HCV.

65

El documento WO 03/016522 desvela métodos para la producción de exosomas recombinantes, expresando selectivamente un polipéptido, en particular lactadherina, en los exosomas, mediante la modificación genética de las células productoras de los exosomas, de forma que el exosoma obtenido porte el polipéptido recombinante.

5 Una revisión de la investigación sobre exosomas publicada hasta 2005 puede encontrarse en J. Couzin, "The Ins and Outs of Exosomes", Science (2005), 308, N° 5730, páginas 1862 - 1863. Notablemente, este artículo de revisión no habla de los exosomas como vectores para ADN o ARN no autólogos.

10 Hemos realizado un gran esfuerzo en la comprensión del contenido y de la función biológica de los exosomas liberados específicamente por los mastocitos. En ensayos proteómicos hemos averiguado que estos exosomas contienen un mayor número de proteínas de lo que se creía previamente. Sin embargo, el hallazgo único de nuestra investigación es que hemos descubierto una cantidad sustancial de ARN selectivo en los exosomas de los mastocitos. Además, el uso de diferentes células receptoras muestra una captación del ARN exosómico, lo que indica una transferencia de material genético desde los exosomas a las células receptoras, que a su vez dará lugar a la traducción de la proteína específica en las células objetivo.

15 Considerando el contenido en proteínas del exosoma y su capacidad para comunicarse con diferentes células receptoras, es particularmente útil ser capaces de modificar el contenido genético de los exosomas con objeto de añadir o regular un gen en las células receptoras. En esta solicitud se describe el método que usa la capacidad de los exosomas de portar un material genético específico y transferirlo a células receptoras. En este método, el receptor se ve afectado en su función, así como en su capacidad para permanecer vivo, desarrollarse adicionalmente, proliferar o madurar.

20 El método es único y diferente de cualquier método descrito previamente. Varias patentes y solicitudes de patente usan exosomas para influir en el sistema inmunitario a través de una función estimuladora o inhibidora mediante la interacción de las proteínas exosómicas con las células inmunitarias, y para el tratamiento de una enfermedad vírica mediante una influencia en el sistema inmunitario. Se ha sugerido que las proteínas exosómicas pueden ser modificadas mediante una mutación que afecte al sistema inmunitario. Sin embargo, ninguna patente ni solicitud de patente, ni ninguna información disponible públicamente que hayamos encontrado, describe o sugiere el uso de exosomas para la transferencia de material genético o de ácidos nucleicos a células.

### Resumen de la invención

25 La presente invención desvela nuevos métodos para el suministro de constructos de ácidos nucleicos mediante exosomas a células receptoras. El método de la invención incluye constructos de ARN y de ADN que son transferidos a los exosomas de acuerdo con la reivindicación 1, mediante el uso de métodos convencionales, por ejemplo, una transformación y una transfección, para la introducción de los ácidos nucleicos directamente en los exosomas. El método de la invención es una herramienta excelente para introducir mediante terapia génica material genético en células receptoras, para compensar genes anormales o para introducir ARN o ADN que produzcan proteínas que afecten a la función de las células receptoras o a su capacidad para permanecer vivas o desarrollarse o madurar. Para la terapia génica habitualmente se usan virus o liposomas como vectores para la transferencia del material genético, debido a que pueden administrar el nuevo gen mediante la infección de una célula. El uso de exosomas tiene diversas ventajas en comparación con los métodos convencionales, y lo más importante es que los exosomas derivan de células, y posiblemente incluso de las propias células receptoras, y por lo tanto no son un cuerpo extraño para el sistema inmunitario, lo que evita reacciones inmunitarias adversas. Los exosomas se producen, aíslan y modifican por tanto fácilmente para su uso en la modulación y en la terapia génica.

30 Otros objetos y características de la invención serán mucho mejor apreciables a partir de la siguiente divulgación y de las reivindicaciones anexas.

### Descripción detallada de la invención y de las formas de realización preferidas de la misma

35 El uso de vesículas de exosomas para la transferencia de material genético, ácidos nucleicos, al citosol o al núcleo de una célula, según se describe en la invención del presente documento, puede tratar enfermedades hereditarias, disfunciones celulares o corporales, inducir o reprimir la muerte celular (apoptosis), modificar el envejecimiento celular, inducir tolerancia, redirigir respuestas inmunitarias distantes, modificar la actividad intracelular o el comportamiento celular. También puede usarse en cualquier tipo de terapia génica de trastornos genéticos, enfermedades malignas o enfermedades que implican a las células inmunitarias o a cualquier otro tipo de célula del cuerpo incluyendo de la vasculatura, células epiteliales, células intersticiales, de la musculatura, del sistema esquelético, del sistema nervioso, células hepáticas, células renales, células intestinales, células pulmonares, células cutáneas o cualquier otra célula del cuerpo.

40 El material genético que puede ser transferido por los exosomas, descritos en la invención del presente documento es: microARN, ARNm, ARNt, ARNr, ARNip, ARN regulador, ARN no codificante y codificante, fragmentos de ADN y plásmidos de ADN, incluyendo ácidos nucleicos de cualquier tipo. Los métodos para la transferencia del material genético (constructos de ADN o de ARN, o cualquier tipo de ácido nucleico) directamente en los exosomas son

transformación, transfección y microinyección.

Los exosomas genéticamente distintos pueden ser aislados para su administración adicional a células receptoras mediante el uso de sus células donantes o mediante la introducción de ácidos nucleicos específicos en ellos. A continuación se describen diferentes metodologías para la producción de exosomas que contienen un conjunto de material genético.

Algunos procedimientos diferentes para la producción de exosomas genéticamente distintos mediante el uso de las células productoras de exosomas, para su administración adicional a las células receptoras incluyen:

(a) *exosomas de diferentes células receptoras*. Los exosomas que contienen un conjunto de material genético diferente pueden ser aislados a partir de células de donantes diferentes (por ejemplo, linfocitos B y T, mastocitos y células dendríticas) para su administración adicional a las células receptoras. Dado que el genotipo de las células donantes es distinto, lo que es debido a su papel y entorno, los exosomas aislados de diferentes tipos celulares darán lugar a exosomas con unos genotipos distintos.

(b) *exosomas de diferentes condiciones*. El crecimiento de las células productoras de exosomas en unas condiciones dadas da lugar a cambios celulares, y posteriormente a exosomas modificados genéticamente. Los exosomas pueden usarse posteriormente para la transferencia del conjunto de ácidos nucleicos a las células receptoras.

(c) *exosomas de diferentes seres humanos o enfermedades*. Los exosomas de diferentes personas o enfermedades contienen diversos conjuntos de ácidos nucleicos. El genotipo de los exosomas es diferente debido a sus fuentes y condiciones celulares donantes. Los exosomas con el conjunto único de ácidos nucleicos pueden ser aislados para la administración posterior de los ácidos nucleicos a las células receptoras.

(d) *exosomas de células donantes modificadas genéticamente*. La desestabilización o las mutaciones génicas en las células productoras de los exosomas dan lugar a exosomas modificados genéticamente, que pueden usarse para la administración de sus ácidos nucleicos a las células receptoras. La expresión de cualquier tipo de ácido nucleico presente en los exosomas puede estar afectada (eliminada o regulada por aumento / disminución) mediante la manipulación génica de las células productoras de los exosomas. Por ejemplo, la disrupción de un gen en una célula productora de exosomas da como resultado la ausencia del correspondiente ARNm en los exosomas.

Simultáneamente, la regulación por aumento o por disminución de un gen en las células productoras de exosomas afecta a la cantidad del correspondiente ARNm en los exosomas.

El (los) constructo(s) específico(s) de ácido(s) nucleico(s) (genes clonados, fragmentos y plásmidos de ADN, microARN, ARNip, ADN y ARN codificante y no codificante) puede(n) ser transferido(s) a las células receptoras a través de exosomas modificados genéticamente. Los constructos nucleicos pueden ser elaborados mediante el uso de las técnicas convencionales, por ejemplo, clonación, aislamiento y amplificación de las secuencias de ARN o de ADN, para su transformación adicional en los exosomas.

(a) *Inserción de constructos específicos en los exosomas mediante el uso de sus células donantes*. Pueden introducirse nuevos constructos (de ARN y de ADN) en exosomas mediante el uso de sus células donantes. Los constructos de ácidos nucleicos pueden ser introducidos en las células donantes (las células productoras del exosoma) y consecuentemente mediante las funciones intracelulares del propio transcrito o constructo, que será translocado en los exosomas.

(b) *Inserción de constructos específicos directamente en los exosomas*. Los exosomas pueden ser aislados a partir de orígenes diferentes, por ejemplo, a partir de células que crecen *in vitro*, en el cuerpo humano o de células originadas a partir de un ser humano y de un animal. Los constructos genéticos de ARN o de ADN pueden ser introducidos en estos exosomas directamente mediante el uso de técnicas convencionales de biología molecular tales como transformación, transfección y microinyección *in vitro*. Los exosomas modificados genéticamente pueden usarse posteriormente para la transferencia de sus ácidos nucleicos a las células receptoras.

El método de la invención puede producir exosomas que comprenden al menos un ácido nucleico no autólogo añadido externamente. La expresión "no autólogo" significa aquí que el ácido o los ácidos nucleicos añadidos no derivan del exosoma original como tal. Por lo tanto, el ácido o los ácidos nucleicos añadidos pueden derivar de otras especies o de otro órgano o tejido distinto al del exosoma, o de diferentes células donantes, diferentes condiciones, diferentes seres humanos o enfermedades, o de células donantes modificadas genéticamente.

Los ácidos nucleicos pueden ser cualquier material genético que pueda ser transferido como se ha mencionado anteriormente.

El método de la invención puede comprender además la etapa del uso de los exosomas en la preparación de un producto farmacéutico.

Métodos para la producción de exosomas modificados genéticamente

La transformación o la transfección de material genético en los exosomas Hablando de forma más general, los términos transformación y transfección se usan para describir mecanismos de transferencia de ADN y de ARN en biología molecular, y fueron descritos por primera vez en 1944 por Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty (Lederberg J., Genetics. Febrero de 1994; 136 (2): 423 - 6).

(a) *Electroporación*. Mediante estos métodos se realizan varias perforaciones en las células / los exosomas mediante un breve choque con un campo eléctrico de 100 - 200 V/cm. El ADN / ARN puede entrar en las células / los exosomas a través de las perforaciones realizadas por el campo eléctrico.

(b) *Lipofección*. El método se denomina habitualmente transfección y puede usarse para la transformación de las células / los exosomas con ADN / ARN a través de vesículas que contienen los constructos genéticos deseados. Las vesículas se funden con la membrana celular (similar a como se fundirán dos gotas de aceite en la parte superior de un caldo) y se combina el contenido de las vesículas y de las células. Existen diversos kits de transfección en el mercado, listos para su uso, por ejemplo, DeliverX ARNip Transfection Kit (Nº de cat. DX0002) de Panomics, FuGENE® HD Transfection Reagent (Nº de cat. 04709691001) de Roche y LIPOFECTAMINE™ 2000 (Nº de cat. 11668-027) de Invitrogen.

(c) *Transformación mediante el uso de un choque térmico*. El enfriamiento de las células / los exosomas en presencia de cationes divalentes tales como Ca<sup>2+</sup> (en CaCl<sub>2</sub>) hace que sus membranas se vuelvan permeables a los plásmidos / fragmentos de ARN o de ADN. Las células / los exosomas se incuban con el ADN y después se chocan térmicamente brevemente (42 °C durante 30 - 120 segundos), lo que provoca que el ADN entre en la célula. Este método funciona bien para plásmidos de ADN circulares.

Los métodos anteriores describen brevemente cómo puede conseguirse la generación de exosomas modificados genéticamente para transferir ARN y ADN a células receptoras. Los exosomas que contienen ARN / ADN o que están modificados para contener el gen de interés, serán aislados y desplazados a las células receptoras, para que afecten a su función biológica o a su supervivencia. Consecuentemente, los exosomas dispondrán su contenido en el citoplasma de las células objetivo, lo que a su vez dará lugar a la traducción del ARNm en proteínas específicas en la célula objetivo a través de la propia maquinaria proteica de la célula. Además, los exosomas son capaces de portar y transferir pequeños ARN codificantes y no codificantes tales como microARN y ARNip, que pueden regular la traducción de un gen específico.

Los exosomas, al ser vesículas como portadores de ADN o de ARN según se describen en la invención del presente documento, pueden usarse para el tratamiento de enfermedades hereditarias en células madre hematopoyéticas, no hematopoyéticas y en órganos. Las vesículas de exosomas también pueden usarse como portadores de constructos de ADN o de ARN para el tratamiento de infecciones microbiológicas o de enfermedades, o de disfunciones en seres humanos o en animales, o para la transferencia del material genético de cualquier membrana biológica.

Debido a que en los seres humanos, los linfocitos T CD4 son el objetivo de las infecciones por el VIH, las células infectadas pueden ser tratadas con constructos de ARN o de ADN (ARNip, ARNi o ADN) portado y transferido por exosomas a los linfocitos T infectados, diseñados específicamente para silenciar la traducción del ARN vírico. Por lo tanto, nuestra invención desvela que los exosomas que son capaces de transferir sus ácidos nucleicos a los linfocitos T CD4 pueden usarse en el tratamiento de los linfocitos T infectados por el VIH, así como en neoplasias de los linfocitos T tales como linfomas o leucemias linfáticas.

El cambio o la modificación del material genético de los exosomas mediante la alteración del estado de las células productoras de los exosomas, se lleva a cabo mediante la modificación del pH, de la temperatura, de las condiciones de crecimiento, o mediante el uso de anticuerpos / sustancias químicas dirigidas a las células productoras de los exosomas. Esto da como resultado una alteración en el contenido en ácidos nucleicos. También puede usarse la sobreexpresión o la represión de citocinas, quimiocinas y otros genes de las células productoras de los exosomas para cambiar o modificar el contenido genético de los exosomas.

La transferencia de ARN sentido o antisentido a células específicas mediante el uso de vesículas de exosomas para desactivar los genes en lugar de añadir unos nuevos da como resultado una regulación por disminución (ralentización) o que se impida la traducción de un gen en particular. El método se denomina ARN de interferencia (ARNip).

La invención del presente documento hace posible la transferencia de materiales genéticos *in vitro* a células madre adquiridas de un paciente o de un donante antes de la administración de esta célula madre a un paciente o a un receptor humano o animal.

Para administrar ácidos nucleicos a células o a tejidos receptores, pueden administrarse los exosomas que contienen ADN o ARN a las células mediante la adición de los exosomas a cultivos celulares *in vitro*, o mediante la inyección de estos exosomas intravenosamente, o mediante cualquier otra vía, *in vivo*, como se sabe en la materia. Los exosomas pueden ser dirigidos a cualquier célula del cuerpo, incluyendo las células del sistema cardiovascular, las células de músculo esquelético, las células articulares, las células neurales, las células intestinales, las células

pulmonares, las células hepáticas, las células renales o las células del sistema inmunitario, o a cualquier tipo de célula con cualquier función o disfunción en el cuerpo de seres humanos o de animales, incluyendo células malignas.

5 Según se divulga en la invención del presente documento, pueden usarse los exosomas para la administración de material genético a células receptoras para usar la propia maquinaria proteica de la célula en la producción de cualquier fármaco o del precursor de cualquier fármaco, o para afectar a la función o al metabolismo de cualquier fármaco, en cualquier célula de seres humanos o de animales.

10 Para evitar interferencias con material genético indeseable o no pertinente, es preferible el uso de los exosomas que carecen de contenido genético. Pueden usarse los exosomas vacíos para dirigir la transferencia a células receptoras o para dirigir una transfección / transformación de un gen específico (ARN o ADN) en los exosomas.

15 Detección de los exosomas derivados de mastocitos.

Los exosomas liberados a partir de la línea celular de mastocitos murinos MC/9 (ATCC Manassas, VA, EE.UU., número: CRL-8306) se aislaron, se adsorbieron en rejillas recubiertas con carbono y se detectaron mediante el uso de una microscopía electrónica. Para la detección de la proteína de superficie específica del exosoma CD63, también se purificaron los exosomas tanto de mastocitos primarios de médula ósea (BMMC) como de la línea celular MC/9. Los exosomas se adhirieron en microesferas de aldehído y se tiñeron con un anticuerpo CD63, seguido de un anticuerpo secundario acoplado a PE. Estas microesferas se analizaron mediante el uso de una detección por citometría de flujo, confirmando la presencia del CD63 en la superficie de ambos exosomas derivados de BMMC y de MC9.

25 Identificación de las proteínas exosómicas.

Para comprender la función biológica de los exosomas derivados de mastocitos, se analizó el contenido proteico mediante el uso de una CL-EM/EM de nano-flujo. Se extrajo el contenido proteico total de los exosomas aislados y se recogió en un gel de SDS-PAGE. La banda proteica se tripsinizó y se analizó mediante una CL-EM/EM. Los resultados de los espectros de masas en tándem fueron registrados por el programa MASCOT (Matrix Science, Londres) para su identificación. Los resultados revelaron que estos exosomas contienen un número mayor de proteínas de lo que se sabía previamente. Se identificaron aproximadamente 150 proteínas, muchas de las cuales estaban asociadas con la transcripción celular, la traducción y el plegamiento de la proteína. Las proteínas identificadas incluyen varias proteínas ribosómicas, así como proteínas de choque térmico, chaperonas, anexasinas, proteínas del citoesqueleto y proteínas unidas a la membrana, tales como CD63, CD54, CD43 y el MHC de clase I.

35 Detección del ADN y del ARN de exosomas derivados de mastocitos.

Dado que un cierto número de las proteínas identificadas están asociadas con el ARN y la maquinaria de transcripción, establecimos la hipótesis de que los exosomas también pueden contener ADN y/o ARN. Para examinar esto, realizamos una extracción del ARN y del ADN a partir de ambos exosomas y de los mastocitos productores de exosomas completos. Se determinó la presencia de ADN y de ARN mediante una espectrofotometría y en un gel de agarosa. No pudo detectarse nada de ADN en la muestra de exosoma, mientras que se observó una cantidad sustancial de ARN selectivo procedente de los exosomas. Específicamente, el ARN exosómico contenía unas cantidades muy bajas o indetectables de ARN ribosómico, lo que indica la presencia de otros tipos de ARN, es decir, de ARNm.

45 Análisis con micromatriz del ARN exosómico.

Con objeto de caracterizar el ARN procedente de los exosomas derivados de mastocitos, se aplicó una micromatriz de ADN de ratón Affymetrix (Affymetrix) mediante el uso de ARN de ambos mastocitos y de sus exosomas. Los resultados revelaron que los exosomas cortan el ARNm de aproximadamente 2.500 genes, lo que es aproximadamente un 10 % de los genes que son expresados en los mastocitos madre. Además, el análisis del perfil genético mostró unas diferencias esenciales en el ARNm entre los exosomas y sus células parentales. Los transcritos más abundantes en los exosomas difieren de los abundantes transcritos en las células parentales, lo que indica una selectividad del ARN exosómico. Interesantemente, los exosomas portaban el ARNm de 180 genes cuyos transcritos estaban ausentes en sus mastocitos madre. Los resultados indican que el ARNm es transportado en los exosomas de una forma altamente selectiva, y parece que las células parentales expresan un cierto número de genes exclusivamente para la administración exosómica.

60 Detección del ARN de los exosomas de BMMC.

Para identificar el ARN de los exosomas de una fuente distinta a una línea celular, se recogieron células de médula ósea de ratones y se cultivaron para que se transformaran mastocitos (mastocitos derivados de médula ósea: BMMC) durante 4 semanas. Durante las últimas 48 horas, las células se cultivaron en presencia de uracilo radioactivo (véase el **ejemplo 1**). Los exosomas del cultivo se aislaron, y el ARN marcado con radioactividad se

detectó con un contador de centelleo. Los resultados mostraron que el uracilo radioactivo incorporado en el ARN celular podría ser encontrado en el ARN de los exosomas. La cantidad de ARN de los exosomas derivados de médula ósea no es tan abundante como en los exosomas derivados de la línea celular de médula ósea, lo que puede explicarse por el bajo número de células BMMC usadas para la recolección, y por las condiciones de crecimiento *in vitro* de estas células.

#### Transferencia del ARN entre células a través de los exosomas.

Con objeto de examinar si los exosomas pueden transferir el ARNm que contienen a otra célula, se añadieron los exosomas derivados de mastocitos que contienen ARNm con uracilo radioactivo a células dendríticas cultivadas (DC), a linfocitos T CD4 y a mastocitos MC/9. Se extrajeron muestras de los cultivos a diferentes intervalos y las células se aislaron y se lavaron mediante centrifugación. El ARN de las células receptoras se aisló y se examinó para comprobar el uracilo radioactivo mediante el uso de un contador. Lo más importante es que las células DC, CD4 y MC/9 expuestas a los exosomas contenían una cantidad aumentada de uracilo radioactivo, por lo que habían sido absorbidas desde los exosomas. Los resultados muestran que los exosomas derivados de mastocitos pueden transferir el ARN a otras células, en este caso, a células DC, CD4 y MC/9.

Los datos muestran que el ARNm puede ser transferido entre dos células de mamífero a través de exosomas. Biológicamente, esto sugiere que una célula puede afectar a la producción proteica de otra célula mediante una señalización a través de exosomas. Esto tiene unas sustanciales aplicaciones biotecnológicas, dado que pueden usarse los exosomas como portadores para la administración de ARNm, o de sondas de ADN, para dirigirse a células tales como células malignas o células del sistema inmunitario. Por lo tanto, de acuerdo con esta invención, los exosomas proporcionan un vehículo para la modulación y la terapia génica que probablemente esté exento de los efectos secundarios de otros vehículos de terapia génica, tales como los virus u otros tipos de cuerpos lipídicos.

Las características de la presente invención se comprenderán más fácilmente mediante referencia a los siguientes **ejemplos**, que no deben ser interpretados como limitantes de la invención.

#### EJEMPLO 1

##### *Preparación celular*

Se cultivaron células MC/9 (ATCC) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para eliminar los exosomas presentes en el suero, se ultracentrifugaron T-Stim y FBS de rata a 120.000 g durante 90 min mediante el uso de un rotor Ti70 (Beckman optima LE-80k Ultracentrifuge). Se cultivó la línea celular de mastocitos humanos HMC-1 (Dr. Roger Butterfield, Clínica Mayo, EE.UU.) en IMDM que contenía un 10 % de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM y alfa-tioglicerol 1,2 mM. Para la liberación del exosoma, se cultivaron las células HMC-1 en presencia de un ionóforo de calcio 1 µM durante 30 min. Los mastocitos de médula ósea (BMMC) se prepararon mediante el cultivo de las células de médula ósea procedentes de fémures de BALB/c machos de 7 - 10 semanas de edad en presencia de IL-3 (R and D systems) según se describió previamente (Razin, E. et al. Interleukin 3: A differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulphate E proteoglycan. J Immunol. 132, 1479 - 1486 (1984)). Después de 4 semanas de cultivo se recogieron las células y consistían en un 96 % de MC puras, según se analizó mediante morfología. Durante las últimas 48 h, las BMMC se cultivaron a 3 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio completo con FBS ultracentrifugado complementado con 10 ng/ml de IL-4 (R&D-systems), y en algunos experimentos, en presencia de 1 µl/ml de <sup>3</sup>H-Uracilo (Amersham Biosciences). Para el cultivo de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se recogieron bazo de ratón y se hicieron pasar a través de un filtro de 70 µm, seguido de uno de 30 µm. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se purificaron mediante una selección negativa mediante el uso del cóctel de enriquecimiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratón SPINCEP® (Stemcell Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> variaba entre el 89 y el 91 %, según se analizó mediante una citometría de flujo. Las células se cultivaron en RPMI 1640 que contenía un 10 % de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin a 1 x 10<sup>5</sup> células por ml en placas de 48 pocillos de fondo plano.

#### EJEMPLO 2

##### *Purificación de los exosomas*

Los exosomas se prepararon a partir del sobrenadante de las células MC/9, BMMC y HMC-1 mediante centrifugaciones diferenciales según se describió previamente (Raposo, G. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. J. Exp. Med. 183, 1161 - 1172 (1996)). Se recogieron las células, se centrifugaron a 500 g durante 10 min para eliminar las células y a 16.500 g durante 20 min, seguido de una filtración a través de un filtro de 0,22 µm para eliminar los desechos celulares. Los exosomas fueron sedimentados mediante una ultracentrifugación (Beckman Ti70 rotor) a 120.000 g durante 70 min. Para la espectrometría de masas, el sedimento de los exosomas se lavó una vez con PBS. Se midió el contenido en proteínas de los exosomas mediante el uso del BCA™ Protein Assay Kit (Pierce). Para el experimento en gradiente de densidad, el sedimento de los exosomas a 120.000 g se hizo flotar en un gradiente de sacarosa (sacarosa 0,25 - 2 M, Hepes / NaOH 20 mM, pH 7,2). Los exosomas se disolvieron en sacarosa 2,5 M y el gradiente se estratificó en la parte superior de la suspensión de

exosomas. El gradiente se centrifugó a 100.000 g durante 15 h de acuerdo con (Rapso et al 1996). En resumen, se recogieron las fracciones del gradiente (10 x 3,8 ml) del fondo del tubo, se diluyeron con 10 ml de PBS y se ultracentrifugaron durante 2 h a 150.000 g (rotor Beckman Ti70.1), y los sedimentos se extrajeron con Trizol® (Invitrogen).

### 5 EJEMPLO 3

#### *Aislamiento del ARN, del ADN y de las proteínas*

10 El ARN, el ADN y las proteínas se aislaron mediante el uso de Trizol® (Invitrogen) o del RNEASY® mini kit (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para la purificación conjunta del microARN y del ARN total, se extrajo el ARN mediante el uso de Trizol, seguido del RNEASY® mini kit. Se desorganizaron las células y los exosomas y se homogenizaron en tampón RLT (Qiagen) y se añadieron 3,5 volúmenes de etanol al 100 por ciento a las muestras antes del uso de la columna RNEASY mini spin. El resto del procedimiento se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante.

### 15 EJEMPLO 4

#### *Introducción de fragmentos de ADN / ARN o de constructos en los exosomas*

#### 20 Inserción de constructos específicos directamente en los exosomas

Los exosomas pueden aislarse a partir de orígenes diferentes, por ejemplo, de células en crecimiento *in vitro*, del cuerpo humano o de células procedentes de un ser humano y de un animal. Los constructos genéticos de ARN o de ADN pueden ser introducidos directamente en estos exosomas mediante el uso de técnicas convencionales de biología molecular tales como transformación, transfección y microinyección *in vitro*.

### 25 EJEMPLO 5

#### 30 *Administración de exosomas que contienen ADN o ARN a células*

#### Experimentos de transferencia

35 Para marcar el ARN de los exosomas de MC/9, se cultivaron las células en medio completo complementado con 1 µl/ml de <sup>3</sup>H-Uracilo 72 h antes del aislamiento de los exosomas. Los exosomas se aislaron de acuerdo con el protocolo de aislamiento y se lavaron mediante ultrafiltración (10 kDa, Millipore) para eliminar los nucleótidos libres. Los exosomas se añadieron a células MC/9, CD4<sup>+</sup> y HMC-1 en la proporción de 8:1 entre las células donantes y las receptoras en el punto de inicio del marcaje. A las 0 h y 24 h, se recogieron las células y se lavaron dos veces. El ARN se aisló mediante un RNEASY® mini kit y se midió la señal del ARN radioactivo mediante el uso de centelleo. El medio complementado con 1 µl/ml de <sup>3</sup>H-Uracilo ausente en las células donantes se trató igualmente y se usó como control negativo.

#### Traducción *in vitro*

45 Se purificó el ARN exosómico total mediante el uso del RNEASY® mini kit y se usaron 0,5 µg para la traducción. Se usó el kit de traducción del lisado de conejo *in vitro* (Promega Corporation) de acuerdo con la recomendación del fabricante para traducir el ARNm exosómico en proteínas. Igualmente se trató una muestra sin ARN exosómico y se usó como control negativo. Una vez completado el procedimiento de traducción, las proteínas totales se precipitaron mediante el uso de acetona y se determinaron mediante el uso del ensayo de proteínas RC DC (BioRad). El contenido de proteínas en las muestras (presencia y ausencia de ARN exosómico) fue comparado mediante el uso de 2D-PAGE, BioRad instruments (Mini-protean®3cell) y recomendación. Los geles en 2D se visualizaron mediante el uso de SyproRuby (BioRad) y se digitalizaron mediante el uso de un fosfoimager. Se compararon las manchas de proteínas de las muestras y una selección de las proteínas recién producidas se cortó, se tripsinizó y se identificó mediante el uso de una CL-EM/EM seguido de una búsqueda con el programa MASCOT. Las proteínas recién producidas procedentes de ratón se compararon con los genes identificados en el análisis por micromatriz del ADN.

#### Traducción *in vivo*

60 Se añadieron exosomas de MC/9 (1.000 µg) a células HMC-1 (8 x 10<sup>6</sup>) en tres puntos temporales diferentes (0, 3, 6 h) y las células se incubaron durante aproximadamente 24 h. Las células HMC-1 se recogieron, se lavaron y se separaron las proteínas totales de las células mediante una 2D-PAGE de acuerdo con la instalación de Proteomics Core. Se trató igualmente una muestra sin exosomas y se usó como control negativo. Las proteínas recién producidas fueron detectadas mediante el uso de PDQUEST y se cortaron 96 manchas y se identificaron mediante el uso de una MALDI-tof seguido del programa de búsqueda MASCOT, de acuerdo con la instalación de Proteomics Core (Universidad de Gothenburg).



Después los exosomas administraron los ácidos nucleicos a las células receptoras y posteriormente afectaron a su función biológica o a su supervivencia.

EJEMPLO 6

5

*Producción de exosomas que carecen de material genético*

Los exosomas vacíos se usaron para una transferencia directa a células receptoras o para una transfección / transformación directa de un gen específico (ARN o ADN) en los exosomas. Los métodos para producir exosomas vacíos (carentes de material genético) son múltiples, como sabe el experto en la materia; incluyen la exposición a UV, la mutación de proteínas que llevan el ARN en los exosomas, así como la electroporación y los tratamientos químicos, para abrir poros en las membranas de los exosomas. Los métodos incluyen la mutación / delección de cualquier proteína que pueda modificar la carga de cualquier ácido nucleico en los exosomas.

15 EJEMPLO 7

*Producción de proteínas de ratón en mastocitos humanos después de la transferencia de exosomas MC/9 de ratón*

Para ensayar si podrían producirse proteínas de ratón en mastocitos humanos después de la transferencia de exosomas MC/9 de ratón, determinamos la presencia de las proteínas de ratón en la célula receptora mediante una 2D-PAGE seguido de una MALDI-tof. Después de la incubación de las células humanas con los exosomas MC/9 de ratón durante 24 horas, se identificaron 96 marchas de proteínas nuevas o potenciadas. Interesantemente se identificaron tres proteínas de ratón distintas a las células humanas que están presentes en los exosomas MC/9. Estas proteínas eran la CDC6 de ratón (089033), la proteína en dedo de cinc de ratón 271 (P15620) y la CX7A2 de ratón (P48771). El ARNm de las dos primeras proteínas estaba presente en dos de los experimentos de micromatriz, y la última estaba presente en las cuatro micromatrices realizadas, lo que sugiere que el ARNm administrado por los exosomas a una célula receptora puede ser traducido en proteínas.

Los resultados proteómicos de la transferencia de los exosomas MC/9 a las células HMC-1 cuando se incubaron mastocitos humanos HMC-1 con y sin los MC/9 de ratón durante 24 horas demuestran que las proteínas de ratón podían ser producidas en los mastocitos humanos. Las proteínas de los dos geles estaban emparejadas, y se identificaron 96 proteínas recién producidas mediante una MALDI-tof y se produjeron proteínas de ratón a partir del ARNm exosómico.

35 EJEMPLO 8

*Uso de los exosomas como terapia génica en enfermedades malignas*

Los exosomas son producidos por las células malignas, tomados de un paciente que padece una enfermedad maligna. Estos exosomas son procesados para que contengan constructos genéticos de cualquier tipo o especificidad, para ser reintroducidos en el paciente. Después los exosomas de las células malignas se fusionan preferentemente con las células del mismo tipo, administrando los constructos de ADN y o de ARN específicamente a la célula maligna, como una terapia génica de la enfermedad maligna. El procedimiento se lleva a cabo de acuerdo con los **ejemplos** 1 - 6, pero con los exosomas producidos por células malignas.

Aunque se ha descrito la invención con referencia a las formas de realización específicas, se apreciará que son posibles numerosas variaciones, modificaciones y formas de realización.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la producción de exosomas *in vitro* que contienen un constructo de un ácido nucleico seleccionado, que comprende:
- a) el aislamiento de los exosomas que tienen un tamaño en el intervalo de entre 30 y 100 nm, a partir de células que crecen *in vitro* o a partir de células que han sido obtenidas a partir de un ser humano o de un animal; y
  - b) la introducción del constructo de un ácido nucleico seleccionado directamente en los exosomas aislados.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el constructo de un ácido nucleico seleccionado se elige de entre el grupo que consiste en ARNm, ARNt, ARNr, ARNip, ARN regulador, ARN no codificante, ARN codificante, fragmentos de ADN y plásmidos de ADN.
- 15 3. Un método de la reivindicación 1, en el que el constructo de un ácido nucleico seleccionado es ARN.
4. Un método de la reivindicación 1, en el que el constructo de un ácido nucleico seleccionado es ARNip.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en el que la introducción del constructo de un ácido nucleico seleccionado directamente en los exosomas se consigue mediante el uso de un método seleccionado de entre el grupo que consiste en la transformación de los exosomas, la transfección de los exosomas y la microinyección del material genético seleccionado en los exosomas.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, que además comprende la etapa de c) la transferencia del constructo de un ácido nucleico seleccionado desde los exosomas a las células receptoras *in vitro*.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el constructo de un ácido nucleico seleccionado es transferido a las células receptoras mediante la adición de los exosomas a un cultivo celular *in vitro*.
- 30 8. El método de la reivindicación 6, en el que la célula receptora es una célula madre previamente adquirida a partir de un donante.
- 35 9. El método de la reivindicación 6, en el que dichas células receptoras comprenden linfocitos T CD4 que pueden usarse en un método para el tratamiento de los linfocitos T infectados por el VIH, así como de neoplasias de los linfocitos T.
- 40 10. El método de la reivindicación 9, en el que el constructo de un ácido nucleico seleccionado introducido en los exosomas comprende un constructo de ARN o de ADN que está diseñado específicamente para silenciar la traducción del ARN del VIH.
- 45 11. El método de la reivindicación 1, en el que los exosomas son aislados a partir de células malignas.
12. El método de la reivindicación 1, que además comprende la etapa del uso de los exosomas en la preparación de un producto farmacéutico.