

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 492**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2015.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2011** **E 11705585 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015** **EP 2542250**

54 Título: **Microvesículas (MVs) derivadas de citoblastos de etapa adulta para uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad neoplásica.**

30 Prioridad:

**02.03.2010 EP 10425052**

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

**21.12.2015**

73 Titular/es:

**FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND  
GMBH (100.0%)  
Else-Kroener-Strasse 1  
61352 Bad Homburg, DE**

72 Inventor/es:

**BRUNO, STEFANIA;  
HERRERA SANCHEZ, MARIA BEATRIZ;  
FONSATO, VALENTINA;  
CAMUSSI, GIOVANNI y  
TETTA, CIRO**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 554 492 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

Microvesículas (MVs) derivadas de citoblastos de etapa adulta para uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad neoplásica.

La presente invención se relaciona con el tratamiento terapéutico de una enfermedad neoplásica.

- 5 Se conoce que el trasplante de citoblastos hematopoyéticos ejerce efectos de inhibición de tumores en pacientes con tumor sólido, así como efectos anti-neoplásicos en cáncer metastásico de mama, de riñón, de ovario, de próstata y de páncreas.

10 Se demuestra que los citoblastos mesenquimales de médula ósea humana (BM-MSC) contribuyen a la reparación de una amplia variedad de órganos y reparación de tejidos y los estudios experimentales sugieren que el trasplante de MSCs puede tener un efecto beneficioso sobre la recuperación funcional y estructural en diversos órganos como corazón, hígado y riñón.

El microambiente de citoblastos parece cumplir una función esencial en la prevención de carcinogénesis, al proporcionar señales para inhibir la proliferación y para promover la diferenciación.

- 15 Sin embargo, el uso de citoblastos en las indicaciones terapéuticas es menos aconsejable, dado que se ha reportado un riesgo potencial tumorigénico de dicha terapia con citoblastos (Amariglio N et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. PLoS Med. 2009 Feb 17;6(2))

20 Las microvesículas derivadas de células (MV) son vesículas pequeñas liberadas por células que expresan antígenos característicos de la célula de la que se originan y llevan componentes citoplasmáticos y de membrana y se han descrito como un nuevo mecanismo de comunicación celular. Recientemente, los presentes inventores demostraron que las microvesículas derivadas de células progenitoras endoteliales humanas (EPC), BM-MSC y citoblastos de hígado pueden servir como un vehículo para la transferencia de material genético (mARN) que puede reprogramar las células diferenciadas dirigidas, como células endoteliales, células epiteliales tubulares y hepatocitos (Deregibus MC et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. Blood. 2007 Oct 1; 110(7):2440-8; Bruno S et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. J Am Soc Nephrol. 2009 May;20(5):1053-67; Herrera MB et al. Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. J Cell Mol Med. 2009 Jul 24) y contribuir con la regeneración y reparación de tejidos.

30 La solicitud de patente internacional WO2009/087361 describe la producción de células diferenciadas al aplicar un inductor a una primera población de células no diferenciadas y luego aislar las microvesículas de las células diferenciadas. Véase al respecto el primer párrafo de la página 30 del documento WO2009/087361. La primera población de células no diferenciadas es, por ejemplo los citoblastos mesenquimales de médula ósea. Sin embargo, el documento WO2009/087361 no describe la obtención de microvesículas directamente de las células no diferenciadas.

35 Los presentes inventores han encontrado ahora que las microvesículas (MVS) derivadas de citoblastos de etapa adulta, preferiblemente de médula ósea o citoblastos mesenquimales glomerulares o de citoblastos hepáticos no ovales, muestran actividades anti-neoplásicas notables tanto in vitro como in vivo, representando de este modo una alternativa ventajosa sobre los citoblastos enteros correspondientes para el tratamiento terapéutico de cáncer. La actividad anti-neoplásica de las microvesículas derivadas de citoblastos de etapa adulta de acuerdo con la presente invención se demostró in vitro al medir el efecto de las microvesículas sobre la proliferación y la apoptosis de una variedad de estirpes celulares de cáncer humano, así como también su efecto sobre la formación de estructuras de tipo capilar. La actividad anti-neoplásica de las microvesículas también se confirmó en un modelo de ratón in vivo al medir el efecto de tratamiento de MVs sobre el crecimiento tumoral.

45 Las actividades anti-neoplásicas observadas de microvesículas derivadas de citoblastos de etapa adulta son inesperadas sobre la técnica anterior. Las preparaciones de citoblastos mesenquimales (MSCs) son, de hecho conocidas por ejercer un efecto regenerador sobre algunos tejidos. Por ejemplo, las MSC derivadas de médula ósea son conocidas por apoyar naturalmente la hematopoyesis al secretar una serie de moléculas tróficas, que incluyen glicoproteínas solubles en la matriz extracelular, citoquinas y factores de crecimiento. Más aún, en el documento WO2009/050742 se muestra que las microvesículas derivadas de citoblastos endoteliales promueven angiogénesis y resistencia a apoptosis, tanto in vitro como in vivo. En el documento WO2009/057165 se muestra que las microvesículas derivadas de citoblastos inducen regeneración endotelial y epitelial de tejidos u órganos dañados.

50 En el documento WO2009/10504 se dice especulativamente que las microvesículas derivadas de un citoblasto mesenquimal son adecuadas para uso en el tratamiento de un número alto y una gran variedad de enfermedades. No se proporcionan evidencia experimental, explicación teórica ni método específico para el tratamiento de cáncer.

De esta manera, un primer aspecto de la presente invención es una microvesícula derivada de un citoblasto de etapa adulta pluripotente o multipotente para uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad neoplásica.

5 En este sentido, se debe entender que las microvesículas no se derivan necesariamente de los citoblastos de etapa adulta tomados del mismo paciente al que se administrarán. Más bien, se pueden derivar de un sujeto diferente, preparar y mantener en la forma de un medicamento y luego ser administradas a un paciente en necesidad de las mismas. Este es el así denominado método alogénico.

10 En una realización preferida, el citoblasto de etapa adulta es un citoblasto mesenquimal humano o un citoblasto de hígado. Un citoblasto de hígado humano preferido es el citoblasto de hígado no ovalado humano (HLSC) que expresa marcadores de citoblastos mesenquimales y embrionarios descritos en el documento WO 2006/126219. Esta estirpe celular, en particular, se caracteriza por el hecho de que es una estirpe celular progenitora pluripotente de hígado humano no ovalada aislada a partir de tejido en etapa adulta que expresa marcadores de células hepáticas y que es capaz de diferenciarse en las células maduras del hígado, células productoras de insulina, células osteogénicas y células epiteliales y preferiblemente expresar marcadores seleccionados de entre el grupo que comprende albúmina, proteína- $\alpha$  fetoproteína, CK18, CD44, CD29, CD73, CD146, CD105, CD90 y preferiblemente no expresan marcadores seleccionados del grupo que comprende CD 133, CD117, CK19, CD34, citocromo P450.

20 En otra realización preferida, el citoblasto mesenquimal humano se deriva de médula ósea de etapa adulta humana (BM-MSc). En otra realización preferida, el citoblasto mesenquimal humano se deriva de glomérulos descapsulados de etapa adulta humanos (GI-MSc), como se describe en la solicitud de patente europea No. 08425708.8. Estas células se caracterizan además en que son CD133 negativas, CD146 positivas y CD34 negativas y que son capaces de diferenciarse en podocitos, células endoteliales y células mesangiales y también expresan preferiblemente marcadores seleccionados del grupo que comprende CD24, Pax-2, CD31, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, nanog, Musashi, vimentina, nestina y preferiblemente no expresan marcadores seleccionados del grupo que comprende  $\alpha$ -SMA, Oct-4, CD45, citoqueratina, CD80, CD86, CD40.

25 De acuerdo con una realización de la invención, la enfermedad neoplásica se selecciona del grupo que consiste de tumor de hígado (por ejemplo hepatoma), tumor epitelial (por ejemplo sarcoma de Kaposi), tumor de mama (por ejemplo adenocarcinoma de mama), tumor de pulmón, tumor de próstata, tumor gástrico, tumor de colon y tumor de ovario.

30 Otro aspecto de la presente invención es el uso de una microvesícula derivada de un citoblasto de etapa adulta como se definió anteriormente, para preparar un medicamento para el tratamiento terapéutico de una enfermedad neoplásica como se definió anteriormente.

35 En una realización, el tratamiento terapéutico comprende la administración de uno o más agentes citotóxicos o citoestáticos. Los agentes citotóxicos o citoestáticos adecuados incluyen por ejemplo Paclitaxel, Lenalidomida, Pomalidomida, Epirubicina, 5FU, Sunitinib, Lapatinib, Canertinib, ciclofosfamida, doxorubicina, Lenalidomiden/Dexametasona, Pomalidomida/Dexametasona, Carboplatina, Rapamicina, mitoxantron, oxaliplatina, docetaxel, vinorelbina, vincristina y cualquier combinación de los mismos. La administración de una combinación de doxorubicina y/o vincristina con MV derivada de un citoblasto de etapa adulta es altamente preferida, dado que se ha mostrado que dicha combinación ejerce un efecto sinérgico (véase Figura 13).

40 La microvesícula se administra a un paciente en necesidad de la misma ya sea localmente o sistémicamente. Una forma de dosificación farmacéutica adecuada para la administración local y sistémica es por ejemplo una forma de dosificación inyectable. Por vía de ejemplo, se administra la microvesícula mediante inyección intra-tumor local (i.t.) en un tumor sólido, o por vía de inyección i.v. o infusión, en el caso de un tumor sólido y en el caso de metástasis. Una dosis adecuada MV para ser administrada depende de una pluralidad de factores, pero generalmente está comprendida entre 0.1 a 200 microgramos/kg de peso corporal del receptor, preferiblemente 1 a 150 microgramos/kg de peso corporal del receptor, incluso más preferiblemente 3 a 120 microgramos/kg de peso corporal del receptor.

45 La expresión "microvesícula (MV) derivada de un citoblasto de etapa adulta" como se utiliza aquí se refiere a una partícula de membrana que es por lo menos en parte derivada de un citoblasto de etapa adulta. A su vez, el término "citoblasto de etapa adulta" incluye cualquier célula indiferenciada o parcialmente indiferenciada que es capaz de proliferar (autorrenovación) y diferenciar (plasticidad), reemplazando de esta manera las células maduras de un linaje de células especializadas que han alcanzado al final de su ciclo de la vida. El término "citoblasto de etapa adulta" tal como se utiliza en la presente descripción incluye los citoblastos que tienen la capacidad ilimitada de autorrenovación y plasticidad pluripotente y las células progenitoras con plasticidad multipotente y, en algunos casos, una capacidad de autorrenovación limitada. Los "citoblastos de etapa adulta" tienen plasticidad pluripotente o multipotente que significa que son capaces de diferenciarse en por lo menos dos, más preferiblemente por lo menos tres, tipos distintos de células especializadas, completamente diferenciadas, maduras.

Dentro del contexto de la presente descripción, la expresión “citoblasto de etapa adulta” está destinada a significar un citoblasto que se aísla de un tejido en etapa adulta, en contraste con una “citoblasto embrionario” que se aísla de la masa celular interna de un citoblasto. Los citoblastos de etapa adulta son también conocidos como “citoblastos somáticos”.

- 5 En el contexto de la presente descripción, la expresión “microvesículas (MV) derivadas de un citoblasto de etapa adulta” pretende significar que las microvesículas se derivan directamente de los citoblastos indiferenciados.

En el contexto de la presente descripción, la expresión “directamente” significa que las microvesículas se derivan de los citoblastos de etapa adulta no diferenciados sin ninguna etapa de diferenciación que se lleva a cabo o que haya tenido lugar antes de la obtención de las microvesículas.

- 10 Las microvesículas derivadas de citoblastos de etapa adulta utilizadas en la presente invención generalmente es esferoide y tienen un diámetro dentro del rango de 100 nm a 5  $\mu$ m, más normalmente de entre 0.2 y 1  $\mu$ m. Si la partícula no es esferoide, los valores anteriormente mencionados se refieren a la dimensión más grande de la partícula.

- 15 Los citoblastos de los cuales se obtienen las microvesículas utilizadas en la invención pueden ser aislados como se describe en la sección experimental de la descripción. Las microvesículas (MVs) luego se pueden obtener a partir de los sobrenadantes de los citoblastos aislados, por ejemplo, mediante ultracentrifugación como se describe en la sección experimental de la descripción. Las MV aisladas luego se pueden almacenar hasta uso por congelación a muy baja temperatura, por ejemplo, a -80° C, en una suspensión con uno o más agentes crioprotectores. Los agentes crioprotectores adecuados son, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol. El uso de DMSO a una concentración de 1% del volumen de la suspensión celular garantiza una buena conservación de las células y un efecto tóxico limitado en los pacientes a los que se vuelve a infundir. Otras sustancias que se pueden mencionar como agentes crioprotectores son agentes crioprotectores extracelulares, es decir, sustancias de alto peso molecular que actúan en la superficie celular formando una barrera hermética que reduce la deshidratación intracelular.

- 20 Otros objetos y ventajas de la invención aparecerán más claramente a partir de los siguientes ejemplos, que se proporcionan solo a modo de ilustración. En el ejemplo, se hace referencia a las siguientes figuras:

- 25 Las Figuras 1A y B muestran que la incubación de células HepG2 (Figura 1A) y células KS (Figura 1B) con diferentes dosis de microvesículas (MV) inhibe significativamente la proliferación en comparación con células de control incubadas con solo vehículo. La proliferación de células HepG2 y KS se evalúa mediante ensayo de incorporación de BrdU después de 48 horas de incubación con diferentes dosis de MV (1, 10 y 30  $\mu$ g/ml) de BM-  
30 MSC o de GL- MSCs tratada previamente o son RNasa. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE de 3 experimentos.

- 35 Las Figuras 2A y B muestran que la incubación de células HepG2 y KS con MVs promueve significativamente la apoptosis comparado con el control incubado solo con vehículo y de la misma manera la estimulación doxorrubicina. La apoptosis de células HepG2 y KS se evalúa mediante el ensayo Tunel como el porcentaje de células apoptóticas después de 24 horas y/o 48 horas de incubación con diferentes dosis de MVs de BM-MSC (pre-tratadas o no con RNasa) o GI-MSC. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE de 3 experimentos.

- 40 Las Figuras 3A y 3B muestran que la incubación de células MCF-7 (Figura 3A) y células SKOV-3 (Figura 3B) con 30  $\mu$ g/ml de MVs de BM-MSC durante 48 horas inhibe significativamente la proliferación en comparación con células de control incubadas solo con vehículo. La proliferación de las células MCF-7 y SKOV-3 se evalúa mediante ensayo de incorporación de BrdU después de 48 horas de incubación con 30  $\mu$ g/ml de MVs de BM-MSC o de GI-MSC. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EE de 3 experimentos.

- 45 La Figura 4 muestra que las MV de BM-MSC inducen un aumento de las células en la fase G0/G1, especialmente en células SKOV-3. El contenido de ADN se midió en células SKOV-3 cultivadas con 10% de FCS, privados de FCS (inanición) y en presencia de 30  $\mu$ /ml de MVs durante 24 horas. Se observa un aumento del número de células en la fase G0/G1 en presencia de MVs.

Las Figuras 5A y 5B muestran los resultados de experimentos llevados a cabo para evaluar el efecto de MVs sobre la angiogénesis in vitro. Se evalúa la capacidad de los HUVECs y TECs para formar estructuras similares a capilares dentro de Matrigel.

- 50 La Figura 6 muestra los resultados de experimentos llevados a cabo para evaluar el efecto de MVs sobre la apoptosis in vitro. La apoptosis de las HUVECs y TECs se evalúa mediante el ensayo Tunel como un porcentaje de células apoptóticas después de 48 horas de incubación con diferentes dosis de MVs.

La Figura 7 muestra los resultados de experimentos llevados a cabo para evaluar el efecto de MVs sobre la proliferación de TECs. La proliferación de TECs se evalúa mediante ensayo de incorporación de BrdU después de 48 horas de incubación con diferentes dosis de MV (10 y 30 µg/ml) de BM-MSc pre-tratados o no con RNasa. Los resultados se expresan como la media ± EE de 2 experimentos.

5 La Figura 8 muestra la actividad anti-neoplásica in vivo de MVs, tratadas o no con RNasa, administrada intratumoralmente a ratones SCID portadores de tumores de xenoinjertos HepG2. La asa tumoral se determina al medir el calibre de dos diámetros perpendiculares del implante cada semana. Los resultados se muestran como el porcentaje de incremento de la masa tumoral: la masa tumoral en el primer tratamiento (1 semana después de inyección HepG2) se fija por convención como el valor 100%.

10 La Figura 9 muestra que las MVs derivadas de BM-MSc reducen el crecimiento del tumor in vivo. A) Ejemplos representativos de ratones con tumores HepG2 tratados (a la derecha) o no (a la izquierda) con MV de BM-MSc. B) Ejemplos representativos de tumores extirpados HepG2 tratados (a la derecha) o no (a la izquierda) con MV de BM-MSc. C) Tinción con hematoxilina y eosina de los tumores HepG2 tratados (a la derecha) o no (a la izquierda) con el MV de BM-MSc.

15 La Figura 10 muestra que el tratamiento previo de MVs con RNasa aboga la actividad anti-neoplásica de MVs derivadas de BM-MSc. A) Ejemplos representativos de los tumores extirpados HepG2 tratados con MV-RNasa. B) Tinción con hematoxilina y eosina de los tumores HepG2 tratados con MV-RNasa.

La Figura 11 es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de proliferación basado en BrdU en HepG2. Las HepG2 se cultivan solo en DMEM o complementado con diferentes dosis de MVs derivadas de HLSCs. Después de 20 3 días, la proliferación HepG2 se cuantifica utilizando el ensayo de incorporación de BrdU.

La Figura 12 es una gráfica que muestra los resultados de ensayos de apoptosis en células HepG2. Las células HepG2 se cultivan solo en DMEM o con 10% de FCS y se complementan con vincristina (100 ng/ml), o MV-HLSC (30 µg/ml), o MV-HLSC (tratada previamente con RNasa, 30 µg/ml). El análisis se realiza después de 24 horas.

25 La Figura 13 es una gráfica que muestra los resultados de ensayos de apoptosis en las células HepG2 en condiciones basales o células HepG2 tratadas con vincristina, doxorubicina, MV-HLSCs, o con vincristina más MV-HLSCs y doxorubicina más MV-HLSCs.

La Figura 14 es una gráfica que muestra los datos obtenidos al medir el volumen del tumor de los tumores HepG2 recuperados después de MV-HLSC (n = 3), vehículo (n = 2) o MV-HLSC (n = 3) tratadas con RNasa, tratamiento I.T. al momento de sacrificio de ratones. El volumen del tumor se determina al medir un calibrador dos diámetros 30 perpendiculares del implante cada semana.

La Figura 15 muestra micrografías que muestran la inhibición in vivo del crecimiento del tumor mediante tratamiento HLSC-MV y apoptosis intra-tumor inducida. A) micrografías representativas que muestran la apoptosis, PCNA y tinción con Hematoxilina y Eosina de los tumores HepG2 recuperados después de 4 semanas. B) micrografías 35 representativas que muestran la apoptosis, PCNA y tinción con Hematoxilina y eosina de los tumores HepG2 recuperados de ratones tratados con MV. C) micrografías representativas que muestran la apoptosis, PCNA y tinción con Hematoxilina y eosina de tumores HepG2 recuperados de ratones tratados MV-ARNasa

La Figura 16 es una gráfica que muestra los resultados de ensayos de proliferación in vitro llevados a cabo al incubar las células MCF-7 con diferentes concentraciones de HLSC-MVs. La proliferación de las células MCF-7 se evalúa mediante ensayo de incorporación de BrdU después de 48 horas de incubación con 2, 10, 15 y 30 µg/ml de 40 MVs derivadas de células HLSC. El experimento se realiza por triplicado. P <0.05.

La Figura 17 es una gráfica que muestra los resultados de ensayos de proliferación in vitro llevados a cabo al incubar células de Kaposi (SK) con diferentes concentraciones de HLSC-MVs. La proliferación de células de Kaposi se evalúa por ensayo de incorporación de BrdU después de 48 horas de incubación con 2, 10, 15 y 30 µg/ml de MVs derivadas de células HLSC. El experimento se realiza por triplicado. P <0.05.

45 La Figura 18 es una gráfica que muestra los resultados de ensayos de apoptosis in vitro llevados a cabo al incubar células MCF-7 y células de Kaposi con HLSC-MVs. La apoptosis se evalúa mediante el ensayo de TUNEL como el porcentaje de células apoptóticas después de 48 horas de incubación con diferentes dosis de MVs (2; 10; 15; y 30 µg/ml y 30 µg/ml de MVs tratadas con RNasa). La doxorubicina se utiliza como control positivo de la inducción de apoptosis. En el control negativo, células MCF-7 y células de Kaposi se tratan con solo vehículo. El experimento se 50 realiza por triplicado. P <0.05.

#### 1. Microvesículas (MVs) de citoblastos mesenquimales (MSC)

## 1.1 Aislamiento y caracterización de las MSC

Las células de médula ósea se disponen en capas sobre un gradiente de Ficoll (densidad: 1.022 g/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se centrifuga a 1500 rpm durante 30 minutos. Las células mononucleadas se cultivan en presencia de Medio Basal de citoblastos mesenquimales (MSCBM, Lonza). Después de 5 días de cultivo, se cambia el medio. Para expandir las células aisladas, la monocapa adherente se separa por tratamiento con tripsina durante 5 minutos a 37° C, en 15 días para el primer pasaje y cada 7 días para los pasajes posteriores. Las células se siembran a una densidad de 10,000 células/cm<sup>2</sup> y se utilizan no más tarde del pasaje 6.

Las poblaciones de MSC de glomérulos (GI -MSC) se obtienen de la porción normal de la corteza de los riñones extirpados quirúrgicamente, como se describe en Bruno S et al. Isolation and characterization of resident mesenchymal stem cells in human glomeruli. *Stem Cells Dev.* 2009;18:867-880. Después de disección de la corteza, la suspensión glomerular se recoge utilizando una técnica estándar establecida: después de pasar a través de una serie graduada de mallas (mallas de 60 y 120), los glomérulos se recuperaron en la parte superior del tamiz de malla 120. Los glomérulos luego se recogen, en la parte inferior de un tubo cónico mediante precipitación espontánea (10 minutos a temperatura ambiente) y se privan de la capa visceral de la cápsula de Bowman mecánicamente, por varias rondas de aspiración/expulsión utilizando una pipeta de 10 ml, y enzimáticamente, por digestión durante 2 minutos con colagenasa I (Sigma, St. Louis, MO). Los glomérulos luego se recogen, en la parte inferior de un tubo cónico mediante precipitación espontánea con el fin de eliminar las células y las cápsulas de Bowman, y se transfieren a matraces T25 recubiertos de fibronectina (Falcon, BD Bioscience, Two Oak Park, Bedford, MA). Los glomérulos se cultivan en presencia de medio basal de citoblastos mesenquimales (MSCBM, Lonza). Se deja que las células alcancen confluencia antes de los pasajes; el intervalo entre pasajes varía (3-7 días), hasta el pasaje 4, y a partir de entonces se establece alrededor de 7 días.

En cada pasaje, se cuentan las células y se analizan para inmunofenotipo mediante análisis citofluorimétrico e inmunofluorescencia. El análisis citofluorimétrico se realiza con los siguientes anticuerpos, todos con ficoeritrina (PE) o isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado: anticuerpos monoclonales anti-CD105, -CD29, -CD31, -CD 146, -CD44, -CD90 (DakoCytomation, Copenhagen, Dinamarca); -CD73, -CD34, -CD45, -CD80, -CD86, -CD166, HLA-I (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Jose, CA); -CD133 (Miltenyi Biotec, Auburn); KDR (R & D Systems, Abington, Reino Unido); -HLA-II (Chemicon Internacional Temecula, CA), -CD40 (Immunotech, Beckman Coulter), -CD154 (Serotec, Raleigh, NC EE.UU.). Los controles isotípicos IgG de ratón son de Dakocytomation. Todas las incubaciones se realizan en 100 µl de solución salina regulada con fosfato (PBS) que contiene 0.1% de albúmina de suero bovino y 0.1% de azida de sodio, a 4° C. Para cada muestra, se analizan 10,000 células en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences Pharmingen). La activación se construye con base en controles negativos y los controles de compensación se incluyen en todos los análisis realizados. Los porcentajes y cifras de población se generan para poblaciones activadas de cada experimento utilizando el software Cell Quest (BD Biosciences Pharmingen).

La inmunofluorescencia indirecta se realiza en las MSC cultivadas en portaobjetos de cámara (Nalgen Nunc International, Rochester, NY, EE.UU.), se fija en 4% de paraformaldehído que contiene 2% de sacarosa y, si es necesario, permeabilizan con regulador Hepes-Triton X 100 (Sigma, St. Louis, MO). Se utilizan los siguientes anticuerpos: anti-vimentina monoclonal de ratón (Sigma) y factor anti-von Willebrand policlonal de conejo (Dakocytomation). La omisión de los anticuerpos primarios o sustitución con IgG de conejo no inmune o de ratón se utilizan como controles donde sea apropiado. Se utilizan anti-conejo y anti-ratón Alexa Fluor 488 de Rojo Texas (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) como Abs secundarias. Se realiza un análisis de microscopía confocal utilizando un Microscopio Confocal Modelo Zeiss LSM 5 Pascal (Carl Zeiss International, Alemania). Se agrega tinte Hoechst 33258 (Sigma) para tinción nuclear.

Las preparaciones BM-MSC y GI-MSC no expresan marcadores hematopoyéticos tales como CD45, CD14 y CD34. No expresan las moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40) y los marcadores endoteliales (CD31, factor von Willebrand, KDR). Todas las preparaciones de células en diferentes pasajes del cultivo expresan los marcadores MSC típicos: CD105, CD73, CD44, CD90, CD166 y CD146. También expresan HLA clase I.

Las habilidades adipogénicas, osteogénicas y de diferenciación condrogénica de MSC se determinan como se describe en Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res* 2004;95:9-20. En resumen, las MSC se cultivan con Medio Adipogénico (Lonza) durante 3 semanas. Para evaluar la diferenciación, las células se fijan con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se tiñen con 0.5% de Oil Red O (Sigma) en metanol (Sigma) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

La diferenciación osteogénica se evalúa al cultivar las MSC en Medio Osteogénico (Lonza). El medio se cambia dos veces por semana durante 3 semanas. Para evaluar la diferenciación, las células se fijan con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se tiñen con rojo de alizarina, pH 4.1 (Lonza) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Para la diferenciación condrogénica, 2,5 x 10<sup>5</sup> MSCs se centrifugan en un tubo de polipropileno cónico de 15 ml (Falcon BD Bioscience) a 150 g durante 5 minutos y se lava dos veces con DMEM. Los sedimentos se cultivan en

medio condrogénica (Lonza) complementado con 10 ng/ml de factor transformador del crecimiento  $\beta 3$  (Lonza). El medio se cambia cada 3 días durante 28 días. Los sedimentos se fijan en paraformaldehído al 4% durante la noche, y las secciones incluidas en parafina se tiñen para glicosaminoglicanos utilizando 0.1% de safranina O (Sigma) y para proteoglicanos sulfatados utilizando 1% de azul de Alcian.

5 1.2 Aislamiento y caracterización de MVs derivadas de MSC

Las microvesículas (MVS) se obtienen de sobrenadantes de BM-MSC o GI -MSC obtenidos como se describió anteriormente cultivados en medio RPMI privado de FCS y complementado con 0.5% de BSA (Sigma). Después de centrifugación a 2,000 g durante 20 minutos para eliminar los desechos, los sobrenadantes libres de células se centrifugan a 100,000 g (ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K) durante 1 hora a 4° C, se lavan en medio libre de suero 199 que contiene ácido N-2- hidroxietilpiperazina- N'-2-etanosulfónico (HEPES) 25 mM (Sigma) y se somete a una segunda ultracentrifugación en las mismas condiciones. La contaminación por endotoxinas de MVs se excluye mediante la prueba de Limulus de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA, EE.UU.) y las MVs se almacenan a -80° C.

15 En los experimentos seleccionados, las MVs se tratan con 1 U/ml de RNasa (Ambion Inc., Austin, TX, EE.UU.) durante 1 hora a 37° C, la reacción se detiene por adición de 10 U/ml de inhibidor de RNasa (Ambion Inc.) y las MV se lavan mediante ultracentrifugación.

1.3 Experimentos in vitro realizados con MVs derivadas de MSCs

20 Cultivo de estirpes celulares de cáncer. Se cultivan estirpe celular de cáncer de hígado humano (HepG2), estirpe celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) y estirpe celular de cáncer de ovario humano (SKOV-3) en DMEM bajo en glucosa (Euroclone) que contiene 10% de suero de ternera fetal (FCS, Euroclone), 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina y glutamina al 1% (todos de Sigma) y se mantienen en una incubadora con una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. Un cultivo primario de células del sarcoma de Kaposi (células KS) se obtiene de una lesión cutánea de un paciente que tiene aloinjerto renal bajo terapia inmunosupresora y se cultivan en medio RPMI 1640 complementado con 10% de FCS, 100 µg/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina.

30 Células de tumor endoteliales (TEC): Aislamiento y cultivo. Las TEC se aíslan a partir de muestras de carcinomas de células renales del tipo células claras utilizando anti-CD105 Ab acoplado a perlas magnéticas mediante clasificación celular magnética utilizando el sistema MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EE.UU.). Las estirpes celulares de TEC se establecen y mantienen en cultivo en medio completo basal endotelial (EBM) complementado con factor de crecimiento epidérmico (10 ng/ml), hidrocortisona (1 mg/ml), extracto de cerebro bovino (todos de Lonza) y 10% de FCS. Las TEC se caracterizan como las células endoteliales mediante morfología, tinción positiva para el antígeno de vWF, CD105, CD146 y caderina endotelial vascular y tinción negativa para citoqueratina y desmina (Bussolati B et al. *Altered angiogenesis and survival in endothelial cells derived from renal carcinoma*. *FASEB J* 2003; 17:1159-1161).

35 Células endoteliales de vena umbilical (HUVEC): Aislamiento y cultivo. Células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVEC) se obtienen de la vena umbilical, como se ha descrito previamente (Bussolati B et al. *Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide*. *Am J Pathol*. 2001 Sep; 159(3):993-1008) y se mantienen en EBM y 10% de FCS. Los experimentos se realizan en HUVECs de segundo o tercer pasaje.

40 Proliferación celular. Las células HepG2, MCF-7, SKOV-3, KS o HUVECs se siembran a 2,000 o 4,000 células/pozo en placas de 96 pozos en DMEM (Sigma) privadas de FCS con diferentes concentraciones de microvesículas pretratadas o no pretratadas con RNasa. La síntesis de ADN se detecta como la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el ADN celular después de 48 horas de cultivo. Las células se fijan con etanol/HCl 0.5 M y se incuban con nucleasa para digerir el ADN. La incorporación de BrdU en el ADN se detecta utilizando un anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa mAb y se visualiza con un sustrato cromogénico soluble (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 405 nm.

50 Análisis del ciclo celular. Las estirpes celulares de cáncer humano se estimulan durante 24 horas con 30 µg/ml de diferentes preparaciones de MVs, separadas por tripsina y fijas en etanol frío al 80%. Las células se mantienen durante por lo menos 24 horas a -20° C y después se lavan en PBS. Luego, las células se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con yoduro de propidio (50 µg/ml) (Sigma) para teñir el ADN en una solución que contiene RNasa (200 µg/ml) (Sigma) y 0.5% de Nonidet P40 (Sigma). Para cada muestra, se analizan 50,000 células en citómetro FACSCalibur (BD Biosciences Pharmingen).

Ensayo apoptótico. Las células HepG2, MCF-7, SKOV-3, KS, HUVECs o TECs se siembran a 8,000 células/pozo en placas de 96 pozos en DMEM (Sigma) con 10% de FCS y en presencia de doxorubicina (100 ng/ml, Sigma) o

5 diferentes concentraciones de MVs (10 y 30  $\mu\text{g/ml}$ ) pre-tratadas o no con RNasa. La apoptosis se evalúa mediante el ensayo de TUNEL (ApopTag Oncor, Gaithersburg, MD, EE.UU.). Después de 24 a 48 horas de tratamiento, las células se lavan con PBS, se fijan en paraformaldehído al 1% pH 7.4 durante 15 minutos a 4° C, se lavan dos veces en PBS y luego se fijan posteriormente en etanol-ácido acético 2: 1 enfriado previamente durante 5 minutos a -20° C. Las muestras se tratan con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Las células luego se tratan con el conjugado anti-digoxigenina caliente con fluoresceína y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se montan en medio que contiene 1  $\mu\text{g/ml}$  de yoduro de propidio y las células se analizan mediante inmunofluorescencia. Los resultados se expresan como el porcentaje de células que emiten fluorescencia verde (células apoptóticas) frente a células que emiten fluorescencia roja (células totales).

10 Angiogénesis in vitro. Placas de 24 pozos se recubren con factor de crecimiento reducido Matrigel (BD Biosciences) a 4° C y se incuban durante 30 minutos a 37° C, 5% de  $\text{CO}_2$ , en un ambiente humidificado. Las HUVEC o TEC se siembran en los pozos recubiertos con Matrigel en RPMI o EBM con 5% de FCS a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pozo, en presencia o en ausencia de diferentes concentraciones de MVs tratadas o no tratadas con RNasa. Después de 6 horas de incubación, las células se observan bajo un microscopio invertido Nikon (Nikon) y se registran los resultados experimentales. Los resultados se expresan como la media de la longitud del tubo, medido con el sistema de análisis de MicroImage (Cast Imaging), expresada en unidades arbitrarias y se evalúa en 5 campos diferentes con un aumento de 20X en pozos duplicados de 3 experimentos diferentes.

20 Análisis estadístico. Todos los datos de diferentes procedimientos experimentales se expresan como la media  $\pm$  EE. El análisis estadístico se realiza mediante ANOVA con prueba de comparación múltiple Newmann- Keuls cuando sea apropiado.

#### 1.4 Resultados in vitro

##### 1.4.1 Efectos biológicos in vitro de las MV derivadas de BMSCs y GI -MSC en estirpes celulares tumorales

La actividad anti-neoplásica de las MV derivadas de BM-MSC humano, se evalúa in vitro al medir su capacidad para inhibir la proliferación y para inducir apoptosis en estirpes celulares de HepG2, MCF-7, SKOV-3 y KS.

25 La Figura 1 muestra que la incubación de células HepG2 (Figura 1A) y células KS (Figura 1 B) con diferentes dosis de MVs durante 48 horas inhibe significativamente la proliferación en comparación con células de control incubadas con solo vehículo.

30 La Figura 2 muestra que la incubación de células HepG2 (Figura 2A) y células KS (Figura 2B) con MVs durante 24 y 48 horas de apoptosis se promueve significativamente en comparación con células de control incubadas con solo vehículo y de la misma forma de estimulación con doxorrubicina.

35 Cuando las MVs se incuban con RNasa para inducir la degradación completa del ARN transportado por MVs, se reducen los efectos de proliferación anti- y pro-apoptótica provocados por MVs en células HepG2 y KS (Figuras 1 y 2). El tratamiento con RNasa de MV no interfiere per se con apoptosis de estirpe celular de cáncer inducida por doxorrubicina (Figura 2).

40 Por el contrario, la incubación de células MCF-7 y células SKOV-3 con 30  $\mu\text{g/ml}$  de MVs de BM-MSC durante 48 horas inhibe significativamente la proliferación en comparación con las células de control incubadas con solo vehículo (Figura 3A y 3B), pero no promueven la apoptosis. En estas dos estirpes celulares tumorales los inventores también han estudiado el ciclo celular con la técnica de tinción con yoduro de propidio, con el fin de evaluar el porcentaje de células en la fase G0/G1 en comparación con las células en las fases S y G2. Los inventores han observado que las MVs de BM-MSC inducen un aumento de células en la fase G0/G1, especialmente en células SKOV-3 (Figura 4), lo que puede explicar la inhibición de la proliferación observada con la incorporación de BrdU.

45 Los inventores también han probado los efectos de MVs derivadas de GI -MSC sobre la proliferación y la apoptosis de estirpes celulares tumorales. Las GI -MSC no afectan la proliferación y apoptosis de la estirpe celular HepG2. Por el contrario, las MVs derivadas de GI -MSCs inhiben la proliferación y la apoptosis inducida de células KS (Figuras 1 y 2). Más aún, la incubación de células MCF-7 y células SKOV-3 con 30  $\mu\text{g/ml}$  de MVs derivadas de GI -MSCs durante 48 horas inhibe la proliferación en comparación con células de control incubadas con solo vehículo (Figura 3), pero no la promoción de la apoptosis.

##### 1.4.2 MVs derivadas de fibroblastos humanos

50 Las MVs derivadas de fibroblastos humanos no inhiben la proliferación y no inducen la apoptosis de diferentes estirpes celulares de cáncer (datos no mostrados).

#### 1.4.3 Efectos in vitro de MV derivadas de BM-MSC sobre células endoteliales

Los inventores también han estudiado los efectos in vitro de MVs derivadas de BM-MSC sobre la proliferación, apoptosis y formación similar a capilar de HUVECs y células endoteliales tumorales (TEC).

5 El tratamiento MV no afecta la proliferación (datos no mostrados) y la capacidad de formación similar a capilar de HUVECs (Figura 5A). Además, la incubación de HUVECs con diferentes dosis de MVs durante 48 horas no induce la apoptosis (Figura 6).

10 En contraste, la incubación de TECs con diferentes dosis de MVs durante 48 horas, inhibe significativamente la proliferación (Figura 7) y promueve la apoptosis (Figura 6) en comparación con las células de control incubadas con solo vehículo. La proliferación de las TEC se evalúa mediante ensayo de incorporación de BrdU después de 48 horas de incubación con diferentes dosis de MVs (10 y 30  $\mu\text{g/ml}$ ) de BM-MSC tratada previamente o no con RNasa. Los resultados en la Figura 7 se expresan como la media  $\pm$  EE de 2 experimentos.

15 Cuando las MV se incuban con RNasa, el efecto apoptótico provocado por las MV en TECs se reduce significativamente. La incubación de TECs sembradas en Matrigel con diferentes dosis de MVs inhibe significativamente la capacidad de las TECs para formar estructuras similares a capilares in vitro. El tratamiento previo de MV con RNasa abroga el efecto inhibitor de las MV en la formación de túbulos (Figura 5B).

#### 1.5 Experimentos in vivo con MV derivadas de MSC

Formación de tumores.  $3 \times 10^6$  células de HepG2 se recogen y se implantan subcutáneamente en ratones SCID (Charles River, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Las células cultivadas, cosechadas utilizando tripsina-EDTA, se lavan con PBS, se cuentan en una cámara de microcitómetro y se resuspenden en 100  $\mu\text{l}$  de DMEM y 100  $\mu\text{l}$  de matriz de Matrigel (Becton Dickinson). Las células se enfrían en hielo, y se inyectan por vía subcutánea en la parte posterior izquierda de ratones SCID mediante una aguja de calibre 26 utilizando una jeringa de 1 ml. Los animales se monitorizan por actividad y condiciones físicas de cada día, y la determinación del peso corporal y la medición de la masa tumoral se realizan cada 3 días. La masa tumoral se determina mediante la medición del calibre en dos diámetros perpendiculares del implante y se calcula utilizando la fórmula  $1/2a \times b^2$ , donde a es el diámetro largo y b es el diámetro corto (Hou J et al. Experimental therapy of hepatoma with artemisin and its derivatives: in vitro and in vivo activity, chemosensitization and mechanism of action. Clin Cancer Research. 2008;14:5519-5530)). Después de 1 semana, cuando los tumores implantados alcanzan el volumen de aproximadamente 15  $\text{mm}^3$ , los inventores comienzan la inyección intra-tumoral semanal de MVS. El primer tratamiento es con 100  $\mu\text{g}$  de MVs (tratadas o no con RNasa) para un volumen máximo de 20  $\mu\text{l}$ ; las subsiguientes inyecciones intra-tumorales fueron de 50  $\mu\text{g}$  de MVs (tratadas o no con RNasa), para un máximo de 20  $\mu\text{l}$ . En los ratones de control, los inventores inyectan intra-tumoralmente el mismo volumen de solo vehículo. Los ratones se distribuyen aleatoriamente en tres grupos de tratamiento: a) grupo intra- tumor inyectado de MVs (n = 8); b) grupo intra-tumor inyectado con MVs tratado con RNasa (n = 8); y c) el grupo de control inyectado con el mismo volumen de solo vehículo (n = 5). Después de tres semanas de inyección de Matrigel, los ratones se sacrifican y los tumores se recuperan y se procesan para histología.

#### 1.6 Resultados in vivo

##### 1.6.1 Efectos biológicos in vivo de MV derivadas de BMMSCs sobre el crecimiento tumoral HEPG2

40 La formación de tumores y el crecimiento se inhiben por MV derivadas de BM-MSC en ratones SCID. Para determinar el efecto de las MVs derivadas de BM-MSC en la formación de tumores y el crecimiento in vivo, los ratones SCID se inyectan por vía subcutánea con HepG2 en presencia de Matrigel. Una semana después de inyección, cuando el volumen de los tumores es de aproximadamente 15  $\text{mm}^3$ , los inventores comienzan a inyectar semanalmente los ratones intra-tumoralmente con MVs (tratadas o no con RNasa), con un volumen máximo de 20  $\mu\text{l}$ . El primer tratamiento es con 100  $\mu\text{g}$  de MVs; las subsiguientes inyecciones intra-tumorales son con 50  $\mu\text{g}$  de MVs. En los ratones de control, los inventores inyectan intra-tumoralmente 20  $\mu\text{l}$  de solo vehículo.

45 Después de tres semanas de inyección con Matrigel, todos los tumores se recuperan y analizan. En el modelo de xenoinjerto HepG2, la inyección de MV intra-tumoral muestra un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral (Figura 8). El tamaño del tumor y el volumen son significativamente menores en los ratones SCID tratados con MV (Figura 9A y B) y los análisis histológicos muestran áreas de necrosis en los tumores HepG2 tratados con MV (Figura 9C). Los tumores inyectados con MVs tratados previamente con RNasa no difieren en tamaño e histología de los tumores de control (Figura 10A y B).

#### 2. Microvesículas (MVS) de hígado de citoblastos

##### 2.1 Aislamiento y caracterización de citoblastos hepáticos humanos de etapa adulta (HLSCs)

5 Las HLSCs se aíslan de hepatocitos normales criopreservados humanos obtenidos de Cambrex Bio Science Verviers Sprl (Verviers, Bélgica) se cultivan en medio mínimo esencial de células/medio endotelial basal 1 ( $\alpha$ -MEM/EBM) (3: 1) (Gibco/Cambrex) complementado con L-glutamina (5 mM), Hepes (12 mM, pH 7.4), penicilina (50 IU/ml), estreptomycin (50  $\mu$ g/ml) (todos de Sigma, St. Louis), FCS (10%). Las células expandidas se transfieren a un matraz T-75 y se analizan cuando se acercan a la confluencia.

La estirpe celular de hepatoma HepG2 se cultiva en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (bajo nivel de glucosa) que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS).

## 2.2 Aislamiento de MVs derivadas de HLSCs

10 Las MVs se obtienen de sobrenadantes de HLSCs cultivadas en MEM alfa complementado con 2% de suero bovino fetal (FBS). La viabilidad de las células incubadas durante la noche sin suero se detecta por exclusión de azul de tripano. Después de centrifugación a 2000 g durante 20 minutos para eliminar los desechos, los sobrenadantes libres de células se centrifugan a 100,000 g (ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K) durante 1 hora a 4° C, se lavan en medio libre de suero 199 que contiene ácido N-2- hidroxietilpiperazina-N'-2- etanosulfónico (HEPES) 25 mM (Sigma) y se somete a una segunda ultracentrifugación en las mismas condiciones. Para rastrear, in vitro e in vivo, las MVs por microscopía de fluorescencia o el análisis FACS, las MVs de citoblastos se marcan con cromóforo alifático de fluorescencia roja intercalante en tinte de bicapas lipídicas PKH26 (Sigma). Después de etiquetado, las MV se lavan y ultracentrifugan a 100,000 g durante 1 hora a 4° C. Los sedimentos de MV se suspenden en medio 199, y el contenido de proteína se cuantifica por el método de Bradford (BioRad, Hercules, CA). La contaminación por endotoxinas de MVs se excluye por la prueba de Limulus de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA), y las MVs se almacenan a -80° C. El análisis morfológico realizado en suspensión de MV después de tinción con yoduro de propidio no muestra la presencia de cuerpos apoptóticos.

25 En los experimentos seleccionados, las MVs de HLSCs se tratan con 1 U/ml de RNasa (Ambion Inc., Austin, TX) durante 1 hora a 37° C, la reacción se detiene mediante la adición de inhibidor de RNasa 10 U/ml (Ambion Inc) y las MVs se lavan mediante ultracentrifugación. La eficacia del tratamiento de RNasa se evalúa después de extracción de ARN utilizando reactivo de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) mediante análisis de espectrofotómetro de ARN total extraído (no tratado:  $1.3 \pm 0.2$   $\mu$ g de ARN/mg de proteína MV; tratado con RNasa:  $<0.2$   $\mu$ g de ARN/mg de proteína MV). Además, el ARN extraído de MVs tratada con RNasa y no tratada se marca mediante retrotranscripción impulsada por oligo dT y se analiza en gel de agarosa al 0.6% para mostrar la degradación completa de ARN mediante tratamiento con RNasa. Como control, las MVs se tratan con 1 U/ml de DNasa (Ambion Inc.) durante 1 hora a 37° C.

## 2.3 Experimentos in vitro realizados con MV aisladas de HLSCs

35 Ensayo de proliferación. La síntesis de ADN se detecta como la incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) en el ADN celular utilizando un equipo de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Chemicon, Temecula, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, después del lavado, las células se incuban con 10 mol/l de BrdU durante 6 a 12 horas a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub>, en una atmósfera humidificada, se fijan con 0.5 mol/L de etanol/HCl y se incuban con nucleasa para digerir el ADN. El BrdU incorporado en el ADN se detecta utilizando un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa anti-BrdU y se visualiza con un sustrato cromogénico soluble. La densidad óptica se mide con un lector de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas a 405 nm.

40 Ensayo de apoptosis. La apoptosis se evalúa utilizando el ensayo de dUTP terminal de marcado de extremo roto (ApoTag; Oncor, Gaithersburg, MD). Las células ( $8 \times 10^3$ /pozo) se cultivan en placas de 96 pozos, suspendidas en solución salina con fosfato (PBS) y se fijan en paraformaldehído al 1% en PBS, pH 7.4, durante 15 minutos a 4° C seguido de etanol/ácido acético enfriado previamente (2: 1) durante 5 minutos a -20° C. Las células se tratan con el terminal de la enzima desoxinucleótido transferasa y se incuban en una cámara humidificada durante 1 hora a 37° C y luego se tratan con antidigoxigenina fluoresceína caliente conjugada con isotiocianato durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, las muestras se montan en un medio que contiene 1 g/ml de yoduro de propidio y las células se analizan mediante inmunofluorescencia.

50 Análisis estadístico. Todos los datos de los diferentes procedimientos experimentales se expresan como media  $\pm$  EE. El análisis estadístico se realiza mediante ANOVA con prueba de comparación múltiple Newmann- Keuls cuando sea apropiado.

## 2.4 Resultados in vitro

### 2.4.1 Efectos de las MV derivadas de HLSCs sobre la proliferación de la estirpe celular de hepatoma HepG2

Los inventores evalúan los efectos de las MVs derivadas de HLSCs sobre la proliferación HepG2. Brevemente, las células HepG2 se incuban con diferentes dosis (10, 20 y 30 µg/ml) de MVs derivadas de HLSC como tal o tratadas con RNasa durante 3 días. Al final de la incubación, los cultivos HepG2 se cuentan o fijan en etanol/HCl 0.5 M y se incuban con nucleasa para digerir el ADN. La BrdU incorporada en el ADN se detecta utilizando un conjugado con peroxidasa anti-BrdU mAb y se visualiza con un sustrato cromogénico soluble. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 405 nm. Como se muestra en la Figura 11, las MVs derivadas de HLSCs son capaces de inhibir significativamente la proliferación de HepG2. Esto también se aplica a MVs tratadas con RNasa.

#### 2.4.2 Efectos de la MV derivada de HLSCs en la apoptosis de estirpe celular de hepatoma HepG2

Se evalúa la capacidad de las MV derivadas de HLSC para inducir la apoptosis en células HepG2. Brevemente, las HepG2 se siembran a una densidad de 8,000 células/pozo en placas de 96 pozos en DMEM con 10% de FCS y la apoptosis se induce mediante cultivo en ausencia de FCS, mediante tratamiento con vincristina (100 ng/ml), o doxorubicina (50 ng/ml), dos inhibidores de la mitosis utilizados en la quimioterapia del cáncer, o por tratamiento MV (30 µg/ml). Como control, las MVs también se tratan con 1 U/ml de RNasa 18 (Ambion, Austin, TX) durante 1 hora a 37° C para evaluar si la contribución a la inhibición del crecimiento de células de cáncer depende de una transferencia horizontal de mRNA suministrado por las MV a las células cancerosas. La apoptosis se evalúa utilizando el análisis de ensayo TUNEL a las 24 y 72 horas. Como se muestra en la Figura 12, las MVs derivadas de HLSCs son capaces de inducir apoptosis de HepG2 comparable con la inducida por vincristina. Por el contrario, el tratamiento con RNasa no logra inducir la apoptosis. Además, el tratamiento de HepG2 con vincristina más MV-HLSCs o doxorubicina más MV-HLSCs resulta en un efecto aditivo como se muestra en la Figura 13.

#### 2.5 Experimentos in vivo realizados con MVs aisladas de HLSCs

Cultivo celular. Las células de hepatoma humano HepG2, se cultivan en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10%, 100 µg/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomycin y se mantiene en una incubadora con una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C.

Los citoblastos de hígado humano (HLSCs) se cultivan en α-MEM/EBM (3: 1), complementado con suero bovino fetal al 10%, 100 µg/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomycin. El EBM se reconstituye con hEGF (factor de crecimiento epitelial humano), hidrocortisona, GA (gentamicina), BBE (Extracto de cerebro de bovino).

Aislamiento de microvesículas (MVs) de HLSCs. Las MVs se obtienen de sobrenadantes de HLSCs cultivadas en medio α-MEM complementado con suero bovino fetal al 2%. Después de centrifugación a 2,000 g durante 20 minutos para eliminar los desechos, los sobrenadantes libres de células se centrifugan a 100,000 g durante 1 hora a 4° C, se lavan en medio libre de suero 199 que contiene ácido N-2-hidroxietilpiperazina- N'-2-etanosulfónico (HEPES ) 25 mM y se somete a una segunda ultracentrifugación en las mismas condiciones. Los sedimentos de MV se suspenden en medio 199 en 0.1% de DMSO y el contenido de proteína se cuantifica utilizando el método de Bradford.

Diseño experimental. Ratones SCID machos de 4 a 5 meses de edad, se obtienen de los laboratorios Charles River. Todos los ratones se alojan en una instalación limpia y se mantienen durante 1 semana para aclimatarse. En el día 0, se aplican dos inyecciones de 3x10<sup>6</sup> de células tumorales HepG2 se resuspenden en DMEM libre de suero con matriz de membrana basal Matrigel en una relación de 1: 1. La suspensión celular se inyecta en un volumen total de 0.2 ml en la zona inguinal izquierda de los ratones SCID. Todos los ratones se distribuyen aleatoriamente en tres grupos de tratamiento: 20 µl de inyección de MV intratumoral (I.T.) (n = 3); 20 µl de inyección i.t. de PBS (n = 2) y 20 µl de Inyección i.t. de MV tratada con RNasa (n = 3). En el día 7 post-tratamiento se inicia el tratamiento de trasplante de células tumorales. Los tumores se hacen palpables a partir del día 7; 50 o 100 µg de MV, suspendidas en M199 complementado con 0.1% de DMSO, se inyectan 7, 12, 14 y 18 días después del trasplante del tumor. El tratamiento comienza cuando los tumores elevan el volumen de aproximadamente 15 mm<sup>3</sup>. Los animales se monitorizan para actividad y condición física todos los días, y la determinación del peso corporal y la medición de la masa del tumor se realizan cada 3 días.

Los tumores se miden con calibradores. La masa tumoral se determina mediante calibrador, medición en dos diámetros perpendiculares del implante y se calcula utilizando la fórmula  $1/2a \times b^2$ , donde a es el diámetro largo y b es el diámetro corto. Los animales se sacrifican el día 28, y los tumores se recogen para análisis posterior.

Estudios morfológicos. Los tumores se fijan en 10% de formalina regulada neutra, se procesan rutinariamente, se embeben en parafina, se seccionan a 5 µm, y se tiñen con H & E para examen microscópico. La inmunohistoquímica para la detección de la proliferación se realiza utilizando el anticuerpo monoclonal anti-PCNA. Las secciones se bloquean y se marcan con anticuerpo secundario anti-ratón HRP (dilución 1: 300). La omisión de los anticuerpos primarios o sustitución con IgG de ratón no inmune se utiliza como control. La apoptosis se evalúa en secciones tumorales incluidas en parafina mediante TUNEL. Diez secciones no consecutivas se cuentan para células tumorales positivas a apoptosis en un aumento de 630x. Se agrega tinte Hoechst 33258 para la tinción nuclear.

Análisis estadístico. Todos los datos de los diferentes procedimientos experimentales se expresan como media  $\pm$  EE. El análisis estadístico se realiza mediante ANOVA con prueba de comparación múltiple Newmann- Keuls cuando sea apropiado.

## 2.6 Resultados in vivo

### 5 2.6.1 El crecimiento de tumor y la proliferación se inhiben por MV derivadas de HLSCs en un modelo de xenoinjerto de hepatoma en ratones SCID

10 Para determinar el efecto de las MVs derivadas de crecimiento del tumor hijo HLSC in vivo, los ratones SCID se trasplantan por vía subcutánea con la estirpe celular de hepatocarcinoma humano HepG2. Una y dos semanas después de la inyección de HepG2, cuando el volumen de los tumores es de aproximadamente 15 mm<sup>3</sup>, los ratones se tratan con inyección intra-tumoral de MVs (50 o 100  $\mu$ g), para un máximo de 20  $\mu$ l de volumen. En los ratones de control, se inyectan tumor con 20  $\mu$ l de solo vehículo. Después de tres y cuatro semanas de inyección de HepG2, todos los tumores se recuperan y analizan. En este modelo de xenoinjerto, la inyección intra-tumoral de MVs (Figura 14) muestra un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral. Además, los análisis histológicos muestran áreas de necrosis en los tumores tratados con MVs (Figura 15 B) y se observa efecto anti-proliferativo mediante la tinción de PCNA (Figura 15 B).

### 15 2.6.2 Inducción de apoptosis por MVs derivadas de HLSCs en un modelo de xenoinjerto de hepatoma en ratones SCID

20 Para determinar el efecto en la apoptosis intra-tumoral, las secciones de parafina de los tumores tratados con MVs se analizan por TUNEL. La apoptosis inducida por el tratamiento MV se compara con los tumores tratados con solo vehículo (Figura 15 A).

## 2.7 Efecto biológico In vitro de MVs derivadas de HLSCs en adenocarcinoma de mama MCF-7 y células de sarcoma de Kaposi (KS)

### 2.7.1 Materiales y métodos

25 Cultivo celular. Los citoblastos de hígado ovalado no humanos (HLSC) se cultivan en  $\alpha$ -MEM/EBM (3: 1), complementado con suero bovino fetal al 10%, 100  $\mu$ g/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin. El EBM se reconstituye con hEGF (factor de crecimiento epitelial humano), hidrocortisona, GA (gentamicina), BBE (Extracto de cerebro de bovino).

30 Se obtienen estirpes celulares de adenocarcinoma de mama MCF-7 de la American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se cultivan en DMEM complementado con 10% de FCS, 100  $\mu$ g/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin y se mantienen en una incubadora con un ambiente humidificado de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C.

Un cultivo primario de células de sarcoma de Kaposi (células KS) se obtiene de una lesión cutánea de un paciente que tiene aloinjerto renal bajo terapia inmunosupresora y se cultiva en medio RPMI 1640 complementado con 10% de FCS, 100  $\mu$ g/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin.

35 Aislamiento de MVS. Las MVs se obtienen a partir de sobrenadantes de HLSCs cultivadas en MEM alfa complementado con 2% de suero bovino fetal (FBS) durante 18 horas. En los experimentos seleccionados, las MVs se recogen en ausencia de FBS. La viabilidad de las células incubadas durante la noche a 2% de FBS y sin suero se detecta por exclusión de azul de tripano (más del 90%, datos no mostrados). Después de centrifugación a 2,000 g durante 20 minutos para eliminar los desechos, los sobrenadantes libres de células se centrifugan a 100,000 g (ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K) durante 1 hora a 4° C, se lavan en medio libre de suero 199 que contiene ácido N-2- hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 25 mM y se somete a una segunda ultracentrifugación en las mismas condiciones. Lo sedimentos de MV se suspenden en medio 199, y el contenido de proteína se mide con el método de Bradford. Las MV se almacenan a -80° C. El análisis morfológico llevado a cabo en una suspensión de MVs después de tinción con yoduro de propidio no muestra la presencia de cuerpos apoptóticos.

45 Tratamiento de RNasa. En experimentos seleccionados, las MVs de HLSCs se tratan con 1 U/ml de RNasa durante 1 hora a 37° C. La reacción se detiene mediante la adición de 10 U/ml de inhibidor de RNasa y las MVs se lavan mediante ultracentrifugación.

50 Proliferación celular. Con el fin de investigar si las MVs derivadas de HLSCs ejercen su actividad anti-neoplásica en estirpes celulares derivadas de una variedad de tumores, células de adenocarcinoma de mama MCF-7 y células del sarcoma de Kaposi se siembran en placas de 96 pozos a 8,000 células/pozo en DMEM y RPMI, respectivamente, con diferentes concentraciones de MVs (2; 10; 15; y 30  $\mu$ g/ml y 30  $\mu$ g/ml de RNasa tratada con MVs). La síntesis de

ADN se detecta como la incorporación de 5-bromo-2'-desoxi-uridina (BrdU) en el ADN celular después de 48 horas de cultivo. Las células se fijan con etanol/HCl 0.5 M y se incuban con nucleasa para digerir el ADN. La BrdU incorporada en el ADN se detecta utilizando un anticuerpo mAb conjugado con peroxidasa anti-BrdU y se visualiza con un sustrato cromogénico soluble. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 405 nm.

- 5 Ensayo apoptótico. Las células MCF-7 y KS se siembran a 8,000 células/pozo en placas de 96 pozos en DMEM bajo en glucosa con 10% de FCS y en presencia de doxorubicina (100 ng/ml) o diferentes concentraciones de MVs (2; 10; 15; y 30 µg/ml y 30 µg/ml de MVs tratadas con RNasa). La apoptosis se evalúa utilizando el ensayo de TUNEL.

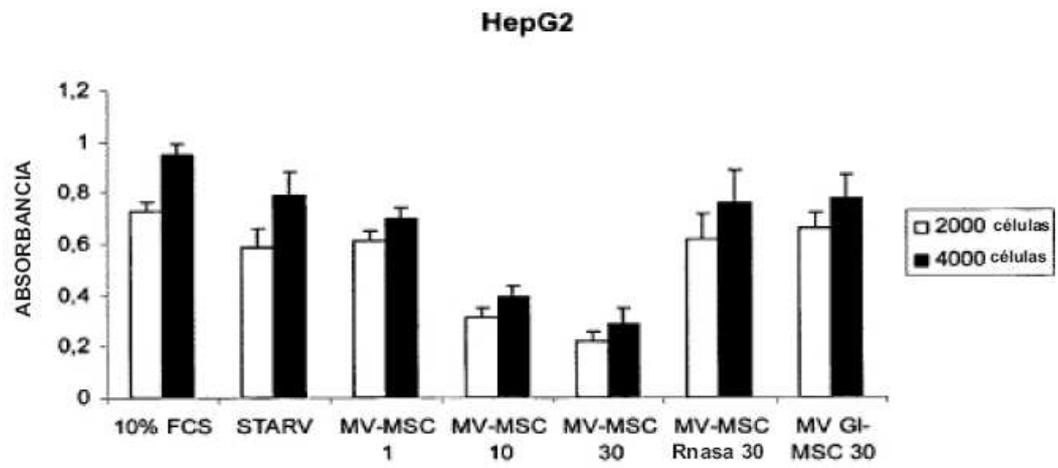
2.7.2 Resultados: las MVS derivados de HLSCs inhiben la proliferación in vitro de células MCF-7 y las células KS

- 10 La incubación durante 48 horas de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 y células del sarcoma de Kaposi con 2, 10, 15 y 30 µg/ml de MVs (Figuras 16 y 17) derivadas de células HLSC-6B inhibe significativamente la proliferación celular en comparación con células incubadas de control con solo vehículo. Estos resultados muestran que los efectos anti-neoplásicos de los citoblastos residentes de tejido no son específicos contra los tumores originados a partir del mismo tejido. Por otra parte, la incubación de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 y células del sarcoma de Kaposi durante 48 horas con 2, 10, 15 y 30 µg/ml de MVs (Figura 18) derivadas de células  
15 HLSC-6B induce apoptosis, en comparación con las células de control incubadas con solo vehículo, con efectos que son similares a los de doxorubicina, un fármaco quimioterapéutico. Esto confirma que los efectos anti-neoplásicos de los citoblastos residentes de tejido no son específicos contra los tumores originados a partir del mismo tejido.

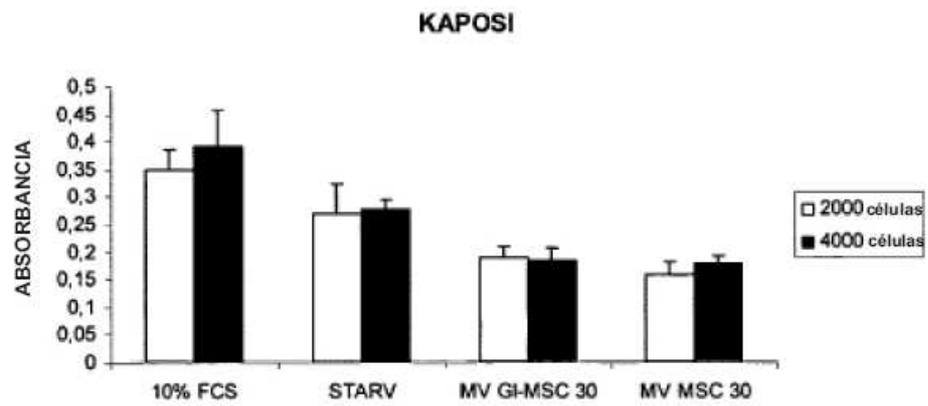
**REIVINDICACIONES**

1. Una microvesícula (MV) derivada de un citoblasto de etapa adulta pluripotente o multipotente para uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad neoplásica.
- 5 2. La microvesícula (MV) para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el citoblasto de etapa adulta pluripotente o multipotente se selecciona del grupo que consiste de citoblasto mesenquimal y citoblasto de hígado.
3. La microvesícula (MV) para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el citoblasto de etapa adulta pluripotente o multipotente se selecciona del grupo que consiste de citoblasto mesenquimal humano derivado de la médula ósea (BM-MSC), citoblasto mesenquimal humano derivado de glomérulos desencapsulados (GI-MSC) y citoblasto de hígado ovalado no humano (HLSC).
- 10 4. La microvesícula (MV) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la enfermedad neoplásica se selecciona del grupo que consiste de tumor de hígado, tumor epitelial, tumor de mama, tumor de pulmón, tumor de próstata, tumor gástrico, tumor de colon y tumor de ovario.
- 15 5. La microvesícula (MV) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el tratamiento terapéutico de una enfermedad neoplásica comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una dosis MV comprendida entre 0.1 a 200 microgramos/kg de peso corporal del paciente, preferiblemente 1-150 microgramos/ kg de peso corporal del paciente, incluso más preferiblemente 3-120 microgramos/ kg de peso corporal del paciente.
- 20 6. La microvesícula (MV) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que está en una forma de dosificación farmacéutica adecuada para administración local o sistémica.
7. La microvesícula (MV) para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tratamiento terapéutico comprende la administración de uno o más agentes citotóxicos y/o citoestáticos.
- 25 8. La microvesícula (MV) para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los agentes citotóxicos y/o citoestáticos se seleccionan del grupo que consiste de Paclitaxel, Lenalidomida, Pomalidomida, Epirubicina, 5FU, Sunitinib, Lapatinib, Canertinib, ciclofosfamida, doxorubicina, Lenalidomida/Dexametasona, Pomalidomida/Dexametasona, Carboplatina, Rapamicina, mitoxantron, oxaliplatin, docetaxel, vinorelbina, vincristina y cualquier combinación de los mismos.
9. La microvesícula (MV) para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde los agentes citotóxicos y/o citoestáticos son doxorubicina o vincristina.

A

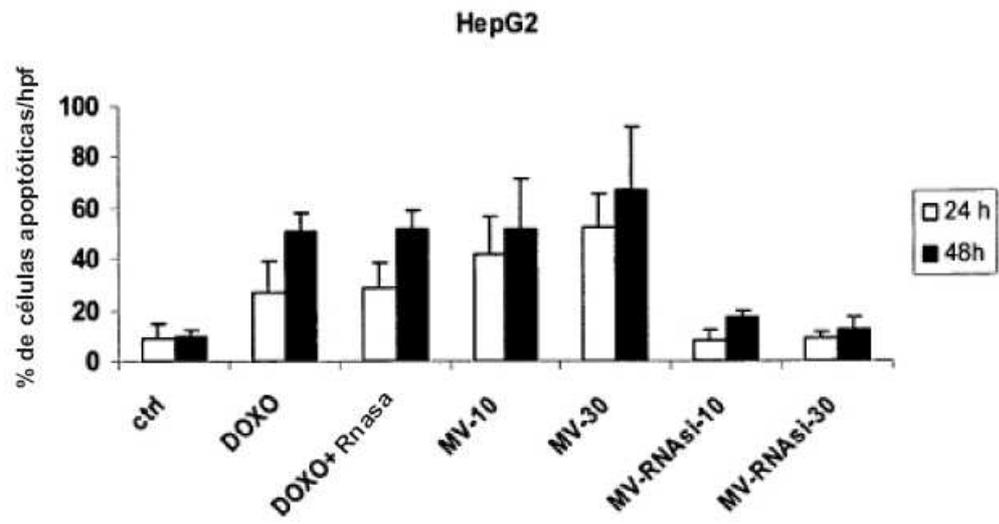


B

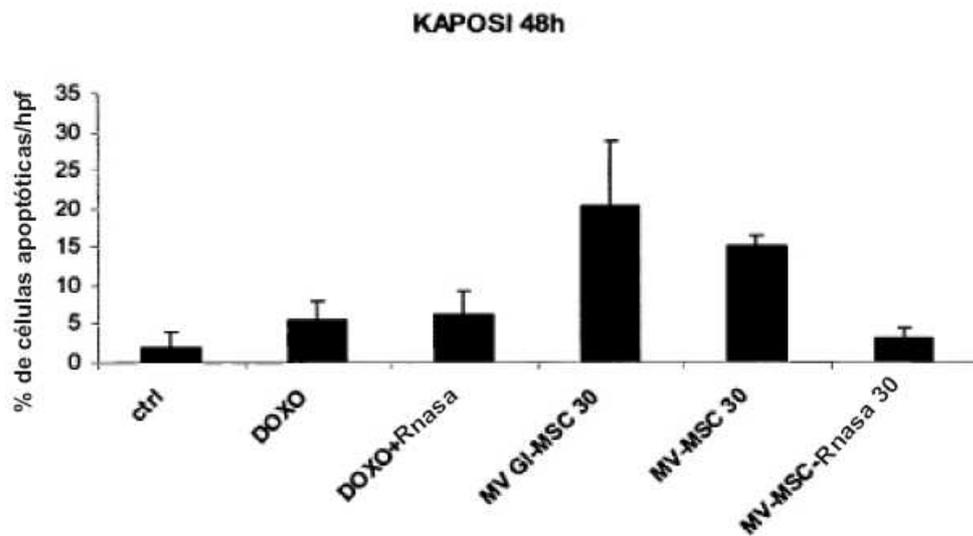


**FIG. 1**

A

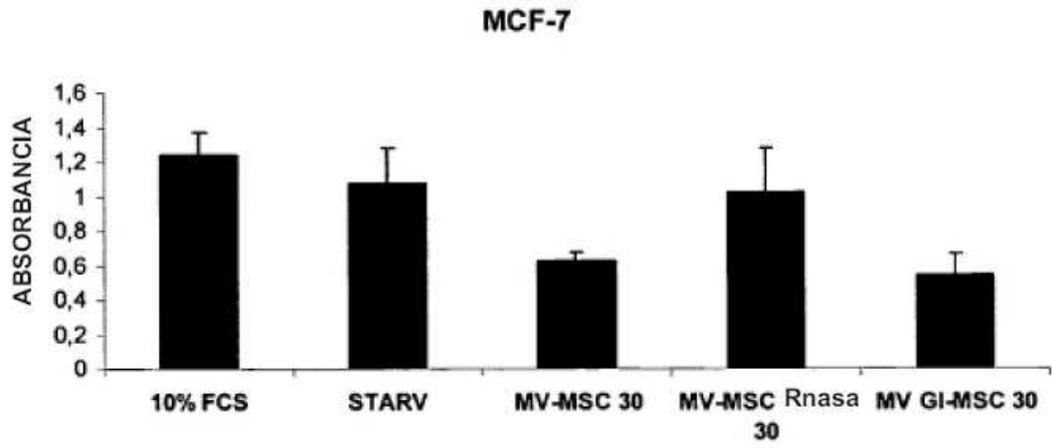


B

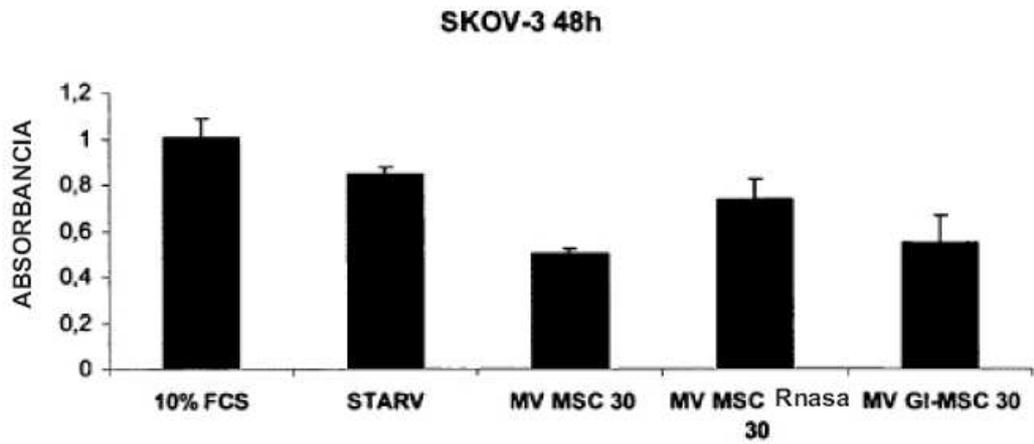


**FIG. 2**

A

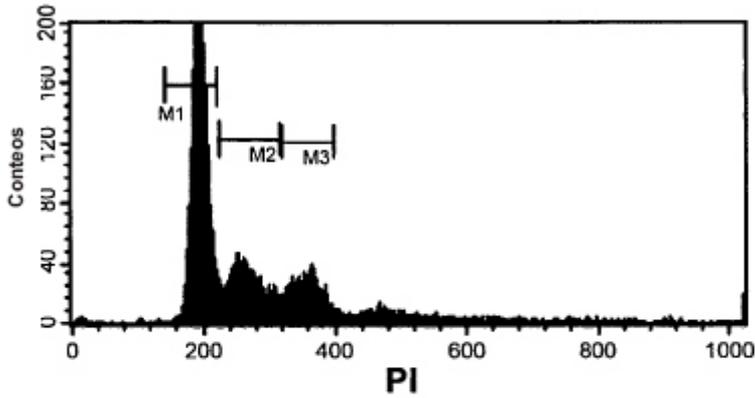


B



**FIG. 3**

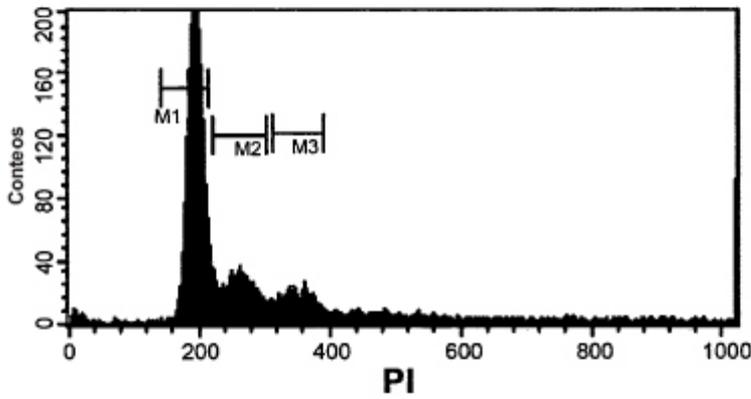
**SKOV-3**



% Total de Marcador

All	100.00
M1	50.90 G1/G0
M2	22.34 S
M3	15.61 G2

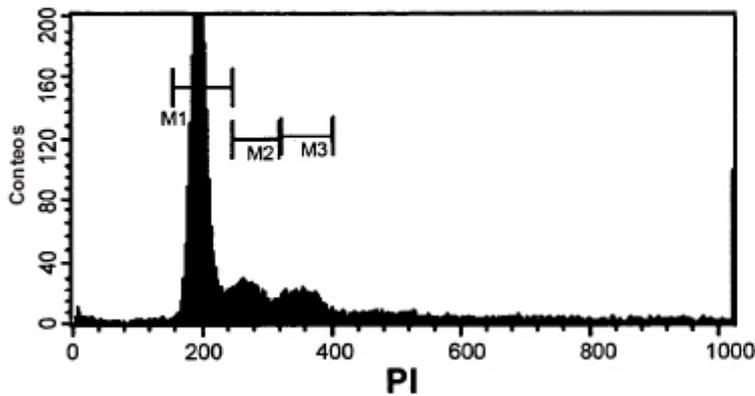
**INANICIÓN:**



% Total de Marcador

All	100.00
M1	54.37 G1/G0
M2	16.47 S
M3	11.12 G2

**+ 30 µg/ml BM-MSC MV:**

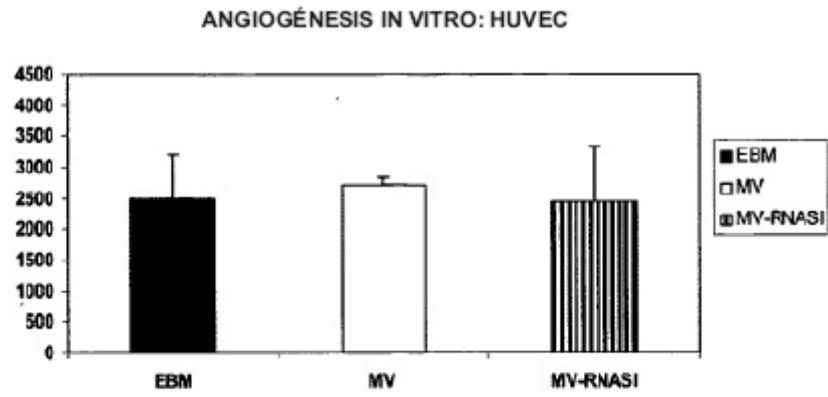


% Total de Marcador

All	100.00
M1	64.77 G1/G0
M2	11.78 S
M3	10.15 G2

**FIG. 4**

A



B

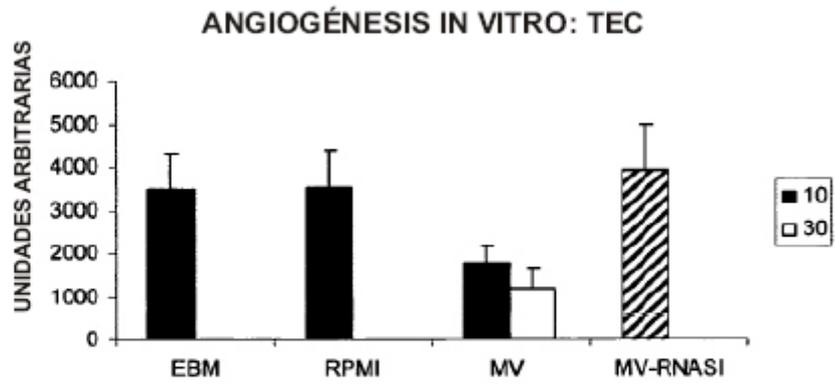


FIG. 5

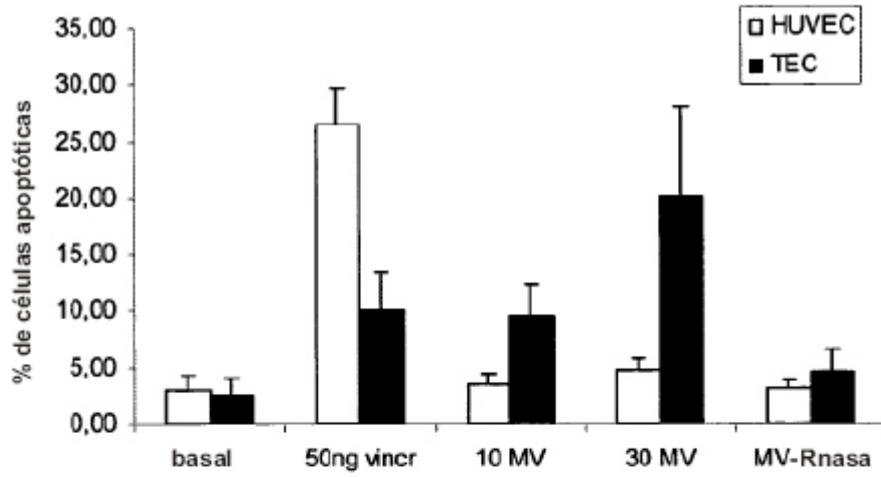


FIG. 6

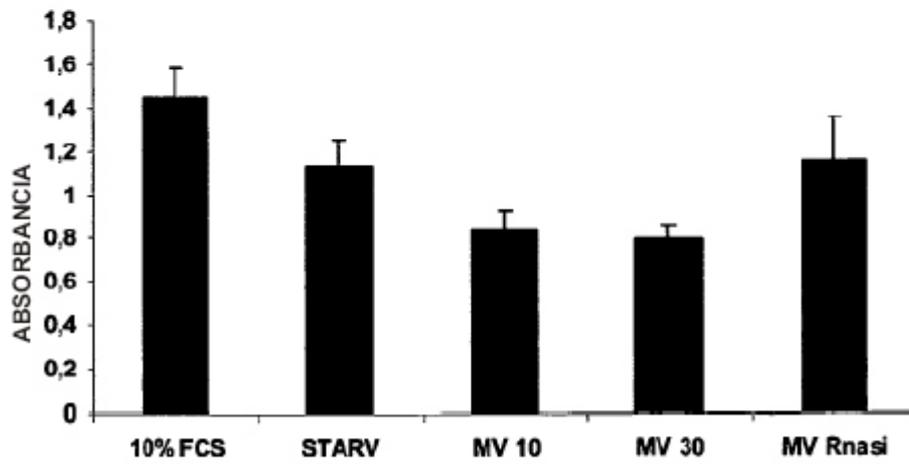


FIG. 7

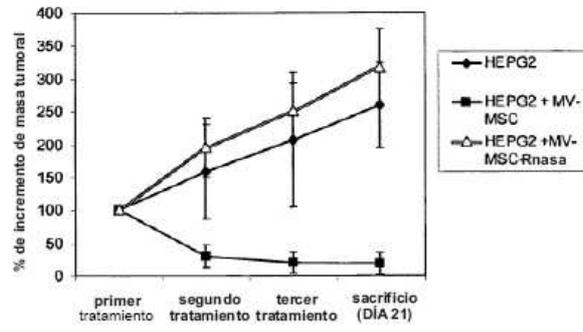


FIG. 8

TUMORES HEPG2:

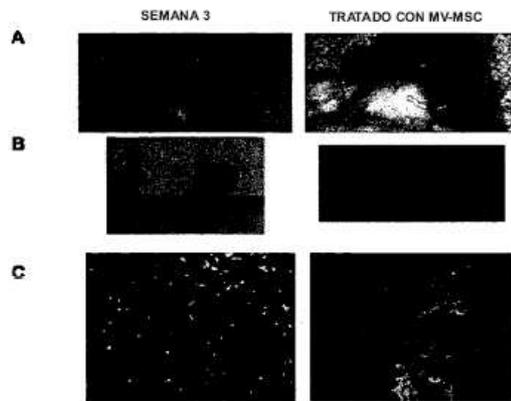


FIG. 9

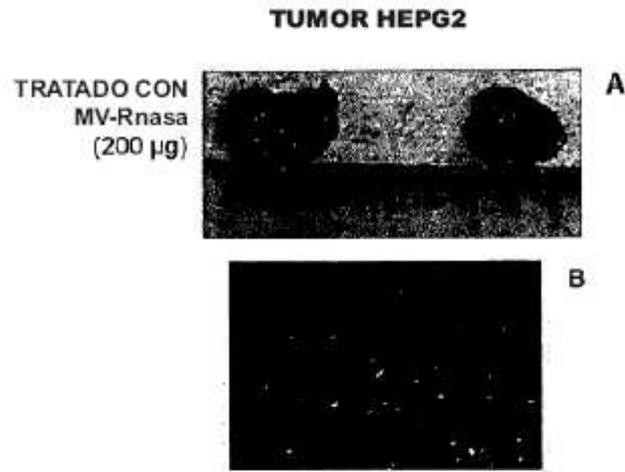


FIG. 10

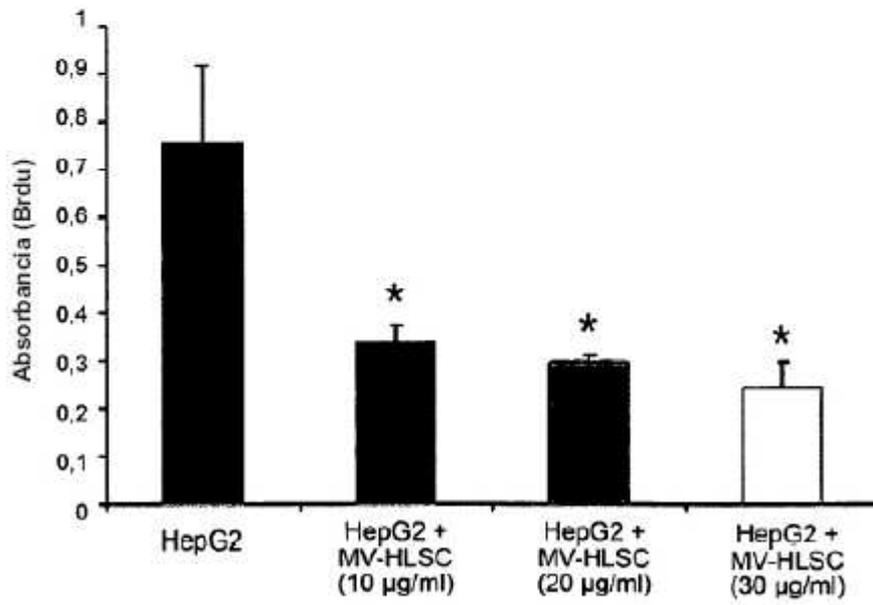


FIG. 11

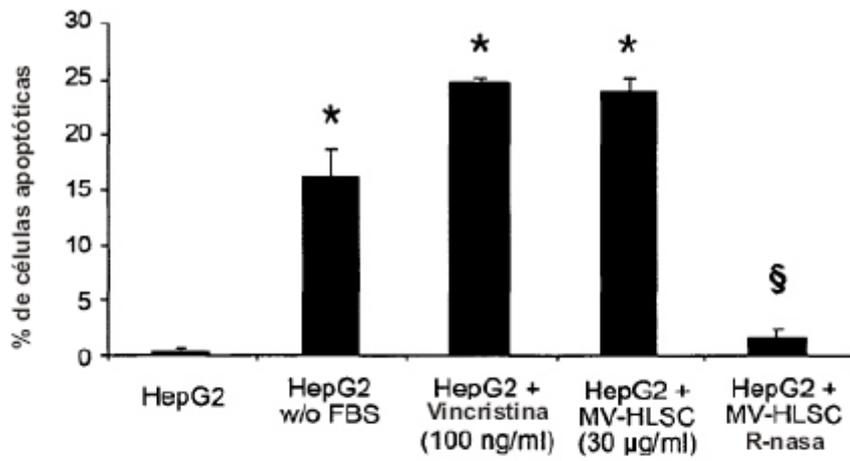


FIG. 12

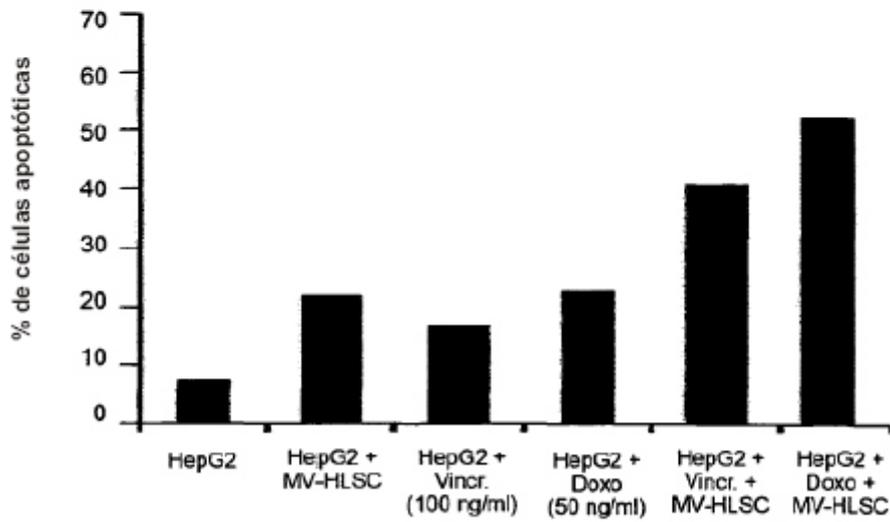


FIG. 13

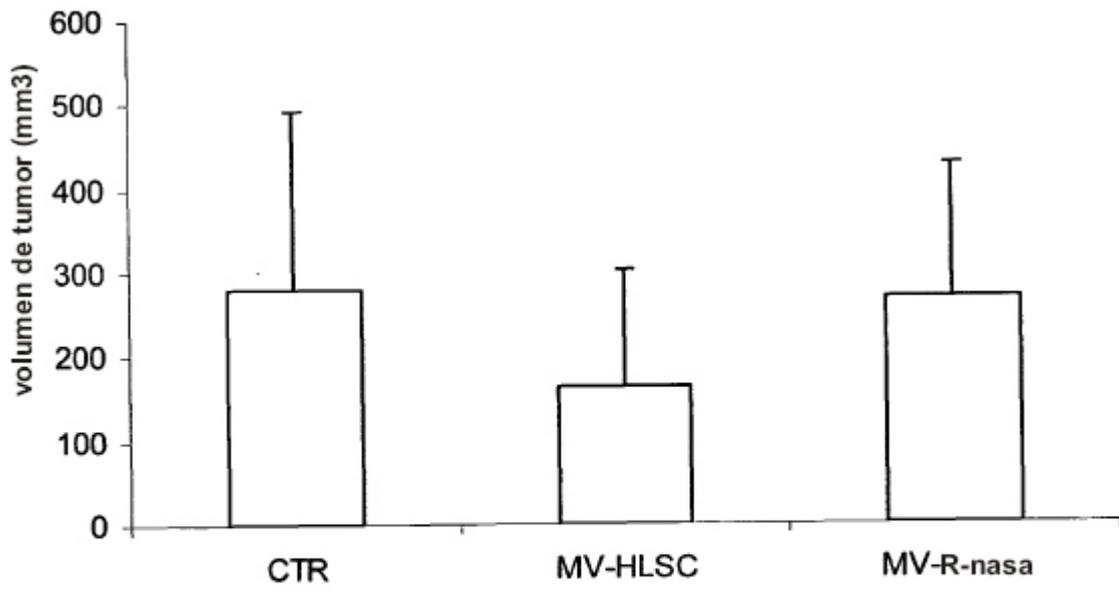


FIG. 14

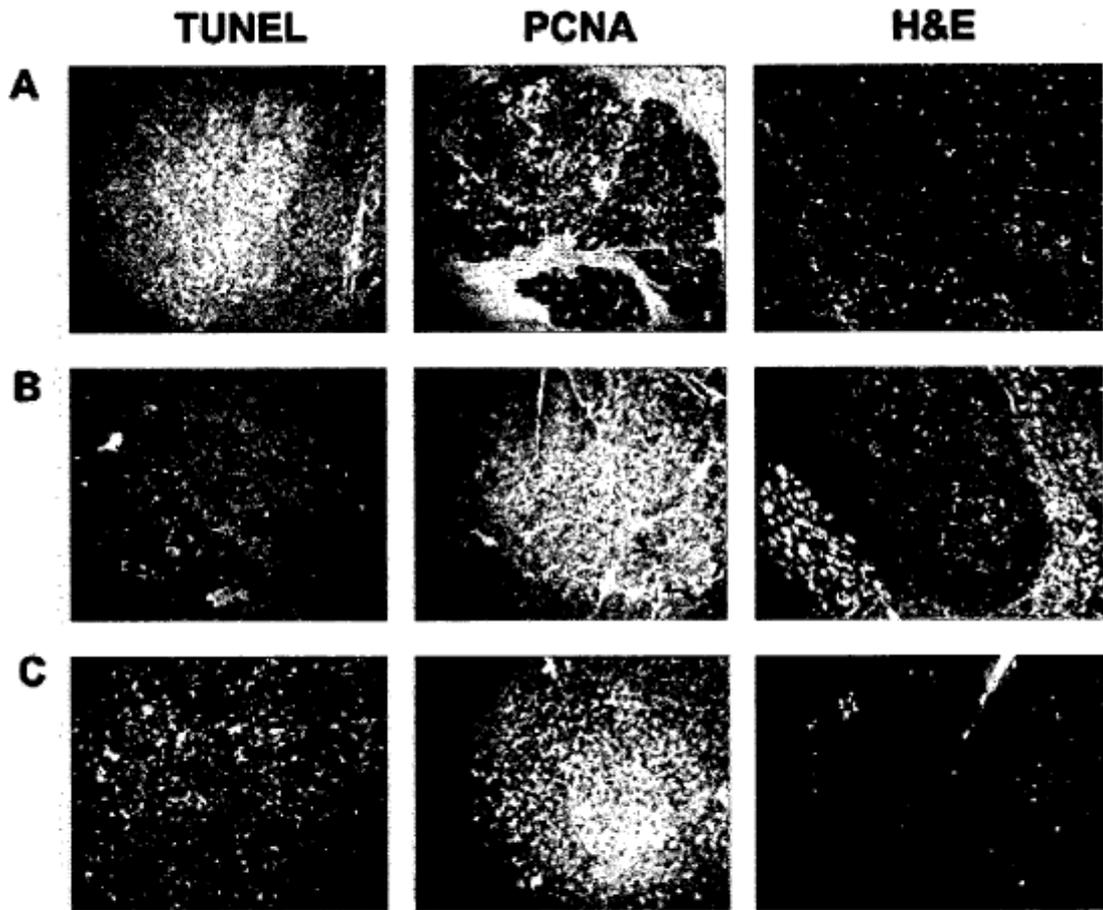


FIG. 15

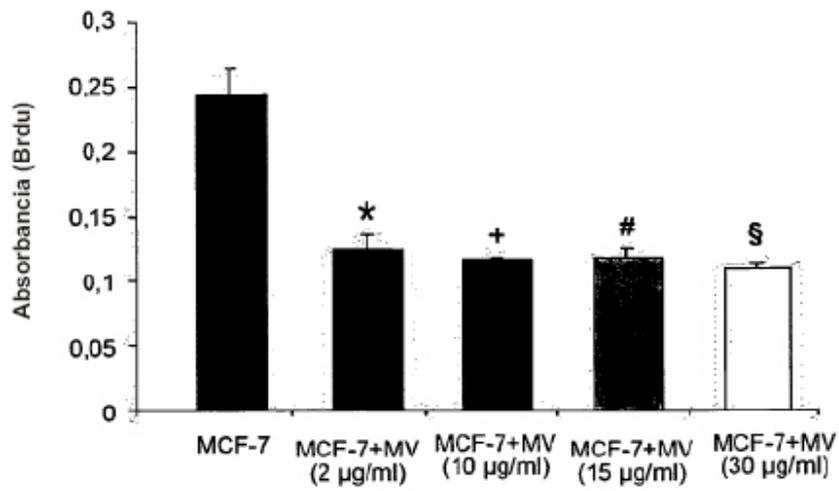


FIG. 16

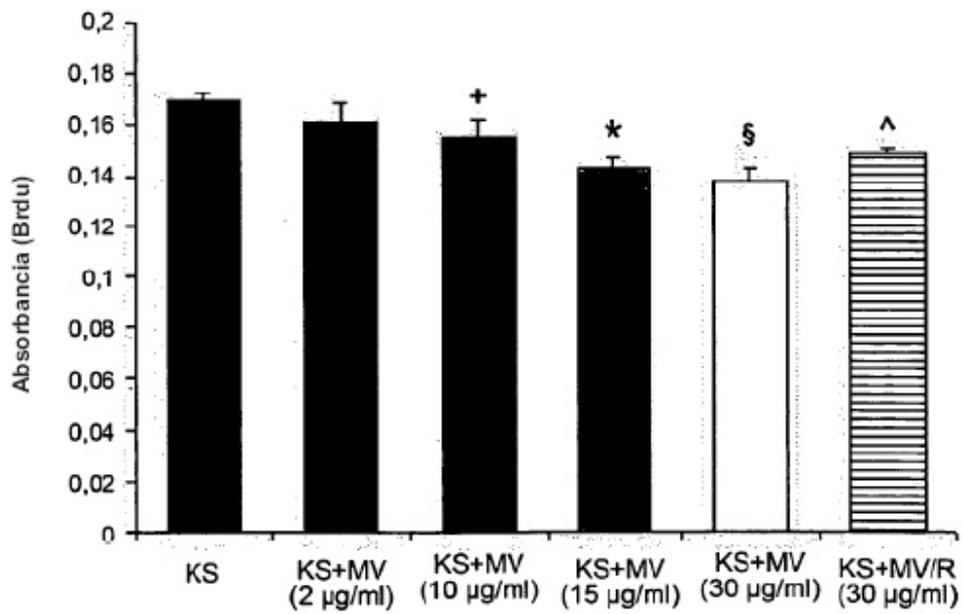


FIG. 17

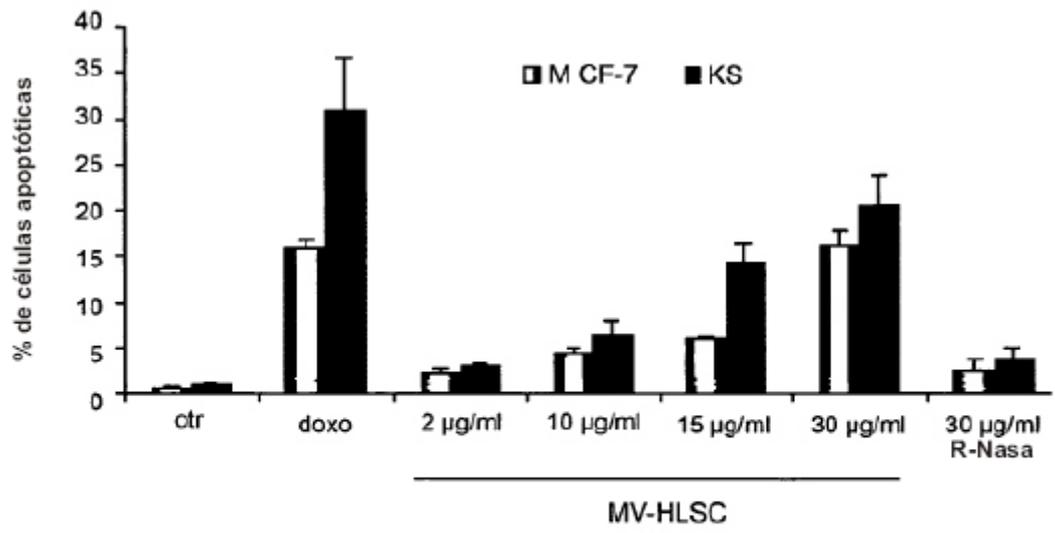


FIG. 18