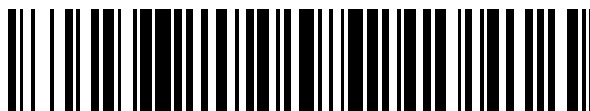


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 863**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2012 PCT/GB2012/053052**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13084000**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2012 E 12799264 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2788019**

54 Título: **Exosomas para el suministro de agentes bioterapéuticos**

30 Prioridad:

07.12.2011 GB 201121070

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

20.07.2017

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(100.0%)
Buxton Court, 3 West Way, Botley
Oxford OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:

**WOOD, MATTHEW;
LAKHAL-LITTLETON, SAMIRA y
EL ANDALOUSSI, SAMIR**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 625 863 T3

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

DESCRIPCIÓN

Exosomas para el suministro de agentes bioterapéuticos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para el suministro de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. La divulgación se refiere, en líneas más generales, a exosomas, cargados con proteína o péptido y a métodos de producción de los mismos.

10

Antecedentes de la invención

Los agentes bioterapéuticos se usan de forma rutinaria en el tratamiento y/o la prevención de una amplia gama de enfermedades, incluyendo el cáncer, trastornos genéticos y enfermedades autoinmunes. Los agentes bioterapéuticos normalmente son proteínas o péptidos, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, y tienden a administrarse en forma desnuda, es decir, sin ningún auxiliar para su suministro. Sin embargo, en algunos casos, por ejemplo, debido a una rápida eliminación, la ausencia de distribución específica de órgano y una baja eficacia de captación celular, sería deseable la administración de agentes bioterapéuticos en vehículos de suministro especializados.

20

Los exosomas son pequeñas vesículas unidas a membrana (30-100 nm) de origen endocítico que se liberan al entorno extracelular después de la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. Se ha descrito la producción de exosomas para muchas células inmunitarias, incluyendo células B, células T y células dendríticas (DC). Los exosomas derivados de linfocitos B y DC maduras expresan MHC-II, MHC-I, CD86 e ICAM-1 [1,2] y se han usado para inducir respuestas citotóxicas T antitumorales específicas e inmunidad antitumoral en modelos experimentales y ensayos clínicos [2, 3]. El potencial del suministro génico mediado por exosomas se ha demostrado con el suministro de ARNm y miARN murinos a mastocitos humanos [4] y los exosomas derivados de glioma [5] han demostrado transferir los ARNm producidos por plásmidos de ADN exógeno a células heterólogas. Los exosomas con ADN exógeno, ARNip y otros oligonucleótidos modificados también se han descrito [6].

25

La técnica anterior también incluye Pharmaceutical Research, 17, 2000, 275-283, que describe micropartículas cargadas con IgG y el suministro *in vivo* de las mismas.

30

Resumen de la invención

35

La invención es como se expone en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción.

Los autores de la presente invención han cargado exosomas de forma exitosa con proteína exógena y, en particular, anticuerpos exógenos. Por tanto, la presente divulgación se refiere a métodos para cargar exosomas con proteína y/o péptido exógeno, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, a los exosomas cargados con dicha proteína y/o péptido exógeno y a su uso en el suministro de la proteína y/o péptido para terapia.

40

Los exosomas de la presente divulgación pueden tener un motivo de señalización expresado en su superficie. También se describen proteínas de fusión que comprenden proteínas transmembrana exosómicas y un motivo de señalización que permite la expresión del motivo de señalización en la superficie de los exosomas y construcciones de ácido nucleico que codifican dichas proteínas de fusión. Los exosomas que comprenden motivos de señalización pueden cargarse con proteína y/o péptidos exógenos, incluyendo anticuerpos o fragmentos de los mismos, de acuerdo con la descripción y pueden usarse en el suministro de la proteína y/o péptidos para terapia.

45

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una composición que comprende un exosoma, donde el exosoma está cargado con proteína y/o péptido exógeno.

50

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende un exosoma que contiene proteína y/o péptido, donde el exosoma deriva de una célula dendrítica inmadura, para su uso en un método de suministro de la proteína y/o péptido *in vivo*.

55

En otra realización, la divulgación proporciona un método de carga de los exosomas con proteína y/o péptido, que comprende proporcionar una composición de exosomas y cargar los exosomas con proteína y/o péptido por electroporación.

60

En otra realización, la divulgación proporciona un método de carga de los exosomas con proteína y/o péptido, que comprende proporcionar una composición de exosomas y cargar los exosomas con proteína y/o péptido por transfección, usando un agente de transfección de liposoma catiónico.

Descripción de las figuras

Figura 1. Carga de células HEK con exosomas HEK que contienen anticuerpo de isotipo IgG conjugado con PE: A muestra la localización del anticuerpo conjugado con PE en células HEK, donde se mezclaron los exosomas HEK, pero no se sometieron a electroporación, con el anticuerpo. B muestra la localización del anticuerpo conjugado con PE en células HEK, donde el anticuerpo se cargó en los exosomas HEK por electroporación a 200 mV.

Figura 2. Carga de fibroblastos humanos con exosomas HEK que contienen FITC-avidina: Se cargaron exosomas de transportan-Lamp2 con FITC-avidina por electroporación a 0 mV, 100 mV, 200 mV y 400 mV. Los exosomas se incubaron después con fibroblastos humanos y se midió la cantidad de fluorescencia emitida por los fibroblastos.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a exosomas y a su uso como vehículos de suministro para agentes bioterapéuticos proteicos y/o peptídicos, incluyendo anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. Los exosomas son pequeñas vesículas unidas a membrana de origen endocítico que se liberan al entorno extracelular después de la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. De este modo, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende dichos exosomas. Normalmente, los exosomas tienen un diámetro entre 30 y 100 nm, pero pueden incluir partículas de membrana de origen similar de hasta 200 nm. Exosomas, como se usa en este documento, se refiere a nanopartículas de origen endosómico que se secretan desde cuerpos multivesiculares.

Los exosomas se producen por muchos tipos diferentes de células, incluyendo células inmunitarias tales como linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas (DC) y mastocitos. Los exosomas también se producen, por ejemplo, por células de glioma, plaquetas, reticulocitos, neuronas, células epiteliales intestinales, células tumorales, células HELA, células de riñón embrionario humano (células HEK), células B2M17, células Bend3, células dendríticas primarias derivadas de médula ósea, microglíocitos BV-2 y células NEURO2A. Los exosomas para su uso de acuerdo con la presente solicitud pueden derivar de cualquier célula adecuada, incluyendo las células identificadas anteriormente. Los exosomas también se han aislado de fluidos fisiológicos, tales como plasma, orina, líquido amniótico y derrames malignos.

En un aspecto preferido de la presente divulgación, los exosomas derivan de DC, preferentemente DC inmaduras. Los exosomas producidos a partir de DC inmaduras no expresan MHC-II, MHC-I o CD86. Por tanto, dichos exosomas no estimulan células T vírgenes a un grado significativo y son incapaces de inducir una respuesta en una reacción de linfocitos variados. Por tanto, los exosomas producidos a partir de células dendríticas inmaduras son candidatos ideales para su uso en el suministro de agentes bioterapéuticos proteicos y/o peptídicos, particularmente para su uso *in vivo*, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer y de enfermedades autoinmunes.

De este modo, de acuerdo con el primer aspecto de la presente divulgación, los exosomas derivados de células dendríticas se proporcionan para su uso en el suministro *in vivo* de proteína y/o péptido.

Como se resume anteriormente, los exosomas se producen por muchos tipos diferentes de células y también se han aislado de fluidos fisiológicos. De este modo, de acuerdo con la presente divulgación, los exosomas pueden obtenerse de cualquier tipo celular adecuado como se analiza anteriormente, o por aislamiento de fluidos fisiológicos. Normalmente, los métodos de la presente divulgación comprenden el aislamiento de los exosomas a partir del medio de cultivo celular o el sobrenadante tisular.

Los exosomas producidos a partir de las células pueden recogerse del medio de cultivo por cualquier método adecuado. Normalmente, una preparación de exosomas puede prepararse a partir del cultivo celular o del sobrenadante tisular por centrifugación, filtración o combinaciones de estos métodos. Por ejemplo, los exosomas pueden prepararse por centrifugación diferencial, que es centrifugación a baja velocidad (<20.000g) para sedimentar partículas más grandes seguido de centrifugación a alta velocidad (>100.000g) para sedimentar los exosomas, filtración por tamaño con filtros apropiados (por ejemplo, filtro de 0,22 µm), ultracentrifugación en gradiente (por ejemplo, con gradiente de sacarosa) o una combinación de estos métodos.

De acuerdo con la presente divulgación, los exosomas se cargan con proteína y/o péptido exógeno. En particular, de acuerdo con la presente descripción, los exosomas se preparan y después se cargan con la proteína y/o péptido deseado para su suministro. En otro aspecto, la proteína o péptido puede cargarse en los exosomas por sobreexpresión de la proteína o péptido en la célula que se usa para producir los exosomas, de modo que los exosomas puedan cargarse con el péptido o proteína. Exógena se refiere a una proteína con la que el exosoma no está asociado normalmente.

El uso de exosomas para suministrar agentes bioterapéuticos ofrece varias ventajas sobre los medios convencionales de suministro de dichos compuestos. Por ejemplo, cuando se suministran agentes bioterapéuticos usando exosomas, se protegen de la degradación y son más estables; los agentes bioterapéuticos pueden

- 5 suministrarse a un tejido diana, tal como un tipo específico de cáncer, de forma más eficaz y/o de forma más específica que si no estuvieran encapsulados dentro de los exosomas; y/o la carga puede tener menor probabilidad de provocar una respuesta inmunitaria porque está contenida dentro de los exosomas y de ese modo no está libremente disponible para su detección por las células inmunitarias y/o su unión a los anticuerpos. Otras ventajas
- 10 potenciales del uso de exosomas para suministrar agentes bioterapéuticos incluyen eludir las células hepáticas después del suministro sistémico de los exosomas y/o evitar la resistencia a los fármacos, tal como la regulación positiva de los transportadores de fármacos tales como los transportadores ABC.
- 15 La proteína y/o péptido adecuado para su suministro incluye anticuerpos exógenos y fragmentos de anticuerpo. De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, la proteína y/o péptido cargado en el exosoma no es una proteína y/o péptido que esté normalmente asociado con los exosomas, por ejemplo, la proteína y/o aminoácido preferentemente no es una proteína o un péptido que se incorpora en un exosoma al producirse desde la célula. En particular, la presente descripción se refiere a la capacidad de cargar proteína y/o péptido en una preparación de exosomas que se ha aislado de las células. Por tanto, la proteína y/o péptido exógeno se refiere a la proteína y/o
- 20 péptido incluyendo proteínas y péptidos que no están normalmente asociados con los exosomas. En realizaciones particularmente preferidas, la proteína y/o péptido es un anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo que no se encuentra normalmente en los exosomas.
- 25 Cualquier proteína y/o péptido bioterapéutico que tenga utilidad en el tratamiento y/o la prevención de una afección, enfermedad o trastorno puede incorporarse en los exosomas de acuerdo con la presente divulgación. En una realización preferida, la proteína o péptido para su incorporación en los exosomas es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
- 30 La proteína y/o péptido a cargarse en los exosomas se elige basándose en el efecto deseado de esa proteína y/o péptido sobre la célula en la que se pretende suministrar y el mecanismo por el que tiene que llevarse a cabo ese efecto. Puede incorporarse una única proteína o péptido en los exosomas. Como alternativa, puede incorporarse más de una proteína y/o péptido en los exosomas. La más de una proteína y/o péptido puede actuar sobre la misma diana o una diferente para lograr su efecto terapéutico y/o preventivo.
- 35 En un aspecto preferido de la presente divulgación, el péptido o proteína bioterapéutica para su suministro no es una que se use para generar una respuesta inmunitaria. En particular, la proteína normalmente derivada de una proteína humana y no es un péptido completamente de origen no humano, cuando se usa para tratar a un ser humano. Normalmente, el péptido no derivado de una bacteria, virus u otro agente infeccioso. Además, el péptido o proteína no se selecciona o deriva de un antígeno tumoral. Por tanto, el péptido o proteína se selecciona para proporcionar un beneficio terapéutico en sí mismo, y no está previsto para usarse para generar una respuesta inmunitaria contra el péptido o proteína.
- 40 Las proteínas y/o péptidos a incorporarse en los exosomas pueden ser útiles, por ejemplo, en el tratamiento y/o la prevención del cáncer. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse usando agentes bioterapéuticos proteicos o peptídicos incluyen leucemia, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, linfoma no hodgkiniano, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, adenocarcinoma y tumores sólidos. Dichas proteínas y/o péptidos bioterapéuticos son normalmente anticuerpos o fragmentos de los mismos, particularmente anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos.
- 45 Los agentes bioterapéuticos proteicos y/o peptídicos también pueden usarse en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes surgen de una respuesta inmunitaria hiperactiva del organismo contra sustancias, tejidos y órganos normalmente presentes en el organismo.
- 50 Las proteínas y/o péptidos bioterapéuticos cargados en los exosomas de acuerdo con la presente descripción también pueden usarse para tratar y/o prevenir otras afecciones, incluyendo enfermedades cardiovasculares, hemofilia, septicemia, apoplejía, distrofia muscular, incluyendo distrofia muscular de Duchenne (DMD), degeneración macular y enfermedad de Alzheimer.
- 55 En una realización preferida, el agente bioterapéutico cargado en los exosomas de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo terapéutico. En una realización más preferida, el anticuerpo terapéutico se selecciona de un anticuerpo monoclonal para bloquear el sitio activo de Bace-1 y b-amiloideos; un anticuerpo monoclonal contra quinasas de glioblastoma y un anticuerpo contra α 4-integrina para el tratamiento de MS, por ejemplo, Natalizumab.
- 60 En una realización preferida, el agente bioterapéutico cargado en los exosomas de acuerdo con la presente descripción es un péptido. En una realización más preferida, el péptido se selecciona de un péptido inmunodominante para provocar respuestas inmunitarias contra antígenos víricos y/o tumorales; un péptido neuroprotector tal como un ligando del receptor δ -opioideo, por ejemplo, Bifalina; un péptido inmunosupresor para neuroinflamación, por ejemplo, adrenomedulina y un péptido NBD que se une a e inhibe la señalización de NfKB.
- 65 La proteína y/o péptido exógeno puede introducirse en los exosomas por varias técnicas diferentes. En realizaciones particularmente preferidas de la divulgación, los exosomas se cargan por electroporación o por el uso de un reactivo

de transfección. Los autores de la presente invención han identificado que, a pesar del tamaño pequeño de los exosomas, aún es posible usar la electroporación para cargar los exosomas con la proteína y/o péptido exógeno. Esto es sorprendente en vista del tamaño pequeño de los exosomas en comparación con las células. La extrapolación de las tensiones usadas para la electroporación de las células para tener en cuenta el tamaño de los exosomas sugeriría que se requerirían tensiones excesivamente altas para la electroporación de los exosomas. Sorprendentemente, sin embargo, los autores de la presente invención han identificado que es posible usar la electroporación para cargar los exosomas con anticuerpos. Las condiciones de electroporación pueden variar dependiendo de la carga y el tamaño de la carga bioterapéutica. Las tensiones normales están en el intervalo de 20 V/cm a 1.000 V/cm, tal como de 20 V/cm a 100 V/cm con una capacitancia típicamente entre 25 μ F y 250 μ F, tal como entre 25 μ F y 125 μ F. Se prefiere una tensión en el intervalo de 150 mV a 250 mV, particularmente una tensión de 200 mV para cargar los exosomas con un anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

Como alternativa, los exosomas pueden cargarse con proteína y/o péptido exógeno usando un agente de transfección. A pesar del tamaño pequeño de los exosomas, pueden usarse agentes convencionales de transfección para la transfección de exosomas con proteína y/o péptido. Los reactivos preferidos de transfección para su uso de acuerdo con la presente descripción incluyen liposomas catiónicos.

En otra realización, los exosomas también pueden cargarse transformando o transfectando una célula huésped con una construcción de ácido nucleico que expresa una proteína o péptido terapéutico de interés, de modo que la proteína o péptido terapéutico se incorpore en los exosomas según se producen los exosomas desde la célula.

Anticuerpos

Como se describe en este documento, de acuerdo con la invención, la proteína y/o péptido a incorporarse en los exosomas es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El término "anticuerpo" mencionado en este documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "sección de unión a antígeno") o cadenas individuales de los mismos. Un anticuerpo se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro o una sección de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada como V_H) y una región constante de la cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada como V_L) y una región constante de la cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco (FR).

Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos hospedadores o factores, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

Un anticuerpo de uso en la invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, y será preferentemente un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo de uso en la invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con las CDR injertadas, un nanocuerpo, un anticuerpo humano o humanizado o una sección de unión a antígeno de cualquiera de los mismos. Para la producción tanto de anticuerpos monoclonales como de anticuerpos policlonales, el animal experimental normalmente es un mamífero no humano tal como una cabra, conejo, rata o ratón, pero también pueden generarse en otras especies tales como camélidos.

Los anticuerpos policlonales pueden producirse por métodos rutinarios tales como inmunización de un animal adecuado, con el antígeno de interés. Posteriormente puede extraerse sangre del animal y purificarse la fracción de IgG.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) de uso en la invención pueden producirse por una diversidad de técnicas, incluyendo metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica convencional de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein. El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en ratones es un procedimiento muy bien establecido y puede conseguirse usando técnicas bien conocidas en la técnica.

La expresión "sección de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro de la expresión "sección de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. También se pretende que los anticuerpos de cadena sencilla tales como los anticuerpos scFv estén englobados dentro de la expresión "sección de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia, y los fragmentos pueden explorarse para su utilidad de la misma manera que los

anticuerpos intactos.

Un anticuerpo de uso en la invención puede prepararse, expresarse, crearse o aislarse por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina de interés o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo de interés, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

Un anticuerpo de uso en la invención puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. La expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de uso en la invención pueden incluir restos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de las CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

Dicho anticuerpo humano puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dicho anticuerpo monoclonal humano puede producirse por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

Los anticuerpos humanos pueden prepararse por inmunización *in vitro* de linfocitos humanos, seguida de transformación de los linfocitos con virus de Epstein-Barr.

La expresión "derivados de anticuerpo humano" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

La expresión "anticuerpo humanizado" pretende hacer referencia a anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Pueden hacerse modificaciones adicionales en la región marco dentro de las secuencias marco humanas.

Objetivo

Los exosomas de la presente divulgación pueden dirigirse a un tipo celular o tejido deseado. Este objetivo se consigue expresando sobre la superficie del exosoma un motivo de señalización que se une a un motivo de superficie celular expresado en la superficie de la célula a abordar. Normalmente, el motivo de señalización es un péptido que se expresa como una proteína de fusión con una proteína transmembrana normalmente expresada en la superficie del exosoma.

En más detalle, los exosomas de la descripción pueden dirigirse a tipos celulares o tejidos particulares expresando en su superficie un motivo de señalización tal como un péptido. Los péptidos adecuados son aquellos que se unen a motivos de la superficie celular tales como receptores o sus ligandos encontrados sobre la superficie celular de la célula a abordar. Los ejemplos de motivos de señalización adecuados son péptidos cortos, scFv y proteínas completas, siempre que el motivo de señalización pueda expresarse sobre la superficie del exosoma y no impida la inserción de la proteína de membrana en el exosoma. Normalmente, el péptido de señalización es heterólogo a la proteína exosómica transmembrana. Los motivos de señalización peptídicos normalmente pueden ser de menos de 100 aminoácidos de longitud, por ejemplo, de menos de 50 aminoácidos de longitud, de menos de 30 aminoácidos de longitud, hasta una longitud mínima de 10, 5 o 3 aminoácidos.

Los motivos de señalización pueden seleccionarse para abordar tipos tisulares particulares tales como músculo, cerebro, hígado, páncreas y pulmón, por ejemplo, o para abordar un tejido enfermo tal como un tumor. En una realización particularmente preferida de la presente descripción, los exosomas están dirigidos a tejido cerebral.

Los ejemplos específicos de motivos de señalización incluyen péptido específico de músculo, descubierto por exposición en fagos, para abordar el músculo esquelético, un fragmento de 29 aminoácidos de la glucoproteína del virus de la rabia que se une al receptor de acetilcolina o un fragmento del factor de crecimiento neural dirigido a su receptor para abordar las neuronas, el péptido transportan y el péptido secretina que se une al receptor de secretina puede usarse para abordar los epitelios biliar y pancreático. Como alternativa, las inmunoglobulinas y sus derivados, incluyendo fragmentos de anticuerpo scFv también pueden expresarse como una proteína de fusión para abordar antígenos específicos, tales como VEGFR para terapia génica contra el cáncer. Como alternativa, pueden

expresarse ligandos naturales para los receptores como proteínas de fusión para conferir especificidad, tal como NGF que se une a NGFR y confiere dirección específica a las neuronas.

5 El motivo de señalización peptídico se expresa sobre la superficie del exosoma expresándolo como una proteína de fusión con una proteína transmembrana exosómica. Se conocen varias proteínas que están asociadas con los exosomas; es decir, se incorporan en el exosoma según se forma. Las proteínas preferidas para su uso en la dirección de los exosomas de la presente invención son aquellas que son proteínas transmembrana. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, Lamp-1, Lamp-2, CD13, CD86, flotilina, sintaxina-3, CD2, CD36, CD40, CD40L, CD41a, CD44, CD45, ICAM-1, integrina alfa4, LiCAM, LFA-1, Mac-1 alfa y beta, Vti-1A y B, CD3 épsilon y zeta, CD9, 10 CD18, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CXCR4, FcR, GluR2/3, HLA-DM (MHC II), inmunoglobulinas, componentes de MHC-I o MHC-II, TCR beta y tetraspaninas. En realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, los exosomas cargados con proteína y/o péptido bioterapéutico se dirigen usando una proteína transmembrana seleccionada de Lamp-1, Lamp-2, CD13, CD86, flotilina, sintaxina-3. En una realización particularmente preferida, la proteína transmembrana es Lamp-2. La secuencia de Lamp-2 se expone en la SEQ ID 15 NO: 1.

La siguiente sección se refiere a características generales de todos los polipéptidos y, en particular, a variaciones, alteraciones, modificaciones o derivatizaciones de la secuencia de aminoácidos. Se entenderá que dichas variaciones, alteraciones, modificaciones o derivatizaciones de los polipéptidos que se describen en este documento 20 están sometidas al requisito de que los polipéptidos retengan cualquier actividad o característica requerida adicional que pueda especificarse en secciones posteriores de esta descripción.

Las variantes de polipéptidos pueden definirse por niveles particulares de identidad de aminoácidos que se describen en más detalle en secciones posteriores de esta descripción. La identidad de aminoácidos puede 25 calcularse usando cualquier algoritmo adecuado. Por ejemplo, pueden usarse los algoritmos PILEUP y BLAST para calcular la homología o alinear las secuencias (tal como identificando secuencias equivalentes o correspondientes (normalmente con sus ajustes por defecto), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10. El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar, en primer lugar, un par de secuencias de alta valoración (HSP) identificando 30 palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que se ajustan o satisfacen algún valor umbral T valorado positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se menciona como el umbral del valor de palabra cercana (Altschul *et al.*, *supra*). Estos aciertos iniciales de palabra cercana actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar HSP que las contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia siempre que pueda aumentarse el valor de alineación acumulada. Las extensiones de los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: el valor de alineación acumulada descendiendo una cantidad X de su valor máximo conseguido; el valor acumulado llega a cero o por debajo de cero, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de valoración negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del programa BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de valores BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919), alienaciones (B) 40 de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y 45 Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que puede producirse por efecto del azar una coincidencia entre dos secuencias polinucleotídicas o de aminoácidos. Por ejemplo, se considera que una secuencia es similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferentemente menor de aproximadamente 0,1, más preferentemente menor de aproximadamente 0,01 y mucho 50 más preferentemente menor de aproximadamente 0,001. Como alternativa, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo, usado con sus ajustes por defecto) (Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395).

55 Se entenderá que las variantes de polipéptidos también incluyen variantes de sustitución. Las variantes de sustitución preferentemente implican el remplazo de uno o más aminoácidos con la misma cantidad de aminoácidos y la generación de sustituciones conservativas de aminoácido. Por ejemplo, un aminoácido puede sustituirse con un aminoácido alternativo que tiene propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido cargado, otro aminoácido hidrófilo, otro aminoácido hidrófobo, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático. Algunas propiedades de los 20 60 aminoácidos principales que pueden usarse para seleccionar sustituyentes adecuados son las siguientes:

Ala	alifático, hidrófobo, neutro	Met	hidrófobo, neutro
Cys	polar, hidrófobo, neutro	Asn	polar, hidrófilo, neutro
Asp	polar, hidrófilo, cargado (-)	Pro	hidrófobo, neutro
Glu	polar, hidrófilo, cargado (-)	Gln	polar, hidrófilo, neutro
Phe	aromático, hidrófobo, neutro	Arg	polar, hidrófilo, cargado (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	polar, hidrófilo, neutro
His	aromático, polar, hidrófilo, cargado (+)	Thr	polar, hidrófilo, neutro
Ile	alifático, hidrófobo, neutro	Val	alifático, hidrófobo, neutro
Lys	polar, hidrófilo, cargado (+)	Trp	aromático, hidrófobo, neutro
Leu	alifático, hidrófobo, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrófobo

5 La secuencia de aminoácidos de los polipéptidos para su uso en la invención puede modificarse para que incluya características químicas de origen no natural o para aumentar la estabilidad y especificidad de dirección del compuesto. Cuando los polipéptidos se producen por medios sintéticos, dichos aminoácidos pueden introducirse durante la producción. Los polipéptidos también pueden modificarse siguiendo una producción sintética o recombinante.

10 En la técnica se conocen varias modificaciones de cadena lateral y pueden hacerse a las cadenas laterales de los polipéptidos, condicionadas a que los polipéptidos retengan cualquier actividad o característica requerida adicional que pueda especificarse en este documento.

15 Los polipéptidos variantes que se describen en esta sección son aquellos para los que la secuencia de aminoácidos varía respecto a la de la SEQ ID NO: 1, pero que retienen la capacidad de insertarse en la membrana de un exosoma.

20 Las secuencias variantes normalmente difieren en al menos 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 100 o más mutaciones (que pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos). Por ejemplo, pueden hacerse de 1 a 100, de 2 a 50, de 3 a 30 o de 5 a 20 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácido, con la condición de que el polipéptido modificado se inserte en la membrana de un exosoma.

25 Normalmente, los polipéptidos que son variantes de Lamp-2 tienen más de aproximadamente un 50 %, un 55 % o un 65 % de identidad, preferentemente al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % y, en particular, preferentemente al menos un 95 %, al menos un 97 % o al menos un 99 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. La identidad de las variantes de la SEQ ID NO: 1 puede medirse sobre una región de al menos 30, 50, 100, 200, 250, 300, 350 o más aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o más preferentemente sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 1, excluyendo la secuencia señal.

30 El fragmento del polipéptido Lamp-2 usado en la dirección de los exosomas de la invención normalmente es de al menos 55 aminoácidos, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de longitud.

35 La proteína transmembrana exosómica se modifica para que incorpore un motivo de señalización. Por tanto, la proteína transmembrana exosómica se expresa como una proteína de fusión que comprende el motivo de señalización. El motivo de señalización se incorpora en la proteína transmembrana de tal manera que se coloque en la parte de la proteína transmembrana presente sobre la superficie de los exosomas. En un aspecto preferido de la presente invención, la proteína transmembrana exosómica es Lamp-2 y el motivo de señalización se expresan como una proteína de fusión, donde el motivo de señalización está presente cerca del extremo N-terminal de la proteína Lamp-2, por ejemplo, en 30 o en 20 desde el aminoácido N-terminal de Lamp-2, sin incluir la secuencia señal.

40 Pueden proporcionarse secuencias espaciadoras o enlazadoras entre el motivo de señalización y el resto de la proteína transmembrana, por ejemplo, para evitar las interferencias del motivo de señalización en el plegamiento de la proteína transmembrana.

45 Las secuencias enlazadoras o espaciadoras normalmente son de 1 a 10 de longitud, normalmente de 1 a 8 aminoácidos de longitud, tal como de 2, 3 o 4 aminoácidos de longitud. Los aminoácidos adecuados para su incorporación en los enlazadores son alanina, arginina, serina o glicina. Los enlazadores adecuados incluyen Ala-Arg y Ser-Gly-Gly.

En un aspecto particularmente preferido de la presente descripción, la proteína transmembrana es Lamp-2 y el

motivo de señalización está presente en o cerca del extremo N-terminal de la proteína, separado de Lamp-2 con secuencias enlazadoras.

5 El motivo de señalización puede introducirse en el exosoma expresando la proteína de fusión que comprende el motivo de señalización y la proteína transmembrana exosómica dentro de una célula usada para producir los exosomas. La expresión de esta proteína de fusión en la célula permite que la proteína de fusión se incorpore en el exosoma según se produce desde la célula.

10 Por ejemplo, una construcción de polinucleótido, tal como un plásmido de ADN, que expresa la proteína de fusión, se introduce por transfección en la célula. Puede usarse cualquier método adecuado para la introducción de la construcción de polinucleótido en la célula. La construcción de polinucleótido incluye secuencias promotoras adecuadas de modo que la proteína de fusión codificada se exprese en la célula. También se incluyen secuencias de péptido señal de modo que la proteína se incorpore a la membrana del retículo endoplasmático según se produzca. La proteína de membrana entonces se exporta posteriormente al compartimento exosómico/lisosómico antes de la incorporación al exosoma. La secuencia señal normalmente es una secuencia de péptido señal para una proteína transmembrana exosómica. Por ejemplo, la secuencia de péptido señal deriva preferentemente de Lamp-2.

15 Las células preferidas para la producción de exosomas se analizan en más detalle anteriormente. Normalmente, una célula preferida, tal como una célula dendrítica inmadura, se transfecta con una construcción de polinucleótido como se describe anteriormente, de modo que la proteína de fusión de la invención se exprese en la célula. Los exosomas producidos por la célula pueden recogerse posteriormente. Dichos exosomas tiene la proteína de fusión insertada en la membrana de tal manera que los exosomas se dirigen al tejido o tipo celular deseado a través del motivo de señalización.

25 Los exosomas producidos a partir de las células pueden recogerse del medio de cultivo por cualquier método adecuado. Normalmente, una preparación de exosomas puede prepararse a partir del cultivo celular o del sobrenadante tisular por centrifugación, filtración o combinaciones de estos métodos. Por ejemplo, los exosomas pueden prepararse por centrifugación diferencial, que es centrifugación a baja velocidad (<20.000g) para sedimentar partículas más grandes seguido de centrifugación a alta velocidad (>100.000g) para sedimentar los exosomas, filtración por tamaño con filtros apropiados (por ejemplo, filtro de 0,22 µm), ultracentrifugación en gradiente (por ejemplo, con gradiente de sacarosa) o una combinación de estos métodos.

30 De acuerdo con un aspecto preferido de la presente descripción, los exosomas dirigidos se cargan con proteína y/o péptido exógeno. En particular, de acuerdo con la presente descripción, los exosomas se preparan con un motivo de señalización como se describe en este documento y después se cargan con la proteína deseada y/o para su suministro o como se describe anteriormente.

35 En otras realizaciones de la descripción, no tiene que incluirse un motivo de señalización específico en el exosoma. Por ejemplo, los exosomas pueden administrarse directamente al sitio donde se requiere terapia. Como alternativa, puede que no se requiera dirección directa a un sitio específico y que el suministro, por ejemplo, suministro intradérmico o muscular pueda ser suficiente para generar la respuesta inmunitaria deseada sin dirigir los exosomas a ningún tipo celular específico.

40 En algunas realizaciones de la descripción, no se incluye motivo de señalización sobre la superficie de los exosomas. Sin embargo, los exosomas se seleccionan de tal manera que tienen mayor probabilidad de dirigirse a un tipo tisular específico. Por ejemplo, los exosomas derivados de diferentes células pueden tener afinidades naturales por subtipos celulares específicos según lo requiera su función fisiológica tal como la afinidad bien establecida de los exosomas derivados de células dendríticas maduras por las células T. Esta afinidad puede utilizarse para suministrar específicamente la carga mencionada anteriormente a un tejido.

50 *Suministro/administración*

Las construcciones de la descripción pueden administrarse por cualquier medio adecuado. La administración a un ser humano o sujeto animal puede seleccionarse de administración parenteral, intramuscular, intracerebral, intravascular (incluyendo intravenosa), subcutánea, intranasal, intracardiaca, intracerebroventricular, intraperitoneal o transdérmica. Normalmente, el método de suministro es por inyección. Preferentemente, la inyección es intramuscular o intravascular (por ejemplo, intravenosa). Un médico será capaz de determinar la vía de administración requerida para cada paciente particular.

60 Las construcciones se suministran preferentemente como una composición. La composición puede formularse para cualquier medio adecuado de administración, incluyendo administración parenteral, intramuscular, intracerebral, intravascular (incluyendo intravenosa), intracardiaca, intracerebroventricular, intraperitoneal, subcutánea, intranasal o transdérmica. Las composiciones para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Las construcciones de la descripción pueden formularse en una composición farmacéutica, que puede incluir vehículos farmacéuticamente aceptables, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y

similares además de los exosomas.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" (excipiente) es un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un sujeto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables habituales incluyen, aunque sin limitación, aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos de metales, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); disgregantes (por ejemplo, almidón, glicolato de almidón sódico, etc.); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico, etc.).

Las composiciones proporcionadas en este documento pueden contener adicionalmente otros componentes complementarios encontrados convencionalmente en las composiciones farmacéuticas. De este modo, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos compatibles adicionales o pueden contener materiales adicionales útiles al formular físicamente diversas formas de dosificación de la composición de la presente invención, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, cuando se añaden, no deben interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones proporcionadas en este documento.

Se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición. La dosis puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con la gravedad de la afección, la edad y el peso del paciente a tratarse; la vía de administración; y el régimen requerido. Un médico será capaz de determinar la vía de administración requerida y la dosificación para cualquier paciente particular. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de las construcciones individuales, generalmente puede estimarse basándose en las CE50 encontradas como eficaces *in vitro* y en modelos animales *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 mg/kg a 100 mg por kg de peso corporal. Una dosis diaria habitual es de aproximadamente 0,1 a 50 mg por kg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, de acuerdo con la potencia de la construcción específica, la edad, el peso y el estado del sujeto a tratarse, la gravedad de la enfermedad y la frecuencia y vía de administración. Pueden administrarse diferentes dosificaciones de la construcción dependiendo de si la administración es por inyección intramuscular o inyección sistémica (intravenosa o subcutánea). Preferentemente, la dosis de una única inyección intramuscular está en el intervalo de aproximadamente 5 a 20 µg. Preferentemente, la dosis de inyecciones sistémicas únicas o múltiples está en el intervalo de 10 a 100 mg/kg de peso corporal.

Debido a la eliminación de la construcción (y la descomposición de cualquier molécula dirigida), puede que el paciente tenga que tratarse repetidamente, por ejemplo, una vez o más al día, a la semana, al mes o al año. Los expertos en la materia pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosis basándose en los tiempos medidos de permanencia de la construcción en los fluidos corporales o tejidos. Después de un tratamiento satisfactorio, puede ser deseable que el paciente experimente terapia de mantenimiento, donde la construcción se administra a dosis de mantenimiento, que varían de 0,01 mg/kg a 100 mg por kg de peso corporal, una vez o más al día, hasta una vez cada 20 años.

La invención se describe en más detalle a continuación en este documento con referencia a los siguientes ejemplos.

En la medida en que los ejemplos se refieren a la invención, deben contemplarse tal como se ilustran en la misma. Para todo lo demás, los ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos solamente.

50 Ejemplos

Ejemplo 1 - carga de células HEK con exosomas HEK cargados con anticuerpo IgG

Se mezclaron exosomas de células de riñón embrionario humano (HEK) con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con ficoeritrina (PE) en tampón de electroporación (fosfato de potasio 1,15 mM pH 7,2, KCl 25 mM, Optiprep al 21 %) y se dejaron sin cargar (mezclados con el anticuerpo pero sin someterse a electroporación) o se sometieron a electroporación a 200 mV. Después se añadieron los exosomas cargados con anticuerpo a las células HEK y se incubaron durante dos horas, midiendo la fluorescencia a 575 nm. Después se lavaron las células HEK en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se tomaron imágenes. La figura 1 muestra la localización citoplasmática y nuclear de la señal del anticuerpo-PE cuando las células se trataban con exosomas cargados a 200 mV (B) en oposición a los exosomas de control que se mezclaron con el anticuerpo pero no se sometieron a electroporación (A).

Ejemplo 2 - carga de fibroblastos humanos con exosomas HEK cargados con FITC-avidina

El péptido transportan GWTLNSAGYLLGKINKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 2) codificado por la secuencia

polinucleotídica ggctggaccctgaacagcgcgggctatctgctgggcaaaattaacctgaaagcgcctggcggcgcctggcga aaaaaattctg (SEQ ID NO: 3) se insertó en el vector de expresión de Lamp2b descrito previamente en la publicación internacional n.º WO/2010/119256.

- 5 El vector de expresión se basa en el vector pEGFP-C1 (Clonotech) en el que se ha eliminado el gen de eGFP. Lamp2b se clonó con el ADNc de células C2C12 y se insertaron los sitios de restricción XhoI y BspEI después de la secuencia de péptido señal junto con enlazadores de glicina (Ala-Arg-{péptido de dirección}-Ser-Gly-Gly). El péptido señal de Lamp2b es necesario para la inserción en la membrana, pero se elimina por escisión en la proteína madura. Después se clonó la construcción completa en dirección 3' del promotor de CMV con los sitios de restricción NheI y BamHI en un vector pEGFP-C1, eliminando la eGFP en el proceso.

La secuencia adicional cargada después del péptido señal que contiene los sitios XhoI y BspEI posibilitó la inserción de la secuencia codificante de transportan en la parte N-terminal de Lamp2b.

- 15 Los enlazadores de glicina que flanquean el péptido de dirección transportan evitan que el péptido de dirección transportan influya sobre el plegamiento de la proteína Lamp2b. Finalmente, el péptido de dirección transportan debe estar localizado sobre la superficie externa de los exosomas, confiriendo de este modo las capacidades de dirección a los exosomas.

- 20 El péptido de señalización transportan de la SEQ ID NO: 2 codificado por la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 3 se clonó en Lamp2b y se introdujo por transfección en células dendríticas 4 días antes de la purificación de los exosomas. Un obstáculo principal para la capacidad de expresar ligandos de dirección sobre la superficie de los exosomas es que las células dendríticas primarias son difíciles de transfectar y tienen el potencial de diferenciarse después de la transfección. La infección con vectores víricos no es ideal porque las células dendríticas probablemente se activarán por el virus [30], produciendo de ese modo moléculas inmunoestimuladoras que se incorporarán en los exosomas resultantes. Se seleccionó el reactivo TransIT-LT1 de Mirus Bio porque parece transducir de forma eficaz las células dendríticas sin activar significativamente las células dendríticas. La transfección de las células HEK se realizó con 5 µg del vector de expresión pLamp2b-péptido transportan y 5 µl de reactivo de transfección TransIT LT1 (Mirus Bio) en una placa de 6 pocillos con 106 células en el día 4 después de recoger y aislar los exosomas en el día 8.

- 35 Los exosomas de transportan-Lamp2 (5 µg) derivados de células HEK se mezclaron con 5 µg de FITC-avidina y se sometieron a electroporación a 0 mV, 100 mV, 200 mV y 400 mV. Una población de control de los exosomas no se trató con FITC-avidina. Los fibroblastos de los pacientes se trataron durante 3 h con las diferentes poblaciones de exosomas, después de los cual se lavaron las células tres veces con PBS y se trataron con tripsina para retirar el material unido a la membrana. Los fibroblastos se lisaron después y se midió la fluorescencia a 490/520 nm. La figura 2 muestra que fibroblastos incubados con los exosomas no tratados tenían el nivel más bajo de fluorescencia. Los fibroblastos incubados con exosomas tratados con FICT-avidina y sometidos a electroporación a 0 mV, 200 mV y 400 mV emitían más fluorescencia que las células tratadas con los exosomas de control. Sin embargo, las células incubadas con exosomas tratados con FITC-avidina y sometidos a electroporación a 100 mV emitían el nivel más alto de fluorescencia, con una UFR de más de 35.000.

- 45 ¹ Raposo G, Nijman HW, Stoomogel W, LiejendekkerR, Harding CV, Melief DJ Geuze HJ (1996), B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles, *J Exp Med* 183:1161-1172.

- ² Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S (1998), Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes, *Nat Med* 4:5 94-600.

- 50 ³ Hao S, Moyana T, Xiang J (2007), Review: cancer immunotherapy by exosome-based vaccines, *Cancer Biother Radiopharm* 22:692-703.

- ⁴ Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO (2007), Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nat Cell Biol* 9(6):654-9.

- 55 ⁵ Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO (2008), Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers, *Nat Cell Biol* 10(12):1470-6.

60 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ISIS INNOVATION LIMITED

<120> EXOSOMAS PARA EL SUMINISTRO DE AGENTES BIOTERAPÉUTICOS

65

<130> N.114954A

<150> UK 1121070.5
 <151> 07-12-2011

5 <160> 3
 <170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 1

```

Met Cys Leu Ser Pro Val Lys Gly Ala Lys Leu Ile Leu Ile Phe Leu
 1          5          10          15
Phe Leu Gly Ala Val Gln Ser Asn Ala Leu Ile Val Asn Leu Thr Asp
          20          25          30
Ser Lys Gly Thr Cys Leu Tyr Ala Glu Trp Glu Met Asn Phe Thr Ile
          35          40          45
Thr Tyr Glu Thr Thr Asn Gln Thr Asn Lys Thr Ile Thr Ile Ala Val
          50          55          60
Pro Asp Lys Ala Thr His Asp Gly Ser Ser Cys Gly Asp Asp Arg Asn
65          70          75          80
Ser Ala Lys Ile Met Ile Gln Phe Gly Phe Ala Val Ser Trp Ala Val
          85          90          95
Asn Phe Thr Lys Glu Ala Ser His Tyr Ser Ile His Asp Ile Val Leu
          100          105          110
Ser Tyr Asn Thr Ser Asp Ser Thr Val Phe Pro Gly Ala Val Ala Lys
          115          120          125
Gly Val His Thr Val Lys Asn Pro Glu Asn Phe Lys Val Pro Leu Asp
130          135          140
Val Ile Phe Lys Cys Asn Ser Val Leu Thr Tyr Asn Leu Thr Pro Val
145          150          155          160
Val Gln Lys Tyr Trp Gly Ile His Leu Gln Ala Phe Val Gln Asn Gly
          165          170          175
Thr Val Ser Lys Asn Glu Gln Val Cys Glu Glu Asp Gln Thr Pro Thr
          180          185          190
Thr Val Ala Pro Ile Ile His Thr Thr Ala Pro Ser Thr Thr Thr Thr
          195          200          205
Leu Thr Pro Thr Ser Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr
210          215          220
    
```

15

ES 2 625 863 T3

Val Gly Asn Tyr Ser Ile Arg Asn Gly Asn Thr Thr Cys Leu Leu Ala
 225 230 235 240

Thr Met Gly Leu Gln Leu Asn Ile Thr Glu Glu Lys Val Pro Phe Ile
 245 250 255

Phe Asn Ile Asn Pro Ala Thr Thr Asn Phe Thr Gly Ser Cys Gln Pro
 260 265 270

Gln Ser Ala Gln Leu Arg Leu Asn Asn Ser Gln Ile Lys Tyr Leu Asp
 275 280 285

Phe Ile Phe Ala Val Lys Asn Glu Lys Arg Phe Tyr Leu Lys Glu Val
 290 295 300

Asn Val Tyr Met Tyr Leu Ala Asn Gly Ser Ala Phe Asn Ile Ser Asn
 305 310 315 320

Lys Asn Leu Ser Phe Trp Asp Ala Pro Leu Gly Ser Ser Tyr Met Cys
 325 330 335

Asn Lys Glu Gln Val Leu Ser Val Ser Arg Ala Phe Gln Ile Asn Thr
 340 345 350

Phe Asn Leu Lys Val Gln Pro Phe Asn Val Thr Lys Gly Gln Tyr Ser
 355 360 365

Thr Ala Gln Glu Cys Ser Leu Asp Asp Asp Thr Ile Leu Ile Pro Ile
 370 375 380

Ile Val Gly Ala Gly Leu Ser Gly Leu Ile Ile Val Ile Val Ile Ala
 385 390 395 400

Tyr Leu Ile Gly Arg Arg Lys Thr Tyr Ala Gly Tyr Gln Thr Leu
 405 410 415

<210> 2
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> transportan

10

<400> 2

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
 20 25

15 <210> 3
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> transportan

ES 2 625 863 T3

<400> 3

ggctggacct tgaacagcgc gggctatctg ctgggcaaaa ttaacctgaa agcgcctggcg 60

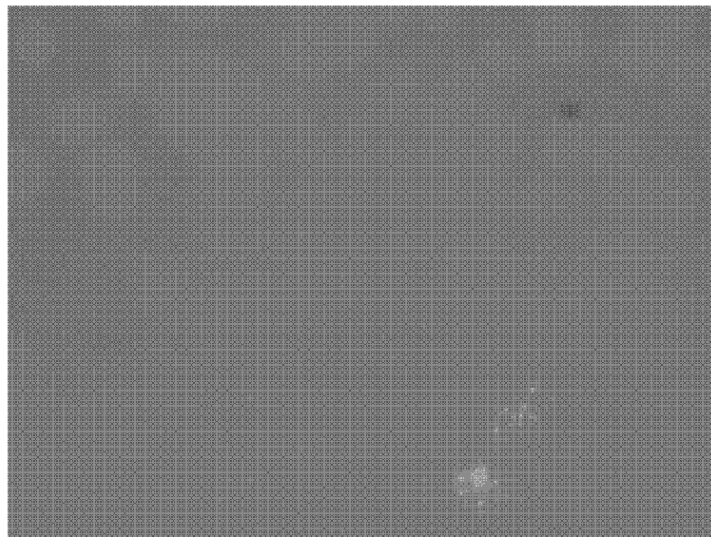
gcgcctggcga aaaaaattct g 81

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un exosoma, donde el exosoma está cargado con proteína y/o péptido exógeno, donde la proteína o el péptido exógeno es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 5 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el exosoma deriva de células dendríticas.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la proteína y/o el péptido es para su uso en un método de tratamiento de un organismo humano o animal por terapia.
- 10 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, donde la proteína y/o el péptido es para su uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer, enfermedades autoinmunes y/o rechazo del trasplante de órganos o células.
- 15 5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho exosoma comprende un motivo de señalización expresado en la superficie del exosoma.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, donde el motivo de señalización comprende un péptido que se une a un motivo presente en la célula a abordar.
- 20 7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6, donde el exosoma comprende una proteína transmembrana exosómica que se ha modificado para que incorpore el motivo de señalización peptídico.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, donde la proteína transmembrana exosómica se selecciona de Lamp-1, Lamp-2, CD13, CD86, flotilina, syntaxina-3.
- 25 9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, donde la proteína transmembrana exosómica es Lamp-2b.
10. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo.
- 30 11. Un método de carga de los exosomas con proteína y/o péptido, que comprende proporcionar una composición de exosomas y cargar los exosomas con proteína y/o péptido por electroporación, donde la proteína y/o el péptido es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 35 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, donde la electroporación se realiza a una tensión entre 20 V/cm a 100 V/cm, o en el que la electroporación se realiza a una tensión de 200 mV.
- 40 13. Un método de carga de los exosomas con proteína y/o péptido, que comprende proporcionar una composición de exosomas y cargar los exosomas con proteína y/o péptido por transfección, usando un agente de transfección de liposoma catiónico, donde la proteína y/o el péptido es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 45 14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo.
15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde los exosomas derivan de células dendríticas.

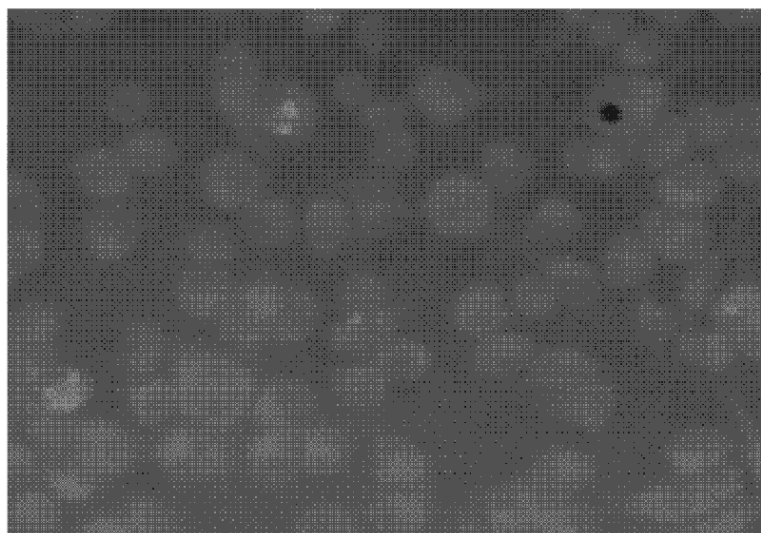
Figura 1

A



0 mV

B



200 mV

Figura 2

