

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 502**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 35/28** (2015.01)  
**A61K 35/42** (2015.01)  
**A61K 9/12** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**C07K 14/785** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012 PCT/US2012/028524**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12125471**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12709484 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2683389**

54 Título: **Métodos y composiciones relacionados con exosomas de células madre mesenquimales**

30 Prioridad:

**11.03.2011 US 201161451981 P**

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

**10.08.2017**

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION  
(100.0%)  
300 Longwood Avenue  
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**MITSIALIS, S., ALEXANDER;  
LEE, CHANGJIN y  
KOUREMBANAS, STELLA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 629 502 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**

Métodos y composiciones relacionados con exosomas de células madre mesenquimales

**INVESTIGACIÓN PATROCINADA FEDERALMENTE**

5 Esta invención se realizó con el apoyo del Gobierno bajo los números de subvención RO1 HL055454 y R01 HL085446 adjudicados por el National Heart Lung and Blood Institute. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 Los bebés prematuros padecen o están en riesgo de desarrollar determinadas enfermedades (o afecciones) pulmonares crónicas (o respiratorias) en mayor proporción que los bebés nacidos a su debido tiempo o cerca del mismo. Debido a que los pulmones y la capacidad de respiración del bebé se ven comprometidos, estas enfermedades son a menudo letales. El aumento de las tasas de supervivencia de los bebés prematuros ha dado lugar a una incidencia incrementada de este tipo de enfermedades pulmonares. La inflamación es una característica fisiopatológica clave de múltiples enfermedades pulmonares, incluyendo la hipertensión pulmonar (PH o PAH), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibrosis pulmonar idiopática (IPF) y enfermedad pulmonar crónica de la infancia, también conocidos como displasia broncopulmonar (BPD). El aumento de las tasas de supervivencia de los bebés prematuros ha dado lugar a un aumento de la incidencia de BPD y sus complicaciones asociadas, que incluyen PH secundaria, asma y aumento de la tasa de re-hospitalización en los primeros años de vida. La BPD es una complicación común de la prematuridad (Kinsella et al, Lancet, 2006, 367:1421-1431; Stenmark y Abman, Annu Rev Physiol, 2005, 67:623-661) y en algunos estudios puede afectar hasta un 35 - 40% de los bebés prematuros nacidos con < 29 semanas de gestación. Sus causas subyacentes incluyen lesión mecánica, toxicidad del oxígeno, infección e inflamación pulmonar resultante y el daño del pulmón en desarrollo. Los intentos para controlar la BPD han implicado estrategias de ventilación suave y el uso de agentes anti-inflamatorios tales como corticosteroides. Sin embargo, estos tratamientos tienen un éxito limitado y los efectos secundarios inaceptables (Baveja y Christou, Semin Perinatol, 2006, 30:209-218). Los efectos a largo plazo de estas enfermedades pulmonares crónicas son también una preocupación e incluyen daño pulmonar sostenido y retraso del desarrollo neurológico. La PH es una complicación grave de la BPD y se asocia con una alta tasa de mortalidad. También se asocia con otras formas de enfermedad pulmonar tales como la COPD. Más recientemente, la PH ha sido reconocida como una de las principales complicaciones de la esquistosomiasis a través de mecanismos que implican inflamación. La esquistosomiasis tiene una muy alta prevalencia en determinadas partes del mundo y está altamente vinculada con la PH secundaria, aumentando en potencia drásticamente la incidencia de esta enfermedad vascular en todo el mundo.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones y se proporciona toda información que no caiga dentro de las reivindicaciones se proporciona sólo para información.

35 La invención proporciona composiciones que comprenden exosomas derivados de células madre mesenquimales (MSC) y su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad pulmonar.

40 En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados, formulados para la administración intratraqueal o la administración por inhalación. En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados, formulados para la administración intravenosa.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados y un agente tensioactivo pulmonar.

45 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados y un corticosteroide pulmonar. El corticosteroide pulmonar puede ser metilprednisolona, aunque no está limitado a ella.

En otros aspectos, la invención proporciona exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados aerosolizados, que comprenden exosomas de MSC aislados, aerosolizados.

50 En otro aspecto, la invención proporciona una composición de exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados para uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad pulmonar. En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad pulmonar que comprende exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición de exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados para su uso como un medicamento para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad pulmonar una cantidad eficaz de exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados.

En todavía otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados para tratar o prevenir enfermedades pulmonares en un sujeto, o el uso de exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad pulmonar.

10 En todavía otro aspecto, la invención proporciona exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados para uso en un método para tratar o prevenir la enfermedad pulmonar, que comprende administrar una cantidad eficaz de los exosomas de MSC aislados a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad pulmonar.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad pulmonar una cantidad eficaz de exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados.

20 Diversas realizaciones son igualmente aplicables a los diversos aspectos de la invención, tal como se describe más adelante. En algunas realizaciones, la enfermedad pulmonar es enfermedad pulmonar inflamatoria. En algunas realizaciones, la enfermedad pulmonar inflamatoria es hipertensión pulmonar, asma, displasia broncopulmonar (BPD), alergia o fibrosis pulmonar idiopática. En algunas realizaciones, la enfermedad pulmonar es enfermedad vascular pulmonar. En algunas realizaciones, la enfermedad pulmonar es una lesión pulmonar aguda. En algunas realizaciones, la lesión pulmonar aguda se asocia con la sepsis o es el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) inducida por el ventilador.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene o es probable que desarrolle esquistosomiasis.

25 En algunas realizaciones, el sujeto es un recién nacido. En algunas realizaciones, el sujeto es un bebé. En algunas realizaciones, el sujeto es de entre 3-18 años de edad. En algunas realizaciones, el sujeto es un adulto. En cualquiera de estas realizaciones, el sujeto puede ser uno que nació prematuramente. En algunas realizaciones, el sujeto nació en menos de 35 semanas de gestación. En algunas realizaciones, el sujeto nació en menos de 26 semanas de gestación.

30 En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se utilizan junto con un agente secundario. En algunas realizaciones, el agente secundario es un esteroide, un antioxidante, o el óxido nítrico inhalado. En algunas realizaciones, el esteroide es un corticosteroide. En algunas realizaciones, el corticosteroide es metilprednisolona. En algunas realizaciones, el antioxidante es superóxido dismutasa.

En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran en el espacio de una hora del nacimiento. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran en el espacio de 1 mes del nacimiento.

35 En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran por vía intravenosa. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran a los pulmones o la tráquea del sujeto. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran por inhalación. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran en un aerosol. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran utilizando un nebulizador. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran utilizando un tubo intratraqueal.

En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran o formulan con un tensioactivo pulmonar. En algunas realizaciones, el tensioactivo pulmonar es un tensioactivo que se produce de forma natural, aislado. En algunas realizaciones, el tensioactivo pulmonar se deriva de pulmón bovino o de pulmón porcino. En algunas realizaciones, el tensioactivo pulmonar es un tensioactivo sintético.

45 En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran repetidamente al sujeto. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran dos veces al sujeto. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se administran continuamente al sujeto.

En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se derivan de MSC de sangre del cordón umbilical. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados se derivan de MSC de la médula ósea.

50 En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados son autólogos al sujeto. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC aislados son alogénicos para el sujeto.

En algunas realizaciones, el sujeto no está recibiendo un trasplante de células o de órganos.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de exosomas de células madre mesenquimales (MSC) humanas aislados, y un agente tensioactivo pulmonar, formulada para la administración a los pulmones, para uso en un sujeto humano que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad pulmonar, en donde el sujeto es de menos de 4 semanas de edad. La divulgación proporciona de manera similar un método de uso de los exosomas de MSC, que comprende administrar una cantidad eficaz de exosomas de células madre mesenquimales (MSC) humanas aislados, formulada para la administración a los pulmones, a un sujeto humano que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad pulmonar, en donde el sujeto es de menos de 4 semanas de edad. La divulgación proporciona de manera similar el uso de una cantidad eficaz de exosomas de células madre mesenquimales (MSC) humanas aislados y un agente tensioactivo pulmonar, formulada para la administración a los pulmones, en un sujeto humano que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad pulmonar, en donde el sujeto es de menos de 4 semanas de edad. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC humanas aislados se aíslan de cordón umbilical humano (p. ej., gelatina de Wharton). En algunas realizaciones, el sujeto humano nació antes de las 37 semanas de gestación. En algunas realizaciones, al sujeto humano se le ha administrado oxígeno o ha sido conectado a un respirador. En algunas realizaciones, el sujeto humano tiene o está en riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar. En algunas realizaciones, la displasia broncopulmonar es no inflamatoria. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC humanas aislados se administran en el espacio de 1 día del nacimiento. En algunas realizaciones, los exosomas de MSC humanas aislados se administran en el espacio de 1 hora del nacimiento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona exosomas de MSC sintéticos que tienen características similares o idénticas de exosomas de MSC aislados, composiciones que comprenden dichos exosomas de MSC sintéticos, y métodos de su uso. La divulgación contempla que exosomas de MSC sintéticos se pueden formular y utilizar de la misma manera que exosomas de MSC aislados. Los exosomas sintéticos pueden comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o las ocho de las siguientes proteínas: haptoglobina (N° de Acc. q61646), proteína de unión a galectina-3 (N° de Acc. q07797), trombospondina-2 (N° de Acc. q03350), lactadherina (N° de Acc. q21956), proteína de unión a potenciador de adipocitos 1 (N° de Acc. q640n1), vimentina (N° de Acc. p20152), subunidad alfa de proteasoma tipo 2 (N° de Acc. p49722) y la proteína beta amiloide A4 (N° de Acc. p12023). Estos exosomas se pueden formular tal como se describe en esta memoria para exosomas de MSC aislados, incluyendo los formulados para administración intranasal o intratraqueal o inhalación. Pueden ser formulados y/o administrados con agentes tensioactivos pulmonares u otros agentes terapéuticos.

Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se describirán con mayor detalle en esta memoria.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Factores secretores de BM-MSC son anti-inflamatorios. Efectos de BM-MSC-CM sobre la infiltración inducida por hipoxia de los macrófagos en el pulmón (A). Ratones ( $n > 8$ ) a los que se inyectó vehículo o BM-MSC-CM o MLF-CM fueron expuestos a hipoxia (8,5% de  $O_2$ ) durante 48 horas y se recogieron BALFs de los ratones hipóxicos, así como de ratones control normóxicos emparejados por edades. Se contó el número de macrófagos alveolares en BALFs mediante tinción de Kimura. Análisis de inmunotransferencia comparativo de proteínas en BALFs libres de células de ratones control hipóxicos y normóxicos. (B). Se agruparon volúmenes equivalentes de BALFs libres de células de ratón individual en el mismo grupo ( $n > 8$ ) y se analizaron proteínas de volumen equivalente de BALFs agrupados mediante transferencia western utilizando anticuerpos específicos para MCP-1 (parte superior) y HIMF/FIZZ1 (parte inferior). Intensidades relativas de MCP-1 y HIMF están representadas por la normalización sobre la señal de IgA de la misma transferencia.

FIG 2. Aislamiento de exosomas de medio acondicionado con BM-MSC libre de células. Los exosomas en BM-MSC-CM o MLF-CM se aislaron por ultrafiltración y cromatografía de exclusión por tamaño. 1,6% (p/p) de proteínas en BM-MSC-CM fueron asociados con exosomas y los exosomas en las fracciones de la cromatografía de exclusión por tamaño se visualizaron por microscopía electrónica (B - E). Para verificar el aislamiento de exosomas de BM-MSC-CM, la fracción en el volumen vacío ( $v_e = v_o$ ) (B) y la fracción entre el volumen vacío y el volumen total ( $v_o < v_t$ ) de la columna (C) se analizaron por microscopía electrónica de tinción negativa a 30.000 aumentos. La morfología y la distribución por tamaño de los exosomas aisladas de BM-MSC-CM (D) o MLF-CM (E) eran idénticas. Análisis de transferencia Western frente a las proteínas asociadas con exosomas (F-G). 3  $\mu$ g de proteínas en cada una de las muestras se analizaron por transferencia western utilizando los anticuerpos contra CD63, 14-3-3s, moesina, factor estimulante de colonias de macrófagos (mCSF), osteopontina (OPN) y dicer. Para el control positivo, se utilizaron 35  $\mu$ g de proteínas lisados de células enteras BM-MSC.

FIG. 3. MEX suprime la inflamación pulmonar aguda inducida por hipoxia. Ratones ( $n > 7$ ) a los que se inyectó vehículo o MEX o fracción libre de exosomas de BM-MSC-CM o FEX se expusieron a hipoxia (8,5% de  $O_2$ ) durante 48 horas y se recogieron BALFs de los ratones hipóxicos y ratones normóxicos emparejados por edades. Se contó el número de macrófagos alveolares en BALF de cada uno de los ratones mediante tinción de Kimura (A). Análisis de inmunotransferencia comparativo de proteínas en BALFs libres de células de ratones control hipóxicos y los

normóxicos (B). Se agrupó el volumen equivalente de BALFs libres de células de ratón individual en el mismo grupo ( $n > 7$ ) y proteínas de volumen equivalente de BALFs agrupados se analizaron mediante transferencia western utilizando anticuerpos específicos para MCP-1 (parte superior) y HIMF/FIZZ1 (parte inferior). Los niveles relativos de MCP-1 y HIMF están representados por la normalización sobre la señal de IgA de la misma transferencia.

5 FIG. 4. Efecto en el curso del tiempo sobre la inflamación pulmonar derivada de hipoxia por la administración única y múltiple de MEX. Ratones a los que se inyectó vehículo (A) o MEX (B) el día 0 fueron expuestos a hipoxia (8,5% de  $O_2$ ) durante los periodos indicados. Para el experimento de inyección múltiple, los ratones que recibieron MEX el día 0 fueron expuestos a hipoxia durante 4 días. La segunda inyección de la misma dosis de MEX el día 4 fue seguida de exposición adicional a hipoxia los días indicados (C). Se recogieron BALFs en los periodos de tiempo seleccionados de acondicionamiento hipóxico y se contó el número de macrófagos alveolares en BALF de ratones individuales. Volúmenes equivalentes de BALFs libres de células de ratones individuales en el mismo grupo ( $n > 7$ ) se agruparon y las proteínas de 10% (v/v) de BALFs agrupados se analizaron mediante transferencia western utilizando anticuerpos específicos para MCP-1 y HIMF (D).

15 FIG. 5. MEX suprime PAH inducida por hipoxia. A ratones ( $n > 7$ ) se les inyectó una o dos veces vehículo (el día 0 y el día 4) o MEX (el día 0 y/o el día 4), o FEX (el día 0 y el día 4) y se expusieron a hipoxia (8,5% de  $O_2$ ) durante periodos de 3 semanas (A). RVSP (B) y el Índice de Fulton (C) de los ratones control hipóxicos y normóxicos se midieron al final del periodo experimental. Secciones de pulmón embebidas en parafina de ratones seleccionados al azar ( $n = 4$ ) en cada uno de los grupo se inmunotifieron para  $\alpha$ -SMA para resaltar paredes de los vasos de arteriolas pulmonares (D). Aumento original para imágenes: 400x. Se seleccionaron arteriolas pulmonares pequeñas con 20 ~ 30  $\mu m$  de diámetro de cada uno de los grupos para medir el espesor de pared del vaso que se expresó como un porcentaje del área total del vaso. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 40 \sim 50$  arteriolas por grupo).

25 FIG. 6. Purificación de exosomas derivados de MSC. Los exosomas se purificaron por cromatografía en columna de filtración en gel Sephacryl S-400. Nanopartículas de 50 nm fluorescentes cargadas negativamente se aplicaron sobre la columna S-400 y se eluyó con una condición idéntica a la purificación del exosoma (A). A partir de la purificación del exosoma, se separó un volumen equivalente de cada una de las fracciones tanto en gel de poliacrilamida desnaturizante al 10% (B) como en electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (C). La mancha para el gel de agarosa se tiñó con anticuerpo anti-CD81 (D).

30 FIG. 7. Análisis bioquímico comparativo de exosomas derivados de MSC y fracciones libres de exosoma. Cantidades de proteína equivalentes en ambas agrupaciones de fracciones de exosoma (M) y fracciones libres de exosoma (MF) se separaron en gel de poliacrilamida desnaturizante al 12% (A). Gel de agarosa al 1,2% cargado por cantidades de proteína equivalentes en ambas agrupaciones de fracciones de exosoma y fracciones libres de exosoma así como nanopartículas de 50 nm en ausencia (izquierda, B) o presencia de SDS al 0,5% (derecha, B) se tiñeron con azul coloidal. Gel de agarosa al 1,2% cargado por cantidades de proteína equivalentes en ambas agrupaciones de fracciones de exosoma y fracciones libres de exosoma se tiñeron con bromuro de etidio para los ácidos nucleicos (izquierda, C) o azul coloidal para las proteínas (derecha, C). Manchas para geles cargados con cantidades de proteína equivalentes en ambas agrupaciones de fracciones de exosoma y fracciones libres de exosoma, separadas tanto en gel de agarosa al 1.2% como en gel desnaturizante de poliacrilamida al 12%, se inmunotifieron con anticuerpos anti-CD81 y anticuerpos anti-SPP-1 (D). M, agrupación de fracciones exosomales; MF, agrupación de las fracciones libres de exosoma; N, nanoesferas fluorescentes de 50 nm, cargadas negativamente.

40 FIG. 8. Secreción inducida por hipoxia de HIMF/FIZZ-1/Retn1 $\alpha$  en el pulmón. Ratones fueron expuestos durante los periodos de tiempo indicados a hipoxia monobárica (8,5% de  $O_2$ ). Las proteínas en BAL normalizadas en volumen (A) y la cantidad (B) de cada uno de los ratones individuales en el mismo grupo se agruparon y se separaron en gel de poliacrilamida al 14%. Los niveles de HIMF, lisozima e IgA fueron evaluados por análisis de transferencia western utilizando anticuerpos específicos.

45 FIG. 9. Exosomas derivados de MSCs suprimen la secreción inducida por hipoxia de HIMF/FIZZ-1/Retn1 $\alpha$  en el pulmón. Ratones a los que se inyectaron 10  $\mu g$  de MEX (M) o vehículo (V) por la vena de la cola fueron expuestos durante los periodos de tiempo indicados a hipoxia monobárica (8,5% de  $O_2$ ). Las proteínas en BAL normalizadas en volumen (A) y la cantidad (B) de cada uno de los ratones individuales en el mismo grupo se agruparon y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 14%. Los niveles de HIMF, lisozima e IgA fueron evaluados por análisis de transferencia western utilizando anticuerpos específicos.

50 FIG. 10. Exosomas derivados de MSCs suprimen la secreción inducida por hipoxia de HIMF/FIZZ-1/Retn1 $\alpha$  en el pulmón. Ratones a los que se inyectaron 10  $\mu g$  de MEX (M) o vehículo (V) por la vena de la cola fueron expuestos durante los periodos de tiempo indicados a hipoxia monobárica (8,5% de  $O_2$ ). 10  $\mu g$  de proteínas BAL de cada uno de los ratones individuales se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 14% (A, B). Las proteínas en BAL normalizadas por la cantidad de cada uno de los ratones individuales en el mismo grupo se agruparon y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 14% (C). Los niveles de HIMF, lisozima e IgA fueron evaluados por análisis de transferencia western utilizando anticuerpos específicos.

FIG. 11. Exosomas derivados de MSCs suprimen la regulación positiva inducida por hipoxia de HIF2 $\alpha$  en el tejido pulmonar. Ratones a los que se inyectaron 10  $\mu$ g de MEX o vehículo por la vena de la cola fueron expuestos durante los periodos de tiempo indicados a hipoxia monobárica (8,5% de O<sub>2</sub>). Una cantidad equivalente de proteínas a partir de homogeneizado de tejido pulmonar individual se separó por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida. Los niveles de HIF2 $\alpha$  y actina se detectaron por análisis de transferencia western utilizando anticuerpos específicos (A, B). Las intensidades relativas para HIF2 $\alpha$ /actina fueron evaluadas por análisis densitométrico (C). \*\*,  $p < 0,01$  frente a normoxia ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía); ###,  $p < 0,01$  frente a vehículo (hipoxia, 2 días) ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía).

FIG. 12. Exosomas derivados de MSCs suprimen la activación inducida por hipoxia de NF $\kappa$ B p65 en el tejido pulmonar. Ratones a los que se inyectaron 10  $\mu$ g de MEX o vehículo por la vena de la cola fueron expuestos durante los periodos de tiempo indicados a hipoxia monobárica (8,5% de O<sub>2</sub>). Una cantidad equivalente de proteínas a partir de homogeneizado de tejido pulmonar individual se separó por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida. Los niveles de p65, p65 fosforilado (S536) y actina se detectaron mediante análisis de transferencia western utilizando anticuerpos específicos (A, B). Las intensidades relativas para P-p65/actina fueron evaluadas por análisis densitométrico (C). \*,  $p < 0,05$  frente a normoxia ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía); ###,  $p < 0,01$  frente a vehículo (hipoxia, 2 días) ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía).

FIG. 13. Exosomas derivados de MSCs suprimen la activación inducida por hipoxia de STAT3 en el tejido pulmonar. Ratones a los que se inyectaron 10  $\mu$ g de MEX o vehículo por la vena de la cola fueron expuestos a hipoxia monobárica (8,5% de O<sub>2</sub>) durante 2 días. Una cantidad equivalente de proteínas a partir de homogeneizados de tejido pulmonar individuales se separó por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida. Los niveles de STAT3, STAT3 fosforilada (Y705) y actina se detectaron por análisis de transferencia western utilizando anticuerpos específicos (A). Las intensidades relativas para P-STAT3/STAT3 fueron evaluadas por análisis densitométrico (B). \*\*,  $p < 0,01$  frente a normoxia ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía); ###,  $p < 0,01$  frente a vehículo ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía).

FIG. 14. Exosomas derivados de MSCs suprimen la activación inducida por hipoxia de STAT3 en el tejido pulmonar. Ratones a los que se inyectaron 10  $\mu$ g de MEX o vehículo por la vena de la cola fueron expuestos durante los periodos de tiempo indicados a hipoxia monobárica (8,5% de O<sub>2</sub>). Una cantidad equivalente de proteínas a partir de homogeneizado de tejido pulmonar individual se separó por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida. Los niveles de STAT3 (Y705) y actina se detectaron por análisis de transferencia western utilizando anticuerpos específicos (A, B). Las intensidades relativas para P-STAT3/actina fueron evaluadas por análisis densitométrico (C). \*\*\*,  $p < 0,001$  frente a normoxia o vehículo (hipoxia, 7 días), o MEX (hipoxia, 2 y 7 días) ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía); ###,  $p < 0,001$  frente a vehículo (hipoxia, 2 días) ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía); ns normoxia frente a MEX (hipoxia, 2 días) ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía).

FIG. 15. Exosomas derivados de MSCs suprimen la regulación positiva de HIMF inducida por hipoxia en el tejido pulmonar. Ratones a los que se inyectaron 10  $\mu$ g de MEX o vehículo por la vena de la cola fueron expuestos a hipoxia monobárica (8,5% de O<sub>2</sub>) durante 7 días. Una cantidad equivalente de proteínas a partir de homogeneizado de tejido pulmonar individual se separó por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida. Los niveles de HIMF y actina se detectaron por análisis de transferencia western utilizando anticuerpos específicos (A). Las intensidades relativas para HIMF/actina fueron evaluadas por análisis densitométrico (B). \*\*,  $p < 0,01$  frente a normoxia ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía); #,  $p < 0,05$  frente a vehículo ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía). estadísticamente no significativa entre MEX frente a normoxia ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía).

FIG. 16. Exosomas derivados de MSCs suprimen la regulación positiva de HIMF inducida por hipoxia en el tejido pulmonar. Ratones a los que se inyectaron 10  $\mu$ g de MEX o vehículo por la vena de la cola fueron expuestos durante los periodos de tiempo indicados a hipoxia monobárica (8,5% de O<sub>2</sub>). Una cantidad equivalente de proteínas a partir de homogeneizado de tejido pulmonar individual se separó por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida. Los niveles de HIMF y actina se detectaron por análisis de transferencia western utilizando anticuerpos específicos (A, B). Las intensidades relativas para HIMF/actina fueron evaluadas por análisis densitométrico (C, D). \*\*\*,  $p < 0,001$  frente a normoxia ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía); \*\*,  $p < 0,01$  frente a normoxia ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía); #,  $p < 0,05$  frente a vehículo ( $n = 4 \pm DE$ , ANOVA de una vía).

FIG. 17. Exosomas derivados de MSCs protegen hipertrofia cardíaca derecha inducida por hipoxia crónica. Ratones a los que se inyectaron 10  $\mu$ g de MEX (M) o vehículo (V) por la vena de la cola fueron expuestos durante los periodos de tiempo indicados a hipoxia monobárica (8,5% de O<sub>2</sub>) durante 3 semanas (A). Corazones de ratones individuales se procesaron, a continuación se midió la relación de RV/(LV + S) (B). \*\*\*,  $p < 0,001$  frente a normoxia ( $n = 9$ , ANOVA de una vía); ###,  $p < 0,001$  frente a vehículo ( $n = 11$ , ANOVA de una vía); estadísticamente no significativa entre MEX y normoxia (ANOVA de una vía).

FIG.18. Perfil de alta resolución de la purificación de exosomas de MSC por FPLC (Cromatografía Líquida de Proteínas Rápida). Panel superior: Cromatografía Líquida de Proteínas Rápida de purificación de exosomas de MSC. Matriz: HiPrep Sephacyl S-400. Fase móvil Solución Salina Tamponada con Fosfato, 300 mM. Caudal: 0,5

ml/min. Medios acondicionados concentrados se aplicaron a la columna y la proteína eluida se vigiló por A280. exosomas de MSC (MEX) aislados eluyeron a 65,5 ml. Un patrón de tamaño molecular de nanopartículas de 50 nm de diámetro co-eluyó con exosomas de MSC. Panel inferior: las fracciones del producto eluido se aplicaron a un gel de electroforesis de poli(acrilamida) nativo y posteriormente se tiñeron para la proteína total. La fracción MEX migró como formas de alto PM, distintas de la proteína a granel en el medio acondicionado.

FIG. 19. Los MEX de origen murino o humano suprimen la activación hipóxica de STAT3. (A) Extractos totales de proteínas de los pulmones de animales individuales tratados con 10 µg de preparaciones de MEX. Panel derecho: la exposición a la hipoxia durante 2 días resultó en la activación de STAT3 a través de la fosforilación en Tyr-705 (pY-STAT3) en pulmón de ratón, y esto se evitó por tratamiento con MEX de origen murino. Panel izquierdo: cuantificación de la activación de STAT3. Para todos los grupos, n = 4, ANOVA de una vía: \*\*, p < 0,01 frente a normoxia. \*\*, p < 0,01 frente a PBS. (B) Cultivos primarios de Células Endoteliales la Arteria Pulmonar humanas (hPAECs) expuestas a hipoxia (1% de O<sub>2</sub>, 5 h) exhiben una activación robusta de STAT3 que se suprime de manera eficiente en presencia de MEX secretada por las MSC del estroma del cordón umbilical humano (hUC-MEX). La fracción agotada en microvesículas de medios condicionados por hUC-MSCs (hUC-ExD-CM) no tiene efecto sobre la activación de STAT3.

FIG. 20. El tratamiento con MEX suprime la inducción hipóxica de la superfamilia miR-17 de microARN y aumenta los niveles de miR-204 anti-proliferativa en el pulmón. Los niveles de microARN en pulmón total de ratón de animales tratados con 10 µg de preparaciones MEX. Los niveles de miR se evaluaron mediante qPCR a los 7 días de la exposición hipóxica y se presentan con relación a la media del grupo normóxico. (A) Seleccionar miRs que representan los racimos miR-17~92, miR-106b~25 y miR-106a~363. (B) Seleccionar miRs de los que se informa que están implicados en la señalización de la hipoxia. (C) Regulación positiva de los niveles basales de miR-204 específica de la arteriola pulmonar tras el tratamiento MEX. Los puntos representan los niveles de expresión en los animales individuales. NRX: normoxia; HPX: hipoxia. Para todos los grupos, n = 4, ANOVA de una vía: \*\*, p < 0,01; §, p < 0,001 frente a normoxia. §, p < 0,001 frente a PBS.

FIG. 21. Esquema de una hipótesis no limitativa que sintetiza los resultados de este estudio. La hipoxia desplaza el equilibrio Th1/Th2 de inmunomoduladores en el pulmón, lo que resulta en macrófagos alveolares activados alternativos (AA-AMφ) y, en la fase temprana, induce la expresión de HIMF en el epitelio pulmonar. Acción mitogénica de HIMF sobre la vasculatura requiere citoquinas Th2 tales como IL-4. Consecuencias del desplazamiento hacia la proliferación incluyen la activación hipóxica de la señalización de STAT3 y la regulación positiva de la familia miR-17 de microARNs. El tratamiento con MEX interfiere con una señal hipóxica temprana en el pulmón, suprimiendo tanto la inflamación y como la regulación positiva transcripcional de HIMF. Además, el tratamiento con MEX puede regular directamente de forma positiva los niveles de miR-204, rompiendo así el bucle directo de alimentación STAT3-miR-204-STAT3, y desplazando el equilibrio a un estado anti-proliferativo.

FIG. 22. Marcadores específicos para los exosomas de MSCs humanas de gelatina de Wharton (WJ). El análisis de transferencia Western de la fracción de 50 nm (E1) de las siguientes fuentes: UC: medios de crecimiento de MSC no acondicionados. MPD UC: medios de cultivo agotados en micropartículas. Marcadores exosomales en el medio de crecimiento se separan por precipitación con polietilenglicol. hMEX: exosomas de MSCs de WJ. hFEX: exosomas de fibroblastos dérmicos humanos. Tetraespaninas CD9 y CD81 están enriquecidas en las fracciones exosomales.

FIG. 23. mMEX suprime la regulación positiva hipóxica de HIF1α y la fosforilación de STAT3 en fibroblastos de pulmón de ratón. Fibroblastos de pulmón de ratón fueron expuestos a hipoxia en presencia o ausencia de exosomas derivados de MSC de médula ósea de ratón (mMEX), tal como se indica. La estabilización del factor inducible por hipoxia (HIF) y la activación de STAT3 por fosforilación (P-STAT3) se determinaron por transferencia western.

FIG. 24. hPAEC tratadas con exosomas de MSCs derivadas de médula ósea de ratón (mMEX, 1 µg/ml) o exosomas de fibroblastos de pulmón de ratón (mFEX, 1 µg/ml) fueron expuestas a 1% de O<sub>2</sub> durante 6 h. La activación hipóxica de STAT3 (P-STAT3), STAT3 total y la estabilización de HIF2α se determinaron por transferencia western. NRX: normoxia. PBS: control de hipoxia.

FIG. 25. PAECs humanas tratadas con exosomas de MSCs de jalea de Wharton (hMEX, 1 µg/ml) o exosomas de fibroblastos dérmicos humanos (hFEX, 1 µg/ml) fueron expuestas a 1% de O<sub>2</sub> durante 6 h. s Stat = 3 activación (P-STAT3) y STAT3 total de se determinaron por transferencia western. NRX: normoxia. PBS: control de hipoxia.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se basa, en parte, en el sorprendente hallazgo de que los exosomas derivados de células madre mesenquimales proporcionan un efecto terapéutico a determinadas enfermedades pulmonares, incluyendo, pero no limitadas a enfermedades pulmonares inflamatorias.

La invención se define en las reivindicaciones.

La invención se refiere, en términos generales, a composiciones de exosomas derivados de células madre mesenquimales (MSC), a los que se alude indistintamente como exosomas de células madre mesenquimales o exosomas de MSC, y a métodos de su uso en el tratamiento y/o la prevención de determinadas enfermedades pulmonares, incluyendo pero no limitadas a las enfermedades pulmonares inflamatorias.

5 *Exosomas y Preparación de Exosomas*

Los exosomas de la invención son vesículas de la membrana (es decir, bicapa lipídica) que son liberados a partir de células madre mesenquimales. Tienen un diámetro que oscila entre aproximadamente 30 nm y 100 nm. Por microscopía electrónica, los exosomas parecen tener una morfología en forma de copa. Se sedimentan a aproximadamente 100.000 x g y tienen una densidad de flotación en sacarosa de aproximadamente 1,10 a aproximadamente 1,21 g/ml. A los exosomas se les puede aludir como microvesículas o nanovesículas.

Los exosomas pueden comprender un cierto número de proteínas y/o ácidos nucleicos que incluyen especies de ARN, tales como ARNm. Las proteínas que pueden expresarse en exosomas incluyen Alix, TSG101, CD63, CD9, CD81, moesina, HSP70, Dicer, M-CSF, osteopontina, y una o más de las proteínas enumeradas en la Tabla 1 (incluyendo cualquier combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de esas proteínas, junto con cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente). En algunas realizaciones, los exosomas, incluyendo los exosomas sintéticos que se comentan más adelante, comprenden ARNm, Dicer, M-CSF, osteopontina y una o más de las proteínas de la Tabla 1 (incluyendo todas las proteínas de la Tabla 1).

La invención se refiere a exosomas aislados. Tal como se utiliza en esta memoria, un exosome aislado es uno que está separado físicamente de su entorno natural. Un exosoma aislado puede separarse físicamente, en su totalidad o en parte, a partir de tejido o células con los que naturalmente existe, incluyendo células madre mesenquimales. En algunas realizaciones de la invención, una composición de exosomas aislados puede estar libre de células, tales como células madre mesenquimales, o puede estar libre o sustancialmente libre de medios acondicionados. En algunas realizaciones, los exosomas aislados pueden proporcionarse en una concentración más alta que los exosomas presentes en medios acondicionados no manipulados.

Los exosomas se pueden aislar de medios acondicionados de cultivo de células madre mesenquimales. Un método para la recogida de exosomas de células madre mesenquimales se proporciona en los Ejemplos. En síntesis, un método de este tipo implica cultivar primero células madre mesenquimales bajo condiciones estándares hasta que alcancen aproximadamente un 70% de confluencia, y después cultivar las células en un medio libre de suero durante 24 horas, después de lo cual los medios acondicionados se recogen y se someten a centrifugación diferencial a 400 xg durante 10 minutos y a 12000 xg durante 10 minutos con el fin de separar las células y restos celulares. Los medios acondicionados clarificados se concentran a continuación por ultrafiltración utilizando un filtro MWCO de 100 kDa (Millipore), y después se centrifugó de nuevo a 12000 xg durante 10 minutos. Los exosomas se aíslan a continuación, utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño mediante la carga del medio acondicionado concentrado en una columna equilibrada con PBS Chroma S-200 (Clontech), eluyendo con PBS y recogiendo fracciones de 350-550 microlitros. Las fracciones que contenían exosomas se identifican y potencialmente se agrupan. La concentración de proteína se mide utilizando un ensayo de Bradford estándar (Bio-Rad). Partes alícuotas de las preparaciones de exosomas enriquecidos se pueden almacenar a -80°C.

Los exosomas pueden también ser purificados por ultracentrifugación de medios acondicionados clarificados a 100.000 x g. También pueden ser purificados por ultracentrifugación en un colchón de sacarosa. Métodos GMP para la purificación de exosomas de las células dendríticas se han descrito en J Immunol Methods. 2002; 270: 211-226.

Los exosomas también se pueden purificar por filtración diferencial, a través de filtros de membrana de nilón de tamaño de poro definido. Una primera filtración a través de un tamaño de poros grande retendrá fragmentos celulares y residuos. Una filtración posterior a través de un tamaño de poros más pequeño retendrá exosomas y los purificará de contaminantes de menor tamaño.

La divulgación también contempla el uso de exosomas sintéticos que tienen algunas o todas las características de los exosomas de MSC aislados descritos en esta memoria. Estos exosomas sintéticos se sintetizarán in vitro (en lugar de derivarse y aislarse de MSC o MSC-CM). Pueden ser liposomas sintéticos que tienen uno o más, incluyendo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más de las proteínas enumeradas en la Tabla 1 o la FIG. 22. Pueden o pueden no comprender ácidos nucleicos que codifican una o más, incluyendo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más de estas proteínas. La síntesis de liposomas es conocida en la técnica, y los liposomas se pueden adquirir de fuentes comerciales. Ha de entenderse que las diversas composiciones, formulaciones, métodos y usos descritos en esta memoria con relación a los exosomas derivados y aislados a partir de MSC o MSC-CM también se contemplan en el contexto de exosomas sintéticos.

La invención contempla el uso inmediato de exosomas o, alternativamente, el almacenamiento a corto y/o a largo plazo de los exosomas, por ejemplo, en un estado crioconservado antes de su uso. Inhibidores de proteinasa se incluyen típicamente en medios de congelación, ya que proporcionan la integridad de los exosomas durante el

almacenamiento a largo plazo. No se prefiere la congelación a -20°C, ya que se asocia con una mayor pérdida de actividad de los exosomas. La congelación rápida a -80°C es más preferida, ya que preserva la actividad. (Véase, por ejemplo, *Kidney International* (2006) 69, 1471-1476). Se pueden utilizar aditivos para los medios de congelación con el fin de potenciar la conservación de la actividad biológica de exosomas. Este tipo de aditivos será similar a los utilizados para la crioconservación de células intactas y pueden incluir, pero no se limitan a DMSO, glicerol y polietilenglicol.

**Tabla 1.**

**Proteínas específicas y abundantes asociadas con MEX frente a FEX**

Identificación	Nº Acc.	Espectros MS/MS	Cobertura de secuencia (%)	Espectros MS/MS en FEX
Haptoglobina	q61646	166	15,9	2
Proteína unión a galedina-3	q07797	39	43,7	0
Trombospondina-2	q03350	36	23,5	0
Lactadherina	p21956	32	26,5	2
Proteína potenciadora de unión a adipocitos 1	q640n1	27	19,1	3
Vimentina	p20152	28	35,0	0
Proteasoma subunidad alfa tipo-2	p49722	26	50,9	3
Proteína amiloide beta A4	p12023	26	27,1	2

\*Los datos se presentaron cuando los aciertos totales MS/MS son >25 y la relación de MEX/FEX en la cobertura de la secuencia es > 3 para la proteína particular

10 *Células Madre Mesenquimales*

Una célula madre mesenquimal es una célula progenitora que tiene la capacidad de diferenciarse en células neuronales, adipocitos, condrocitos, osteoblastos, miocitos, tejido cardíaco, y otras células endoteliales y epiteliales. (Véase, por ejemplo, Wang, *Stem Cells* 2004;22(7);1330-7; McElreavey; 1991 *Biochem Soc Trans* (1); 29s; Takechi, *Placenta* 1993 marzo/abril; 14 (2); 235-45; Takechi, 1993; Kobayashi; *Early Human Development*; 1998; 10 de julio; 51 (3); 223-33; Yen; *Stem Cells*; 2005; 23 (1) 3-9). Estas células pueden ser definidas fenotípicamente por la expresión génica o de proteínas. Estas células se han caracterizado para expresar (y por tanto ser positivas para) una o más de CD13, CD29, CD44, CD49a, b, c, e, f, CD51, CD54, CD58, CD71, CD73, CD90, CD102, CD105, CD106, CDw119, CD120a, CD120b, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140a, CD166, P75, TGF-βIR, TGF-βIIR, HLA-A, B, C, SSEA-3, SSEA-4, D7 y PD- L1. Estas células también se han caracterizado como que no expresan (y, por tanto, son negativas para) CD3, CD5, CD6, CD9, CD10, CD11a, CD14, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD62E, L, S, CD80, CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1 y ABO. Por lo tanto, las células madre mesenquimales se pueden caracterizar fenotípica y/o funcionalmente de acuerdo con su potencial de diferenciación.

Las células madre mesenquimales se pueden recoger de un cierto número de fuentes, incluyendo pero no limitadas a la médula ósea, la sangre, el periostio, la dermis, sangre y/o matriz del cordón umbilical (p. ej., gelatina de Wharton) y la placenta. Métodos para la recogida de células madre mesenquimales se describen con mayor detalle en los Ejemplos. También se puede hacer referencia a la Patente de EE.UU. Nº 5486359 para otros métodos de recogida que se pueden utilizar en la presente invención.

Las células madre mesenquimales y, por lo tanto, los exosomas, contemplados para uso en los métodos de la divulgación se pueden derivar del mismo sujeto a tratar (y, por lo tanto, se las aludirá como autólogas al sujeto) o se pueden derivar de un sujeto diferente, preferiblemente de la misma especie (y, por lo tanto, se las aludirá como alogénicas para el sujeto).

Tal como se utiliza en esta memoria, ha de entenderse que los aspectos y realizaciones de la invención se refieren a células, así como las poblaciones de células, a menos que se indique lo contrario. Así, cuando se recita una célula, ha de entenderse que también se contempla una población de células, a menos que se indique lo contrario.

Tal como se utiliza en esta memoria, una célula madre mesenquimal aislada es una célula madre mesenquimal que ha sido separada físicamente de su entorno natural, incluyendo la separación física de uno o más componentes de su entorno natural. Por lo tanto, una célula aislada o población de células abarca una célula o una población de células que ha sido manipulada in vitro o ex vivo. Como un ejemplo, células madre mesenquimales aisladas pueden ser células madre mesenquimales que han sido separadas físicamente de al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% e incluso más preferentemente al menos 80% de las células en el tejido del que se recogen las células madre mesenquimales. En algunos casos, las células madre mesenquimales aisladas están presentes en una población que es al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% células madre mesenquimales tal como se define fenotípica y/o funcionalmente en esta memoria.

Preferiblemente, la relación de células madre mesenquimales a otras células se incrementa en la preparación aislada en comparación con la población de partida de células.

5 Las células madre mesenquimales se pueden aislar utilizando métodos conocidos en la técnica, p. ej., a partir de células mononucleares de médula ósea, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, tejido placentario, basándose en su adherencia al plástico de cultivo de tejidos. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden aislar a partir de aspirados de médula ósea disponibles comercialmente. El enriquecimiento de células madre mesenquimales dentro de una población de células se puede lograr utilizando métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a FACS.

10 Medios comercialmente disponibles pueden ser utilizados para el crecimiento, el cultivo y el mantenimiento de células madre mesenquimales. Tales medios incluyen, pero no se limitan a medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Componentes de tales medios que son útiles para el crecimiento, el cultivo y el mantenimiento de las células madre mesenquimales incluyen, pero no se limitan a aminoácidos, vitaminas, una fuente de carbono (natural y no natural), sales, azúcares, hidrolizados derivados de plantas, piruvato de sodio, tensioactivos, amoníaco, lípidos, hormonas o factores de crecimiento, tampones, aminoácidos no naturales, precursores de azúcares, indicadores, nucleósidos y/o nucleótidos, butirato o compuestos orgánicos, DMSO, productos derivados de animales, inductores de genes, azúcares no naturales, reguladores de pH intracelular, betaína u osmoprotector, oligoelementos, minerales, vitaminas no naturales. Los componentes adicionales que pueden utilizarse para complementar un medio de cultivo tisular comercialmente disponible incluyen, por ejemplo, suero animal (p. ej., suero bovino fetal (FBS), suero de ternero fetal (FCS), suero de caballo (HS)), antibióticos (p. ej., incluyendo pero no limitados a penicilina, estreptomycin, sulfato de neomicina, anfotericina B, blasticidina, cloranfenicol, amoxicilina, bacitracina, bleomicina, cefalosporina, clortetraciclina, zeocina y puromicina) y glutamina (p. ej., L-glutamina). La supervivencia de las células madre mesenquimales y el crecimiento también dependen del mantenimiento de un entorno aerobio apropiado, pH y temperatura. Las células madre mesenquimales se pueden mantener utilizando métodos conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Pittenger et al., Science, 284:143-147 (1999)).

#### 25 *Sujetos*

Los métodos de la divulgación se pueden realizar en cualquier sujeto que tenga probabilidades de obtener beneficios de los mismos, incluyendo sujetos humanos, animales de granja agrícola (p. ej., vacas, cerdos, etc.), animales preciaados (p. ej., caballos), animales de compañía (p. ej., perros, gatos, etc.), y similares. En diversos aspectos, se prefieren los sujetos humanos. En algún aspecto, se utilizan sujetos humanos y exosomas de MSC humanos.

30 Los sujetos pueden ser los que tienen una enfermedad (o afección) pulmonar, susceptibles de tratamiento utilizando los exosomas de la invención, o pueden ser aquellos que están en riesgo de desarrollar una enfermedad (o afección) de este tipo. Tales sujetos incluyen los neonatos y, en particular, los neonatos nacidos a una baja edad gestacional. Tal como se utiliza en esta memoria, un neonato humano se refiere a un ser humano desde el momento del nacimiento hasta aproximadamente 4 semanas de edad. Tal como se utiliza en esta memoria, un niño humano se refiere a un ser humano desde aproximadamente la edad de 4 semanas a aproximadamente 3 años de edad. Tal como se utiliza en esta memoria, baja edad gestacional se refiere al nacimiento (o parto) que se produce antes de un plazo de gestación normal para una especie determinada. En los seres humanos, un plazo de gestación completo es de aproximadamente 40 semanas y puede oscilar entre 37 semanas y más de 40 semanas. Baja edad gestacional, en seres humanos, similar a un nacimiento prematuro se define como el nacimiento que se produce antes de las 37 semanas de gestación. Por consiguiente, la invención contempla la prevención y/o el tratamiento de sujetos nacidos antes de las 37 semanas de gestación, incluyendo los nacidos en plazos de gestación incluso más cortos (p. ej., antes de 36, antes de 35, antes de 34, antes de 33, antes de 32, antes de 31, antes de 30, antes de 29, antes de 28, antes de 27, antes de 26 o antes de 25 semanas de gestación). Típicamente, tales niños prematuros serán tratados como neonatos, sin embargo, la invención contempla su tratamiento incluso más allá de la etapa de neonato y en la infancia y/o la edad adulta. Determinados sujetos pueden tener una predisposición genética a determinadas formas de enfermedad pulmonar tales como, por ejemplo, hipertensión pulmonar, y esos sujetos también pueden tratarse de acuerdo con la invención.

#### *Métodos de Prevenir y Tratar Enfermedades*

50 La invención contempla la prevención y el tratamiento de determinadas enfermedades pulmonares. Prevenir una enfermedad significa reducir la probabilidad de que la enfermedad se manifieste y/o retrase la aparición de la enfermedad. Tratar una enfermedad significa reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad.

55 La invención pretende prevenir y/o tratar un cierto número de enfermedades de los pulmones (o pulmonares). Estas enfermedades incluyen enfermedades pulmonares inflamatorias tales como, pero no limitados a la hipertensión pulmonar (PH), a la que también se alude como la hipertensión arterial pulmonar (PAH), asma, displasia broncopulmonar (BPD), alergias, sarcoidosis y fibrosis pulmonar idiopática. Estas enfermedades incluyen también enfermedades vasculares de los pulmones que pueden no tener un componente inflamatorio. Todavía otras

condiciones pulmonares que pueden ser tratadas de acuerdo con la invención incluyen lesión pulmonar aguda que puede estar asociada con la sepsis o con la ventilación. Un ejemplo de esta última afección es el síndrome de dificultad respiratoria aguda que se produce en niños mayores y adultos.

5 La hipertensión pulmonar es una enfermedad pulmonar caracterizada por presión arterial en la arteria pulmonar que está muy por encima de los niveles normales. Los síntomas incluyen falta de aliento, dolor en el pecho, en particular durante la actividad física, debilidad, fatiga, desmayos, ligeros mareos particularmente durante el ejercicio, mareos, ruidos cardíacos anormales y murmullos, congestión de la vena yugular, retención de fluido en el abdomen, las piernas y los tobillos y coloración azulada en el lecho de la uña.

10 La displasia broncopulmonar es una afección que afecta a los recién nacidos a los que se ha dado oxígeno o han estado en respiradores, o neonatos nacidos prematuramente, en particular los que han nacido muy prematuramente (p. ej., aquellos nacidos antes de las 32 semanas de gestación). También se la alude como la enfermedad pulmonar crónica neonatal. Causas de BPD incluyen lesión mecánica, por ejemplo como resultado de la ventilación, la toxicidad del oxígeno, por ejemplo como resultado de la terapia de oxígeno, y la infección. La enfermedad puede progresar de no inflamatoria a inflamatoria con el tiempo. Los síntomas incluyen piel azulada, tos crónica, respiración  
15 rápida y dificultad para respirar. Sujetos que tienen BPD son más susceptibles a infecciones tales como infección por el virus sincitial respiratorio. Sujetos que tienen BPD pueden desarrollar la hipertensión pulmonar.

20 El síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), también conocido como síndrome de dificultad respiratoria (RDS) o síndrome disneico del adulto es una afección que se produce como resultado de lesión a los pulmones o enfermedad aguda. La lesión en el pulmón puede ser el resultado de la ventilación, trauma, quemaduras y/o aspiración. La enfermedad aguda puede ser una neumonía o sepsis. Se considera una forma grave de lesión pulmonar aguda, y es a menudo fatal. Se caracteriza por la inflamación pulmonar, el intercambio gaseoso deteriorado y la liberación de mediadores inflamatorios, hipoxemia y fallo múltiple de órganos. El ARDS también se puede definir como la relación de la tensión arterial parcial de oxígeno ( $\text{PaO}_2$ ) como una fracción de oxígeno  
25 inspirado ( $\text{FiO}_2$ ) por debajo de 200 mm de Hg en presencia de infiltrados bilaterales en la radiografía de tórax. Una relación  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  de menos de 300 mm de Hg con infiltrados bilaterales indica lesión pulmonar aguda, que es a menudo un precursor de ARDS. Los síntomas de ARDS incluyen dificultad para respirar, taquipnea y confusión mental debido a los bajos niveles de oxígeno.

30 La fibrosis pulmonar idiopática se caracteriza por cicatrización o engrosamiento de los pulmones sin una causa conocida. Se presenta con mayor frecuencia en personas de 50-70 años de edad. Sus síntomas incluyen falta de aliento, tos regular (típicamente una tos seca), dolor de pecho y disminución del nivel de actividad.

La prevención y/o el tratamiento pueden implicar en algunos casos el uso de los exosomas de MSC solo o junto con uno o más agentes secundarios. Los sujetos también pueden ser sometidos a intervenciones mecánicas tales como la ventilación con o sin la administración de oxígeno exógeno.

35 Con respecto a los neonatos y particularmente neonatos de baja edad de gestación, la invención contempla la administración de los exosomas de MSC dentro de las 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 1 semana, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 1 día, 12 horas, 6 horas, 3 horas o 1 hora del nacimiento. En algunos casos importantes, los exosomas de MSC se administran dentro de 1 hora del nacimiento.

La descripción contempla, además, la administración de exosomas de MSC, incluso en ausencia de síntomas indicativos de una enfermedad pulmonar tal como, pero no limitado a BPD.

40 La divulgación también contempla la administración repetida de exosomas de MSC, incluyendo dos, tres, cuatro, cinco o más administraciones de exosomas de MSC. En algunos casos, los exosomas de MSC se pueden administrar de forma continua. La administración repetida o continua se puede producir durante un período de varias horas (p. ej., 1-2, 1-3, 1-6, 1-12, 1-18 o 1-24 horas), varios días (p. ej., 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6 días o 1-7 días) o varias  
45 semanas (p. ej., 1-2 semanas, 1-3 semanas o 1-4 semanas) dependiendo de la gravedad de la afección que está siendo tratada. Si la administración se repite, pero no se continúa, el tiempo entre las administraciones puede ser horas (p. ej., 4 horas, 6 horas o 12 horas), días (p. ej., 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o 6 días), o semanas (por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas). El tiempo entre las administraciones puede ser el mismo o puede ser diferente. Como un ejemplo, si los síntomas de la enfermedad parecen que están empeorando, los exosomas de MSC se pueden administrar más frecuentemente, y luego una vez se estabilizan los síntomas o la  
50 disminución de los exosomas de MSC puede administrarse con menos frecuencia.

En algunos casos importantes, los exosomas de MSC se administran al menos una vez dentro de las 24 horas del nacimiento y a continuación al menos una vez más dentro de 1 semana de nacimiento. Incluso más preferiblemente, los exosomas de MSC se administran al menos una vez dentro de 1 hora de nacimiento y luego al menos una vez más dentro de 3-4 días de nacimiento.

En algunos casos, puede producirse la administración repetida por vía intravenosa de bajas dosis de exosomas de MSC. Se ha encontrado que cuando las dosis bajas de exosomas de MSC se administraron por vía intravenosa a sujetos murinos, se alcanzó la actividad máxima cuando los exosomas de MSC se administraron cada 2-4 días. En estos experimentos, 100 ng de exosomas de MSC se administraron a un ratón de un promedio de 20 gramos, que corresponde a una dosis de 5 microgramos por kilogramo. Cuando se utilizaron dosis más altas (p. ej., 10 microgramos por 20 gramos de ratón o 0,5 miligramos por kilogramo), una sola administración intravenosa fue suficiente para conseguir la protección a largo plazo. Por consiguiente, la divulgación contempla la administración repetida de las formas de dosificación baja de exosomas de MSC, así como las administraciones individuales de formas de alta dosificación de exosomas de MSC. Formas de dosificación baja pueden variar desde, sin limitación, 1-50 microgramos por kilogramo, mientras que formas de dosificación altas pueden variar desde, sin limitación, 51-1000 microgramos por kilogramo. Se entenderá que, dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la salud del sujeto, y la vía de administración, entre otros, se contempla la administración única o repetida de exosomas de MSC dosis baja o alta.

#### *Administración, Composiciones Farmacéuticas, Cantidades Eficaces*

Los exosomas de MSC se pueden utilizar (p. ej., administrar) en preparaciones farmacéuticamente aceptables (o composiciones farmacéuticamente aceptables), típicamente cuando se combinan con un soporte farmacéuticamente aceptable. Tales preparaciones pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tampón, conservantes, soportes compatibles, y pueden comprender opcionalmente otros agentes terapéuticos (es decir, secundarios).

Un soporte farmacéuticamente aceptable es un material aceptable, composición o vehículo farmacéuticamente tal como una carga, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante líquido o sólido, implicado en llevar o transportar un agente activo de manera profiláctica o terapéutica. Cada uno de los soportes debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el sujeto. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como soportes farmacéuticamente aceptables incluyen azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; glicoles tales como propilenglicol; polioles tales como glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agentes tampón tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; agua apirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tampón fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

*Agentes Terapéuticos Secundarios.* Los exosomas se pueden administrar con uno o más agentes terapéuticos secundarios. Tal como se utiliza en esta memoria, un agente terapéutico se refiere a cualquier agente que se puede utilizar en la prevención, el tratamiento y/o la gestión de una enfermedad pulmonar tal como las comentadas en esta memoria. Éstas incluyen, pero no se limitan a tensioactivos, óxido nítrico inhalado, almitrina bismesilato, inmunomoduladores y antioxidantes. Ejemplos de inmunomoduladores incluyen esteroides y corticosteroides tales como, pero no limitado a metilprednisolona. Ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a la superóxido dismutasa.

Determinados agentes terapéuticos secundarios utilizados en el tratamiento o la gestión de determinadas enfermedades pulmonares, incluyendo, pero no limitados a la hipertensión pulmonar, incluyen oxígeno, anticoagulantes tales como warfarina (Coumadina); diuréticos tales como furosemida (Lasix<sup>®</sup>) o espironolactona (Aldactone<sup>®</sup>); bloqueadores de los canales de calcio; de potasio tal como K-dur<sup>®</sup>; agentes inotrópicos tales como digoxina; vasodilatadores tales como nifedipina (Procardia<sup>®</sup>) o diltiazem (Cardizem<sup>®</sup>); antagonistas del receptor de endotelina tales como bosentan (Tracleer<sup>®</sup>) y ambrisentan (Letairis<sup>®</sup>); análogos de la prostaciclina tales como epoprostenol (Flolan<sup>®</sup>), treprostinil sódico (Remodulin<sup>®</sup>, Tyvaso<sup>®</sup>) e iloprost (Ventavis<sup>®</sup>); e inhibidores de PDE-5 tales como sildenafil (Revatio<sup>®</sup>) y tadalafil (Adcirca<sup>®</sup>).

*Tensioactivos.* Los exosomas de MSC se pueden administrar con agentes tensioactivos pulmonares. Un agente tensioactivo pulmonar es una mezcla de lipoproteínas útil para mantener abiertas las vías respiratorias pulmonares (p. ej., mediante la prevención de la adhesión de las paredes alveolares entre sí). Agentes tensioactivos pulmonares pueden estar compuestos de fosfolípidos tales como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina (PC), fosfotidilglicerol (PG); colesterol; y proteínas tales como SP-A, B, C y D. Tensioactivos pulmonares pueden derivarse de fuentes que se producen de forma natural tales como tejido pulmonar bovino o porcino. Ejemplos incluyen Alveofact<sup>™</sup> (de lavado pulmonar de vaca), Curosurf<sup>™</sup> (de pulmón de cerdo picado), Infasurf<sup>™</sup> (de lavado pulmonar de ternero) y Survanta<sup>™</sup> (de pulmón de vaca picado, con componentes adicionales que incluyen DPPC, ácido palmítico y tripalmitina). Los tensioactivos pulmonares también pueden ser sintéticos. Ejemplos incluyen Exosurf<sup>™</sup> (compuesto de DPPC con hexadecanol y tiloxapol), Pumactant<sup>™</sup> o Compuesto de Expansión de Pulmón Artificial (ALEC) (compuesto de DPPC y PG), KL-4 (compuesto de DPPC, palmitoil-oleoil fosfatidilglicerol, ácido palmítico y péptido sintético que imita SP-B), Venticute<sup>™</sup> (compuesto de DPPC, PG, ácido palmítico y SP-C recombinante). Tensioactivos pulmonares se pueden obtener de proveedores comerciales.

*Cantidades eficaces.* Las preparaciones de la invención se administran en cantidades eficaces. Una cantidad eficaz es aquella cantidad de un agente que sólo estimula el resultado deseado. La cantidad absoluta dependerá de una

diversidad de factores, incluyendo el material seleccionado para la administración, ya sea la administración en dosis únicas o múltiples, y parámetros individuales del paciente, incluyendo edad, condición física, tamaño, peso y la fase de la enfermedad. Estos factores son bien conocidos por los expertos ordinarios en la técnica y pueden abordarse con no más de experimentación rutinaria.

- 5 *Vía de Administración.* Los exosomas de MSC se pueden administrar por cualquier vía que efectúe el suministro a los pulmones. Son adecuadas vías de administración sistémicas tales como la inyección intravenosa en bolo o la infusión continua. También están contempladas por la invención vías más directas tales como la administración intranasal, la administración intratraqueal (p. ej., a través de intubación) y la inhalación (p. ej., a través de un aerosol a través de la boca o la nariz) y en algunos casos pueden ser más apropiadas, en particular en los casos en los que es necesaria una acción rápida. Tal como se utiliza en esta memoria, un aerosol es una suspensión de líquido dispersado como pequeñas partículas en un gas, y que incluye una fina niebla o un spray que contiene tales partículas. Tal como se utiliza en esta memoria, la aerosolización es el proceso de producir un aerosol mediante la transformación de una suspensión líquida en pequeñas partículas o gotitas. Esto se puede hacer utilizando un sistema de suministro de aerosol tal como un envase presurizado o un nebulizador. Nebulizadores incluyen nebulizadores de chorro de aire (es decir, neumáticos), ultrasónicos y de malla vibratoria, por ejemplo con el uso de un propulsor adecuado tal como, pero no limitado a diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. Además de nebulizadores, otros dispositivos para la administración pulmonar incluyen, pero no se limitan a los inhaladores de dosis medida (MDI) y los inhaladores de polvo seco (DPIs). Las cápsulas y los cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo exosomas liofilizadas y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los exosomas, cuando es deseable suministrarlos sistémicamente, se pueden formular para la administración parenteral por inyección, incluyendo, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes multidosis, con o sin un conservante añadido.

- 25 Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones solubles en agua en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes que aumentan la solubilidad adecuados. Alternativamente, los exosomas pueden estar en forma liofilizada u otro polvo o en forma sólida para la constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril apirógena, antes del uso.

- 35 Ha de entenderse que otros agentes a administrar a sujetos que están siendo tratados de acuerdo con la divulgación se pueden administrar por cualquier vía adecuada, incluyendo administración oral, administración intranasal, administración intratraqueal, por inhalación, administración intravenosa, etc. Los expertos ordinarios en la técnica conocerán las vías habituales de administración para tales agentes secundarios.

#### *Kits*

- 40 La divulgación también abarca un producto farmacéutico envasado y etiquetado. Este artículo de fabricación o kit incluye la forma de dosificación unitaria apropiada en un recipiente o contenedor apropiado tal como un vial de vidrio o ampolla de plástico u otro recipiente que esté herméticamente sellado. La forma de dosificación unitaria debe ser adecuada para la administración pulmonar, por ejemplo por aerosol. Preferiblemente, el artículo de fabricación o kit comprende, además, instrucciones sobre cómo utilizar, incluyendo cómo administrar el producto farmacéutico. Las instrucciones pueden contener, además, el material informativo que informa a un practicante médico, técnico o sujeto sobre cómo prevenir o tratar adecuadamente la enfermedad o el trastorno en cuestión. En otras palabras, el artículo de fabricación incluye instrucciones que indican o sugieren un régimen de dosificación para uso, incluyendo pero no limitado a dosis reales, procedimientos de vigilancia, y otra información de vigilancia.

Como con cualquier producto farmacéutico, el material de envasado y el recipiente están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y envío.

- 50 Los kits pueden incluir exosomas de MSC en suspensiones acuosas estériles que pueden ser utilizados directamente o se pueden diluir con solución salina normal para la inyección intravenosa o uso en un nebulizador, o dilución o combinación con un tensioactivo para la administración intratraqueal. Los kits pueden contener, por tanto, también disolución o agente diluyente tal como solución salina o tensioactivo. El kit también puede incluir un dispositivo de administración pulmonar tal como un nebulizador o componentes desechables, por tanto, tal como la boquilla, boquilla nasal o una máscara.

#### EJEMPLOS

## SUMARIO

La hipoxia induce una respuesta inflamatoria en el pulmón que se manifiesta por la activación alternativa de macrófagos con elevación de mediadores pro-inflamatorios que son críticos para el desarrollo posterior de la hipertensión pulmonar hipóxica (HPH). El trasplante de células del estroma mesenquimales (MSC) previene la inflamación del pulmón, la remodelación vascular y la insuficiencia cardíaca derecha, e inhibe la HPH en modelos experimentales de enfermedad. En este estudio, los autores de la invención tuvieron como objetivo investigar los mecanismos paracrinos mediante los cuales las MSC son protectoras en la HPH.

Fraccionaron medios acondicionados a MSC de ratón para identificar el componente biológicamente activo que afecta a la señalización hipóxica in vivo y determinaron que los exosomas, microvesículas de la membrana secretadas, suprimieron la afluencia pulmonar hipóxica de los macrófagos y la inducción de mediadores pro-inflamatorios y pro-proliferativos, incluyendo proteína quimioatrayente de monocitos 1 y factor mitógeno inducible por hipoxia, en el modelo murino de HPH. La administración intravenosa de exosomas de MSC (MEX) previno la remodelación y el desarrollo vascular de HPH. Múltiples administraciones de MEX de dosis baja suprimieron completamente la respuesta inflamatoria hipóxica temprana y mejoraron la hipertensión pulmonar y la patología del ventrículo derecho. Se encontró que una sola dosis alta de MEX era suficiente para prevenir la remodelación vascular y el desarrollo de la PH inducida por hipoxia crónica. En contraposición, los exosomas derivados de fibroblastos y medios agotados en MEX no tuvieron efecto. MEX suprimió la activación hipóxica de transductores de señales y activadores de la transcripción 3 (STAT3) y la regulación al alza de la superfamilia miR-17 de racimos de microARN, mientras que aumentó los niveles pulmonares de miR-204, un microARN clave, cuya expresión está disminuida en la PH humana. MEX producido por MSCs de cordón umbilical humano inhibía la señalización de STAT3 en PAECs humanas aisladas, lo que demuestra un efecto directo de MEX sobre la activación de STAT3 hipóxica.

Este estudio indica que MEX ejerce un efecto protector pleiotrópicos en el pulmón y puede prevenir la PH través de la supresión de las vías hiperproliferativas mediadas por STAT3 específicas inducidas por la hipoxia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.* Células de médula ósea derivadas de células madre mesenquimales (BM-MSCs) se aislaron a partir de los fémures y las tibias de ratones de 5-7 semanas de edad FVB/s tal como se describió anteriormente. En síntesis, los extremos de cada una de las tibias y el fémur se pinzaron para dejar al descubierto la médula y los huesos insertados en tubos de centrifuga adaptados. Los tubos se centrifugaron durante 1 minuto a 400 x g para recoger la médula. El sedimento se resuspendió en 3 mL medio esencial mínimo  $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM) a través de una aguja de calibre 21, seguido de filtración a través de un filtro de malla de nilón de 70  $\mu$ m. Las células de la médula se estratificaron en un gradiente de densidad de Ficoll-Paque (Amersham), se centrifugaron y se sembraron. Las células adherentes plásticas se mantuvieron en cultivo con medios cambiados cada 2-3 días. Después de 2-3 pasajes, se realizó un inmuno-agotamiento según los protocolos publicados y las directrices de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)<sup>1</sup>. Las células se seleccionaron negativamente para los antígenos CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45 y CD79 $\alpha$  utilizando los anticuerpos fluorescentes etiquetados apropiados (BD Biosciences) en un clasificador de células activadas por fluorescencia (MoFlo), se propagaron adicionalmente y, a continuación, se seleccionaron positivamente para los antígenos CD73, CD90, CD105, c-kit y Sca-1, como antes. Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma. Las células aisladas entre los pasajes 7-12 se pueden utilizar para la producción de medio acondicionado y para el aislamiento de exosomas. Células aisladas y/o cultivadas también se pueden criopreservar antes de la producción de medio acondicionado o exosomas.

*Aislamiento de fibroblastos primarios de pulmón de ratón.* Cultivos de fibroblastos primarios de pulmón de ratón (MLF) se derivaron de acuerdo con métodos estándares.

*Preparación de medio acondicionado de MSC (MSC-CM).* MSCs crio-conservadas se sembraron con medio completo ( $\alpha$ MEM (Invitrogen) complementado con FBS al 10% (Hyclone), suero de caballo al 10% (Hyclone) y L-glutamina 5 mM (Gibco)) seguido de incubación en condiciones de cultivo estándares. MSC-CM libre de suero producido durante 24 h a partir del cultivo se clarificó por centrifugación diferencial a 400 xg durante 10 min y 12000 xg durante 20 min. MSC-CM libre de suero se concentró 250 veces por ultrafiltración con dispositivos de filtro MWCO de 100 kDa (Millipore) seguido de una clarificación adicional por centrifugación a 12.000 xg durante 20 min.

*Purificación de exosomas por cromatografía de filtración en gel Sephacryl S-400.* Concentrados 250 x de MSC-CM se aplicaron en la columna S-400 (14 x 300 mm, Pharmacia) pre-equilibrada con tampón PB2XS (tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4) complementado con NaCl 300 mM) y se eluyó con un caudal constante (0,4 ml/min). Se aplicó un volumen equivalente de cada una de las fracciones (0,8 ml) en gel de poliácridamida desnaturalizante al 10% o gel de agarosa al 1,2% nativo, seguido de inmuno-tinción con anticuerpos específicos contra CD81 (Santa Cruz) y SPP-1 (osteopontina) (R & D Systems). Las fracciones positivas tanto para CD81 como SPP-1 con la migración mayor en gel de agarosa nativo se agruparon y se utilizaron como una preparación de exosomas (FIG. 1).

Exosomas agrupados podrían utilizarse inmediatamente o se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y después se almacenaron a -80°C.

5 *Análisis microscópico de electrones.* Exosomas purificados se adsorbieron a una rejilla recubierta de carbono que se había vuelto hidrofílica por una exposición durante 30 segundos a una descarga luminiscente. El exceso de líquido se separó y los exosomas se tiñeron con formiato de uranilo al 0,75% durante 30 segundos. Después de retirar el exceso de formiato de uranilo, las rejillas se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200EX y las imágenes se grabaron con una cámara CCD 2k de AMT.

10 *Análisis proteómico de exosomas.* 30 µg de proteínas exosomales se separaron en PAGE desnaturante al 12% y posteriormente se digirieron con tripsina de calidad de secuenciación (Promega). El análisis de la secuencia se realizó en las Instalaciones de Microquímica y Análisis Proteómico de Harvard por espectrometría de masas en tándem de nano-electrospray HPLC de fase inversa microcapilar (µLC/MS/MS) en un espectrómetro de masas Thermo LTQ-Orbitrap. Los espectros de MS/MS resultantes de los péptidos se correlacionaron entonces con secuencias específicas para las especies utilizando el algoritmo SEQUEST y programas desarrollados en las Instalaciones de Microquímica de Harvard.

15 *Análisis de transferencia western.* En experimentos de exosomas caracterizantes, 3 µg de proteínas de cualquiera de las fracciones exosomales o de las fracciones libres de exosomas se separaron en electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% después de la transferencia a membranas PVDF de 0,45 µm (Millipore). Después de bloquear con leche desnatada al 5%, se detectaron señales específicas utilizando anti-CD63 policlonal de cabra (Santa Cruz), anti-CD81 (Santa Cruz), anti-mCSF (R & D systems), anti-osteopontina (R & D systems), anti-moesina policlonal de conejo (Abcam), familia anti-14-3-3 (Abcam) y anti-Dicer monoclonal (Abcam) con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa apropiados. Para el control se utilizaron 35 µg de proteínas de extracto BM-MSc en paralelo. Para el análisis de proteínas en BALFs, volúmenes equivalentes de BALF libre de células de ratón individual en el mismo grupo se agruparon entonces después de la precipitación durante la noche mediante ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Los sedimentos de proteína, resuspendidos en tampón de carga de lauril sulfato de sodio (SDS) 1x, se separaron a continuación sobre gel de tris-tricina poliacrilamida desnaturante. Después de la transferencia a membranas de PVDF de 0,2 µm (Millipore), los borrones se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBS que contenía tween 20 al 0,1% (Sigma) durante 1 hora después de incubación con anticuerpo policlonales de proteína quimioatrayente anti-monocitos 1 (MCP-1) de conejo diluida en la relación 1:1000 (Abcam), anticuerpos de factor mitogénico anti-hipoxia inducido (HIMF/FIZZ1/Re1mα) (Abcam), anticuerpos anti-interleuquina-10 (Abcam) y anti-interleuquina-6 (IL-6) (Santa Cruz) durante la noche a 4°C. Para detectar inmunoglobulina A de ratón (IgA) como control de carga, se utilizó anticuerpo IgA anti-ratón de cabra diluido en la relación 1:5.000 (Abcam). Anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (Santa Cruz) se utilizó en una dilución 1:50.000 para visualizar las bandas inmunorreactivas ya sea por el reactivo de quimioluminiscencia potenciada (Pierce) o Lumi-Light<sup>PLUS</sup> (Roche).

35 *Animales y exposición hipóxica.* Ratones machos FVB de 8 semanas de edad se obtuvieron de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) o se criaron en las Instalaciones de Animales en el Hospital Infantil de Boston. Ratones en cada uno de los grupos se expusieron a 8,5% de oxígeno en una cámara de Plexiglas (OxyCycler, Biospherix, Redfield, NY) durante períodos experimentales variables. La ventilación se ajustó para separar CO<sub>2</sub> de manera que no excediera de 5.000 ppm (0,5%) (intervalo medio 1.000-3.000 ppm). El amoníaco se separó por ventilación y filtración de carbón vegetal activado a través de un purificador de aire. Todos los protocolos de los animales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales del Hospital Infantil.

45 *Modelo de ratón con inflamación pulmonar aguda inducida por hipoxia.* A ratones se les inyectó a través de las venas yugulares izquierdas medio acondicionado (40 µg/kg) o exosomas (4 µg/kg) o medio acondicionado libre de exosomas (4 µg/kg). Como control, se inyectaron 50 µl de PBS o medio de cultivo en paralelo. 3 horas después de la inyección, los ratones se expusieron continuamente a hipoxia monobárica (8,5% de O<sub>2</sub>) durante los períodos experimentales señalados. En el experimento de curso en el tiempo, la inyección adicional de MEX se realizó en las venas yugulares derechas a los 4 días después de la exposición hipóxica.

50 *Modelo de ratón con PAH inducida por hipoxia.* Ratones a los que se inyectaron exosomas o controles el día 0 y a los 4 días después de la exposición hipóxica fueron expuestas continuamente a hipoxia durante 3 semanas completas y luego fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg, *i.p.*). La presión sistólica ventricular derecha (RVSP) se midió utilizando un enfoque de tórax cerrado y el sistema PowerLab (ADInstruments, Colorado Springs, CO), como se describió previamente<sup>2</sup>. Después de las mediciones de presión, los pulmones se perfundieron con PBS y se inflaron con paraformaldehído al 4% para fijar la arquitectura pulmonar. Los pulmones fijados fueron luego embebidos en parafina y seccionados para el análisis inmunohistoquímico. Los corazones se analizaron inmediatamente en cuanto a las mediciones del Índice de Fulton (relación entre el peso del ventrículo derecho y el ventrículo izquierdo más el peso del septo, RV/[LV + S]), una evaluación de la hipertrofia del ventrículo derecho.

*Lavado broncoalveolar y recuento de macrófagos alveolares.* Los animales fueron anestesiados con 2,2,2-tribromoetanol (250 mg/kg *i.p.*) y sus tráqueas se canularon y se instaló una aguja de extremo romo. Se recogió

fluido de lavado broncoalveolar (BALF) mediante la administración secuencial de PBS (0,8 ml, 0,8 ml, 0,8 ml y 0,9 ml) y se recuperaron aproximadamente 3 ml de BALF individual. Las células en BALFs se recogieron por centrifugación a 400 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en solución de tinción de Kimura para contar selectivamente los macrófagos alveolares totales en BALFs.

- 5 *Análisis inmunohistoquímico.* Secciones de tejido pulmonar se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en rodajas. El análisis inmunohistoquímico se realizó incubando anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SMA anti-ratón (Sigma) a una dilución de 1:125 durante la noche a 4°C después de bloquear los tejidos durante 1 hora. Después de la inactivación de la peroxidasa endógena con 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol (Sigma), anticuerpos secundarios, y la tinción con peroxidasa se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vector Laboratories, Burlingame, CA). El espesor de la pared  
10 del recipiente se evaluó midiendo la tinción de  $\alpha$ -SMA en vasos de menos de 30  $\mu$ m de diámetro dentro de secciones capturadas bajo un aumento de 400X.

- Aislamiento de MSCs humanas de gelatina de Wharton del cordón umbilical humano.* MSCs derivadas de *gelatina de Wharton* del cordón umbilical humano (hUC-MSCs) se aislaron de acuerdo con métodos publicados (Mitchell, K.E. et al., 2003, *Stem Cells* 21:50-60; y Penolazzi, L. et al., 2011, *J Cell Physiol.*) con modificaciones menores. El  
15 cordón se lavó dos veces con PBS estéril frío, se cortó longitudinalmente y se separaron arterias y vena. Los tejidos de gel blandos se rasparon, se picaron finamente (2 - 3 mm<sup>2</sup>) y se colocaron directamente en placas de 100 mm (15 trozos por placa) con DMEM/F12 (1:1) (Invitrogen) complementado con suero bovino fetal al 10% (Hyclone), L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina, y se incubaron durante 5 días a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Después de separar los tejidos y medio, las placas se lavaron 3 veces con PBS, las células unidas se  
20 cultivaron y medio reciente se reemplazó 3 veces por semana. En el 70-80% de confluencia, se recogieron las células y se tiñeron con anticuerpos conjugados con PE para CD34 (Miltenybiotec) y CD45 (Miltenybiotec). El inmuno-agotamiento se realizó utilizando microperlas anti-PE (Miltenybiotec) y columna MSCS (Miltenybiotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las poblaciones de CD34 y CD45 negativas se propagaron adicionalmente y se seleccionaron para la expresión de marcadores de MSC (CD105, CD90, CD44 y CD73) y la  
25 ausencia de CD11b, CD19 y HLA-DR utilizando un conjunto de anticuerpos marcados de modo fluorescente específicos para la caracterización de MSCs humanas (BD Biosciences) utilizando una citometría de flujo MoFlo (Beckman Coulter).

- Preparación de medios acondicionados.* Para excluir la contaminación de microvesículas derivadas de suero, suero utilizado para la propagación de cultivos de células y la recogida de medios acondicionados se clarificó por  
30 ultracentrifugación a 100.000 x g durante 18 h. Las MSC se cultivaron en medio  $\alpha$ -MEM complementado con suero de bovino fetal (FBS, Hyclone) al 10% (v/v) y suero de caballo (Hyclone) al 10% (v/v). MLFs se cultivaron en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) complementado con FBS al 10% y L-glutamina 2 mM (GIBCO). Cultivos a 70% de confluencia se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con medio libre de suero  
35 complementado con L-glutamina 2 mM durante 24 horas bajo condiciones de cultivo estándar. Se recogieron los medios acondicionados y las células y los desechos se separaron por centrifugaciones diferenciales a 400 x g durante 5 min, a 2.000 x g durante 10 min, y a 13.000 x g durante 30 min. Los medios acondicionados clarificados se filtraron posteriormente a través de una unidad de filtro de 0,2  $\mu$ m y se concentraron utilizando un dispositivo de filtro  
centrífugo Ultracel-100K (Millipore), a un intervalo de concentraciones de proteína de 0,1 - 0,5 mg/ml. Los niveles de proteína en los medios acondicionados se determinaron mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad).

- 40 *Hipoxia in vitro.* PAECs humanas se adquirieron de GIBCO y se cultivaron en medio M200 complementado con LSGS (Invitrogen). A una confluencia de 80%, las células se expusieron a 1% de O<sub>2</sub> durante 5 horas en una estación de trabajo inVivo2 (Ruskin Technology, Bridgend, Reino Unido) en presencia o ausencia de la fracción exosomal (1  $\mu$ g/ml), o la fracción agotada en exosomas de medios acondicionados de hUC-MSC (1  $\mu$ g/ml). Las células fueron  
45 lisadas y las proteínas en lisados de células enteras se separaron en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 8%, seguido por análisis de transferencia western para fosfo-STAT3 y STAT3 (Cell Signaling).

- Aislamiento de exosomas.* 50  $\mu$ l de medio acondicionado concentrado se aplicaron a una columna CHROMA SPIN S-1000 (Clontech) pre-equilibrada con un tampón que contenía fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4) y NaCl 300 mM. Cada una de las fracciones (0,1 ml) se recogió secuencialmente por la gravedad. Para una preparación a gran  
50 escala, 1,5 ml de medios acondicionados clarificados y concentrados se inyectaron en una columna de 16/60 Hiper Sephacryl S-400 HR pre-equilibrada en el tampón anterior utilizando un sistema cromatográfico de purificador AKTA (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se recogieron fracciones (1 ml) a un caudal de 0,5 ml/min. Nanoesferas de poliestireno de 50 nm de diámetro (Phosphorex, Fall River, MA) se utilizaron como una referencia de tamaño y fracciones de elución correspondientes al volumen de retención de la norma se agruparon y se analizaron  
adicionalmente.

- 55 *Extracción de proteínas e inmunotransferencia.* BALF (3 ml) se centrifugó a 420 xg durante 10 min y los sobrenadantes de BALF libres de células se utilizaron para el análisis de proteínas. Se combinaron volúmenes iguales de muestras de BALF de los animales individuales del mismo grupo (1 ml) y las proteínas se precipitaron durante la noche mediante ácido tricloroacético al 20% (Sigma). Una fracción equivalente a 30% de cada uno de los  
sedimentos de proteínas se disolvió y tampón de carga 1x lauril-sulfato de sodio (SDS) se separó en un gel de

5 poliacrilamida desnaturizante al 15%. Después de la transferencia a membranas de 0,2  $\mu\text{m}$  de PVDF (Millipore), los borrones se bloquearon con leche desnatada al 5% y se incubaron con anticuerpo policlonal de proteína quimioatrayente anti-monocitos 1 (MCP-1) de conejo diluida en la relación 1:1.000 (Abcam), anticuerpo de factor mitogénico anti-hipoxia inducido (HIMF/FIZZ1/Re1m $\alpha$ ) (Abcam) durante la noche a 4°C. Para detectar la inmunoglobulina A de ratón, anticuerpo IgA anti-ratón de cabra diluido en la relación 1:5.000 (Abcam). Anti-anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (Santa Cruz) se utilizó en una dilución 1:20.000 para visualizar las bandas inmunorreactivas ya sea mediante el reactivo de quimioluminiscencia potenciada (Pierce) o Lumi-Light<sup>PLUS</sup> (Roche).

10 Para el análisis de proteínas a partir de tejido pulmonar entero, tejidos pulmonares congeladas se cortaron durante 5 segundos por Polytron en PBS frío que contenía fluoruro de fenilmetanosulfonilo 2 mM (Sigma) y se centrifugaron a 3.000 x g durante 3 min. Gránulos de tejido picados se lavaron dos veces con PBS frío que contenía PMSF 2 mM mediante centrifugación a 3.000 xg durante 3 min cada vez y los trozos de tejido blanco limpiado fueron sometidos a lisis con tampón RIPA que contenía un cóctel inhibidor de proteasa (Roche) y un cóctel inhibidor de fosfatasa (Thermo). 40  $\mu\text{g}$  de extractos de tejido pulmonar fueron separados en gel de 10-20% de gradiente (Invitrogen). Los anticuerpos utilizados en la inmunotransferencia fueron contra MCP-1, HIMF, IL-6, factor de crecimiento endotelial vascular (Abcam), STAT3 total y fosfo-STAT3 (Y705) (Cell Signaling). Para el control de la carga, se utilizó anticuerpo de  $\beta$ -actina monoclonal de ratón (Sigma).

20 Preparaciones de exosoma se separaron en gel de poliacrilamida al 12% y después se transfirieron a membrana de PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore). Se utilizaron anticuerpo anti-CD63 policlonal de cabra (1:1000, Santa Cruz), anti-CD81 policlonal de conejo (1:1000, Santa Cruz) y anti-Dicer monoclonal (1:1000, Abcam), Para visualizar las bandas de proteínas específicas, se utilizaron los mismos reactivos ECL descritos anteriormente. Se utilizó el programa representado en imágenes de NIH para la cuantificación mediante análisis densitométrico después de sustracción de fondo apropiada.

25 *Cuantificación de microARNs.* ARN pulmonar total se extrajo por el método de Chomczynski y Sacchi (1987 *Anal Biochem* 162: 156-159) y 750 ng se utilizaron como molde para la transcriptasa inversa con cebadores específicos para cada uno de los microARN diana (Kit de Transcripción Inversa TaqMan, Applied Biosystems, Foster City, CA). Cada una de las reacciones de transcripción inversa incluía también el cebador para el pequeño ARN nuclear sno202, que se utilizó como un control interno. 37,5 ng de ADNc se utilizaron para cada 20  $\mu\text{l}$  de reacción qPCR con mezcla maestra II universal de TaqMan sin UNG (Applied Biosystems) en presencia de sondas específicas para los microARNs indicados y el control interno (ensayo de microARN TaqMan, Applied Biosystems). La amplificación se realizó a 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 s, a 60°C durante 1 min, en una plataforma StepOne Plus (Applied Biosystems).

## RESULTADOS

35 *BM-MSC secretan factores que suprimen las respuestas inflamatorias agudas inducidas por hipoxia.* Se ha observado una capacidad terapéutica de BM-MSC a partir de varios modelos animales de lesiones pulmonares. Los autores de la invención determinaron primero que BM-MSCs eran relevantes para la inflamación pulmonar inducida por hipoxia por su manera paracrina. La exposición hipóxica resulta en una acumulación pulmonar significativa de macrófagos y en una elevación de mediadores proinflamatorios en el espacio de 2 días<sup>2</sup>. Para testar potenciales paracrinos de BM-MSCs en este modelo animal, los ratones que recibieron medio acondicionado con BM-MSC (BM-  
40 MSC-CM) o vehículo o medio acondicionado con MLF (MLF-CM) se expusieron a hipoxia monobárica durante 2 días. En consecuencia, la afluencia pulmonar aguda derivada de hipoxia de macrófagos fue bloqueada por el tratamiento con BM-MSC-CM, mientras que los ratones a los que se inyectó vehículo o MLF-CM mostraron una acumulación significativa de macrófagos en el pulmón (FIG. 1A), sugiriendo que el o los factores que secretan BM-  
45 MSC suprimen las respuestas inflamatorias pulmonares derivadas de hipoxia que señalizan el reclutamiento de macrófagos en el pulmón. Dado que se ha observado que el acondicionamiento hipóxico regula al alza los niveles pulmonares de mediadores proinflamatorios, se emplearon BALFs libres de células de los ratones para el análisis comparativo de mediadores proinflamatorios responsables de la hipoxia, MCP-1 y HIMF/FIZZ1. En ratones a los que se inyectó vehículo o MLF-CM, los niveles de secreción tanto de MCP-1 como de HIMF en el pulmón se incrementaron significativamente por la exposición hipóxica durante 48 horas. Por el contrario, la elevación de estos  
50 mediadores por la hipoxia fue suprimida de manera efectiva en ratones tratados con BM-MSC-CM (FIG. 1B). Tomados en conjunto, el o los factores secretores de BM-MSC son agentes anti-inflamatorios que impiden el reclutamiento pulmonar de macrófagos a través del bloqueo de la regulación positiva inducida por hipoxia de MCP-1 y HIMF/FIZZ1 en el pulmón.

55 *BM-MSC secretan exosomas.* Los autores de la invención aislaron pequeñas vesículas en BM-MSC-CM por un procedimiento que incluye la ultrafiltración y cromatografía de exclusión por tamaño. La Tabla 2 muestra el grado de enriquecimiento logrado en estos experimentos. Tal como se resume en la FIG. 2, aproximadamente el 1,6% (p/p) de las proteínas secretoras en BM-MSC-CM podría estar asociado con sus exosomas. Exosomas derivados de MLF (FEX) se aislaron como un control y se analizaron en paralelo. A partir del análisis microscópico de electrones, se observaron exosomas sólo en la fracción dentro del volumen vacío de la columna, lo que sugiere que la

cromatografía de exclusión por tamaño para excluir moléculas más pequeñas que 8000 kDa es altamente selectiva para enriquecer exosomas (FIGs. 2B, 2C). Además de ello, micrografías electrónicas de exosomas de la fracción equivalente de BM-MSC-CM y MLF-CM confirmaron que los exosomas desprendidos de los dos tipos de células demostraron parámetros físicos de exosomas típicos tales como la heterogeneidad en diámetro que oscila entre 30 y 100 nm y características morfológicas bicóncavas (FIG. 2D, 2E). Con respecto al contenido de proteínas de los exosomas derivados de BM-MSC (MEX), análisis por transferencia western demostró que MEX eran positivos para proteínas exosomales típicas tales como CD63 y moesina, y también que estaban altamente asociados con proteínas inmunomoduladoras incluyendo el factor estimulante de colonias de monocitos (mCSF) y osteopontina (OPN/SPP1). Algunas isoformas de la familia 14-3-3, que son pequeños polipéptidos con una masa molecular de aproximadamente 30 kDa capaces de unir numerosas proteínas de señalización funcionalmente diversas, co-purificadas con exosomas, indicando que un determinado subconjunto de isoformas 14-3-3 se asocia con MEX. Además de ello, Dicer, que cataliza una etapa de procesamiento crítico de la maduración de microARN en el citoplasma sólo se detectó en la fracción exosomal, apoyando fuertemente que los microARNs son otro constituyente de exosomas. Es interesante observar que mCSF y OPN, así como CD63 y moesina se detectaron también abundantemente en fracciones libres de exosoma obtenidas durante el procedimiento de purificación, lo que sugiere la presencia de sus isoformas solubles en la fracción libre de exosomas o una débil o baja asociación por afinidad con la superficie de exosomas (FIG. 2F). El análisis western comparativo reveló que MEX están muy enriquecidos en CD63, Dicer, mCSF y osteopontina en comparación con FEX, mientras que CD81 es más abundante en FEX (FIG. 2G). En consecuencia, MEX preservan las características físicas de los exosomas típicos en términos de tamaño y morfología y estaban muy enriquecidos con Dicer y moduladores inmunes en comparación con FEX. Los autores de la invención realizaron, además, análisis proteómicos comparativos entre los exosomas de los dos tipos de células diferentes por espectrometría de masas para investigar más a fondo los papeles fisiológicos de MEX.

*Los papeles anti-inflamatorios de BM-MSC estaban mediados por sus exosomas secretores.* Los autores de la invención investigaron, además, si exosomas derivados de BM-MSC son fisiológicamente funcionales en el modelo experimental de inflamación pulmonar aguda inducida por hipoxia. Ratones a los que se inyectó MEX purificada fueron expuestos a hipoxia monobárica de 8,5% de O<sub>2</sub>. Después de la exposición continua a hipoxia durante 48 horas, observaron que la afluencia pulmonar derivada de hipoxia de macrófagos se evita eficazmente mediante la administración de MEX. En contraposición, FEX o fracción libre de exosoma de BM-MSC-CM no logró impedir la afluencia pulmonar de macrófagos (FIG. 3A). Las proteínas totales de BALFs libres de células se estudiaron mediante análisis de inmunotransferencia. La regulación positiva de mediadores proinflamatorios secretores tales como MCP-1 y HIMF/FIZZ-1 por la hipoxia fue completamente abrogada por la administración de MEX, mientras que éstos no fueron bloqueados por la inyección de vehículo o FEX (FIG. 3B). Curiosamente, la fracción libre de exosomas de BM-MSC-CM no pudo suprimir la regulación positiva inducida por hipoxia de estos mediadores proinflamatorios. Había algunas otras diferencias en los contenidos de proteínas entre la fracción exosomal y la fracción libre de exosoma, lo que sugiere la posibilidad de que los ácidos nucleicos en exosomas pueden ser importantes en la respuesta. Estos datos ponen de manifiesto que factores secretores derivados de BM-MSC localizados específicamente en exosomas suprimen con eficacia las respuestas inflamatorias pulmonares inducidas por hipoxia mediante el bloqueo de la señal derivada de hipoxia para regular al alza los mediadores proinflamatorios MCP-1 y HIMF/FIZZ1.

*La administración de MEX anula respuestas inflamatorias pulmonares inducidos por hipoxia.* Los autores de la invención observaron que exosomas que secretan BM-MSC anulan las señales hipóxicas para reclutar macrófagos en el pulmón, y también observaron que la exposición hipóxica conduce a respuestas inflamatorias agudas en el pulmón en el espacio de 2 días. Además, investigaron la evolución en el tiempo de los tratamientos individuales o múltiples de MEX sobre las respuestas inflamatorias pulmonares hasta 7 a 11 días de la exposición hipóxica. En el grupo al que se inyectó vehículo, los ratones exhibían una afluencia pulmonar aguda de macrófagos y una elevación drástica del nivel pulmonar tanto de MCP-1 como de HIMF/FIZZ1 mediante 2 días de exposición hipóxica resolviendo el pico inflamatorio a los 7 días de la exposición hipóxica. A diferencia del número reductor de macrófagos alveolares y del nivel pulmonar de MCP-1, se mantuvo un alto nivel de HIMF/FIZZ1 durante 7 días de exposición hipóxica continua, lo que sugiere que MCP-1 está regulando principalmente la afluencia pulmonar de macrófagos, mientras que HIMF/FIZZ1 podría desempeñar distintos papeles en la respuesta a la hipoxia (FIGs 4A, 4D). Es importante destacar que una sola inyección de MEX no era capaz de suprimir las respuestas inflamatorias inducidas por hipoxia durante más de 4 días en condiciones de hipoxia, por lo que se inició la inflamación pulmonar responsable de la hipoxia después de 4 días de la inyección, alcanzó un pico a los 7 días y después se resolvió a los 11 días (FIGs. 4B, 4D). De manera más importante, la inyección adicional de MEX el 4º día de la exposición hipóxica mantuvo el bloqueo de la inflamación pulmonar en condiciones de hipoxia hasta 11 días (FIG. 4C). Con respecto a la regulación al alza de HIMF/FIZZ1 por MEX, una sola inyección de MEX es capaz de suprimir la regulación positiva inducida por hipoxia de HIMF/FIZZ1 durante 4 días de hipoxia. inyecciones adicionales de MEX no fueron capaces de anular la regulación positiva de HIMF/FIZZ1 a los 7 días de hipoxia, lo que sugiere que otra vía de regulación temporal podría estar involucrada en esta respuesta. Tomados en conjunto, la inflamación pulmonar aguda inducida por hipoxia fue suprimida temporalmente por una sola inyección de MEX y los efectos anti-inflamatorios capaces de neutralizar la respuesta pulmonar a la hipoxia se mantuvieron mediante la administración secuencial y múltiple.

*PAH inducida por hipoxia suprimida por exosomas derivados de BM-MSC.* En este estudio, los autores de la invención observaron que MCP-1 y HIMF fueron regulados significativamente al alza por hipoxia en el pulmón, y que la regulación al alza inducida por hipoxia fue marcadamente atenuada por tratamiento mediante MEX. Por lo tanto, los autores de la invención hipotizaron que MEX podría prevenir la PAH inducida por hipoxia bloqueando los dos mediadores importantes de PAH. Para probar la hipótesis, ratones fueron expuestos a hipoxia durante 3 semanas después de recibir MEX o FEX o PBS como control. Al final del período experimental, se midió RVSP y el tejido del corazón se procesó para la hipertrofia por RV. Las FIGs. 5B y 5C demostraron que todos los ratones hipóxicos exhibían una RVSP y un Índice de Fulton elevados en comparación con ratones normóxicos de la misma edad. En contraposición, se observó una mejora significativa para los ratones que recibieron MEX en comparación con los ratones que recibieron PBS o FEX. Además de ello, en comparación con ratones que recibieron una inyección única de MEX, los ratones que recibieron inyecciones adicionales de MEX el día 4 mostraron una hipertrofia por RVSP y RV significativamente reducida bajo hipoxia crónica, lo que indica que la administración repetida de MEX mejora la presión arterial pulmonar y el espesor de la pared ventricular en respuesta a la hipoxia crónica. Para investigar si múltiples tratamientos de MEX podrían atenuar la remodelación vascular pulmonar inducida por hipoxia, secciones histológicas de los pulmones hipóxicos se analizaron morfológicamente por tinción de vasos pulmonares con el anticuerpo alfa-SMA (FIG. 5D). Se determinó el porcentaje de espesor de pared del vaso medial de pequeñas arteriolas pulmonares dentro de un intervalo de 20-30  $\mu\text{m}$  de diámetro. En comparación con ratones de control normóxicos emparejados por edades, se observó un marcado aumento del espesor de las pequeñas arteriolas pulmonares por hipoxia crónica en ratones tratados con PBS o FEX, mientras que no se observó diferencia significativa alguna para el espesor de pared del vaso entre ratones control y tratados con MEX, lo que indica que MEX son capaces de evitar el proceso de remodelación vascular pulmonar inducida por hipoxia (FIG. 5E).

*MEX comprenden una diversidad de factores inmunomoduladores.* Los autores de la invención han observado efectos drásticos de MEX tanto en la inflamación pulmonar aguda inducida por hipoxia como en la hipertensión de la arteria pulmonar por hipoxia crónica. Para investigar su mecanismo molecular, realizaron perfiles proteómicos globales tanto de MEX como de FEX mediante cromatografía líquida de alto rendimiento - espectrometría de masas (HPLC-MS/MS). Se identificó un total de 273 proteínas con alta confianza en MEX y 35% de proteínas también se detectaron en FEX. Para lograr una alta confianza para perfilar proteínas considerables asociadas con MEX, los autores de la invención identificaron proteínas con alto (> 25) número de espectros MS/MS y alta relación (> 3) de MEX/FEX en la cobertura de la secuencia. 8 proteínas se ajustan a este criterio y éstas se enumeran en la Tabla 1. Entre estas proteínas, 3 eran únicas y 5 estaban altamente enriquecidas en MEX. La proteína de unión a galectina-3 (LGALS3BP/MAC2BP), que es una de las proteínas únicas en MEX, es una proteína secretora que ha demostrado poseer actividades inmunomoduladoras mediante la inhibición de la transcripción de citoquina TH2 que es característica del asma<sup>34</sup>. Es capaz de interactuar con una diversidad de proteínas en la superficie celular y la matriz incluyendo la familia de lectina, integrinas, lamininas y fibronectina. Dado que se han implicado interacciones en la modulación de la adhesión de células tumorales a proteínas extracelulares<sup>35</sup>, GAL3BP en la superficie de MEX podría desempeñar un papel importante para dirigir MEX infundidas a la superficie de células receptoras de una manera específica de ligando. Se sabe que otra proteína única en MEX, trombospondina-2, actúa como un potente inhibidor endógeno del crecimiento de tumores y la angiogénesis<sup>36</sup> y que suprime la producción de citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ <sup>37</sup>. Se ha informado que lactadherina (MFGE8), un componente principal de exosomas derivados de células dendríticas<sup>38</sup>, desempeña un papel en la muerte de las células y la apoptosis, al reconocer específicamente la fosfatidilserina expuesta en células apoptóticas y fomenta el aclaramiento fagocítico de células apoptóticas mediante la unión a células que expresan integrina $_{\alpha v}$  e integrin  $p_{63}$ <sup>39,40</sup>. En la superficie de MEX, lactadherina puede estar implicada en fijar como objetivo MEX a sus tipos de células receptoras. Además de ello, se ha informado que lactadherina también está implicada en el aclaramiento fagocítico de péptido amiloide beta (Abeta), que es un componente principal en las placas seniles acumuladas en la enfermedad de Alzheimer, mediante la interacción directa proteína-proteína. La abundancia de Abeta en la fracción exosomal es posiblemente debida a la interacción directa entre lactadherina y Abeta. La proteína de unión a potenciador de adipocitos 1 (AEBP1), también denominada proteína tipo carboxipeptidasa aórtica (ACLP), desempeña importantes papeles fisiológicos en la cicatrización de heridas y la homeostasis de energía. Ratones que carecen de los exones 7-16 exhiben una cicatrización deficiente de las heridas y ratones AEBP1 nulos son resistentes a la obesidad inducida por la dieta<sup>41</sup>. La Tabla 1 y la FIG. 22 describen los diversos mediadores identificados en MEX de ratón y humanos.

*MEX de origen de ratón o humano median en la supresión de la activación de STAT3 por la hipoxia.* La hipoxia temprana resultó en la activación de STAT3 en el pulmón de ratón, a través de la fosforilación en Tyr-705, y sin efecto alguno sobre los niveles totales de proteína STAT3. Esta activación fue suprimida de manera eficiente mediante el tratamiento con MEX (FIG. 19A). STAT3 es un factor de la transcripción integral para señalar vías de muchas citoquinas y factores de crecimiento y la activación de STAT3 desempeña un papel crítico en las respuestas inflamatorias epiteliales respiratorias. Es importante destacar que la activación persistente ex vivo de STAT3 se ha relacionado con el fenotipo hiperproliferativo y resistente a la apoptosis observado en PAECs (Masri, F.A. et al., 2007, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L548-554) y células de la musculatura lisa de la arteria pulmonar (PASMCs) (Paulin, R. et al., 2011, *Circulation* 123:1205-1215) de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática (IPAH). Por lo tanto, la supresión de la activación de STAT3 hipóxica podría ser responsable de los efectos protectores pleiotrópicos de tratamiento con MEX.

Para verificar que la supresión de esta señalización hipóxica no es una propiedad específica para MEX de origen de ratón, MSCs de estroma de cordón umbilical humano (hUC-MSC) (Mitchell, K.E. et al. y Penolazzi, L. et al.) fueron aisladas y fracciones enriquecidas en exosomas (hUC-MEX) y agotadas en exosomas (hUC-ExD-CM) se prepararon a partir de medios acondicionados con hUC-MSC a través de cromatografía de exclusión por tamaño, tal como se describe en esta memoria. Como se representa en la figura FIG. 19B, la exposición de hPAECs a hipoxia resulta en la activación robusta de STAT3 por la fosforilación de Tyr-705. El tratamiento con hUC-MEX anuló completamente esta respuesta, mientras que la fracción agotada de microvesículas no tuvo efecto alguno. Además de demostrar que la supresión de la activación de STAT3 es una propiedad compartida por MEX tanto de origen humano como de ratón, estos resultados sugieren fuertemente que la supresión directa de la señalización hipóxica en las células vasculares pulmonares es una función primaria subyacente a la protección conferida por tratamiento con MEX.

*El tratamiento con MEX suprime la inducción hipóxica de la superfamilia miR-17 de microARN y aumenta los niveles de miR-204 anti-proliferativa en el pulmón.* Se ha informado que STAT3 (activado por VEGF o IL-6) regula directamente la transcripción del racimo miR-17~92 de microARNs en PAECs, resultando niveles disminuidos del receptor de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2), una diana de miR-17 (Brock, M. et al., 2009, *Circ Res* 104: 1184-1191). Por lo tanto, los autores de la invención evaluaron el efecto de la hipoxia y el tratamiento con MEX en el racimo miR-17~92 de microARNs y sus racimos paralog conservados, miR-106b~25 y miR-106a~363. Se ha postulado que estos racimos de microARN son pro-proliferativos, fijando como objetivo una serie de genes implicados en la transición de fases G1/S (Cloonan, N. et al., 2008, *Genome Biol.* 9: R127) y se ha informado que desempeñan un papel central en la morfogénesis embrionaria de pulmón (Carraro, G., 2009, *Dev Biol* 333:238-250). Los autores de la invención encontraron que microARNs seleccionados que representan los tres racimos de la superfamilia miR-17 están regulados al alza por la hipoxia en el pulmón, y esta activación transcripcional fue suprimida de manera eficiente mediante el tratamiento con MEX (FIG. 20A). Curiosamente, los niveles de microARNs implicados en las redes de señalización hipóxicas tales como miR-199a-5p, un microARN del que se informa que estabiliza HIF1 $\alpha$  en miocitos cardiacos (Rane, S. et al., 2009, *Circ Res* 104: 879-886), miR-214, que comparte el mismo gen huésped con miR-199 (Watanabe, T. et al., 2008, *Dev Dyn* 237:3738-3748) o miR-210, un hipoxamir bajo la regulación directa de HIF1 $\alpha$  (Chan, S.Y. et al., 2010, *Cell Cycle* 9:1072-1083), no se vieron afectados por el tratamiento con MEX (FIG. 20B), apuntando a los efectos dirigidos de MEX en vías específicas de señalización reguladas por hipoxia.

Es importante destacar que los autores de la invención observaron que el tratamiento con MEX resultó en el aumento de los niveles pulmonares de miR-204 (FIG. 20C) un microARN enriquecido en las arterias pulmonares distales que es suprimido transcripcionalmente por STAT3, pero también inhibe la activación de STAT3 en un bucle de regulación de alimentación directa (Courboulin, A. et al., 2011, *J Exp Med* 208: 535-548). El fenotipo proliferativo y anti-apoptótico de PASCs aisladas de pacientes con IPAH está inversamente relacionado con el nivel de miR-204 y el suministro de miR-204 exógena a los pulmones de animales con enfermedad PH establecida mejorada. Por lo tanto, los autores de la invención interpretan estos resultados como una indicación de que el tratamiento con MEX, mediante la supresión de la activación de STAT3 en las fases tempranas de la exposición hipóxica, impide la inducción hipóxica de la superfamilia miR-17 pro-proliferativa en la vasculatura pulmonar y bloquea el bucle de alimentación directa STAT3-miR-204-STAT3 en los vasos pulmonares distales. Esto desplaza el equilibrio hacia un estado anti-proliferativo en la vasculatura pulmonar y previene la remodelación vascular en condiciones de hipoxia crónica. La FIG. 21 es una representación esquemática de las vías de señalización hipóxicas propuestas para ser operativas en el desarrollo de PH que son moduladas por MEX.

En resumen, medios acondicionados con MSC se fraccionaron a través de cromatografía de exclusión por tamaño para identificar el componente biológicamente activo que protege frente a la inflamación pulmonar inducida por hipoxia y HPH. Se encontró que MEX son los vectores críticos de la acción de MSC: MEX suprimía eficazmente la afluencia pulmonar hipóxica de macrófagos y bloqueaba la regulación al alza de los mediadores pro-inflamatorios y mitogénicos tales como MCP-1, IL-6 y el factor mitogénico inducido por hipoxia (HIMF; FIZZ1/RELM- $\alpha$ /RETNLA) en el pulmón hipóxico. Vías pro-proliferativas activadas en el pulmón hipóxico también fueron bloqueadas mediante tratamiento con MEX, tal como se evidencia por la supresión de transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT3). Esto resultó en niveles pulmonares incrementados de miR-204, un microARN enriquecido en las arteriolas pulmonares distales que está regulado a la baja tanto en PH humana como en modelos experimentales de la enfermedad (Courboulin, A. et al.). También se encontró que la hipoxia regula al alza miembros de la familia miR-17 de racimos de microARN en el tejido pulmonar, microARNs que muestran estar bajo el control regulador de STAT3, y que el tratamiento con MEX suprime eficientemente esta señal pro-proliferativa. MEX aislado de los medios de cultivo de MSCs derivadas del cordón umbilical humano tenían un efecto inhibitorio similar en las vías de señalización proliferativas hipóxicas como el ratón MEX. MEX humano inhibió significativamente la activación de STAT3 hipóxico en hPAECs cultivadas. En contraposición, los medios de cultivo de MSC agotados en exosomas no tuvo efecto fisiológico alguno in vivo ni en células cultivadas in vitro, apuntando a MEX como los efectores clave de la función paracrina MSC.

## Tabla 2. Purificación de exosomas derivados de MSCs

Etapa	Volumen	Concentración	Proteína total (mg)	Rendimiento (%)
MSCs libres de suero-acondicionadas	25	28,91	7228	100
Ultrafiltración (MWCO de 100 kDa)	1	7.184,70	7185	99,4
cromatografía en columna S-400	4,5	166	747	10,4

Referencias

1. Dominici, M., et al., *Cytotherapy* **8**, 315- 317 (2006).
2. Minamino, T., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 8798-8803 (2001).
3. Steiner, MK, et al. *Circ Res* **104**, 236-244, 228p hasta 244 (2009).
4. Egashira, K., et al., *FASEB J* **14**, 1974-1978 (2000).
- 5 Ikeda, Y., et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H2021-2028 (2002).
6. Teng, X., et al., *Circ Res* **92**, 1065-1067 (2003).
7. Angelini, D.J., et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**, L582-593 (2009).
8. Yamaji-Kegan, K., et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L1159-1168 (2006).
9. Daley, E., et al., *J Exp Med* **205**, 361-372 (2008).
10. Angelini, D.J., et al., *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**, 553-561 (2009).
11. Rojas, M., et al., *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**, 145-152 (2005).
12. Ortiz, L.A., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 8407-8411 (2003).
13. Xu, J., et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L131- 141 (2007).
14. Baber, S.R., et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H1120-1128 (2007).
15. . Aslam, M., et al., *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 1122-1130 (2009).
16. van Haaften, T., et al., *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 1131-1142 (2009).
17. Lee, R.H., et al., *Cell Stem Cell* **5**, 54-63 (2009).
18. Lee, J.W., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16357-16362 (2009).
19. Valadi, H., et al., *Nat Cell Biol* **9**, 654-659 (2007).
20. Aoki, N., et al., *Endocrinology* **148**, 3850-3862 (2007).
21. Segura, E., et al., *J Immunol* **179**, 1489-1496 (2007).
22. Viaud, S., et al., *PLoS One* **4**, e4942 (2009).
23. Kovar, M., et al., *Proc Natl AcadSci U S A* **103**, 11671-11676 (2006).
24. O'Neill, H.C. y Quah, B.J., *Sci Signal* **1**, pe8 (2008).
25. Girl, P.K. y Schorey, J.S., *PLoS One* **3**, e2461 (2008).
26. Yu, S., et al., *J Immunol* **178**, 6867-6875 (2007).
27. Chalmin, F., et al., *J Clin Invest* **120**, 457-471 (2010).
28. Al-Nedawi, et al., *Proc Natl AcadSci U S A* **106**, 3794-3799 (2009).
29. Ratajczak, J., et al., *Leukemia* **20**, 847-856 (2006).
30. Yuan, A., et al., *PLoS One* **4**, e4722 (2009).
31. Zitvogel, L., et al., *Nat Med* **4**, 594-600 (1998).
32. Wieckowski, E.U., et al., *J Immunol* **183**, 3720-3730 (2009).
33. Bruno, S., et al., *J Am SocNephrol* **20**, 1053-1067 (2009).
34. Kalayci, O., et al., *Ann Allergy Asthma Immunol* **93**, 485-492 (2004).
35. Ulmer, T.A., et al., *J Cell Biochem* **98**, 1351-1366 (2006).
36. Streit, M., et al., *Proc Natl AcadSci U S A* **96**, 14888-14893 (1999).
37. Park, Y.W., et al., *Am J Pathol* **165**, 2087-2098 (2004).
38. Thery, C., et al., *J Cell Biol* **147**, 599-610 (1999).
39. Hanayama, R., et al., *Science* **304**, 1147-1150 (2004).
40. Borisenko, G.G., et al., *Cell Death Differ* **11**, 943-945 (2004).
41. Ro, H.S., et al., *Obesity (Silver Spring)* **15**, 288-302 (2007).
42. Liu, T., et al., *J Immunol* **173**, 3425- 3431 (2004).
43. Stutz, A.M., et al., *J Immunol* **170**, 1789-1796 (2003).
44. Nair, M.G., et al., *J Exp Med* **206**, 937-952 (2009).
45. Pesce, J.T., et al., *PLoSPathog* **5** e1000393 (2009).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz de exosomas de células madre mesenquimales (MSC) humanos aislados y un tensioactivo pulmonar, para uso en tratar a un sujeto humano que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad pulmonar, en donde el sujeto es de menos de 4 semanas de edad y en donde la composición se formula para el suministro a los pulmones.
2. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los exosomas de MSC humanos aislados se aíslan de cordón umbilical humano.
- 10 3. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el sujeto humano nació antes de las 37 semanas de gestación, o en donde al sujeto humano se le ha administrado oxígeno o ha estado en un respirador.
4. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el sujeto humano tiene o está en riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar, opcionalmente en donde la displasia broncopulmonar es no inflamatoria.
- 15 5. Exosomas de células madre mesenquimales (MSC) humanos aislados para uso en tratar o prevenir una enfermedad pulmonar en un sujeto.
6. Los exosomas de MSC aislados para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad pulmonar es una enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedad vascular pulmonar o lesión pulmonar aguda, o en donde el sujeto tiene o es probable que desarrolle esquistosomiasis.
- 20 7. Los exosomas de MSC aislados para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la enfermedad pulmonar inflamatoria es hipertensión pulmonar, asma, displasia broncopulmonar (BPD), alergia o fibrosis pulmonar idiopática, o en donde la lesión pulmonar aguda está asociada con sepsis o es síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) inducida por el ventilador.
- 25 8. Los exosomas de MSC aislados para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde el sujeto es un neonato, o en donde el sujeto es un niño o en donde el sujeto es entre 3 y 18 años de edad, o en donde el sujeto es un adulto.
- 30 9. Los exosomas de MSC aislados para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde los exosomas de MSC aislados son para administración intravenosa, o en donde los exosomas de MSC aislados son para la administración a los pulmones o la tráquea del sujeto, opcionalmente en donde los exosomas de MSC aislados son para la administración por inhalación o en donde los exosomas de MSC aislados son para la administración en un aerosol o en donde los exosomas de MSC aislados se administran utilizando un nebulizador o en donde los exosomas de MSC aislados se administran utilizando un tubo intratraqueal.
- 35 10. Los exosomas de MSC aislados para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde los exosomas de MSC aislados son para la administración con un tensioactivo pulmonar, opcionalmente en el tensioactivo pulmonar es un tensioactivo aislado que se produce de forma natural, opcionalmente en donde el tensioactivo pulmonar se deriva de pulmón bovino o pulmón porcino, o en donde el tensioactivo pulmonar es un tensioactivo sintético.
- 40 11. Los exosomas de MSC aislados para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde los exosomas de MSC aislados son para la administración repetida al sujeto, o en donde los exosomas de MSC aislados son para la administración por dos veces al sujeto o en donde los exosomas de MSC aislados son para la administración continua al sujeto.
- 45 12. Los exosomas de MSC aislados para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 precedentes, en donde los exosomas de MSC aislados se derivan de MSC de la sangre del cordón o en donde los exosomas de MSC aislados se derivan de MSC de la médula ósea.
13. Los exosomas de MSC aislados para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en donde los exosomas de MSC aislados son autólogos al sujeto, o en donde los exosomas de MSC aislados son alogénicos para el sujeto.
14. Una composición, que comprende exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados y un tensioactivo pulmonar o un corticosteroide pulmonar.

15. Exosomas de células madre mesenquimales (MSC) aislados aerosolizados.

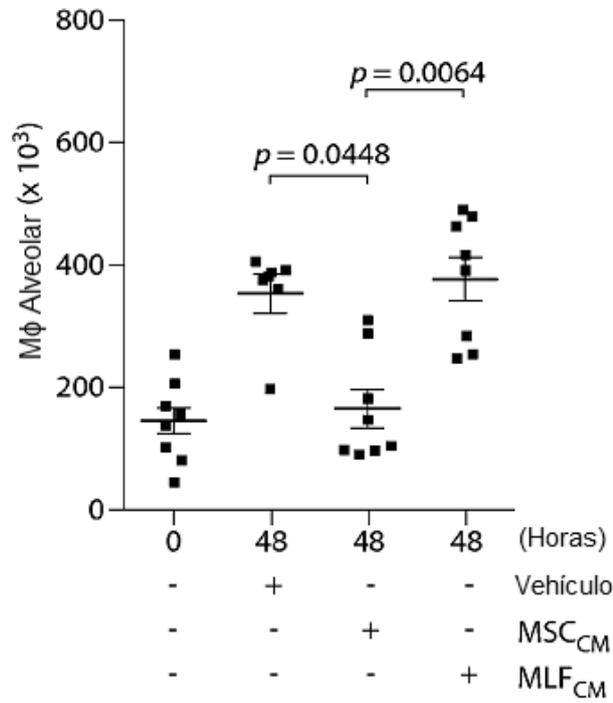


Fig. 1A

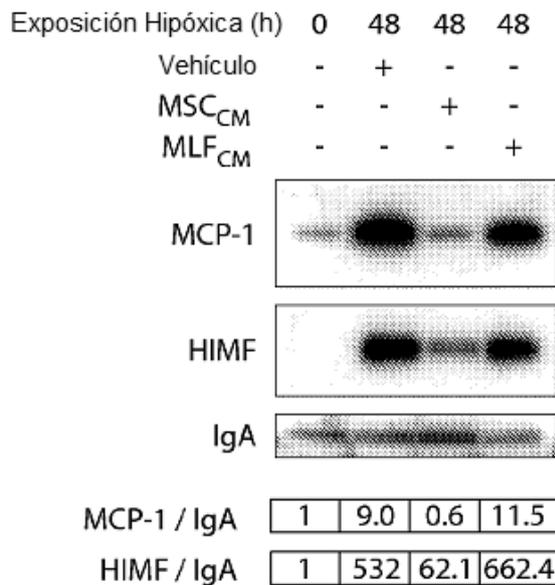


Fig. 1B

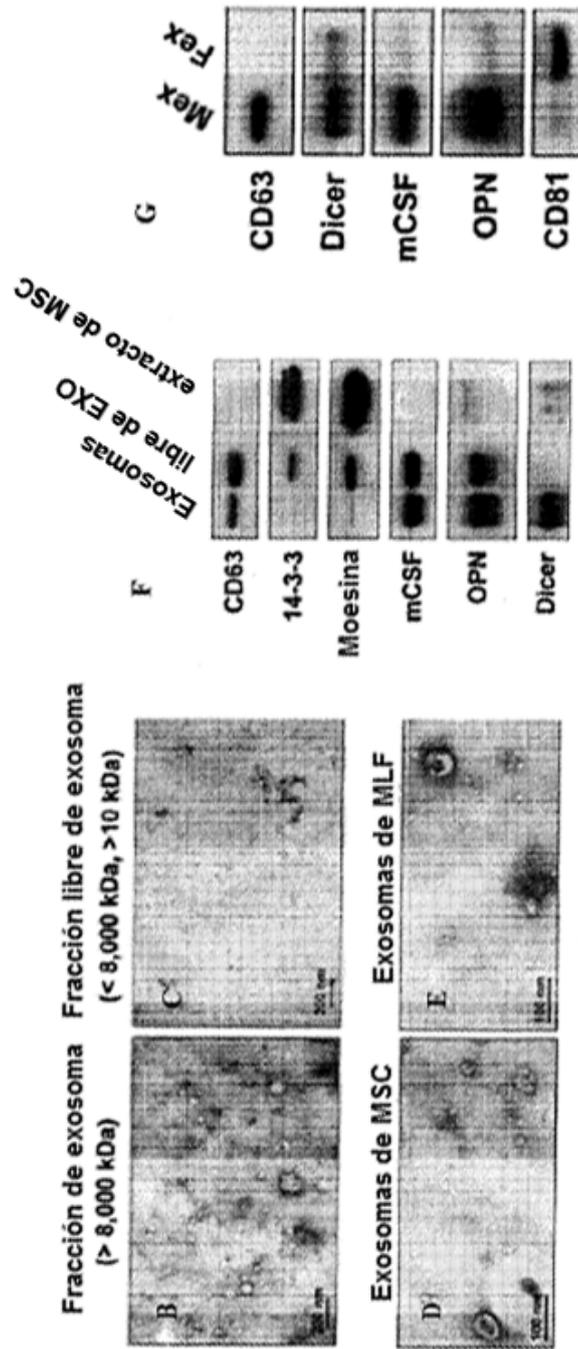


FIG. 2

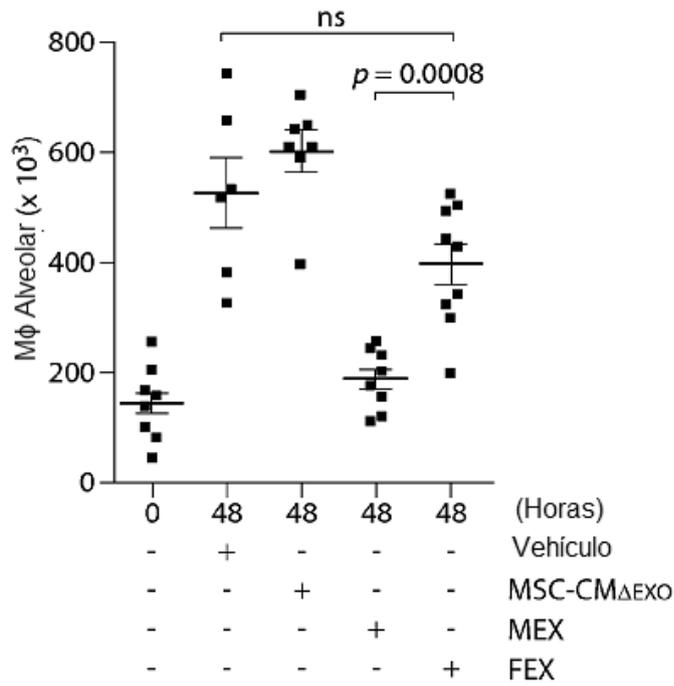


Fig. 3A

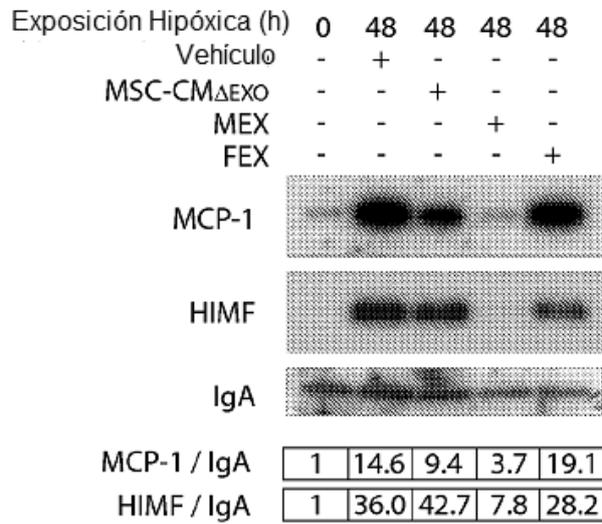


Fig. 3B

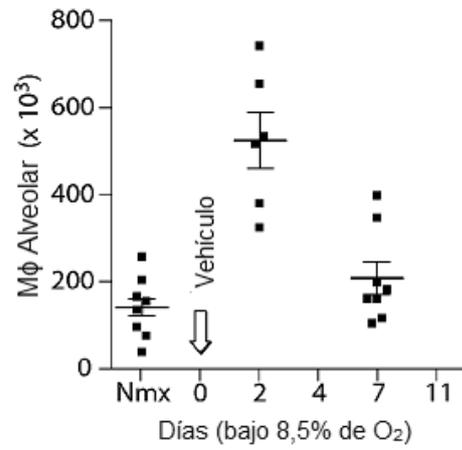


Fig. 4A

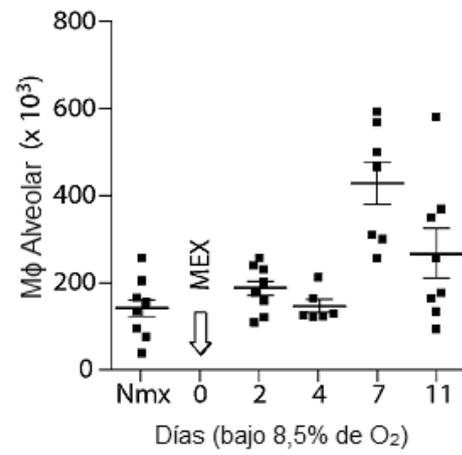


Fig. 4B

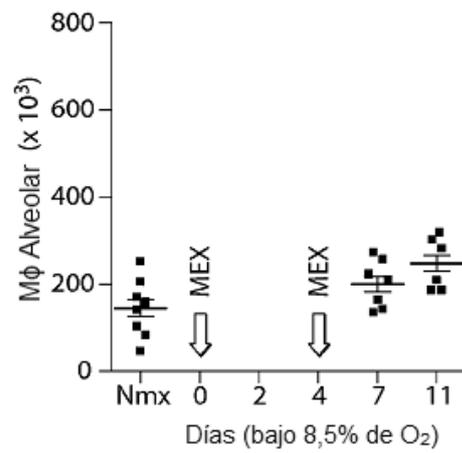


Fig. 4C

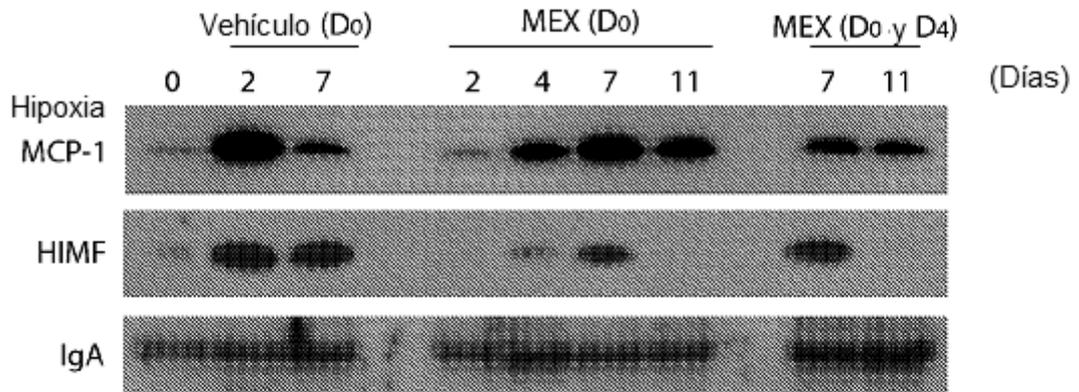
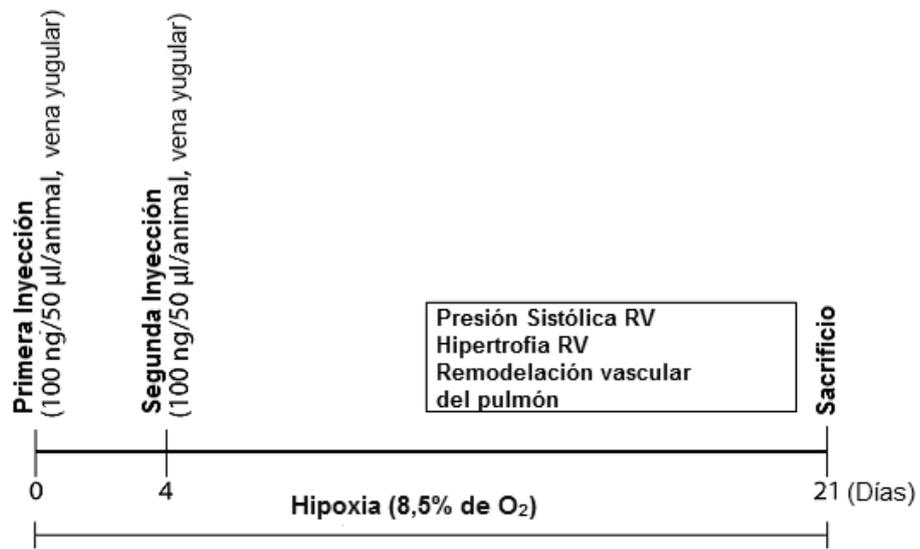


Fig. 4D



Animales  
ratones FVB/s machos, 8 semanas

Fig. 5A

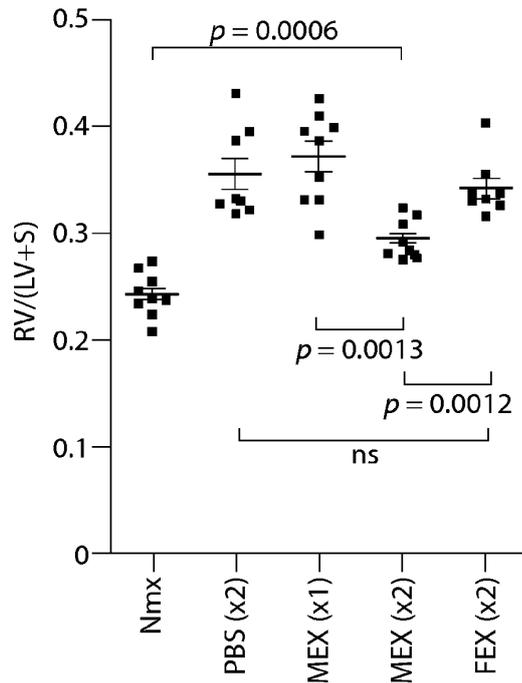


Fig. 5B

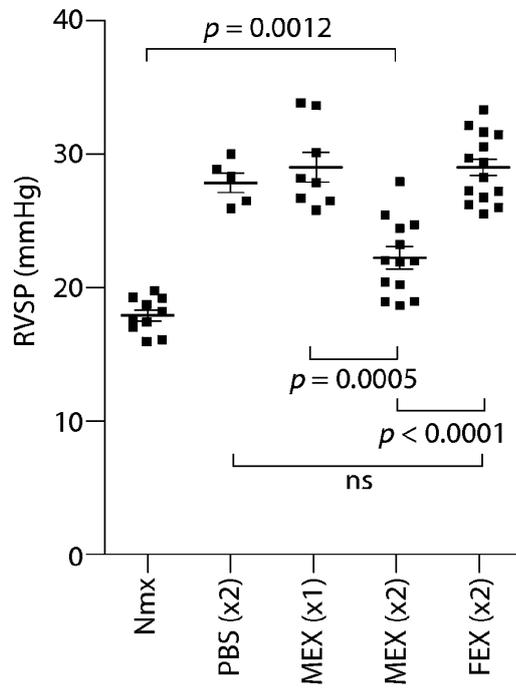


Fig. 5C

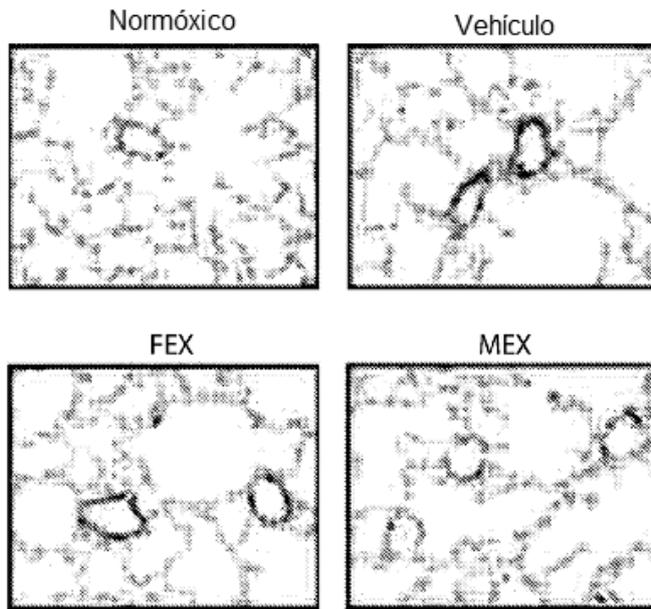


Fig. 5D

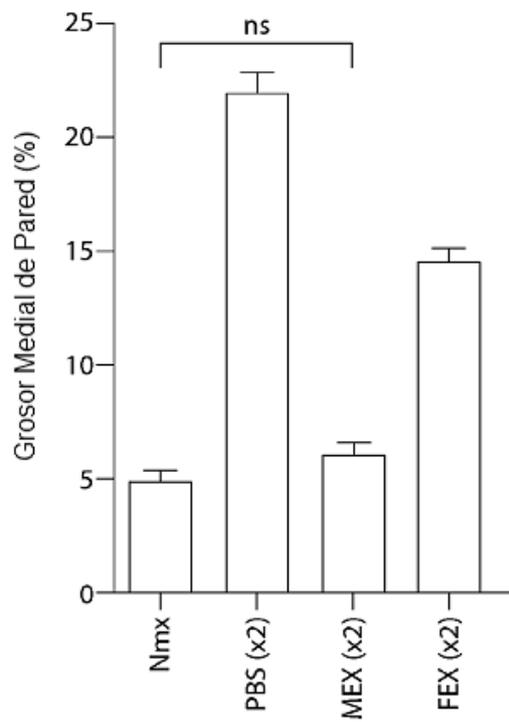


Fig. 5E

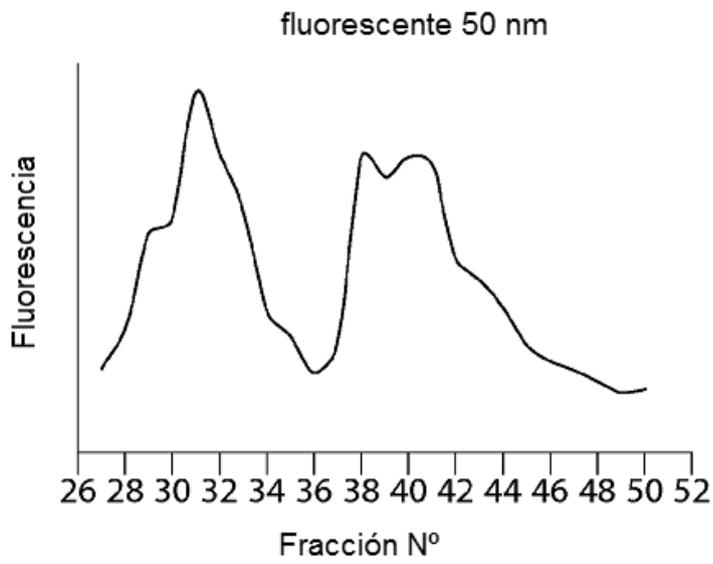
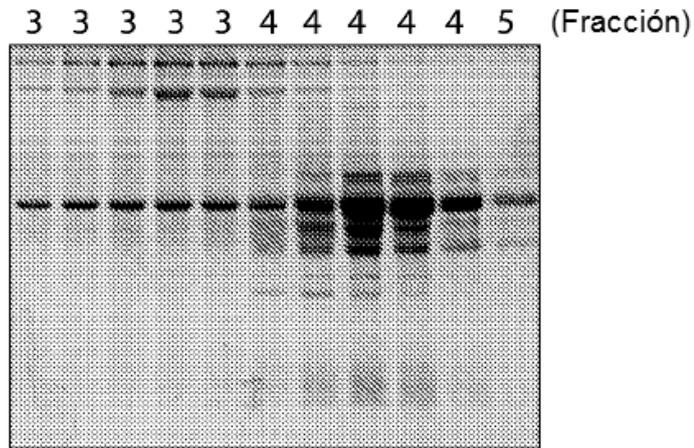
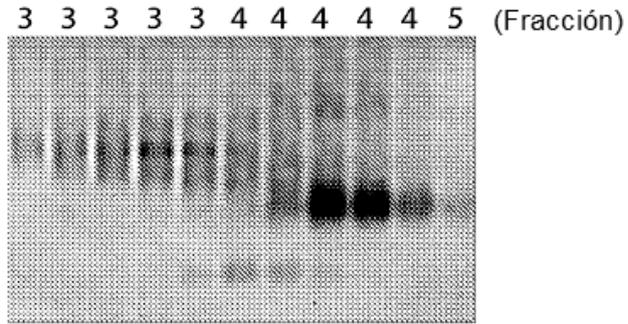


Fig. 6A



gel de poliacrilamida al 10%

Fig. 6B



Gel de agarosa al 1,2%

Fig. 6C

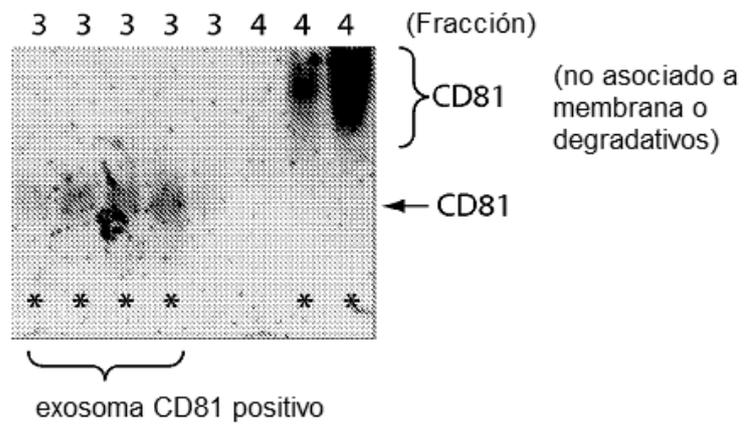


Fig. 6D

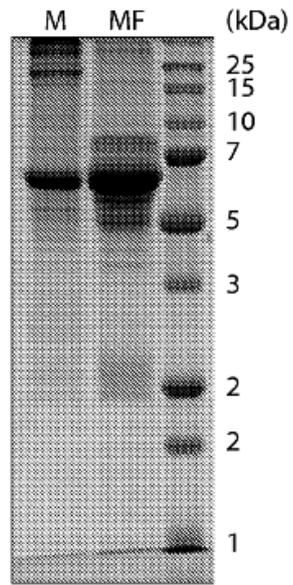


Fig. 7A

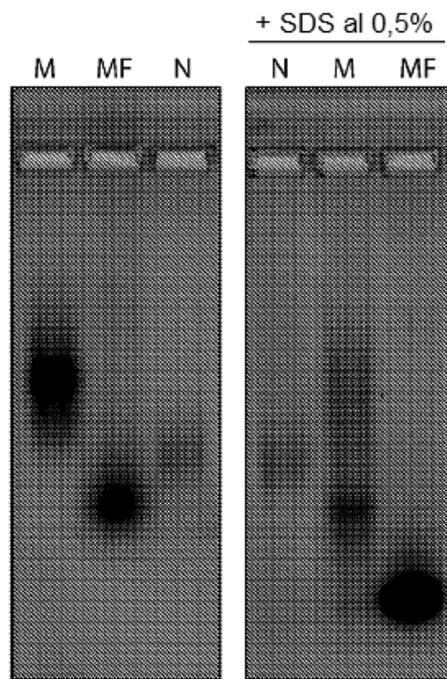


Fig. 7B

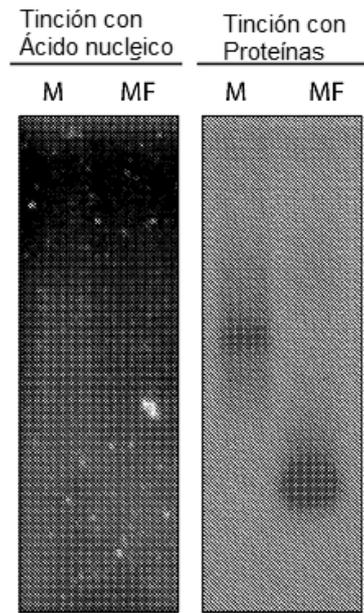


Fig. 7C

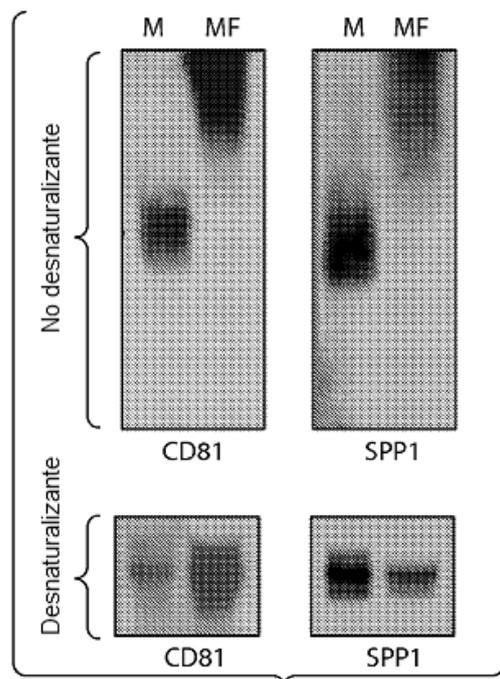


Fig. 7D

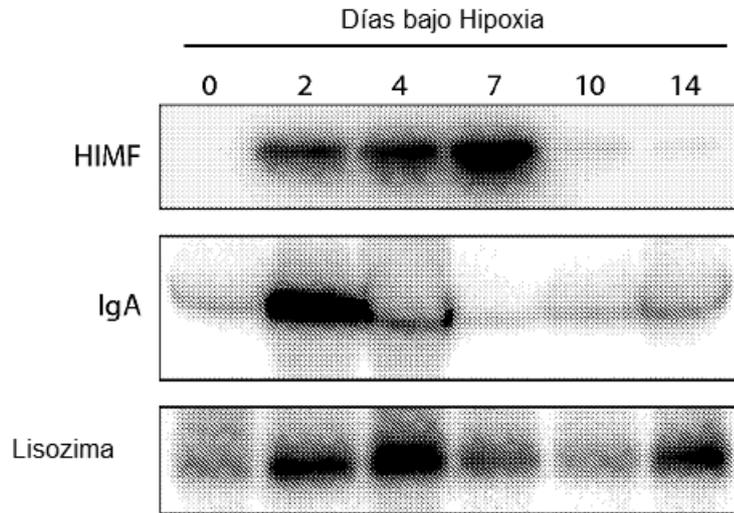


Fig. 8A

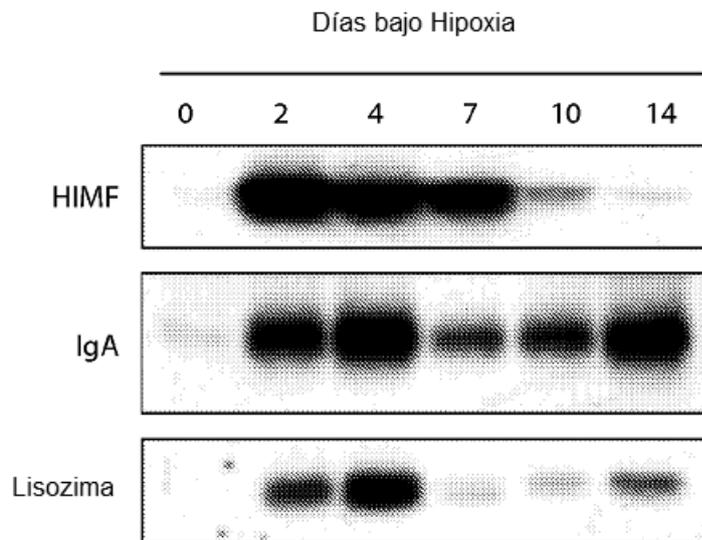


Fig. 8B

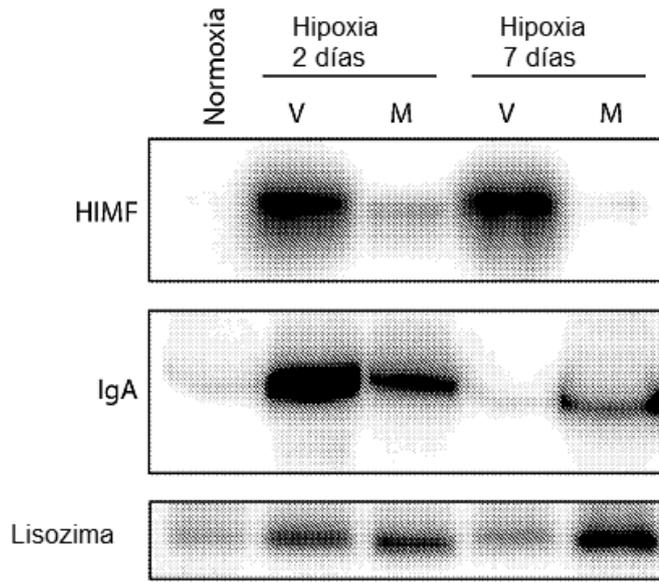


Fig. 9A

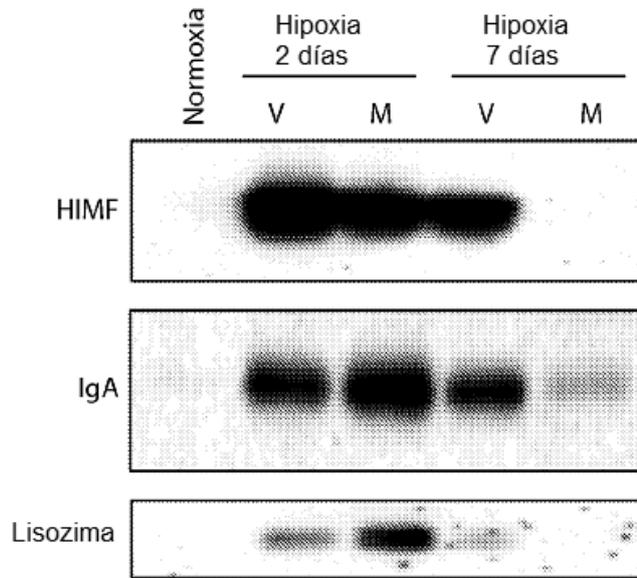


Fig. 9B

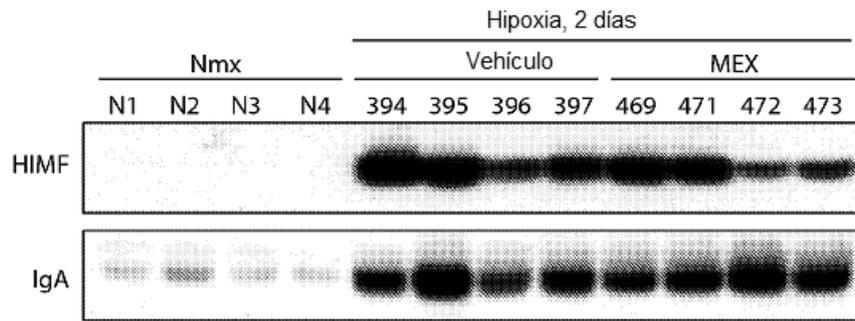


Fig. 10A

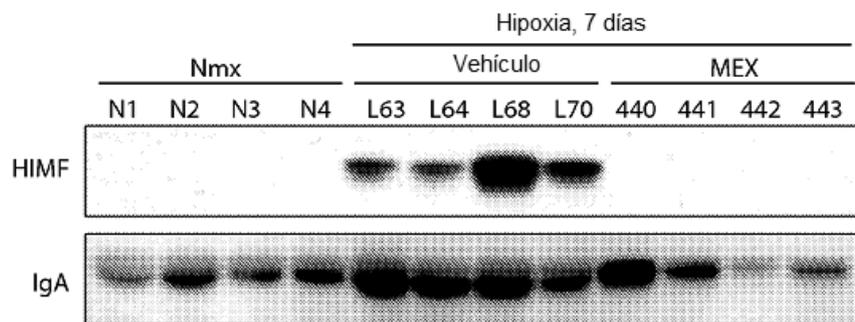


Fig. 10B

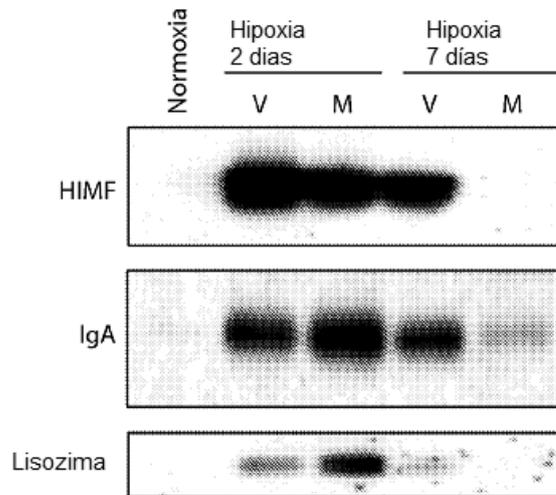


Fig. 10C

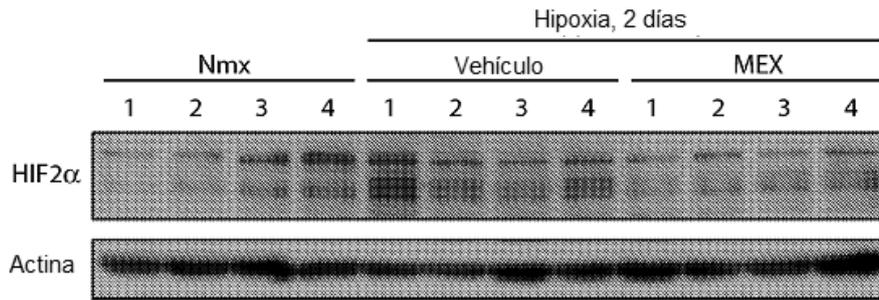


Fig. 11A

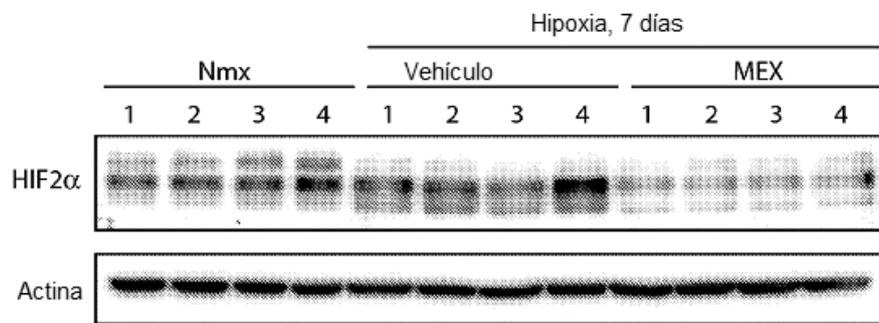


Fig. 11B

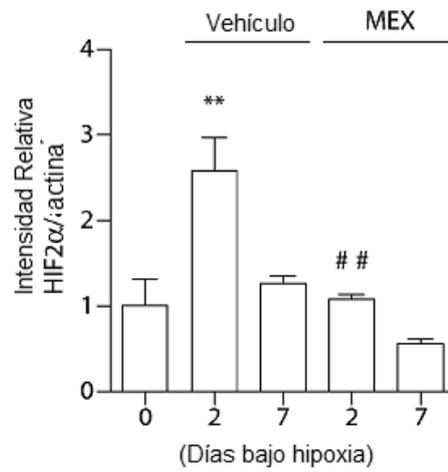


Fig. 11C

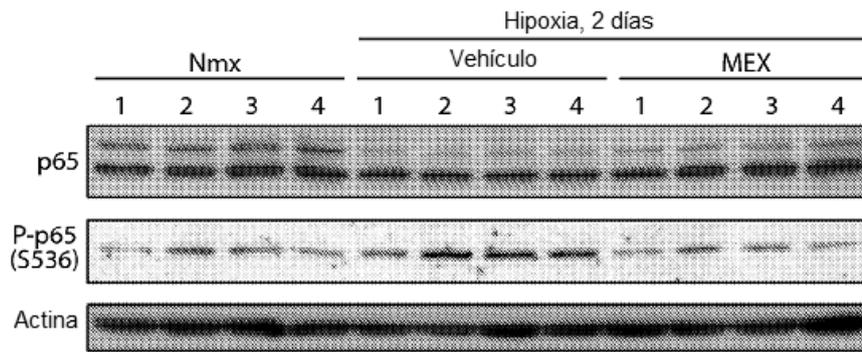


Fig. 12A

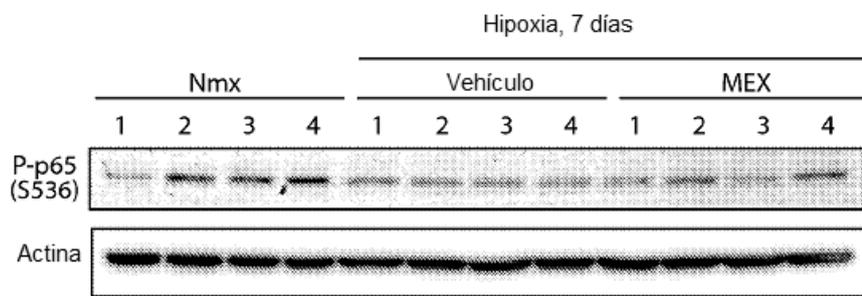


Fig. 12B

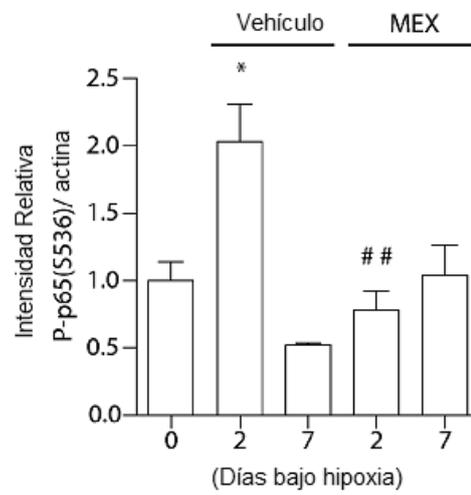


Fig. 12C

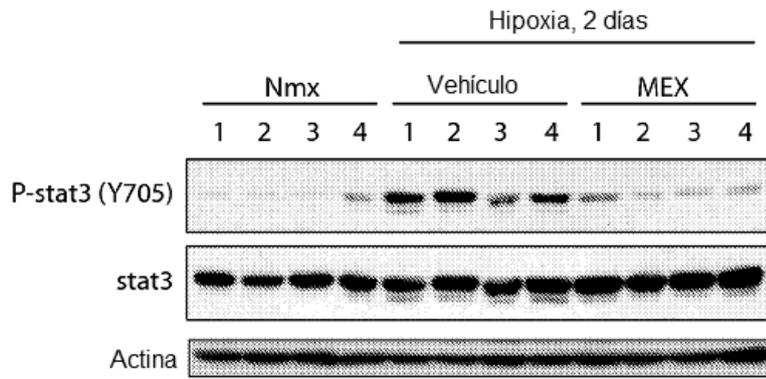


Fig. 13A

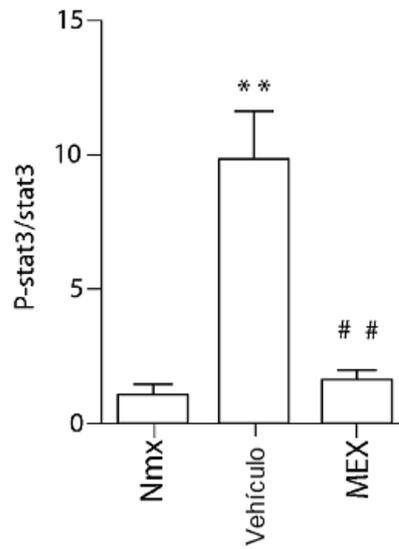


Fig. 13B

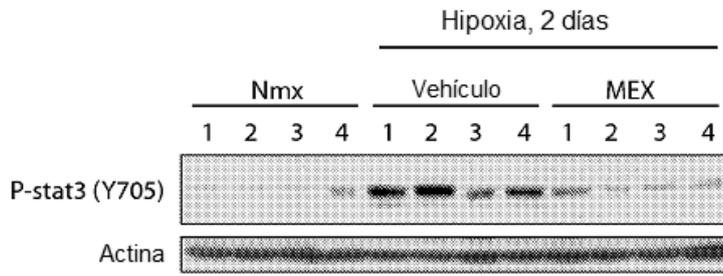


Fig. 14A

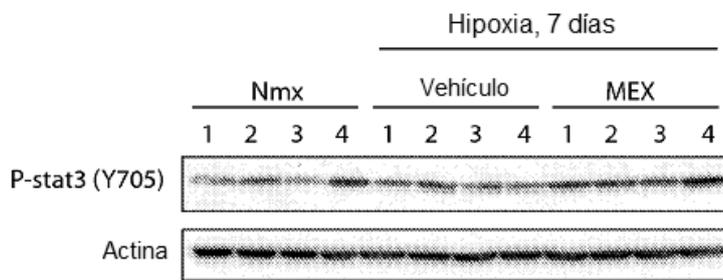


Fig. 14B

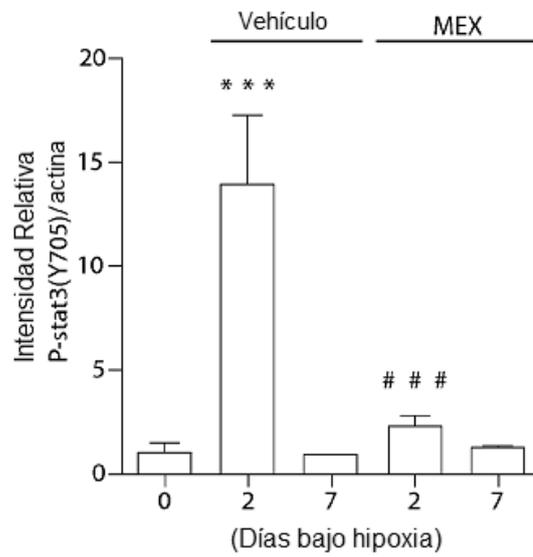


Fig. 14C

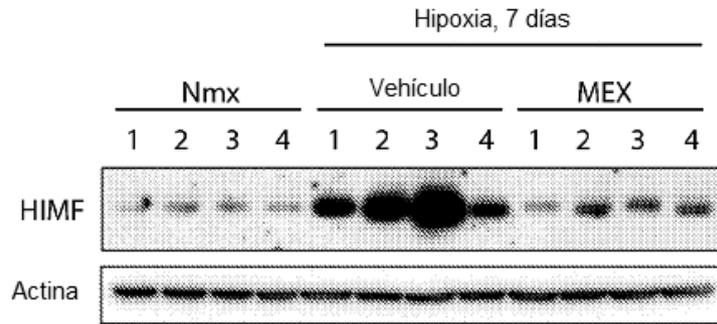


Fig. 15A

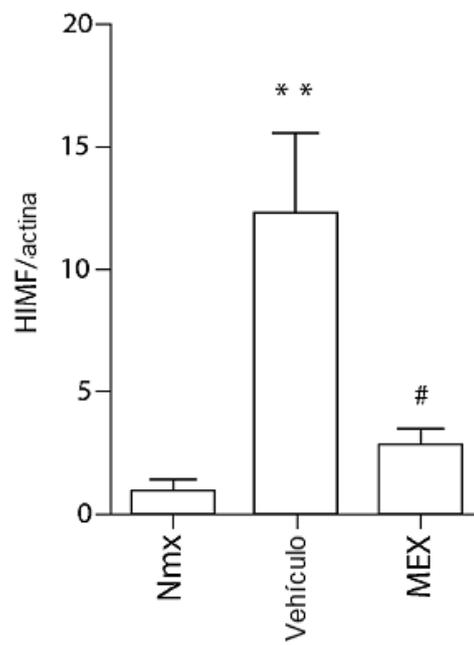


Fig. 15B

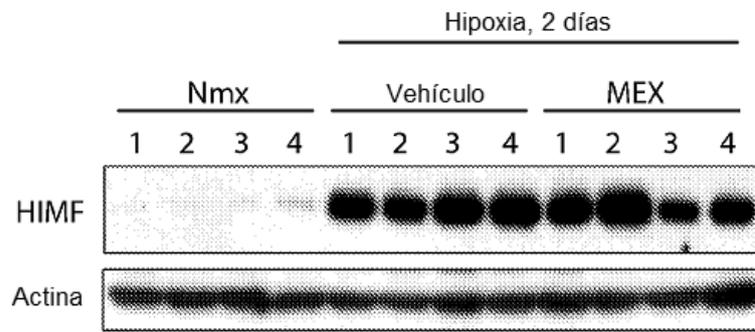


Fig. 16A

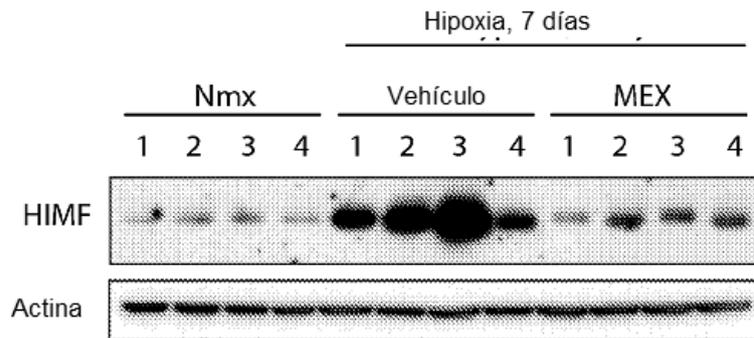


Fig. 16B

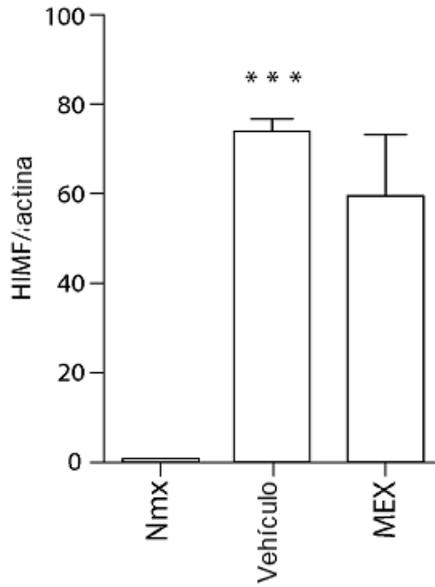


Fig. 16C

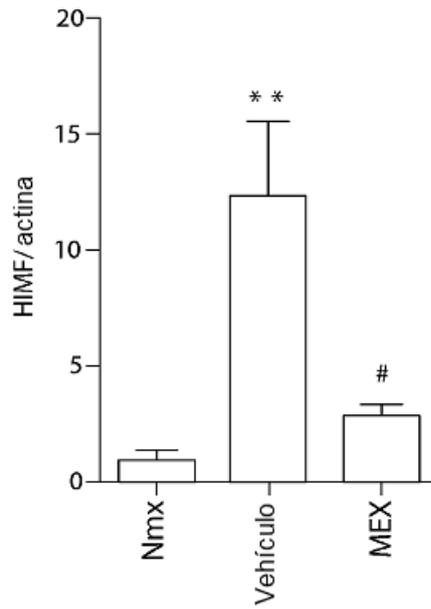


Fig. 16D

Animales: cepa de ratón FVB/s macho de 8 semanas de edad  
 Dosis : 10 µg/100 µl, tvi

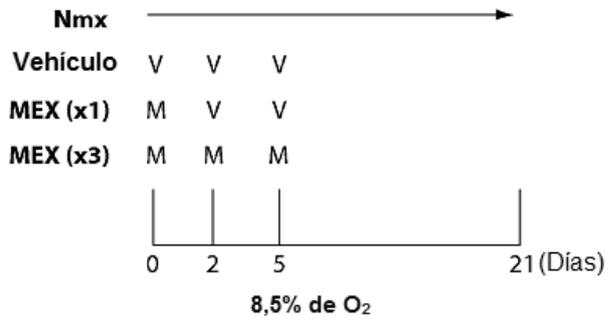


Fig. 17A

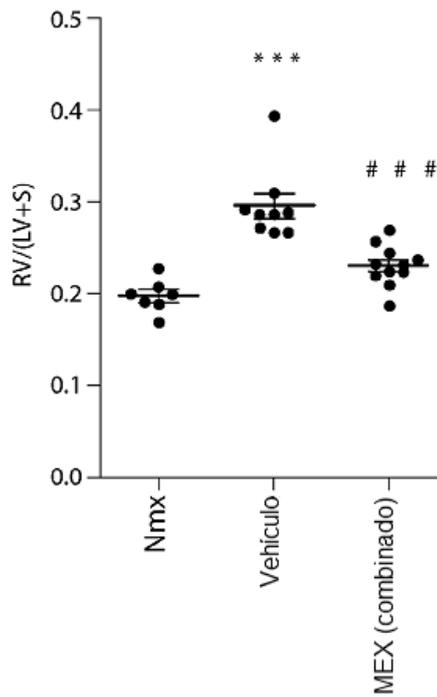


Fig. 17B

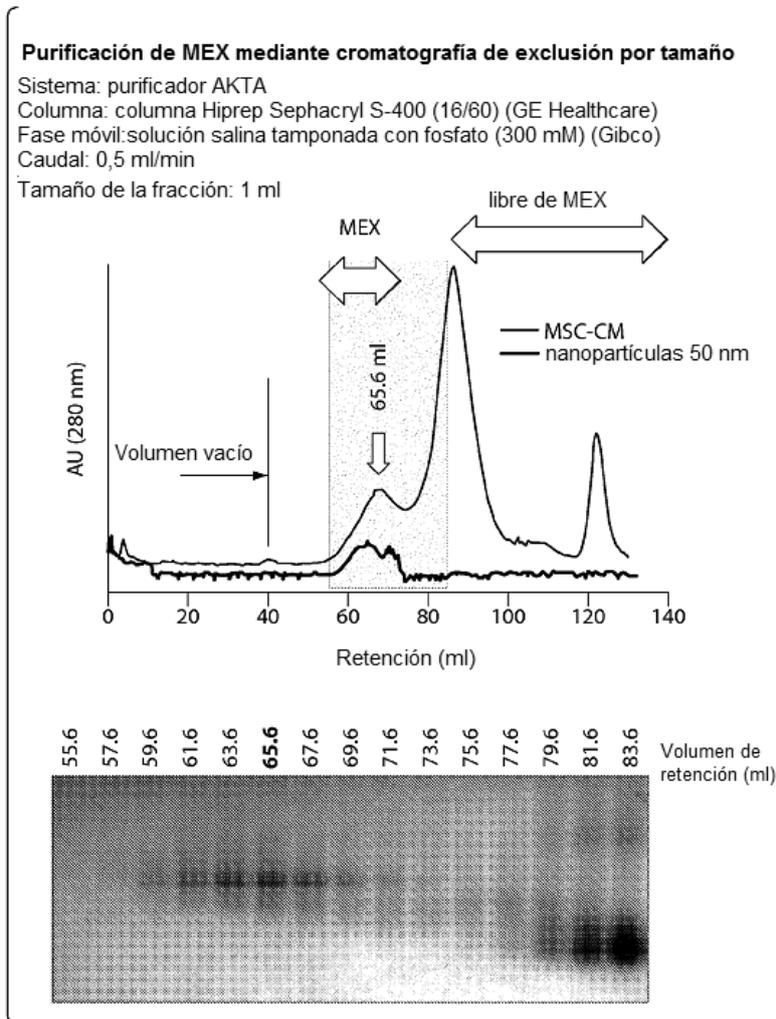


Fig. 18

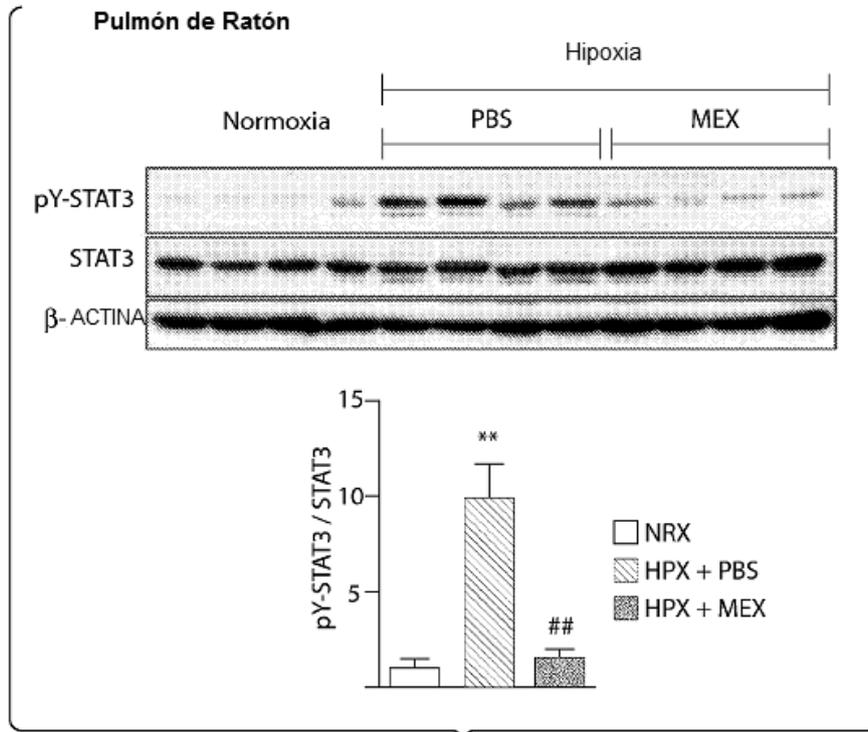


Fig. 19A

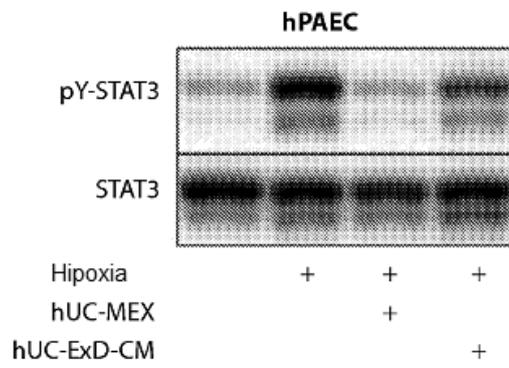


Fig. 19B

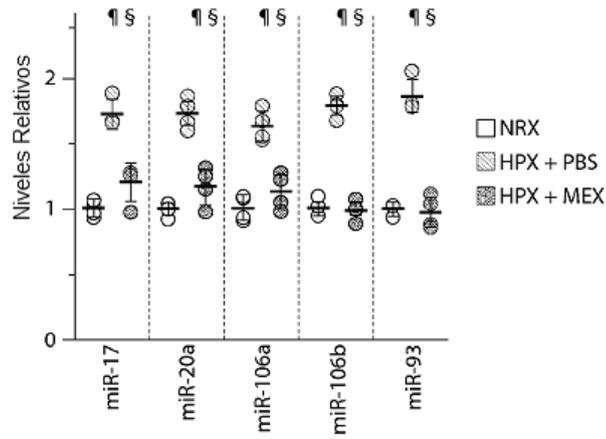


Fig. 20A

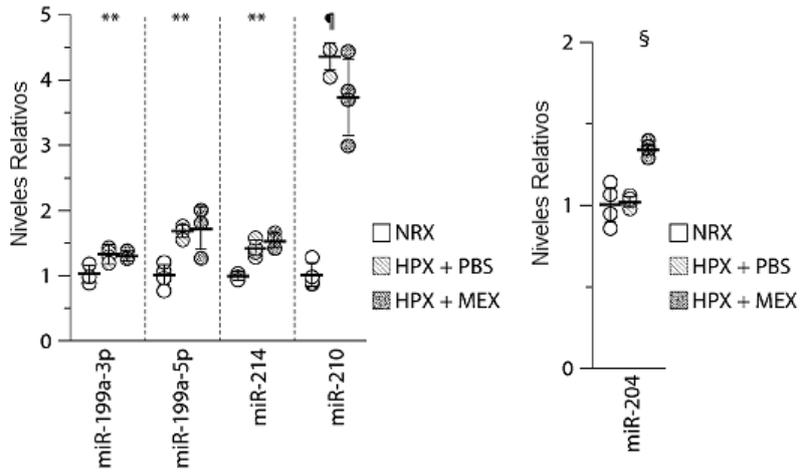


Fig. 20B

Fig. 20C

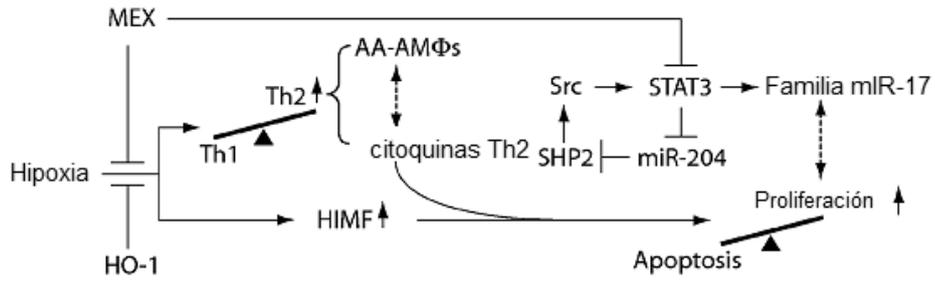


Fig. 21

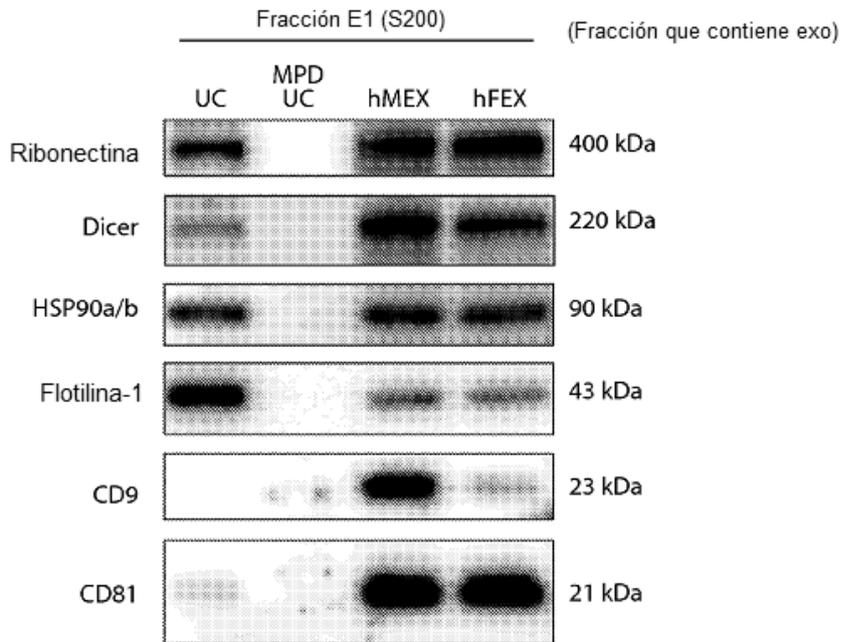


Fig. 22

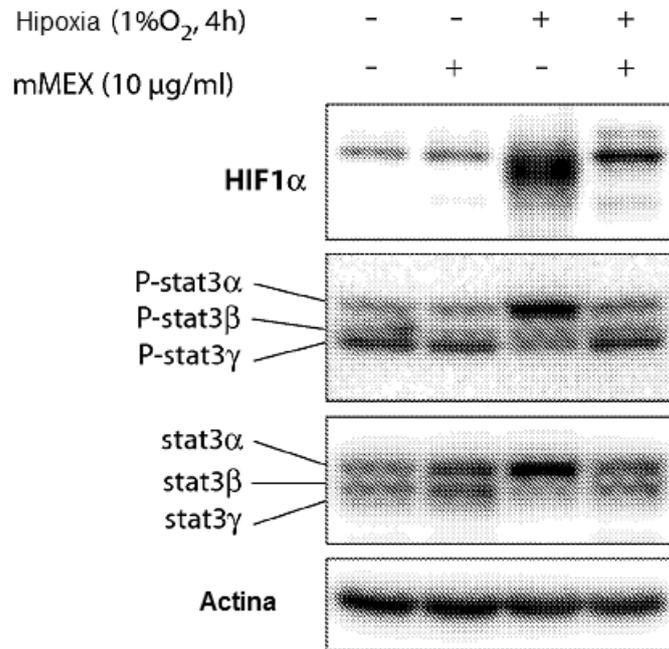


Fig. 23

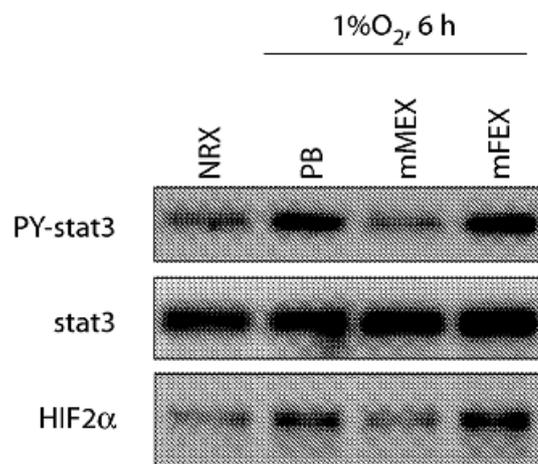


Fig. 24

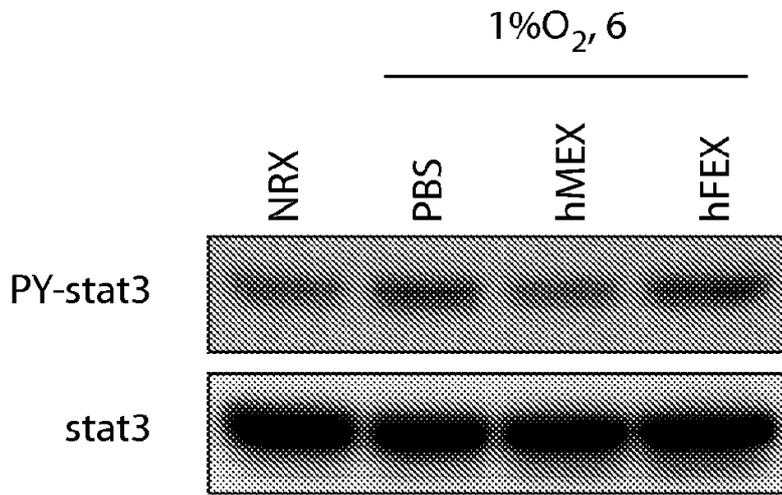


Fig. 25