

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 236**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2012 PCT/US2012/069419**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13090523**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2012 E 12809048 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2791336**

54 Título: **Procedimientos, sistemas y composiciones para administración de microARN derivado de células/a base de vesículas**

30 Prioridad:

13.12.2011 US 201161570081 P

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

28.03.2018

73 Titular/es:

**HENRY FORD HEALTH SYSTEM (100.0%)
1 Ford Place
Detroit, MI 48202, US**

72 Inventor/es:

**KATAKOWSKI, MARK, E.;
BULLER, BENJAMIN, A.L. y
CHOPP, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 661 236 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

Procedimientos, sistemas y composiciones para administración de microARN derivado de células/a base de vesículas

Campo técnico

5 Sin limitación, algunas formas de realización de la divulgación comprenden procedimientos, sistemas y composiciones que se refieren a microARNs y al uso de los mismos en la investigación, diagnóstico y tratamiento de lesiones o enfermedades.

Antecedentes

10 A pesar de los avances en los diagnósticos, quimioterapias y técnicas quirúrgicas, aún es deficiente la prognosis para determinados tipos de cánceres que incluyen, pero no se limitan a cánceres en el cerebro como glioblastomas multiformes ("GBM").

15 Los microarns ("miARNs" o "miRs") pueden regular la expresión génica células y pueden usarse para beneficio terapéutico. Como ejemplos no limitantes, pueden usarse miARNs para inhibir progreso del tumor o para promover curación del tejido. Se ha mostrado que el receptor de factor de crecimiento epidérmico ("EGFR") y la expresión de miR-146b son inversamente correlacionados en los GBMs. Sin embargo, muchos inhibidores de EGFR han fallado en gran medida al inducir la regresión clínica de GBM, incluso cuando se observa en otros cánceres la relación entre el genotipo y la respuesta al medicamento. Además, los muestran una variedad de aberraciones genéticas. Por lo tanto, se mantiene la necesidad de tratamientos terapéuticos para muchos cánceres que incluyen, pero no se limitan a, GBM.

20 Una dificultad que debe superarse para una terapia efectiva con miARN es la administración eficiente de los miARNs terapéuticos a las células, tejidos u órganos específicos. Un reto técnico predominante en el desarrollo de una terapia a base de miARN es hacer que las células diana absorban e incorporen eficientemente cantidades significativas de miARN.

Resumen

25 La presente invención se define en y por las reivindicaciones anexas. Los siguientes ejemplos de algunas formas de realización se proporcionan sin limitarla invención a sólo aquellas formas de realización descritas en el presente documento y sin renunciar a ninguna forma de realización o ningún objeto.

30 La presente divulgación proporciona procedimientos, sistemas y/o composiciones que usan miARNs que son efectivamente especificados, absorbidos por y/o incorporados en células, tejidos u órganos para tratamientos terapéuticos. Algunas formas de realización de la divulgación comprenden procedimientos, sistemas y/o composiciones para producir y/o administrar exosomas modificados u otras vesículas que contienen uno o más miARNs seleccionados, que incluyen, pero no se limitan a miR-146b. En algunas formas de realización de la divulgación, sin limitación, los plásmidos que codifican miARN son transfectados a células productoras que incluyen, pero no se limitan a células estromales mesenquimatosas multipotentes ("MSCs"). Exosomas que contienen los miARNs transfectados son cosechados a partir de aquellas células y se usan para administrar a un sujeto que sufre lesión o de enfermedad. Adicionalmente o de manera alternativa, las células productoras que tienen miARN derivado de los exosomas modificados pueden cosecharse y administrarse al sujeto. Algunas formas de realización de la divulgación comprenden la administración terapéutica y uso de tales miARNs, exosomas modificados y/o células productoras para tratar lesiones y enfermedades en mamíferos, los cuales incluyen seres humanos.

Descripción breve de los dibujos

40 Algunas formas de realización de la divulgación se describirán ahora a manera de ejemplo solamente y sin renunciar a otras formas de realización, con referencia a los dibujos acompañantes en los cuales:

FIG. 1 es una representación de datos e imágenes que muestran que los exosomas a partir de MSCs transfectadas con un plásmido de expresión de miR-146b reducen EGFR y NF-κB a administrarse cultivos de células de 9L glioma.

FIG. 2 muestra una reseña de un sistema de administración de miARN terapéutico a base de exosomas.

45 FIG. 3 es una representación de datos que muestra que los exosomas de MSCs transfectadas con un plásmido de expresión de miR-146b liberan exosomas que contienen niveles significativamente más altos de miR-146b.

FIG. 4 es una representación de datos que muestra que los exosomas de MSCs transfectadas con un plásmido de expresión de miR-146b liberan exosomas que reducen la viabilidad de células tumorales de 9L gliosarcoma.

FIG. 5 es una representación de datos e imágenes que muestran que los exosomas de MSCs transfectadas con un plásmido de expresión de miR-146b reducen el crecimiento tumoral al administrarse ratas que portan tumores de 9L gliosarcoma.

5 FIG. 6 son imágenes y gráficos que muestran una micrografía electrónica de exosomas de MSC aisladas a partir de un medio de cultivo de MSC, detección en tiempo real mediante PCR de la expresión de miR-146b en M67-exo y M146-exo, y una membrana de Western para β -actina y expresión de proteína de EGFR en células de 9L tratadas con M67-exo y M146-exo.

FIG. 7 son imágenes de secciones coronales tincionadas con H&E representativas de ratas sacrificadas después de implantar un tumor, y un gráfico de medición volumétrica de tumores xenoinjertados 9L.

10 Descripción detallada

15 Sin limitación a sólo aquellas formas de realización divulgadas en el presente documento y sin renunciar a ninguna forma de realización u objeto, algunas formas de realización de la divulgación comprenden un sistema de administración de miARN por el cual se modifica la expresión de miARN en células diana que producen exosomas (como un ejemplo no limitante, MSCs), y exosomas u otras vesículas, miARNs a partir de aquellas células/o esas células mismas, se usan como vehículos de administración para administrar miARN(s) terapéutico(s) a células, tejidos u órganos. Algunas formas de realización de la divulgación comprenden la administración terapéutica y el uso de tales células inducidas para tratar lesiones y enfermedades en mamíferos, que incluyen, pero no se limitan a, lesiones o enfermedades del sistema nervioso que pueden dar lugar de otra manera a una función celular o sistémica disminuida. Tal inducción diferenciada de MSCs y/o las células resultantes pueden usarse para tratar daño celular, tisular o de órganos en un paciente mediante la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un miARN de interés, o de MSCs diferenciadas que son inducidas por medio de tales miARNs.

20 Un problema apremiante en el tratamiento con miARN es hacer que las células diana absorban e incorporen eficientemente el miARN. Algunas formas de realización de la divulgación suministrarán efectivamente miARNs terapéutico a un tejido u otros sitios dentro de un sujeto para el tratamiento. Por ejemplo, ciertas formas de realización de la divulgación podrían usarse para producir exosomas personalizados que portan una o más especies de miARNs antitumorales que podrían administrarse a un paciente con cáncer. De manera alternativa, ciertas formas de realización de la divulgación podrían usarse para producir exosomas personalizados que porten una o más especies de miARNs neuro-restauradores que podrían administrarse a un paciente con apoplejía. Algunas formas de realización de la divulgación comprenden un sistema de administración de miARN que puede personalizarse que puede usarse para tratar patologías múltiples en cuyo tratamiento sería útil una terapia con miARN.

25 Los miARNs pueden regular expresión génica en células y pueden usarse para beneficio terapéutico. Por ejemplo, los miARNs pueden usarse para inhibir el progreso de un tumor o para promover la curación de un tejido. Una dificultad que debe superarse para la terapia efectiva con miARN es la administración eficiente del (de los) miARN(s) a las células, los tejidos o los órganos afectados.

30 Algunas formas de realización de la divulgación comprenden el empaquetamiento de exosomas con una o más especies de miARN y puesto que el miARN puede ser endógeno a la célula productora, o extraño, o diseñado artificialmente (como sólo un ejemplo, mediante diseño de plásmido(s) de ADN originales), estos comprenden un método versátil de administración de miARN. Por ejemplo, mientras muchos vehículos de administración de nucleótidos tales como liposomas o nanopartículas requieren precarga o enlazamiento del vehículo con el nucleótido, determinadas formas de realización de la divulgación usan las células productoras para crear el miARN y para cargar el exosoma.

La introducción de partículas extrañas a un paciente puede dar lugar a una respuesta inmune. Si se usan células tales como MSCs, es posible usar las propias MSCs del paciente como células productoras; por lo tanto, es probable que el rechazo inmune de los vehículos de administración pueda evadirse o reducirse.

45 Sin limitación, algunas formas de realización de la divulgación comprenden una producción en desarrollo de exosomas que portan miARN, y también hacen posible el trasplante de células que producen exosomas que portan miARN. Una vez transfectadas, las células productoras podrían crear o continuar produciendo exosomas que portan miARN personalizado y miARNs durante un período prolongado de tiempo. El miARN puede comprender toda la secuencia del miARN, o puede comprender cualquier subfragmento o variante del mismo que retenga la actividad especificada de la secuencia entera. Esta creación o producción podría proporcionar ciertas ventajas, incluyendo, pero no limitado a: 1) exosomas podrían cosecharse en muchos momentos del tiempo y entregarse al paciente durante muchos días o semanas, y 2) las células productoras mismas podrían trasplantarse al tejido que va a tratarse para producir exosomas que portan miARN personalizados y miARNs allí mismo.

55 Hemos descubierto que los miARNs que se introducen a MSCs, y a ciertos otros tipos de células se liberan a continuación de las células en exosomas. Como un ejemplo no limitante, cuando se transfectan MSCs con un plásmido de ADN que ha codificado cel-miR-67 de miARN de *C. elegans*, se ha encontrado una abundancia de miARN de cel-

miR-67 en los exosomas liberados de estas MSCs. Puesto que los exosomas pueden incorporarse a otras células, la divulgación proporciona una producción y un sistema de administración de miARN por el cual se modifica la expresión de miARN en células diana que producen exosomas (como un ejemplo no limitante, MSCs), y se usan exosomas de aquellas células y/o las células mismas como vehículos de administración para llevar el o los miARN(s) terapéuticos a células, tejidos u órganos.

En algunas formas de realización de la divulgación, hemos transfectado células productoras (MSCs, células de 9L glioma y células de HEK) con plásmidos de ADN que se diseñan para codificar miARNs. En algunas formas de realización de la divulgación, hemos usado plásmidos que codificaron cel-miR-67 (un miARN de control no encontrado en células de mamíferos) y miR-146b (se había encontrado que era un miARN con efectos antitumorales). Hemos cosechado exosomas producidos a partir de estas células (después de 1 día, 2 días y 3 días), y usando RT-PCR hemos detectado cel-miR-67 solamente en exosomas de células que fueron transfectadas con el plásmido de cel-miR-67. Además, hemos detectado niveles muy elevados (hasta de 160x control) de miR-146b en los exosomas que fueron afectados con el plásmido de miR-146b. Con base en otro de nuestros trabajos, el tratamiento de células de glioma con cel-miR-67 no tendría efecto en la viabilidad de la célula, mientras que el tratamiento de células de glioma con miR-146b reduciría la viabilidad celular y reduciría la invasión de células tumorales. Las supresiones en el cromosoma 10 son la alteración cromosómica más frecuente observada en GBMs, donde aproximadamente 80% de los casos exhiben pérdida de heterocigotía. miR-146b humano se localiza en el cromosoma 10 dentro de 10q24-26, una región que se encuentra perdida con la mayor frecuencia en GBM. Hemos encontrado que U87-MG, U251 y células, y células de glioblastomas humano primario de HFH66 expresan significativamente menos miR-146b que los astrocitos humanos corticales normales. La amplificación génica de EGFR ocurre en aproximadamente 40% de todos los GBMs y la expresión incrementada de EGFR se correlaciona con la invasividad y malignidad del glioma. La red de señalización de EGFR ha sido una diana para la terapia antitumoral con un esfuerzo significativo enfocado en inhibir el receptor usando anticuerpos, inhibidores de tirosina cinasa o vacunas.

En nuestro trabajo, hemos creado células de gliosarcoma 9L con exosomas de células transfectadas con plásmido cel-miR-67 y células transfectadas con plásmido miR-146b, como también exosomas de células no transfectadas. Usando MTT, hemos encontrado que la viabilidad celular del glioma fue reducida significativamente al tratarse con exosomas de células transfectadas con plásmido miR-146b en comparación con todos los controles. Por lo tanto, usando un plásmido miR-146b y células productoras, hemos administrado de manera efectiva y eficiente miR-146b a células tumorales, provocando un efecto antitumoral significativo.

Los miARNs inhiben la traducción de sus mARNs dianas. MiR-146b puede inhibir la producción de ciertas proteínas que promueven tumores, entre ellas, EGFR, NF-κB, IRAK1 y TRAF6. Usando membrana de Western, hemos encontrado que los exosomas de células transfectadas con plásmido miR-146b reducen significativamente la expresión de EGFR, NF-κB, IRAK-1, y TRAF6 en células de glioma, en comparación con células tratadas con exosomas de control o exosomas de células transfectadas con plásmido cel-miR-67. Otras proteínas que son dianas de miR-146b en otros sistemas no fueron afectadas, tales como MMP16, lo cual indica que el efecto que observamos era específico. La figura 1 muestra la expresión de proteínas en células y astrocitos de glioma después de la exposición a exosomas de MSC. Tal como se indica, los exosomas de miR-146b ("M146-exo") redujeron la expresión de proteína de EGFR y NF-κB en células de 9L en comparación con los exosomas de celmiR-67 ("M67-exo"). NF-κB M146-exo también redujo levemente la proteína NF-κB en astrocitos de rata corticales primarios. Estos resultados muestran que miR-146b empaquetado en exosomas podría inhibir significativamente sus proteínas específicas en células tumorales tratadas, pero no astrocitos no tumorales.

Algunas formas de realización de la divulgación comprenden sistema de administración nuevo y versátil de miARN que puede aplicarse en una gama amplia de enfermedades o lesiones. Clínicamente, los miARNs antitumorales pueden empaquetarse en exosomas y estos exosomas podrían administrarse al sujeto. La capacidad para empaquetar eficientemente una o más especies de miARNs da lugar a un sistema de administración versátil de miARN. Por lo tanto, dependiendo de los miARNs que se empaquetan, podría tratarse una amplia gama de enfermedades o lesiones con exosomas modificados.

Además, tal como se ha descrito en el presente documento, las células productoras podrían administrarse a un sitio especificado en un sujeto, dando lugar a una producción local sostenida de exosomas que portan miARN personalizado y/o a la liberación terapéutica de miARNs seleccionados desde las células productoras mismas.

Ciertas formas de realización de la divulgación comprenden características que incluyen, pero no se limitan a: 1) un procedimiento efectivo de suministro de miARN ya que las vesículas derivadas de células se incorporan fácilmente a las células, 2) producción de vesículas derivadas de células (como un ejemplo no limitante, exosomas) que pueden contener una o más especies de miARN, y estas pueden ser de existencia endógena, o miARNs diseñados de modo personalizado, 3) como cualquier miARN(s) puede empaquetarse, producción de exosomas que portan miARN para tratamiento de muchas enfermedades diferentes, 4) uso de células que producen exosomas para un suministro en desarrollo de exosomas que portan miARN ex vivo, y/o trasplante in vivo para producir localmente exosomas que portan miARN, 5) uso de múltiples tipos de células para producir exosomas que portan miARN, 6) uso de células modificadas y/o exosomas diseñadas para dirigirse específicamente a tejidos de interés terapéutico, y 7) evitación o

mitigación de efectos adversos, ya que los exosomas son de existencia natural y, por lo tanto, los exosomas que portan miARN personalizado tendrán probablemente pocos efectos adversos al administrarse.

5 Algunas formas de realización de la divulgación pueden comprender la producción y/o administración de otras vesículas de membrana derivadas de células, modificadas de manera similar, además de o de modo simultáneo con los exosomas modificados.

10 Ciertas formas de realización de la divulgación comprenden procedimientos, sistemas y/o composiciones para administrar moléculas de miARN terapéuticas a tejidos de pacientes. Tal como se ilustra en la figura 2, algunas formas de realización de la divulgación comprenden procedimientos y/o sistemas con uno o más de los siguientes pasos: 1) miARN que han sido determinados como terapéuticos se expresan en células que producen exosomas, 2) las células productoras comienzan a liberar exosomas que contienen los miARNs terapéuticos introducidos, y 3) exosomas que contienen miARN terapéutico son cosechados y administrados al paciente, y/o las células productoras se administran al paciente para liberar exosomas que contienen miARN terapéutico después de administración.

15 Algunas formas de realización de la divulgación comprenden el empaquetamiento de exosomas con una o más especies de miARN a altas concentraciones y estos miARNs se administran a tejidos en dosis terapéuticas. Los miARNs empaquetados pueden ser aquellos que son endógenos a las células productoras, pero son forzados a expresar a niveles más altos o pueden ser miARNs diseñados artificialmente, introducidos para adaptar la necesidad terapéutica. Una combinación de miARNs también puede empaquetarse dentro de los mismos exosomas.

EJEMPLOS

20 Los siguientes ejemplos se proporcionan sin limitarla invención a sólo aquellas formas de realización descritas en el presente documento y sin renunciar a ninguna forma de realización.

Ejemplo 1:

25 Hemos encontrado que los miARNs que se introducen a MSCs u otras células se empaquetan a continuación en exosomas en abundancia y se liberan de las células. Estos exosomas que contienen miARNs pueden aislarse luego del medio de cultivo. Por ejemplo, cuando transfectamos MSCs con un plásmido de ADN que codifica como cel-miR-67 de miARN, encontramos una abundancia de miARN de cel-miR-67 en los exosomas liberados de estas MSCs. cel-miR-67 de miARN no se produce de manera natural por parte de MSCs de mamíferos. Por lo tanto, uno puede empaquetar miARNs no nativos en exosomas, lo cual significa que algunas formas de realización de la divulgación pueden usarse para diseñar pequeñas secuencias similares a miARN que son personalizadas para dirigirse a cualquier gen de interés. También hemos encontrado de manera inesperada que cuando fueron transfectadas células de MSC con rno-miR-146b, un miARN nativo a las MSCs de mamíferos, los exosomas a partir de MSCs transfectadas con miR-146b contenían niveles significativamente más altos de miR-146b en comparación con el control (figura 3). Hemos detectado que los niveles de miR-146b son relativamente más altos en exosomas de las células que producen miR-146b en comparación con exosomas provenientes de células naive, que los niveles de miR-146b en los cuerpos celulares de los grupos respectivos. Además, los niveles de miR-146b detectados en exosomas de MSC a partir de células productoras de miR-146b eran incrementados de manera consistente e inesperada a niveles varias veces más altos que los de cel-miR-67 detectados en exosomas provenientes de células productoras de cel-miR-67 incluso cuando estaba normalizadas para niveles naive de miR-146b en exosomas de MSC. Estos datos indican que miR-146b es empaquetado preferencialmente en exosomas por las células productoras. Según lo anterior, los exosomas también pueden recogerse de ciertos otros tipos de célula, tales como 9L, HEK, astrocitos, u oligodendrocitos. Sin embargo, hemos encontrado que estos otros ciertos tipos de células carecen de la capacidad de producción de MSCs, y como tales, al transfectarse, MSCs son una nueva célula productora altamente eficiente. Además, hemos encontrado que la expresión de miR-146b no comprometió la producción de exosomas por parte de MSCs ni alteró significativamente la viabilidad de las MSCs, una característica clave, puesto que algunos miARNs antitumorales pueden suprimir procesos metabólicos en las células. Como los exosomas pueden incorporarse a otras células, hemos desarrollado el uso de exosomas de MSC como un vehículo de administración para miARNs terapéuticos.

Ejemplo 2:

50 Un problema actual para el tratamiento con miARN terapéutico es lograr que las células diana absorban e incorporen eficientemente el miARN. Algunas formas de realización de la divulgación usan exosomas que se absorben fácilmente a partir de células tales como MSCs. Luego, empaquetamos miARN terapéutico o una combinación de miARNs terapéuticos en exosomas de MSC y empleamos los exosomas como el vehículo de administración. Por ejemplo, algunas formas de realización de la divulgación podrían usarse para producir exosomas personalizados que porten una o más especies de miARNs antitumorales que podrían administrarse al paciente con cáncer. De manera alternativa, algunas formas de realización de la divulgación podrían usarse para producir exosomas personalizados que porten miARNs neuro-restauradores que van administrarse a un paciente que sufre de una enfermedad neurológica tal como la enfermedad de Alzheimer, o apoplejía. Algunas formas de realización de la divulgación comprenden un sistema de administración de miARN que puede personalizarse, que podría usarse para tratar múltiples patologías en las cuales sería útil el tratamiento con la terapia de miARN.

Hemos empaquetado el miR-146b de miARN antitumoral en exosomas de MSC y tratado células de gliosarcoma 9L con estos exosomas in vitro. Usando el ensayo de viabilidad celular de MTT, hemos encontrado que la viabilidad celular de gliosarcoma 9L fue reducida significativamente al tratarse con exosomas de MSC que contenían miR-146b, en comparación con el control (figura 4, que muestra que los exosomas de MSCs transfectadas con un plásmido de expresión de miR-146b liberan exosomas que reducen la viabilidad celular de células tumorales de gliosarcoma 9L). Por lo tanto, usando un plásmido de miR-146b y células productoras para empaquetar miR-146b en exosomas de MSC, hemos administrado de manera efectiva y eficiente miR-146b a células tumorales, provocando un efecto antitumoral significativo. Para determinar si los exosomas de MSC que portan miR-146b administran el miARN a las células tumorales, hemos expuesto células de 9L a exosomas de MSC (M146-exo) que contienen miR-146b o exosomas que contienen cel-miR-67 (M67-exo) in vitro. Después de un tratamiento de 24 horas, el miR-146b detectado en células de 9L tratadas con M146-exo fue de $8,5 \pm 0,4$ veces más alto en comparación con las células tratadas con M67-exo, mientras que el cel-miR-67 fue detectado en células de 9L tratadas con M67-exo, pero no detectadas en células tratadas con M146-exo. Esto indicó que los exosomas de MSC pueden suministrar miARNs expresados con plásmidos a células tumorales.

Ejemplo 3:

Para determinar si un miARN antitumoral empaquetado en exosomas de MSC reduciría el crecimiento tumoral in vivo, hemos tratado ratas que tenían tumores cerebrales de gliosarcoma 9L con este paquete de exosomas de MSC con miR-146b por medio de una administración intra-tumoral. Las 24 ratas de Fischer fueron implantadas con gliosarcoma 9L. Después de 5 días, los exosomas que contenían cel-miR-67 provenientes de MSCs transfectadas con cel-miR-67 (control), o exosomas que contenían miR-146b provenientes de MSCs transfectadas con miR-146b-, o tratamiento con salmuera fueron administrados mediante inyección intra-tumoral ($n = 8$ por grupo de tratamiento). 10 días después de la implantación del tumor, los animales fueron sacrificados y fue calculado el volumen del tumor. Tal como se muestra en la figura 5, el tratamiento con exosomas de MSC que contenía miR-146b redujeron significativamente el tamaño del tumor en las ratas que tenían tumores de gliosarcoma 9L en comparación con el control de exosomas de MSC que contenía cel-miR-67 (cel-miR-67 no tiene sitios de enlace en el mARN de la rata). (La leyenda de la figura 5: PBS (solamente vehículo), M146-exo o exosomas de cel-miR-67 ("M67-exo") fueron administrados mediante inyección intra-tumoral 5 días después del implante del tumor. Fueron sacrificados los animales a los 10 días después del implante ($n=8$ por grupo). Las barras son la desviación estándar).

Ejemplo 4:

Los exosomas son generalmente vesículas de 30-150 nm que son secretadas por una amplia gama de células de mamíferos que pueden contener miARN. Para determinar si los exosomas de MSC podrían usarse como un vehículo para administrar miARNs antitumorales, hemos transfectado MSCs con un plásmido de expresión de miR-146b y hemos cosechado exosomas liberados por las MSCs. La inyección intra tumoral de exosomas derivados de MSCs que expresan miR-146 redujo significativamente el crecimiento glioma de xenoinjerto en un modelo de rata de tumor cerebral primario.

La expresión génica aberrante es un mecanismo de disfunción de miARN en cáncer, incluyendo en GBMs, y los miARNs se expresan diferencial mente en GBM con relación al tejido normal. El mir-146b humano se localiza en el cromosoma 10 dentro de 10q24-26 (10q24.32, 104186259-104186331+), una región perdida en una mayoría de estos tumores. miR-146b reduce la motilidad y la célula de glioma, y el mARN de EGFR es una diana de enlazamiento para silenciar miR-146b. La amplificación génica de EGFR ocurre en aproximadamente 40% de todos los GBMs y EGFR incrementado se correlaciona con la invasividad y malignidad del glioma. Hemos empleado un modelo de xenoinjerto 9L de tumor cerebral primario para determinar si miR-146b podría funcionar como un miARN anti-glioma in vivo.

Materiales y procedimientos:

Implantación de tumor

Fueron usadas ratas machos de Fischer (250-275 g). Fue hecha una craneotomía de 2 mm de diámetro en el hemisferio derecho anterior a la sutura coronal. Usando una jeringa de Hamilton, fueron inyectadas células tumorales a 3,5 mm de profundidad, 3,0 mm a la derecha y 1,0 mm anterior del bregma. A las ratas se les implantó $2,5 \times 10^5$ de células 9L (5 μ l de PBS) durante un intervalo de 15 minutos. La craneotomía fue cubierta con cera de hueso de Horsley, y la incisión fue cerrada con sutura de seda 4-0 (Ethicon). Los animales fueron pesados al implantarse el tumor, durante el tratamiento y antes del sacrificio. No fue detectada una diferencia estadística en pesos entre los grupos de tratamiento. Las ratas fueron sacrificadas 10 días después de la implantación con anestesia, con administración i.p. de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg). Formalina al 10% fue perfundida a los animales, después siguió un lavado vascular con salmuera al 0,9 %. Los cerebros fueron retirados, fijados y cortados en bloques de 2 mm de grueso, los cuales fueron insertados en parafina. Las secciones fueron tinteadas con hematoxilina y eosina. Para medir el volumen del tumor, en cada sección coronal, el área del tumor fue medida usando software MCID (InterFocus Imaging) rastreando la demarcación del tumor y el volumen de sección fue determinado multiplicando el área rastreada por el grosor de la sección.

Plásmidos y transfección de MSC.

5 Fueron usados plásmidos de expresión de cel-miR-67 y hsa-miR-146b (GenScript). El plásmido usado con respecto a cel-miR-67 fue el plásmido pARN-CMV3.1/Puro, SEQ ID NO: 1; véase también http://www.genscript.com/vector/SD1233-pARN_CMV3_1_Puro.html, que se incorpora por referencia al presente documento. La secuencia de cel-miR-67 insertada comprende la SEQ ID NO: 2. El plásmido usado con respecto a has-miR-146b fue el plásmido de pEP-miR, SEQ ID NO: 3; véase también <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/MIR-146B.pdf>, que se incorpora el presente documento por referencia. La secuencia de has-miR-146b insertada comprende la SEQ ID NO: 4. La transfección de MSC fue efectuada usando electroporación. Fueron suspendidas 2×10^6 de MSCs en 150 μ l de solución de electroporación Ingenio (Mirus) con 2 μ g de ADN de plásmido. Fue usado el programa A-33 para electroporación en un dispositivo de Amaxa Nucleofector. Las células transfectadas fueron resuspendidas en 10 ml de medio de cultivo completo, centrifugadas y luego colocadas en una placa para producción de exosomas.

Preparación y cosecha de exosomas

15 Fueron sembradas 2×10^6 MSCs en 10 ml de medio Eagle modificado de Dulbecco, suplementado con suero fetal bovino al 20%. Después de 48 horas, fueron aislados exosomas del medio de MSC usando ExoQuick-TC (System Biosciences, CA). Las pellas de exosomas fueron re-suspendidas en PBS estéril a una concentración total de proteína de 10 μ g/ μ l. Las suspensiones de exosomas fueron colocadas sobre hielo y se administraron animales dentro de 6 horas siguientes a la cosecha. Los exosomas visualizados por microscopía electrónica fueron fijados en glutaraldehído (5 μ g/ μ l) durante 30 minutos.

20 Tratamiento de exosomas

Para el tratamiento fueron inyectados 5 μ l de la suspensión de M67-exo o M146-exo a cada animal por medio de una inyección intra-tumoral a los 5 días después de la implantación del tumor. Usando una jeringa de Hamilton fue inyectada una suspensión de exosomas o vehículos de PBS en las mismas coordenadas que el implante del tumor, después de un intervalo de 5 minutos. Fue usada PCR en tiempo real para determinar la expresión relativa de celmiR-67 y la expresión de miR-146b en M67-exo y M146-exo usados para el tratamiento. MiR-146b fue en $7,3 \pm 1,7$ veces más alto en M146-exo en comparación con M67-exo. Cel-miR-67 no fue detectada en M146-exo, pero fue detectada con un valor de CT de $33,2 \pm 2,3$ en M67-exo.

PCR en tiempo real.

30 Para analizar la expresión de miARN, fueron lisadas células de MSC, células de 9L o exosomas de MSC en reactivo de Qiazol y fue aislado el ARN total usando el minikit miRNeasy (Qiagen). La transcripción inversa puede efectuar a con el kit de transcripción inversa de miARN (Applied Biosystems), y fue amplificado el ADNc con ensayos de miARN de TaqMan (Applied Biosystems), los cuales son específicos para secuencias de miARN maduro. Se efectuaron 40 ciclos de amplificación. Fue usado el procedimiento de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para determinar expresión relativa de miARN. Si no fue logrado un CT en 40 ciclos de amplificación, el miARN medido fue considerado no detectado.

35 Membrana de Western.

Fueron sembradas 2×10^5 de células 9L en una placa de 6 pozos y cultivada por una noche. Al medio de cultivo se agregaron M67-exo o M146-exo (50 μ g de proteína total) en 5 μ l de PBS. 24 horas más tarde, fueron lisadas células 9L y fue usada la membrana de Western para detectar EGFR y β -actina (Santa Cruz Biotechnology). Fue cuantificada la concentración de proteína usando un kit de ensayo de proteína BCA (Pierce). Para visualización fueron usados SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) y la exposición de película Kodak X-omat (Kodak).

Análisis estadístico.

Los datos se muestran como un promedio \pm e.e.p. (error estándar del promedio). Los valores de p fueron calculados usando ANOVA de una vía o el ensayo t de Student. Un valor de p de 0,05 o menos fue considerado estadísticamente significativo.

45 Resultados:

50 Para determinar si las MSCs empaquetan miR-146b en exosomas secretados, hemos transfectado MSCs de ratas con un plásmido que codificaba miR-146b, o cel-miR-67, el cual no tenía dianas conocidas de enlazamiento de mARN en la rata. 48 horas después de la transfección, fueron aislados exosomas del medio, y fueron medidos miR-146b y cel-miR-67 en MSCs y exosomas extracelulares. La figura 6 A muestra exosomas de MSCs transfectadas con plásmidos de expresión de miR-146b o cel-miR-67. (Figura 6 A: Micrografía electrónica de exosomas de MSC aislados de medio de cultivo de MSC, barra de escala = 500 nm). miR-146b fue $7,1 \pm 3,7$ veces mayor en MSCs y $7,3 \pm 1,7$ veces mayor en exosomas de MSC después de la transfección de plásmido de expresión de miR-146b, en comparación con los niveles de miR-146 en MSCs transfectadas con plásmido de cel-miR-67 y sus exosomas,

respectivamente (figura 6 B: detección por PCR en tiempo real de la expresión de miR-146b en M67-exo y M146-exo (n = 7). Los datos son un promedio \pm e.e.p.; La comparación es un ensayo t de dos colas). No fue detectado cel-miR-67 en las MSCs transfectadas con plásmido de miR-146b o en sus exosomas (M146-exo), pero fue detectado en MSCs transfectaron con plásmido de cel-miR-67 y sus exosomas (M67-exo). Estos datos demuestran que miARN expresado con plásmido se empaqueta eficientemente en exosomas de MSC por medio de mecanismos endógenos.

Para determinar si los exosomas de MSC que portan miR-146b administran el miARN a las células tumorales, hemos expuesto células de 9L a M146-exo o M67-exo in vitro. Después de 24 horas, el miR-146b detectado en células de 9L tratadas con M146-exo fue $8,5 \pm 0,4$ veces más alto en comparación con células tratadas con M67-exo, mientras que cel-miR-67 fue detectado en células de 9L tratadas con M67-exo, pero no detectado en células tratadas con M146-exo. Por lo tanto, los isómeros de MSC pueden suministrar miARNs expresado con plásmido a células tumorales in vitro. Para determinar si M146-exo podría alterar la expresión de la proteína diana, hemos expuesto células de 9L a M146-exo in vitro, y después de 24 horas, los niveles de proteína de EGFR estaban más bajos en las células de 9L tratadas con M146-exo en comparación con las células de 9L tratadas con M67-exo (figura 6C: membrana de Western para β -actina y expresión de proteína EGFR en células de 9L tratadas con M67-exo y M146-exo.) Estos hallazgos nos indicaron que miR-146b, suministrado por medio de isómeros de MSC, es funcionalmente activo en las células tumorales de aceptador.

Finalmente, para determinar si M146-exo tenía un efecto antitumoral in vivo, hemos administrado M146-exo o M67-exo (50 μ g de proteína total en 5 μ l de volumen) a ratas de Fischer que tenían 9L gliosarcoma. Hemos encontrado que una inyección intra-tumoral de M146-exo 5 días después de la implantación de xenoinjerto tumoral intracraneal condujo a una reducción significativa en el volumen de tumor a los 10 días después del implante, en comparación con M67-exo o el control tratado con el vehículo (figura 7 - A: secciones coronales representativas, tinturadas con H&E, de ratas sacrificadas 10 días después de la implantación del tumor; B: medición volumétrica de tumores de xenoinjerto de 9L 10 días después del implante del tumor y 5 días después de tratamiento con PBS, M67-exo, o M146-exo (n = 8 por grupo). ANOVA: p = 0.042. Los datos son el promedio \pm e.e.p. Comparaciones múltiples a posteriori son ensayos t de dos colas). Estos datos nos indicaron que M146-exo provocó un efecto antitumoral en el cerebro de la rata.

Aquí, una inyección intra-tumoral de 50 μ g de M146-exo redujo significativamente el crecimiento de xenoinjerto de glioma en el cerebro de la rata. Nuestros hallazgos nos indican que la exportación de miARN terapéutico específico a exosomas de MSC representa una nueva estrategia de tratamiento para al menos glioma maligno.

Tal como se ha discutido en el presente documento, algunas formas de realización de la divulgación comprenden un tratamiento nuevo por el cual el miARN terapéutico que se produce en MSCs y se carga a exosomas extracelulares mediante mecanismos endógenos se usa para tratar un tumor.

El interés es creciente en usar exosomas como vehículos biológicos de administración. Los exosomas son asimilados por las células del aceptador, por lo cual pueden alterarse los procedimientos celulares. Existe alguna evidencia de que los exosomas no provocan un rechazo inmune agudo, y como no son viables, no generan el riesgo de formación de tumor. Además, los exosomas pueden fabricarse a escala en el cultivo, usando posiblemente células autólogas, y las células que producen exosomas podrían incorporar múltiples miARNs terapéuticos, permitiendo un tratamiento personalizado. Nuestro trabajo indica que los miARNs empaquetados en exosomas de MSC son incorporados por las células tumorales en el cultivo. Para tratamiento in vivo, hemos administrado exosomas directamente mediante inyección intra-tumoral. Existen indicaciones de que miARNs funcionales se transfieren entre células de glioma, lo que sugiere que los miARNs terapéuticos pueden distribuirse por todo el tumor.

Hemos empleado MSCs como células productoras. Sin embargo, también pueden emplearse otros tipos de células para empaquetar miARNs en exosomas. Una vez transfectadas, las células productoras pueden crear exosomas que portan miARN personalizado por un período prolongado de tiempo. Por lo tanto, los exosomas podrían cosecharse en múltiples puntos de tiempo y administrarse al paciente durante varios días o semanas, o las células productoras mismas podrían trasplantarse al tejido que va a tratarse para producir allí mismo exosomas que portan miARN personalizado. Además, las células productoras podrían cosecharse a partir de la médula ósea propia del paciente o de otros órganos a fin de limitar cualquier complicación inmune potencial.

En una configuración clínica, los miARNs terapéuticos podrían empaquetarse en exosomas y estos exosomas podrían administrarse al paciente. Por lo tanto, dependiendo de los miARNs que se empaquetan, una gama amplia de enfermedades podría tratarse con estos exosomas personalizados.

En una configuración clínica, los miARNs podrían empaquetarse en exosomas y estos exosomas podrían congelarse y almacenarse para administración futura al paciente. Por lo tanto, dependiendo del estado de la enfermedad, las células del paciente podrían usarse para producir exosomas personalizados que van administrarse en un momento posterior.

Los miARNs pueden introducirse a las MSCs (o a otras células productoras) para empaquetar los miARNs en exosomas. Sin embargo, la introducción de los miARNs a las MSCs puede alterar las mismas MSCs y, de manera importante, la naturaleza de los exosomas que ellas producen. Por lo tanto, la modificación resultante de los exosomas

(y sus otros componentes) pueden tener un efecto terapéutico en adición a los miARNs empaquetados. Las MSCs (u otras células productoras) pueden transfectarse con miARNs con la intención de modificar los exosomas que se liberan.

5 Por lo tanto, sin limitación y sin renunciar a ningún objeto, algunas formas de realización de la divulgación comprenden exosomas nuevos que contienen uno o más miARNs seleccionados y/o células productoras que contienen los mismos (colectivamente "administración de exosoma modificado/célula productora") para impedir, controlar o aliviar enfermedades o lesiones en mamíferos por medio de la aplicación selectiva de tales miARNs. Tal lesión o enfermedad pueden inhibirse por medio de administración de exosoma / célula productora modificados durante un intervalo finito de tiempo, por lo cual se limita el desarrollo o el curso de tal enfermedad o lesión.

10 Es de una alta probabilidad que la duración de la terapia que comprende la administración de exosomas/célula productora modificados sería relativamente breve y con una alta probabilidad de éxito. La administración profiláctica de exosomas/célula productora modificados de algunas formas de realización puede reducir en gran medida la incidencia de daño que se asocia con muchas formas de enfermedad o lesión.

15 Pueden usarse rutas apropiadas cualesquiera de administración de exosomas/célula productora modificados que se conozcan por aquellos medianamente versados en la técnica.

20 Los exosomas/las células productoras modificados se administrarían y dosificarían de conformidad con la buena práctica médica, tomando en consideración la condición clínica del paciente individual, el sitio y el método de administración, el agendamiento de la administración, la edad, sexo, peso corporal del paciente y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad farmacéuticamente efectiva" para propósitos del presente documento se determina, por lo tanto, mediante tales consideraciones como se conocen en la técnica. La cantidad puede ser efectiva para lograr mejoramiento, incluyendo, pero no limitándose a, el daño o la lesión reducidas, o mejoramiento o eliminación de síntomas y otros indicadores tal como se seleccionan como medidas apropiadas por aquellos versados en la técnica.

25 Los exosomas/células productoras modificados pueden administrarse de diferentes maneras. Pueden administrarse individualmente o como un ingrediente activo en combinación con soportes, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Los exosomas/células productoras modificados pueden administrarse oralmente, por vía subcutánea o parenteral, que incluye administración intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraperitoneal e intranasal, así como también técnicas: intratecal y de infusión, o por medio de administración local o inoculación directa al sitio de enfermedad o condición patológica. También puede ser útiles implantes de los exosomas/células productoras modificados. El paciente que se está tratando es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos que incluyen humanos. Los soportes, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como también los soportes de implante generalmente se refieren a agentes de relleno, diluyentes o material de encapsulamiento inertes, no tóxicos, sólidos o líquidos, los cuales no reaccionan con los componentes activos. Los exosomas/células productoras modificadas pueden alterarse por el uso de anticuerpos a proteínas superficiales de célula o ligandos de receptores conocidos para dirigirse específicamente a tejidos de interés.

35 Puesto que el uso de administración de exosomas/células productoras modificados se dirige específicamente a la evolución, expresión o curso de patologías asociadas, se espera que la elección del momento adecuado y la duración del tratamiento en humanos pueden ser aproximadamente aquellos establecidos para modelos animales en algunos casos. De manera similar, puede esperarse que las dosis establecidas para lograr efectos deseados usando tales compuestos en modelos animales o para otras aplicaciones clínicas sean aplicables en este contexto también. Se nota que los humanos se tratan generalmente más tiempo que los animales experimentales ejemplificados en el presente documento, cuyo tratamiento tiene una duración proporcional a la duración del proceso de la enfermedad y a la efectividad del medicamento. Las dosis pueden ser dosis únicas o dosis múltiples durante períodos de tiempo. El tratamiento generalmente tiene una duración proporcional a la duración del proceso de enfermedad y a la efectividad del medicamento y a especie de paciente que se está tratando.

40 Al administrar por vía parenteral, los exosomas/células productoras modificados generalmente se formularán en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. El soporte puede ser un solvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

55 Cuando es necesario puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de una cubierta tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. También pueden usarse vehículos no acuosos tales como aceite de semilla de algodón, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol o aceite de cacahuete y ésteres tales como miristato de isopropilo en calidad de sistemas de solventes para dichas composiciones de exosomas/células productoras modificados. Adicionalmente pueden agregarse diversos aditivos que promueven la estabilidad, la esterilidad y la isotonicidad de las composiciones, que incluyen preservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y reguladores de pH.

- 5 La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. En muchos casos será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. La adsorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante el uso de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Sin embargo, cualquier vehículo, diluyente o aditivo usado tendrían que ser compatibles con los exosomas/células productoras modificados.
- 10 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando exosomas/células productoras modificados en la cantidad requerida del disolvente apropiado con otros ingredientes diversos, según se desee.
- 15 Una formulación farmacológica puede administrarse al paciente en una formulación inyectable que contiene cualquier soporte compatible, tal como diversos vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes; o el o los inhibidores pueden administrarse por vía parenteral al paciente en forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o sistemas de administración dirigida, tales como anticuerpos monoclonales, administración por vector, matrices poliméricas iontoforéticas, liposomas y microesferas. Muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos de este tipo son bien conocidos por aquellos versados en la técnica.
- 20 Los exosomas/células productoras modificados pueden administrarse inicialmente mediante inyección intravenosa para llevar los niveles de sangre a un nivel adecuado. Los niveles del paciente se mantienen luego mediante una forma de dosificación oral, aunque pueden usarse otras formas de administración, dependiendo de la condición del paciente y tal como se ha indicado antes. La cantidad que va a administrarse y el momento justo de administración pueden variar para el paciente que se está tratando.
- 25 Adicionalmente, los exosomas/células productoras modificados pueden administrarse in situ para llevar los niveles internos a un nivel adecuado. Los niveles del paciente se mantienen luego según sean apropiados de acuerdo con la buena práctica médica mediante formas apropiadas de administración, dependiendo de la condición del paciente. La cantidad que va a administrarse y el momento justo de administración pueden variar para el paciente que se está tratando.
- 30 Mientras que la divulgación ha sido mostrada particularmente y descrita con referencia a las formas preferidas y alternativas de realización anteriores, debería entenderse por parte de aquellos expertos en la técnica que pueden emplearse diversas alternativas a las formas de realización descritas en el presente documento al practicar la divulgación sin apartarse del alcance de la invención, tal como se define en las siguientes reivindicaciones. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención. Debe entenderse que esta descripción de algunas formas de realización incluye todas las combinaciones nuevas y no obvias de elementos descritos en el presente documento y que las reivindicaciones pueden presentarse en esta o en una solicitud posterior a cualquier combinación nueva y no obvia de estos elementos. Las anteriores formas de realización son ilustrativas y ninguna característica o ningún elemento es esencial a todas las combinaciones posibles que pueden reivindicarse en esta solicitud o en una posterior. Cuando las reivindicaciones indiquen "un" o "un primer" elemento del equivalente del mismo, debe entenderse que tales términos incluyen la incorporación de uno o más de dichos elementos, sin requerir ni excluir dos o más de dichos elementos.
- 35

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 –

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCG
CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATT
GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA
ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC
AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTA
CATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
CATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGG
ATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACG
GGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGT
ACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTGGATCCCGTTCGCTTACC
GATTCAGAATGGTTGATATCCGCCATTCTGAATCGGTAAGCGACGAAGCTTAATAAAGGA
TCTTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGCGGCCGCCCTCGACTGTGC
TCTCTAGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGCGG
GAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC
GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCC
GCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTTCGCCCAGTTCGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCT
CTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTTACGGCACCTCGACCCAAA
AAACTTGATTAGGGTGATGGTTACAGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGC
CCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAATGGAACAACA
CTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTGCGGATTTTCGGCCTAT
TGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGT
GTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGC
ATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA
TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCC
CGCCCCAACTCCGCCAGTTCGCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA
TTTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCGCTCTGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCT
TTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGAAAAAGCTCCCGGGATGACCGAGTACAAGCCACGGT
GCGCTCGCCACCCGCGACGACGTCCCGCGGGCGGTACGCACCTTCGCGCCCGCTTCGC
CGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCGACCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTCAACCGA
GCTGCAAGAACTCTTCTCACGCGCGTGGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTTCGCGGA
CGACGGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGACCACGCGGAGAGCGTGAAGCGGGGGCGGTGTT
CGCCGAGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACA
GATGGAAGGCCCTCTGGCGCCGACCCGGCCCAAGGAGCCCGGTGGTTCTTGGCCACCGT
CGGCGTCTCGCCCGACCACAGGGCAAGGGTCTGGGCAGCGCCGTCTGTGCTCCCGGAGT
GGAGGCGGCCGAGCGCGCCGGGTGCCCGCTTCTTGGAGACTTCGCGCCCCGCAACCT
CCCCTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCGTCAACCGCGACGTGAGGTTGCCGAAGGACC
GGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCGGTGCCTGATTGGAATGACCGACCAAGCGACG
CCCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTC
GGAAATCGTTTTTCCGGGACGCGCGCTGGATGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAG
TTCTTCGCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC
ATCACAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCATAGTTGTGGTTTGTCCAAA
CTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAA
TCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATA
CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAAGTAACTCACATTA
ATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA
TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCG
CTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAG
GCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA
GGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
CGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA
GGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTTGGAAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCG
ACCCGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCT
CATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGT
GTGCACGAACCCCGCTTACGCCCCGCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG
TCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC

ES 2 661 236 T3

AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
ACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA
GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTTTGTTTGAAG
CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
TCGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAA
AGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCCTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCG
ATCTGTCTATTTTCGTTCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATA
CGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCG
GCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTCT
GCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGT
TCGCCAGTTAATAGTTTTGCGCAACGTTGTGGCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGC
TCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGA
TCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGT
AAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTC
ATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAA
TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCA
CATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCA
AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCT
TCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCC
GCAAAAAGGGAAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAA
TATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATT
TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATG
CCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCG
CGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGC
TTAGGGTTAGCGGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATT
GATTATTGAC

SEQ ID NO: 2 -

GGATCCTCACAACTCCTAGAAAGAGTAGATTGATATCCGTCTACTCTTTCTAGGAGGTTGTGACGAAGCTT

SEQ ID NO: 3 -

ES 2 661 236 T3

```

1  cccaactttt aaaagaaaag gggggattgg ggggtacagt gcaggggaaa gaatagtaga
61  cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa caaattacaa aattcaaaat
121 tttatcgatg cctccccgtc accaccccc ccaaccgcc cggaccggag ctgagagtaa
181 ttcatacaaa aggactcgcc cctgccttgg ggaatcccag ggaccgtcgt taaactccca
241 ctaacgtaga acccagagat cgtgcggtc cggccccctc acccgcccgc tctcgtcatc
301 actgaggtgg agaagagcat gcgtgaggct ccggtgcccg tcagtgggca gagcgacat
361 cgcccacagt ccccgagaag ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccggg gcctagagaa
421 ggtggcgcgg ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccagg
481 gtgggggaga accgtatata agtgcagtag tcgcctgaa cgttctttt cgcaacgggt
541 ttgccgccag aacacaggta agtgcctgt gtggttcccg cgggctggc ctctttaagg
601 gttatggccc ttgcgtgcct tgaataactt ccacgccctt ggtgcagta cgtgattctt
661 gatccccgac ttcgggttgg aagtgggtgg gagagttega ggccttggc ttaaggagcc
721 ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg cctgggcgt ggggcgccg cgtgcgaatc
781 tggtgaccac ttcgcgcctg tctcgtctgt ttcgataagt ctctagccat ttaaaatctt
841 tgatgatata ctgcgacgct tttttctgg caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat
901 ctgcacactg gtatttcggt tttggggcc gcgggcggcg acggggcccg tgcgtcccag
961 cgcacatggt cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag
1021 tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct ggcctcgcgc cgcctgtgat cgccccccc

```

1081 tggggcggcaa ggctggcccg gtcggcacca gttgctgtag cggaaagatg gccgcttccc
 1141 ggccctgctg cagggagctc aaaatggagg acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag
 1201 tcaccacac aaaggaaaag ggcctttccg tccctcagccg tcgcttcatg tgactcccacg
 1261 gagtaccggg cgccgtccag gcacctcgat tagttctcga ggatccnnnn nnnnnnnnnn
 1321 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 1381 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnngcta gctcgagctt ttggagtacg tcgcttttag
 1441 gttgggggga ggggttttat gcgatggagt ttccccacac tgagtgggtg gagactgaag
 1501 ttaggccagc ttggcacttg atgtaattct ccttggaaatt tgcccttttt gagtttggat
 1561 cttggttcat tctcaagcct cagacagtgg ttcaaagttt ttttcttcca tttcagggtg
 1621 cgtgaaaact acccctctag agtcgagcta cgggtcgcca ccattggtgag caagggcgag
 1681 gaggataaca tggccatcat caaggagttc atgctgctca aggtgcacat ggagggtcc
 1741 gtgaacggcc acgagttcga gatcgagggc gagggcgagg gccgccccta cgagggcacc
 1801 cagaccgcca agctgaaggt gaccaagggt ggccccctgc ccttcgctcg ggacatcctg
 1861 tcccctcagt tcatgtacgg ctccaaggcc tacgtgaagc acccgcgca catccccgac
 1921 tacttgaagc tgtccttccc cgagggtctc aagtgggagc gcgtgatgaa cttcgaggac
 1981 ggcggcgtgg tgaccgtgac ccaggactcc tccctgcagg acggcgagtt catctacaag
 2041 gtgaagctgc gcggcaccaa cttcccctcc gacggccccg taatgcagaa gaagaccatg
 2101 ggtctgggag cctcctccga gggatgtac cccgaggacg gcgccctgaa gggcgagatc
 2161 aagcagagcg tgaagctgaa ggacggcggc cactacgacg ctgaggtcaa gaccacctac
 2221 aaggccaaga agcccggtga gctgcccggc gcctacaacg tcaacatcaa gttggacatc
 2281 acctcccaca acgaggacta caccatcgtg gaacagtacg aacgcgcca gggccgccac
 2341 tcacccgcg gcattggacga gctgtacaag gacccaccgg tcgccaccat gaccgagtac
 2401 aagcccacgg tgcgctcgc caccgcgac gacgtcccca gggcctgacg caccctcgcc
 2461 gcgcttccg ccgactacc cgccacgccc cacaccgctg atccggaccg ccacatcgag
 2521 cgggtcaccg agctgcaaga actcttctcc acgctgctcg ggctcgacat cggcaagggtg
 2581 tgggtcgcgg acgacggcgc cgctgtggcg gtctggacca cgccggagag cgtcgaagcg
 2641 gggggcgtgt tcgcccagat cgcccgcgc atggccgagt tgagcggttc ccgctggcc
 2701 gcgcagcaac agatggaagg cctcctggcg ccgaccggc ccaaggagcc cgcgtggttc
 2761 ctggccaccg tcggcgtctc ccccgaccac cagggcaagg gtctgggca cgcctcgctg
 2821 ctcccgggag tggaggcggc cgagcgcgccc ggggtgcccg ccttcttggg gacctccgcg
 2881 ccccgcaacc tccccttcta cgagcggctc ggcttcaccg tcaccgcca cgtcaggtgc
 2941 ccgaaggacc gcgcgacctg gtgcatgacc cgcaagcccg gtgctgagc ggcgcaatc
 3001 tagacaaaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gactacaaa
 3061 tttcacaat aaagcatttt tttcactgca ttctagtgtg ggtttgtcca aactcatcaa
 3121 tgatctttat catgtctgtg atcaggtacc aaagggcctc gtgatacgc tatttttata
 3181 ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt
 3241 gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag
 3301 acaataaacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca
 3361 tttcctgtgc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc cttcctggtt ttgctcacc
 3421 agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat
 3481 cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc
 3541 aatgatgagc acttttaaaag ttctgctatg ttggcgggta ttatcccga ttgacgcgg
 3601 gcaagagcaa ctccgctgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc
 3661 agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat
 3721 aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga
 3781 gctaacccgt tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgcttgatc gttgggaacc
 3841 ggagctgaa gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctc tagcaatggc
 3901 aacaacggtg cgaacactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt
 3961 aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg ccttccggc
 4021 tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt ggtctcgcg gtatcattgc
 4081 agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagt atctacaga cggggagtca
 4141 ggcactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca
 4201 ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt
 4261 ttaattaaaa agatctaggt gaagatcctt ttgataatc tcatgacca aatcccttaa
 4321 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atctcttga
 4381 gatccttttt ttctgcgctg aatctgctgc ttgcaaaaa aaaaaccacc gctaccagcg
 4441 gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggttcagc
 4501 agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag
 4561 aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc
 4621 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg

 4681 cagcgtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac
 4741 accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga
 4801 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt
 4861 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcccaacct ctgacttgag
 4921 cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgag
 4981 gcctttttac ggttctcggc cttttgctgg ccttttgetc acatgttctt tctcgggta
 5041 tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcggcgc
 5101 agccgaacga ccgagcgcag cgagtcaagt agcgaggaag cggaaagagc cccaatacgc
 5161 aaaccgcctc tcccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc
 5221 gactggaaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctc

ES 2 661 236 T3

SEQ ID NO: 4 -

```
1   tcgaggatcc tgacccatcc tgggcctcaa cttactcadc ctgggaacgg gagacgattc
61  acagaagaaa gcatgcaaga gcagcgtcca ggctgaaaga actttggcca cctggcactg
121 agaactgaat tccatagget gtgagctcta gcaatgcctt gtggactcag ttctgggtgcc
181 cggcagtgct acaacatcaa tgccaaggcc gtggggcagc tgatggtttg ggctoccaac
241 ttcccagcca ggtgcttctg caggcccaca tctgcccac tgggctagct cga
```

REIVINDICACIONES

1. Exosomas que contienen MiR-146b para uso en el tratamiento de un sujeto que sufre de cáncer cerebral, en cuyo caso dichos exosomas se producen mediante los pasos de:
 - 5 i. Transfectar una población de células estromales mesenquimatosas multipotentes capaces de producir exosomas con un plásmido que codifica miR-146b;
 - ii. Cosechar exosomas a partir de la población de células estromales mesenquimatosas multipotentes o de medios que contienen las mismas después de la transfección; y
 - iii. Confirmar la presencia de miR-146b en uno o varios de los exosomas cosechados.
- 10 2. Células estromales mesenquimatosas multipotentes modificadas que producen exosomas para uso en el tratamiento de un sujeto que sufre de cáncer cerebral, en cuyo caso dichas células estromales mesenquimatosas multipotentes modificadas se producen mediante los pasos de:
 - i. Transfectar una población de células estromales mesenquimatosas multipotentes capaz de producir exosomas con un plásmido que codifica miR-146b;
 - 15 ii. Cosechar células de la población de células estromales mesenquimatosas multipotentes después de transfección; y
 - iii. Confirmar la presencia de miR-146b en una o más de las células cosechadas.
3. Los exosomas para uso de la reivindicación 1 o las células para uso de la reivindicación 2, en cuyo caso el sujeto es un humano.
- 20 4. Un medicamento para uso en el tratamiento de cáncer que comprende exosomas modificadas que contienen miR-146b.
5. El medicamento de la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de cáncer cerebral.
6. Un medicamento para uso en el tratamiento de cáncer el cual comprende células estromales mesenquimatosas multipotentes transfectadas para producir exosomas con uno o más plásmidos que codifican miR-146b.
7. El medicamento de la reivindicación 6 para usar en el tratamiento de cáncer cerebral.
- 25 8. El medicamento para uso de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en cuyo caso el cáncer o cáncer cerebral es un cáncer humano o un cáncer cerebral humano, respectivamente.

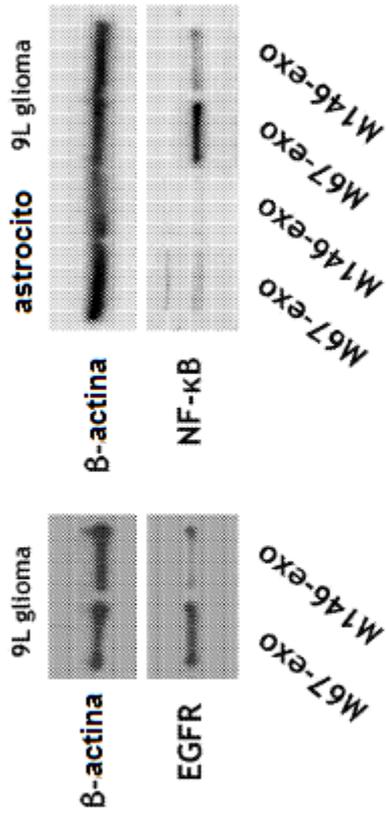


FIG. 1

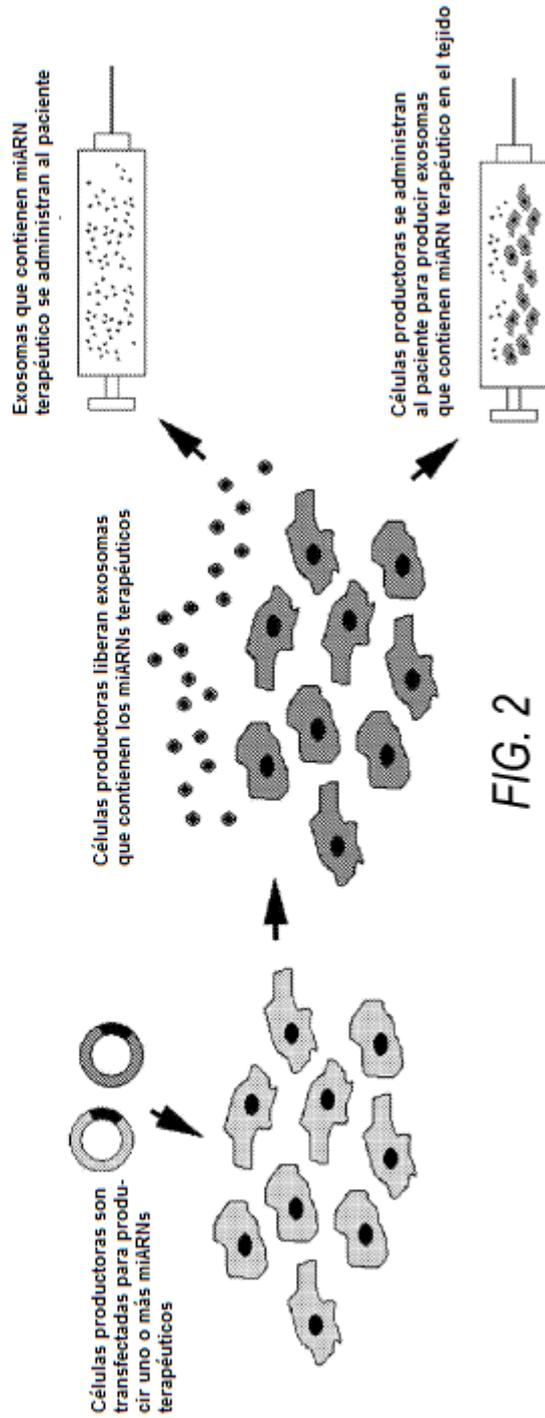


FIG. 2

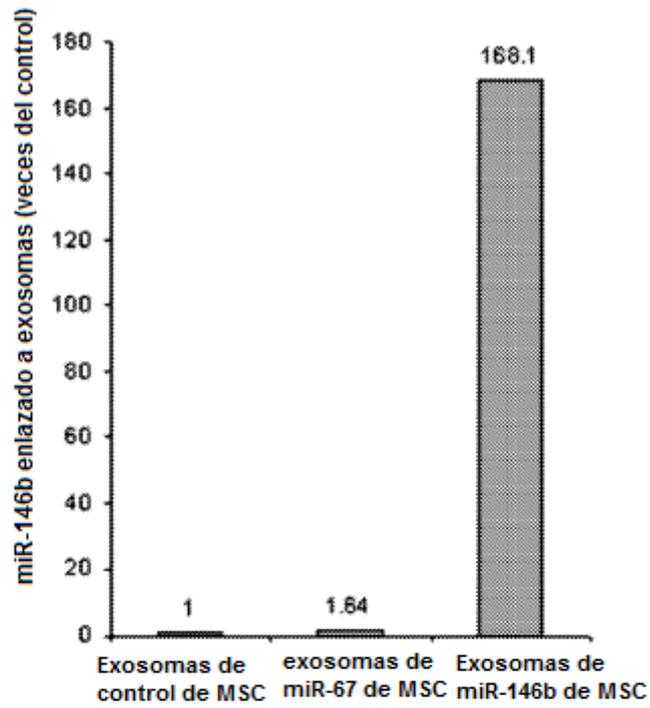


FIG. 3

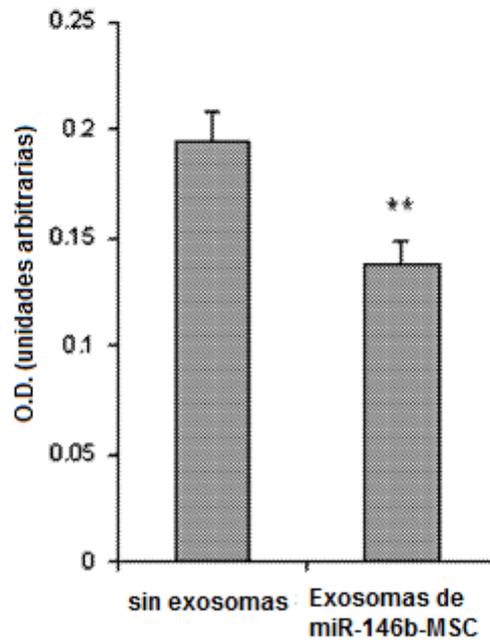


FIG. 4

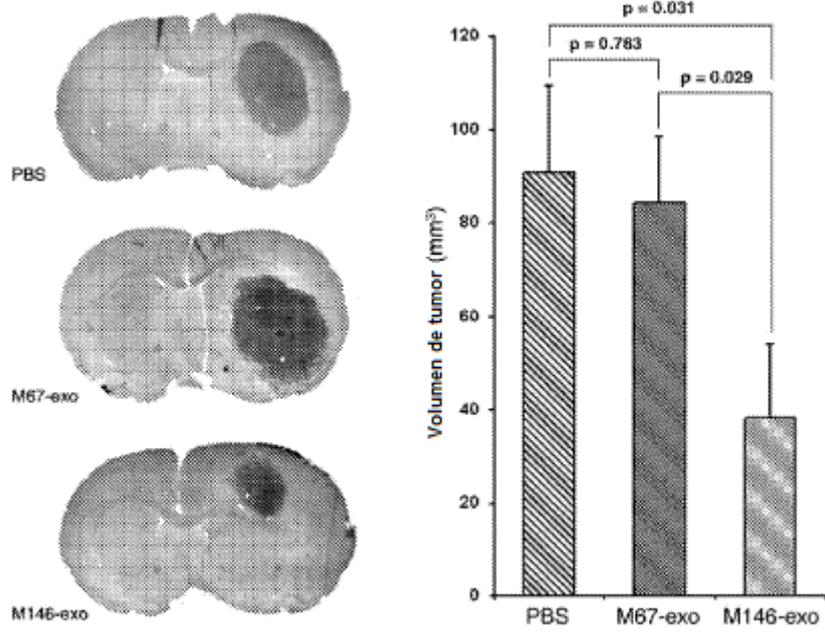


FIG. 5

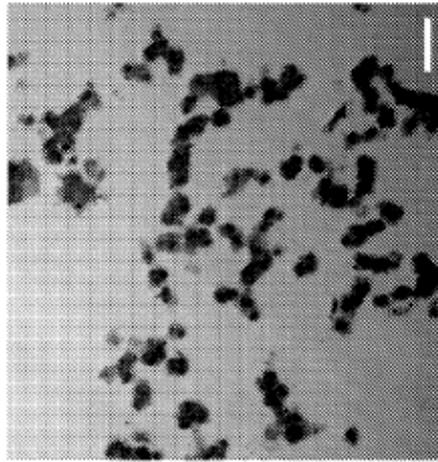


FIG. 6A

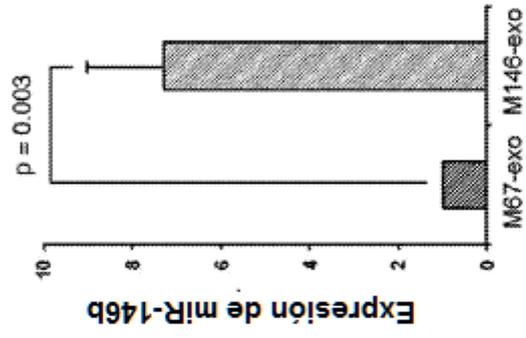


FIG. 6B

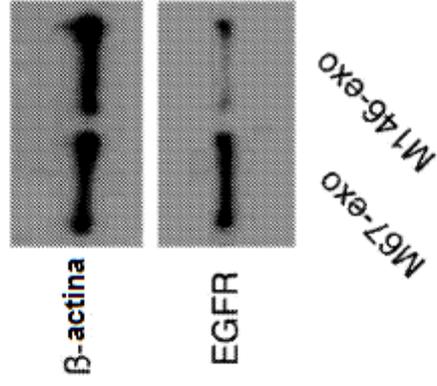


FIG. 6C

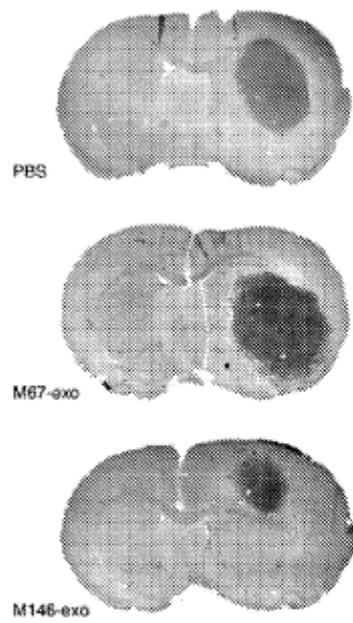


FIG. 7A

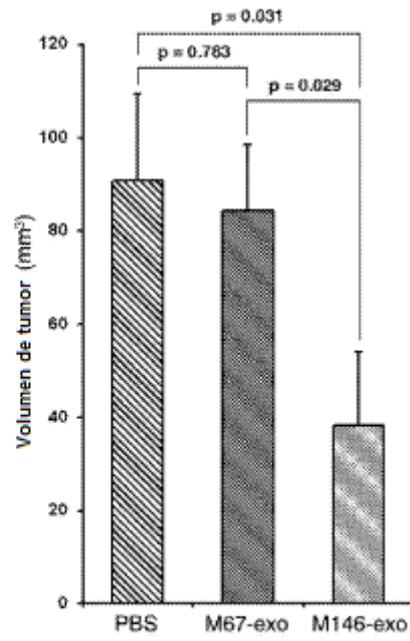


FIG. 7B