(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 749 393**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/11	(2006.01)
A61K 47/42	(2007.01)
C07K 14/705	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
C07K 14/005	(2006.01)
C07K 14/435	(2006.01)
C12N 15/113	(2010.01)
A61K 47/69	(2007.01)
A61K 48/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2010** **PCT/GB2010/000762**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010** **WO10119256**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2010** **E 10714058 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019** **EP 2419144**

(54) Título: **Composición para entrega de material genético**

(30) Prioridad:

17.04.2009 GB 0906693
17.04.2009 GB 0906692

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

SEOW, YIQI;
ALVAREZ, LYDIA y
WOOD, MATTHEW

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 749 393 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

Composición para entrega de material genético

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para la entrega de ácido nucleico o material genético. En particular, la presente invención se refiere a exosomas, cargados de material genético y métodos para producirlos.

Antecedentes de la invención

Los ácidos nucleicos se usan habitualmente en la terapia génica para el reemplazo de genes no funcionales [1] y para neutralización de mutaciones que causan enfermedades por moléculas efectoras de ARN de interferencia (ARNi) como los miARN [2], ARNhc [3] y ARNip [4]. Ya que el ADN y el ARN desnudos son difíciles de entregar *in vivo* debido al rápido aclaramiento [5], las nucleasas [6], la falta de distribución específica a órganos y la baja eficacia de la captación celular, generalmente se usan vehículos especializados de entrega de genes para la entrega.

A modo de antecedentes, la transferencia de exosomas de ácidos nucleicos a las células se ha descrito previamente [6a]. También se ha descrito la mejora de las propiedades inmunoestimuladoras de las vacunas exosómicas mediante la incorporación de la proteína G competente para la fusión del virus de la estomatitis vesicular [6b]. También se describió previamente la estabilidad de suero mejorada y las propiedades biofísicas de los ARNip después de las siguientes modificaciones químicas [6c]. El documento WO2003016522A2 describe métodos y compuestos para el direccionamiento de proteínas a exosomas [6d].

Los vectores virales y los liposomas catiónicos están a la vanguardia de la tecnología de vehículos de entrega y han sido relativamente exitosos con un gran número de estos vehículos de entrega ya en ensayos clínicos [7]. A pesar de estos éxitos, quedan limitaciones significativas que restringen muchas aplicaciones, de las cuales las más significativas son el reconocimiento inmune [8, 9, 10] para la mayoría de los vectores virales y la integración mutagénica [11] para virus como los lentivirus; y la toxicidad inflamatoria y el aclaramiento rápido de los liposomas [12, 13, 14, 15]. El reconocimiento por el sistema inmune innato conduce a respuestas inflamatorias graves, lo que puede requerir el uso de estrategias de inmunosupresión para superar los problemas de captación y readministración de las estrategias actuales [16, 17, 18] que exponen potencialmente a los pacientes a riesgos injustificados de infecciones oportunistas. Los anticuerpos generados contra los vehículos de entrega también disminuyen drásticamente la expresión del transgen en la administración posterior [19].

Los riesgos y limitaciones inherentes de las estrategias actuales generalmente las han limitado a enfermedades potencialmente mortales cuyos beneficios de la terapia superan claramente los riesgos, como la inmunodeficiencia combinada severa [20], a enfermedades en ambientes especiales, tales como sitios inmunoprivilegiados como el ojo [1], o para vacunación genética [21]. Sin embargo, para enfermedades genéticas que son crónicas y debilitantes pero no potencialmente mortales, tales como la distrofia miotónica, se requiere un perfil de riesgo mucho más bajo y la capacidad de mantener la terapia genética correctiva durante décadas, no años, para la intervención curativa. Un ejemplo de un riesgo potencialmente inaceptable para esta clase de enfermedades son las estrategias de inmunosupresión anteriormente discutidas, destacado por la muerte de un paciente sano en un reciente ensayo de terapia génica AAV para la artritis reumatoide debido a una infección oportunista causada por inmunosupresores [22] tomados por el sujeto sin el conocimiento de los administradores del ensayo. Con el creciente número de enfermedades que poseen un componente genético, incluyendo la obesidad, enfermedades del corazón y enfermedades psiquiátricas, existe un tremendo potencial para la modificación de genes de susceptibilidad para soluciones genéticas preventivas, pero solo si los riesgos se reducen aún más y se logra la sostenibilidad a largo plazo. Por lo tanto, es imperativo desarrollar tecnologías que sea capaces de evitar el reconocimiento inmune y la inflamación, mientras se mantienen buenas eficiencias de entrega, para expandir el uso de la terapia génica más allá de las enfermedades letales.

Una de las soluciones puede estar en el uso de exosomas para la entrega de genes. Los exosomas son pequeñas vesículas unidas a la membrana (30-100 nm) de origen endocítico que se liberan en el entorno extracelular después de la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. La producción de exosomas se ha descrito para muchas células inmunes incluyendo las células B, las células T y las células dendríticas (CD). Los exosomas derivados de linfocitos B y CD maduras expresan MHC-II, MHC-I, CD86 e ICAM-1 [23, 24], y se han usado para inducir respuestas citotóxicas T antitumorales específicas e inmunidad antitumoral en modelos experimentales y ensayos clínicos [24, 25]. El potencial de la entrega de genes mediada por exosomas se ha mostrado con la entrega de ARNm y miARN murinos a mastocitos humanos [26] y se ha demostrado que los exosomas derivados de glioma [27] transfieren ARNm producidos por plásmidos de ADN exógenos a células heterólogas, pero aún no se han demostrado carga y entrega de ADN exógeno, ARNip y otros oligonucleótidos modificados.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han cargado con éxito exosomas con material genético exógeno, y en particular ADN

plasmídico exógeno, ARNip y oligonucleótidos modificados. Por tanto, la presente invención se refiere a métodos para cargar exosomas como se caracteriza además más adelante con material genético exógeno, los exosomas cargados con tal material genético exógeno, y su uso en la entrega del ácido nucleico para la terapia génica y el silenciamiento génico.

Los presentes inventores también han introducido con éxito restos dirigidos en exosomas para que los exosomas puedan dirigirse a un tejido seleccionado. Por tanto, la presente invención se refiere a exosomas que tienen un resto dirigido expresado en su superficie como se caracteriza además más adelante. También se describen proteínas de fusión que comprenden proteínas transmembrana exosómicas y un resto dirigido, y construcciones de ácido nucleico que codifican tales proteínas de fusión. Los exosomas pueden cargarse con material genético exógeno, y usarse en la entrega del ácido nucleico para la terapia génica y el silenciamiento génico.

De acuerdo con este primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende un exosoma, en donde el exosoma comprende un resto dirigido expresado en su superficie, en donde el resto dirigido se expresa como una proteína de fusión con una proteína transmembrana exosómica, en donde el exosoma se carga con material genético exógeno.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición según el primer aspecto que comprende un exosoma que contiene material genético, en donde el exosoma se deriva de una célula dendrítica.

En otra realización, la invención proporciona un método para cargar exosomas con material genético que comprende proporcionar una composición de exosomas, y cargar los exosomas con material genético mediante electroporación, en donde los exosomas son como se definen en el primer aspecto.

En otra realización, la invención proporciona un método para cargar exosomas con material genético que comprende proporcionar una composición de exosomas y cargar los exosomas con ácido nucleico mediante transfección, usando un agente catiónico de transfección de liposomas, en donde los exosomas son como se definen en el primer aspecto.

Se describe una composición que comprende un exosoma, en donde tal exosoma comprende un resto dirigido expresado en la superficie del exosoma.

También se describe un polipéptido que comprende una proteína transmembrana exosómica, y un péptido dirigido heterólogo, en donde el péptido dirigido se une a un resto presente en la superficie de la célula a la que se dirige, y en donde cuando el polipéptido está presente en un exosoma, el péptido dirigido está presente en la superficie del exosoma.

También se describe una construcción polinucleotídica que codifica un polipéptido, en donde la construcción comprende polinucleótido que codifica una secuencia señal transmembrana exosómica 5', por ejemplo, un péptido señal dirigido al retículo endoplásmico ligado de manera operativa al polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención.

También se describe un método para dirigir un exosoma a un tejido o tipo de célula seleccionado que comprende someter a transfección una célula hospedadora con una construcción de polinucleótido según la invención, expresar la construcción en la célula hospedadora, y obtener exosomas de la célula hospedadora en la que se ha expresado la construcción.

Descripción de las figuras

Figura 1. Caracterización de exosomas de células dendríticas inmaduras: (a) Micrografías electrónicas de exosomas teñidos con acetato de uranilo al 2 % (exosomas teñidos negativamente); (b) Transferencia Western de exosomas sondados con anti-Lamp2, una proteína de membrana presente en los exosomas; (c) Mediciones del tamaño por dispersión de luz dinámica de exosomas purificados de células dendríticas en PBS a partir de 5 purificaciones diferentes

Figura 2. Transfección de células dendríticas: (a) Modificación de Lamp-2b para la transfección en células dendríticas. (SP = Péptido señal; TP = péptido dirigido; TM = transmembrana; CT = cola citoplasmática); (b) transferencia Western con antiFLAG o anti-Lamp2 en células dendríticas no sometidas a transfección (CTRL) o célula sometida a transfección con pLamp2b-FLAG (FLAG-Lamp2b) y los exosomas recolectados de estas células; (c) qRT-PCR de células dendríticas sometidas a transfección con pLamp2b-MSP, -RVG o nada usando cebadores específicos para las secuencias de MSP y RVG; (d) transferencias Western con anti-Lamp 1 después de la incubación de exosomas normales y exosomas de FLAG con perlas anti-FLAG o perlas anti-AGOI (control no unión) en un ensayo de precipitación (*pulldown*) de exosoma; (e) Mediciones del tamaño por dispersión de luz dinámica de exosomas de MSP purificados.

Figura 3. Electroporación de plásmido con exosoma seguido de ensayo de protección de DNasa: (a) Ensayo de protección de DNasa en diversos tratamientos de exosomas y el plásmido pEGFP-NAD. El ADN lineal se realizó cortando pEGFP-NAD con EcoRI. (Pre = exosomas sometidos previamente a electroporación antes de la adición del plásmido) (b) Comparación de la degradación de DNasa por DNasa con plásmido circular en diferentes

configuraciones de electroporación. (c) Ensayo de protección de DNasa después de la transfección de pEGFP-NAD con diferentes reactivos de transfección. (d) Ensayo de protección de DNasa después de la transfección de exosomas con reactivos de transfección 1-3 y pEGFP-NAD (véase materiales y métodos).

Figura 4. Entrega de pEGFP-NAD mediada por exosoma en las células: (a) Transfección de células Neuro2A con exosomas de tipo silvestre y exosomas que expresan RVG-Lamp2b (exosomas de RVG) sometidos a transfección con pEGFP-NAD en comparación con el plásmido solo después del tratamiento con DNasa. (b y c) cuantificación de qRT-PCR del factor de cambio de eGFP después de la transfección con, exosomas de RVG o MSP normales sobre solo el reactivo de transfección.

Figura 5. Atenuación (*Knockdown*) de GAPDH con entrega de ARNip mediada por exosoma: (a, b) Imágenes representativas del ARNip de GAPDH marcado con Cy5 aplicado a células Neuro2A (a) y C2C12 (b) con exosomas normales o modificados. Se añadieron exosomas no sometidos a electroporación y ARNip como controles. (c, d) qPCR de los niveles de GAPDH en células Neuro2A y células C2C12 recolectadas 2 días después de la transfección con ARNip solo (ARNip), ARNip con lipofectamina 2000 (Invitrogen) (ARNip+LP), exosomas normales (Exosomas), exosomas de MSP (MSP exos) y exosomas de RVG (RVG exos). (* $p < 0,05$) (e, f) Transferencias Western representativas de los niveles de GAPDH después de transfecciones similares.

Figura 6. Atenuación de ciclofilina B con entrega de ARNip mediada por exosoma: (a, b) qPCR de los niveles de ciclofilina B en células Neuro2A y células C2C12 recolectadas 2 días después de la transfección con ARNip solo (ARNip), ARNip con lipofectamina 2000 (Invitrogen) (ARNip+LP), exosomas normales (Exosomas), exosomas de MSP (MSP exos) y exosomas de RVG (RVG exos). (* $p < 0,05$) (c, d) Transferencias Western representativas de los niveles de ciclofilina B después de transfecciones similares.

Figura 7. Retención de ARNip marcado con Cy3 y Cy5 después de la electroporación con exosomas
a, La fluorescencia se correlaciona linealmente con la masa de ARNip. **b y c**, Masa absoluta de ARNip marcado retenido después de **b**, 3 µg de ARNip se sometieron a electroporación con 3 µg p.e. de exosomas de RVG en 200 µl de tampón en la configuración mostrada en el eje x; **c**, 3 µg de ARNip se sometieron a electroporación con 3 µg p.e. de exosomas RVG a 400V 125 µF en el volumen de tampón que se muestra en el eje x. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Figura 8. Entrega de oligonucleótidos 2'-OMe y morfolinos con exosomas normales: Imágenes de fluorescencia de células C2C12 24 horas después de transfección de (a) oligonucleótidos 2'-OMe marcados con Cy3 o (b) PMO con o sin exosomas.

Figura 9. La entrega *in vivo* de ARNip con exosomas dirigidos da como resultado la atenuación de genes específicos del SNC: a, b, c, d, qPCR de GAPDH en el cuerpo estriado, mesencéfalo, córtex, músculo cuádriceps, bazo, hígado, riñón y corazón de ratones 3 días después de la inyección intravenosa de 150 µg de ARNip de GAPDH desnudo o ARNip encapsulado en exosomas no modificados, exosomas de MSP o exosomas de RVG normalizados a controles no tratados (100%). **e**, qPCR de GAPDH de ARN extraído del cuerpo estriado, la corteza y el mesencéfalo de ratones no tratados (control) o ratones inyectados con exosomas de RVG vacíos por vía intravenosa dos veces el día 1 y el día 8 y, luego, con ARNip de GAPDH encapsulado en exosoma de RVG (150 µg) el día 22 antes de sacrificar a los ratones el día 25 (3 inyecciones), **f, g**, qPCR de GAPDH y transferencia Western representativa de ratones inyectados con ARNip encapsulado en exosoma de RVG (150 µg) en 2 ocasiones separadas 6 y 3 días antes del sacrificio. Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con 150 µg de cada uno de los dos ARNip de BACE-1 encapsulados en 150 µg de exosomas de RVG 3 días antes del sacrificio y las secciones corticales se analizaron con **i**, qPCR de BACE-1, **h**, transferencia Western de BACE-1 y **j**, ELISA de β-amiloide 1-42. Toda la qPCR se normalizó a los niveles de ARN 18S. * indica $p < 0,05$ frente a control no tratado. Se inyectaron 3 ratones en cada grupo de muestra y todas las barras de error reflejan la desviación estándar (n=3).

Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a exosomas como se caracterizaron anteriormente, y su uso como vehículos de entrega de genes. Los exosomas son pequeñas vesículas unidas a la membrana de origen endocítico que se liberan en el entorno extracelular después de la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. Por tanto, La presente solicitud se dirige a una composición que comprende tales exosomas. Normalmente, Los exosomas tienen un diámetro de entre 30 y 100 nm pero pueden incluir partículas de membrana de origen similar de hasta 200 nm. Los exosomas, como se usan en el presente documento, se refieren a nanopartículas de origen endosómico que son secretadas a partir de cuerpos multivesiculares.

Los exosomas son producidos por muchos tipos diferentes de células incluyendo células inmunes como los linfocitos B, los linfocitos T, las células dendríticas (CD) y la mayoría de las células. También se producen exosomas, por ejemplo, por células de glioma, plaquetas, reticulocitos, neuronas, células epiteliales intestinales y células tumorales. Los exosomas para usar de acuerdo con la presente solicitud pueden derivarse de cualquier célula adecuada, incluyendo las celdas anteriormente identificadas. Los exosomas también se han aislado de fluidos fisiológicos, tales como el plasma, la orina, el líquido amniótico y los derrames malignos.

Los exosomas pueden derivarse de CD, preferentemente CD inmaduras. Los exosomas producidos a partir de CD inmaduras no expresan MHC-II, MHC-I o CD86. Como tales, tales exosomas no estimulan los linfocitos T no tratados en un grado significativo y son incapaces de inducir una respuesta en una reacción linfocítica mixta. Por tanto, los exosomas producidos a partir de células dendríticas inmaduras son candidatos ideales para su uso en la entrega de material genético, particularmente para su uso *in vivo*, por ejemplo, en la terapia génica.

Por tanto, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, se proporcionan exosomas como se caracterizó anteriormente y derivados de células dendríticas para su uso en la entrega *in vivo* de material genético.

Los exosomas se pueden obtener de cualquier célula madre derivada del paciente autóloga, emparejada a haplotipo heterólogo o heterólogas para reducir o evitar la generación de una respuesta inmune en un paciente al que se entregan los exosomas. Se puede utilizar cualquier célula productora de exosoma para este propósito específico.

Como se describió anteriormente, los exosomas son producidos por muchos tipos diferentes de célula y también han sido aislados de fluidos fisiológicos. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, los exosomas se pueden obtener de cualquier tipo de célula adecuado como se discutió anteriormente, o por aislamiento de fluidos fisiológicos. Normalmente, los métodos comprenden el aislamiento de los exosomas del medio de cultivo celular o del sobrenadante tisular.

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

De acuerdo con la presente invención, los exosomas están cargados con material genético exógeno. En particular, de acuerdo con la presente invención, los exosomas se preparan y luego se cargan con el material genético deseado para la entrega.

El material genético adecuado para la entrega incluye plásmido de ADN exógeno y ARNip. El material genético adecuado también incluye oligonucleótidos modificados y otros restos efectores de ARN de interferencia tales como miARN y ARNhc. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el material genético cargado en el exosoma no es material genético que normalmente está asociado con los exosomas, por ejemplo, el ácido nucleico preferentemente no es un ARNm o un miARN que se incorpora a un exosoma en su producción a partir de una célula. En particular, La presente invención se refiere a la capacidad de cargar material genético en una preparación de exosoma que ya ha sido aislada de las células. Por tanto, el material genético exógeno se refiere al material genético inclusivo de ácidos nucleicos que normalmente no está asociado con los exosomas. En las realizaciones particularmente preferidas, el material de ácido nucleico es ADN plasmídico u otros ácidos nucleicos tales como ARNip y oligonucleótidos modificados que no se encuentran normalmente en exosomas.

Los ácidos nucleicos para su incorporación a los exosomas pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Los ácidos nucleicos monocatenarios incluyen aquellos con química de la cadena principal con fosfodiéster, 2'O-metilo, 2 'metoxi-etilo, fosforamidato, metilfosfonato y/o fosforotioato. Normalmente, se introducen ácidos nucleicos bicatenarios que incluyen, por ejemplo, ADN plasmídico y ARN interferente pequeño (ARNip).

El material genético a cargar en los exosomas se elige sobre la base del efecto deseado de ese material genético en la célula en la que se pretende entregar y el mecanismo por el cual se lleva a cabo ese efecto. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser útil en terapia génica, por ejemplo, para expresar un gen deseado en una célula o grupo de células. Tal ácido nucleico está normalmente en forma de ADN plasmídico o vector viral que codifica el gen deseado y está ligado de manera operativa a secuencias reguladoras apropiadas tales como promotores, potenciadores y similares de tal manera que el ADN plasmídico se exprese una vez que se ha entregado a las células a tratar. Los ejemplos de enfermedades susceptibles a la terapia génica incluyen hemofilia B (Factor IX), fibrosis quística (CTFR) y atrofia muscular espinal (SMN-1).

El ácido nucleico también se puede usar, por ejemplo, en inmunización para expresar uno o más antígenos contra los cuales se desea producir una respuesta inmune. Por tanto, el ácido nucleico a cargar en el exosoma puede codificar uno o más antígenos contra los cuales se desea producir una respuesta inmune, incluyendo,pero sin limitación, antígenos tumorales, antígenos de patógenos tales como patógenos virales, bacterianos o fúngicos.

El ácido nucleico también se puede usar en el silenciamiento génico. Tal silenciamiento génico puede ser útil en la terapia para desactivar la expresión génica aberrante o en estudios con modelo animal para crear una o más inactivaciones genéticas. Normalmente, tal ácido nucleico se proporciona en forma de ARNip. Por ejemplo, las moléculas de ARNi, incluyendo los ARNip, se pueden usar para atenuar DMPK con múltiples repeticiones CUG en células musculares para el tratamiento de la distrofia miotónica. En otros ejemplos, los plásmidos que expresan ARNhc que reduce el gen mutante de Huntington (htt) responsable de la enfermedad de Huntington se pueden entregar con exosomas neuronales específicos. Otros genes diana incluyen BACE-1 para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Algunos genes cancerosos también pueden ser dirigidos con ARNip o ARNhc, tal como ras, c-myc y VEGFR-2. Los exosomas cargados con ARNip dirigidos al cerebro pueden ser particularmente útiles en el silenciamiento de BACE-1 en la enfermedad de Alzheimer, el silenciamiento de alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson, el silenciamiento de htt en la enfermedad de Huntington y el silenciamiento de la caspasa-3 neuronal usada

en el tratamiento del accidente cerebrovascular para reducir el daño isquémico.

Se pueden usar oligonucleótidos modificados antisentido que incluyen compuestos 2'-O-Me y PNA. Por ejemplo, tales oligonucleótidos se pueden diseñar para inducir la omisión de exón, por ejemplo, el gen de la distrofina mutante se puede entregar a las células musculares para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, oligonucleótidos antisentido que inhiben las horquillas, por ejemplo, en el tratamiento de la distrofia miotónica y oligonucleótidos de corte y empalme trans, por ejemplo, para el tratamiento de la atrofia muscular espinal.

El material genético exógeno se puede introducir en los exosomas mediante un número de técnicas diferentes. En realizaciones particularmente preferidas de la invención, los exosomas se cargan mediante electroporación o mediante el uso de un reactivo de transfección. Los presentes inventores han identificado que a pesar del pequeño tamaño de los exosomas, todavía es posible usar la electroporación para cargar los exosomas con el material genético exógeno. Esto es sorprendente en vista del pequeño tamaño de los exosomas en comparación con las células. La extrapolación de los voltajes usados para la electroporación de las células para tener en cuenta el tamaño de los exosomas sugeriría que se requerirían voltajes excesivamente altos para la electroporación de los exosomas. Sorprendentemente, sin embargo, los presentes inventores han identificado que es posible usar la electroporación para cargar exosomas con ADN plasmídico y ARNip. Los voltajes típicos están en el intervalo de 20V/cm a 1.000V/cm, tales como 20V/cm a 100V/cm con capacitancia normalmente entre 25 μF y 250 μF, tal como entre 25 μF y 125 μF.

En un aspecto alternativo de la presente invención, los inventores también han identificado que es posible cargar exosomas usando agentes de transfección. A pesar del pequeño tamaño de los exosomas, Los agentes de transfección convencionales pueden usarse para la transfección de exosomas con material genético. Los reactivos de transfección preferidos para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen liposomas catiónicos.

Direccionamiento

La presente invención también se refiere al direccionamiento de exosomas a un tipo de célula o tejido deseado. Este direccionamiento se logra al expresar en la superficie del exosoma un resto dirigido que se une a un resto de la superficie celular expresado en la superficie de la célula a la que se dirige. El resto dirigido es un péptido que se expresa como una proteína de fusión con una proteína transmembrana expresada en la superficie del exosoma.

Con más detalle, los exosomas pueden dirigirse a tipos de células o tejidos particulares que expresan en su superficie un resto dirigido tal como un péptido. Los péptidos adecuados son aquellos que se unen a restos de la superficie celular tales como receptores o sus ligandos que se encuentran en la superficie celular de la célula a la que se dirige. Ejemplos de restos dirigidos adecuados son péptidos cortos, scFv y proteínas completas, siempre que el resto dirigido pueda expresarse en la superficie del exosoma y no interfiera con la inserción de la proteína de membrana en el exosoma. Normalmente, el péptido dirigido es heterólogo a la proteína exosómica transmembrana. Los restos dirigidos peptídicos pueden tener normalmente menos de 100 aminoácidos de longitud, por ejemplo, menos de 50 aminoácidos de longitud, menos de 30 aminoácidos de longitud, a una longitud mínima de 10, 5 o 3 aminoácidos.

Los restos dirigidos se pueden seleccionar para marcar tipos de tejido particulares, como músculos, cerebro, hígado, páncreas y pulmón, por ejemplo, o para marcar un tejido enfermo tal como un tumor. En una divulgación, los exosomas están dirigidos al tejido cerebral.

Ejemplos específicos de restos dirigidos incluyen péptidos específicos de músculo, descubiertos por la presentación en fagos, [33] para dirigirse músculo esquelético, se puede usar un fragmento de 29 aminoácidos de la glucoproteína del virus de la rabia que se une al receptor de la acetilcolina [36] o un fragmento del factor de crecimiento neural que se dirige a su receptor [37] para marcar neuronas y el péptido de secretina que se une al receptor de secretina para marcar los epitelios biliares y pancreáticos [38]. Como alternativa, también se pueden expresar inmunoglobulinas y sus derivados, incluyendo fragmentos de anticuerpo scFv como una proteína de fusión para dirigirse a antígenos específicos, tal como VEGFR para la terapia génica del cáncer. Como alternativa, los ligandos naturales para receptores se pueden expresar como proteínas de fusión para conferir especificidad, tal como NGF que se une a NGFR y confiere un direccionamiento específico a neuronas.

El resto dirigido peptídico se expresa en la superficie del exosoma expresándolo como una proteína de fusión con una proteína transmembrana exosómica. Se sabe que un número de proteínas están asociadas con los exosomas; es decir, se incorporan al exosoma a medida que se forma. Las proteínas preferidas para su uso de acuerdo con la presente invención son aquellas que son proteínas transmembrana. Ejemplos incluyen, pero sin limitación, Lamp-1, Lamp-2, CD13, CD86, Flotillin, Sintaxin-3, CD2, CD36, CD40, CD40L CD41a, CD44, CD45, ICAM-1, Integrina alfa4, LiCAM, LFA-1, Mac-1 alfa y beta, Vti-1A y B, CD3 épsilon y zeta, CD9, CD18, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CXCR4, FcR, GluR2/3, HLA-DM (MHC II), inmunoglobulinas, Componentes MHC-I o MHC-II, TCR beta y tetraspaninas. En realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, la proteína transmembrana se selecciona de Lamp-1, Lamp-2, CD13, CD86, Flotillin, Sintaxin-3. En una realización particularmente preferida, la proteína transmembrana es Lamp-2. La secuencia de Lamp-2 se expone en la SEQ ID No 1.

La siguiente sección se refiere a las características generales de todos los polipéptidos descritos en el presente

documento, y en particular a las variaciones, alteraciones, modificaciones o derivaciones de la secuencia de aminoácidos. Se entenderá que tales variaciones, alteraciones, modificaciones o derivaciones de polipéptidos como se describen en el presente documento están sujetas al requisito de que los polipéptidos retengan cualquier actividad o característica adicional requerida como se puede especificar en secciones posteriores de esta descripción.

Las variantes de polipéptidos pueden definirse por niveles particulares de identidad de aminoácidos que se describen con más detalle en secciones posteriores de esta descripción. La identidad de aminoácidos se puede calcular usando cualquier algoritmo adecuado. Por ejemplo, los algoritmos PILEUP y BLAST se pueden usar para calcular secuencias de homología o alineación (como identificar secuencias equivalentes o correspondientes (normalmente en su configuración predeterminada), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F. (1993) *J. Mol. Evol.* 36:290-300; Altschul, S., F. y col (1990) *J. Mol. Biol*. 215:403-10. El programa informático para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través del "National Center for Biotechnology Information" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Este algoritmo implica primero identificar un par de secuencia de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que coincidan o satisfagan alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere como el umbral de la puntuación de palabra cercano (Altschul *y col*., *supra*). Estas correspondencias de palabra cercana iniciales actúan como semillas para iniciar investigaciones para encontrar HSP que las contienen. Las correspondencias de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Las extensiones de las correspondencias de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o inferior, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 89:10.915-10.919) alineaciones (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M=5, N= 4, y una comparación de ambas cadenas.

el algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90:5.873-5.787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que se daría una coincidencia entre dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menos de aproximadamente 1, preferentemente menos de aproximadamente 0,1, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01 y más preferentemente menos de aproximadamente 0,001. Como alternativa, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo, usado en su configuración por defecto) (Devereux *y col.* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 387-395).

Se entenderá que las variantes de polipéptidos también incluyen variantes de sustitución. Las variantes de sustitución implican preferentemente el reemplazo de uno o más aminoácidos con el mismo número de aminoácidos y realizar sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, un aminoácido puede estar sustituido con un aminoácido alternativo que tiene propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido cargado, otro aminoácido hidrófilo, otro aminoácido hidrófobo, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático. Algunas propiedades de los 20 aminoácidos principales que se pueden usar para seleccionar sustituyentes adecuados son las siguientes:

Ala	alifática, hidrófoba, neutra	Met	hidrófoba, neutra
Cys	polar, hidrófoba, neutra	Asn	polar, hidrófila, neutra
Asp	polar, hidrófila, cargada (-)	Pro	hidrófoba, neutra
Glu	polar, hidrófila, cargada (-)	Gln	polar, hidrófila, neutra
Phe	aromática, hidrófoba, neutra	Arg	polar, hidrófila, cargada (+)
Gly	alifática, neutra	Ser	polar, hidrófila, neutra
His	aromática, polar, hidrófila, cargada (+)	Thr	polar, hidrófila, neutra
Ile	alifática, hidrófoba, neutra	Val	alifática, hidrófoba, neutra
Lys	polar, hidrófila, cargada (+)	Trp	aromática, hidrófoba, neutra
Leu	alifática, hidrófoba, neutra	Tyr	aromática, polar, hidrófoba

La secuencia de aminoácidos de los polipéptidos para su uso en la invención puede modificarse para incluir productos químicos de no origen natural o para aumentar la estabilidad y la especificidad del direccionamiento del compuesto. Cuando los polipéptidos se producen por medios sintéticos, tales aminoácidos pueden introducirse durante la producción. Los polipéptidos también pueden modificarse después de la producción sintética o recombinante.

Se conocen un número de modificaciones de la cadena lateral en la técnica y se pueden hacer a las cadenas laterales de los polipéptidos, sujetas a los polipéptidos que retienen cualquier actividad o característica adicional requerida como se puede especificar en el presente documento.

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

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

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

El fragmento del polipéptido Lamp-2 utilizado es normalmente de al menos 55 aminoácidos, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de longitud.

La proteína transmembrana exosómica se modifica para incorporar un resto dirigido. Por tanto, la proteína transmembrana exosómica se expresa como una proteína de fusión que comprende el resto dirigido. El resto dirigido se incorpora a la proteína transmembrana de modo que se coloca en la porción de la proteína transmembrana presente en la superficie de los exosomas. La proteína transmembrana exosómica puede ser Lamp-2 y el resto dirigido puede expresarse como una proteína de fusión, en donde el resto dirigido está presente cerca del extremo N-terminal de la proteína Lamp-2, por ejemplo, dentro de 30, o dentro de 20 aminoácidos del aminoácido terminal N de Lamp-2, sin incluir la secuencia señal.

Se pueden proporcionar secuencias espaciadoras o enlazadoras entre el resto dirigido y el resto de la proteína transmembrana, por ejemplo, para evitar la interferencia del resto dirigido en el plegamiento de la proteína transmembrana.

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

La proteína transmembrana puede ser Lamp-2 y el resto dirigido puede estar presente en o cerca del extremo N de la proteína, separado de Lamp-2 con secuencias enlazadoras.

En la práctica de la presente invención, el resto dirigido se introduce al exosoma expresando la proteína de fusión que comprende el resto dirigido y la proteína transmembrana exosómica dentro de una célula usada para producir los exosomas. La expresión de esta proteína de fusión en la célula, permite que la proteína de fusión se incorpore en el exosoma a medida que se produce a partir de la célula.

Por ejemplo, una construcción polinucleotídica tal como un plásmido de ADN, que expresa la proteína de fusión se somete a transfección en la célula. Se puede usar cualquier método adecuado para la introducción de la construcción polinucleotídica en la célula. La construcción polinucleotídica incluye secuencias promotoras adecuadas para que la proteína de fusión codificada se exprese en la célula. Las secuencias de péptido señal también se incluyen para que la proteína se incorpore a la membrana del retículo endoplásmico a medida que se produce. Luego, la proteína de membrana se exporta posteriormente al compartimento exosómico/lisómico antes de su incorporación al exosoma. La secuencia señal es normalmente una secuencia de péptido señal para una proteína transmembrana exosómica. Por ejemplo, la secuencia de péptido señal se deriva preferentemente de Lamp-2, por ejemplo, como se muestra en los ejemplos.

Las células preferidas para la producción de exosomas se analizaron anteriormente con más detalle. Normalmente, una celda preferida, tal como las células dendríticas inmaduras se someten a transfección con una construcción polinucleotídica como se ha descrito anteriormente, de modo que la proteína de fusión de la invención se expresa en la célula. Luego, los exosomas producidos por la célula pueden ser recogidos. Tales exosomas tienen la proteína de fusión insertada en la membrana de modo que los exosomas se dirigen al tejido o tipo de célula deseado a través del resto dirigido.

Los exosomas producidos a partir de células se pueden recoger del medio de cultivo mediante cualquier método adecuado. Normalmente, una preparación de exosomas se puede preparar a partir de sobrenadante de cultivo celular o tejido mediante centrifugación, filtración o combinaciones de estos métodos. Por ejemplo, los exosomas se pueden preparar mediante centrifugación diferencial, es decir, centrifugación a baja velocidad (<20.000 g) para aglomerar partículas más grandes seguido de una centrifugación a alta velocidad (>100.000 g) para aglomerar exosomas,

filtración de tamaño con filtros apropiados (por ejemplo, filtro de 0,22 µm), ultracentrifugación por gradiente (por ejemplo, con gradiente de sacarosa) o una combinación de estos métodos.

De acuerdo con un aspecto preferido de la presente invención, los exosomas dirigidos están cargados de material genético exógeno. En particular, de acuerdo con la presente invención, los exosomas se preparan con un resto dirigido como se describe en el presente documento y luego se cargan con el material genético deseado para la entrega o como se describió anteriormente.

No es necesario incluir un resto dirigido específico en el exosoma. Por ejemplo, los exosomas se pueden administrar directamente al sitio donde se requiere terapia. Como alternativa, por ejemplo, donde los exosomas contienen material genético que codifica inmunógenos, puede que no sea requerido que se dirija a un sitio específico y la administración, por ejemplo, la administración intradérmica o muscular puede ser suficiente para generar la respuesta inmune deseada sin exosomas dirigidos a ningún tipo de célula específico.

Se describen exosomas en los que no se incluye un resto dirigido en la superficie de los exosomas. Sin embargo, luego, los exosomas se seleccionan de manera que tengan más probabilidades de marcar un tipo de tejido específico. Por ejemplo, Los exosomas derivados de diferentes células pueden tener afinidades naturales por subtipos de células específicos según lo requiera su función fisiológica tal como la afinidad bien establecida de los exosomas derivados de células dendríticas maduras por las células T. Esta afinidad se puede utilizar para administrar específicamente la carga anteriormente mencionada a un tejido.

Entrega/Administración

Las composiciones de la invención se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado. La administración a un sujeto humano o animal puede seleccionarse entre administración parenteral, intramuscular, intracerebral, intravascular, subcutánea o transdérmica. Normalmente, el método de administración es por inyección. Preferiblemente, la inyección es intramuscular o intravascular (por ejemplo, intravenosa). Un médico será capaz de determinar la vía de administración requerida para cada paciente particular.

La composición se puede formular para administración parenteral, intramuscular, intracerebral, intravascular (incluido intravenoso), subcutánea o transdérmica. Las composiciones para la administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Las composiciones de la invención se pueden formular en una composición farmacéutica, la cual puede incluir portadores farmacéuticamente aceptables, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y similares, además de los exosomas.

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

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos encontrados convencionalmente en las composiciones farmacéuticas. Por tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos adicionales compatibles o pueden contener materiales adicionales útiles para formular físicamente diversas formas farmacéuticas de la composición de la presente invención, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizadores. Sin embargo, tales materiales, cuando se añaden, no deberían interferir excesivamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones proporcionadas en el presente documento.

Se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición. La dosis puede determinarse según varios parámetros, especialmente según la gravedad de la afección, la edad y el peso del paciente a tratar; la vía de administración; y el régimen requerido. Un médico será capaz de determinar la vía de administración requerida y la dosificación para cualquier paciente particular. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de las construcciones individuales y, en general, pueden estimarse en función de las CE50 que resulten eficaces. *in vitro* y en modelos animales *in vivo*. En general, la dosis es de 0,01 mg/kg a 100 mg por kg de peso corporal. Una dosis diaria típica es de aproximadamente 0,1 a 50 mg por kg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, según la potencia de la construcción específica, la edad, el peso y las condiciones del sujeto a tratar, la gravedad de la enfermedad y la frecuencia y la vía de administración. Se pueden administrar diferentes dosis de la construcción dependiendo de si la administración es mediante inyección intramuscular o inyección sistémica (intravenosa o subcutánea). Preferentemente, la dosis de una sola inyección intramuscular está en el intervalo de aproximadamente 5 a 20 µg. Preferentemente, la dosis de inyecciones sistémicas únicas o múltiples está

en el intervalo de 10 a 100 mg/kg de peso corporal.

Debido al aclaramiento de la construcción (y la descomposición de cualquier molécula dirigida), el paciente puede tener que ser tratado repetidamente, por ejemplo, una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente. Los expertos en la técnica pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosificación en función de los tiempos de residencia medidos y las concentraciones de la construcción en fluidos o tejidos corporales. Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable tener el paciente sometido a una terapia de mantenimiento, en la que la construcción se administra en dosis de mantenimiento, que va desde 0,01 mg/kg a 100 mg por kg de peso corporal, una o más veces al día, a una vez cada 20 años.

La invención se describe más adelante en el presente documento con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Nuestro objetivo fue determinar si los exosomas se pueden producir de forma reproducible a partir de células dendríticas recolectadas de médula ósea murina. Usando un protocolo modificado de Quah *y col.* [28], las células de la médula ósea se recolectaron de fémures de ratones C57BL/6, disociados con trituración suave y se cultivaron en presencia de medio de CD (consúltese materiales y métodos) con 10 ng/ml de GM-CSF, que estimula la proliferación de células progenitoras. Las células no adherentes se separaron después de 4 días, dejando células dendríticas en cultivo. Después de 7 días, se separa GM-CSF y se añade medio de CD nuevo sin GM-CSF para aislar los exosomas. Los exosomas se recolectan diariamente durante los próximos 2 días mediante centrifugación del sobrenadante de cultivo, primero a 10.000 g para separar los restos celulares, luego a 120.000 g para aglomerar exosomas. Luego, los exosomas se resuspenden en una cantidad apropiada de tampón de acetato de amonio 0,1M.

Los exosomas producidos fueron consistentes y físicamente homogéneos, con una distribución de tamaño que alcanzaba un máximo de 80 nm de diámetro según lo determinado por microscopía electrónica (Figura 1a), Western con un anticuerpo contra una proteína exosómica (Lamp2b) (Figura 1b) y dispersión de luz dinámica (Figura 1c).

Se requiere transfección de un ligando dirigido para alterar la especificidad de los exosomas con el fin de marcar eficazmente los tipos de células deseados. La figura 2a ilustra cómo se inserta un ligando dirigido en Lamp2b. Ya que es una proteína de membrana tipo I con un extremo N predicho para sobresalir del exosoma, el ligando dirigido necesita estar unido al extremo N después del péptido señal. El péptido señal es necesario para la inserción de la membrana pero se separa en la proteína madura. Además, el péptido dirigido está flanqueado por enlazadores (Ala-Arg-{Péptido dirigido}-Ser-Gly-Gly) para evitar que el péptido dirigido influya en el plegamiento de la proteína Lamp2b. En última instancia, el péptido dirigido debería estar ubicado en la superficie externa de los exosomas, confiriendo así capacidades de direccionamiento a los exosomas Tres péptidos diferentes - el péptido de la glucoproteína viral de la rabia específica a neurona (RVG) (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG) [32], un péptido específico de músculo (MSP) identificado por presentación en fagos *in vivo* (ASSLNIA) [33], y un epítopo FLAG - se clonaron por separado en Lamp2b y se sometieron a transfección en las células dendríticas 4 días antes de la purificación del exosoma. Tanto MSP como RVG se seleccionaron para la especificidad de órgano, mientras que el epítopo FLAG en el sitio de ligando dirigido se usó para Lamp2b modificado diferenciado y Lamp2b exógeno no modificado. Un obstáculo importante para la capacidad de expresar ligandos dirigidos en la superficie de los exosomas es que las células dendríticas primarias son difíciles de someter a transfección y pueden potencialmente diferenciarse después de la transfección. La infección con vectores virales tampoco es ideal ya que es probable que el virus active las células dendríticas [30], produciendo así moléculas inmunoestimuladoras que se incorporarán a los exosomas resultantes. Por lo tanto, se ensayaron un número de reactivos de transfección y se seleccionó el reactivo TransIT-LT1 de Mirus Bio ya que parecía someter eficientemente a transducción a las células dendríticas, con un aumento de 49.900 veces en el ARNm de eGFP normalizado a GAPDH murino durante la adición por pEGFP-NAD, un plásmido que expresa eGFP, solo sin reactivos de transfección. Más importante, esta transfección no parece activar significativamente las células dendríticas en función de la observación de la morfología celular. Las células dendríticas inmaduras son células compactas redondeadas con bajas relaciones de área de superficie y volumen, mientras que las células dendríticas activadas tienen extensiones dendríticas características y grandes relaciones de área de superficie y volumen [31].

Mientras tanto, la transferencia Western contra el ligando FLAG demuestra claramente que FLAG-Lamp2b (115 kDa) se expresa en células dendríticas y los exosomas correspondientes después de la transfección de pLamp2b-FLAG pero no en células y exosomas normales (Figura 2b). La expresión de MSP-Lamp2b y RVG-Lamp2b se verificó con qRT-PCR de células dendríticas sometidas a transfección con pLamp2b-MSP y pLamp2b-RVG usando cebadores específicos para las secuencias de MSP y RVG (Figura 2c).

Ya que la topología de Lamp2b en exosomas era desconocida, se diseñó un ensayo de precipitación (*pulldown*) con perlas anti-FLAG para establecer la orientación del epítopo dirigido. El anticuerpo anti-FLAG o un anticuerpo no específico (Ago1) se unió a perlas de proteína A Sefarosa (Sigma). Luego, Estas perlas se incubaron con exosomas no modificados o FLAG antes de 3 lavados para separar los no aglutinantes. Si el epítopo FLAG fuera exclusivamente interno e inaccesible para el anticuerpo, ni los exosomas no modificados ni de FLAG deberían estar retenidos sobre las perlas; si el epítopo de FLAG fuera externo, los exosomas de FLAG estarían retenidos pero no los exosomas no

modificados. Después de precipitación, los exosomas retenidos se desnaturalizaron y se detectaron mediante transferencia Western contra LAMP-1, otra proteína exosómica que sirve como marcador de la presencia de exosomas. La transferencia Western para Lamp1, otra proteína específica de exosoma, mostró retención incrementada de los exosomas de FLAG por perlas antiFLAG pero no por perlas de control anti-Ago-1 (no específicas) (Figura 2d). Este resultado demuestra que el resto dirigido se localiza en la superficie exosómica externa y valida su potencial de direccionamiento. Estas modificaciones no parecen afectar a las propiedades físicas de los exosomas modificados en función de la dispersión de luz dinámica de los exosomas de MSP (Figura 2e).

Protocolo: Transfección de células dendríticas

La transfección de las células dendríticas se realizó con 5 µg de derivados de pEGFP-NAD o pLamp2b y 5 µl de reactivo de transfección TransIT LT1 (Mirus Bio) en una placa de 6 pocillos con 10^6 células el día 4 después de la recolección. El medio se cambia el día 7 y los exosomas se aíslan del sobrenadante de cultivo el día 8.

Protocolo: Transfección y electroporación con exosomas y ensayo de protección de DNasa

Para los siguientes experimentos, se usó un plásmido que expresa EGFP, pEGFP-NAD, como carga de ADN, se usaron anti-ARNip de GAPDH marcado con Cy5 y anti-ciclofilina B de ratón sin marcar como carga de ARN y se usaron un oligonucleótido 2'-OMe marcado con Cy3 y un morfolino marcado con Cy3 diseñado para omitir exones en ratones mdx (regalo de Haifang Yin).

Los pEGFP-NAD circulares y linealizados se sometieron a electroporación con exosomas y luego se expusieron a DNasa I durante 10 minutos. Si el ADN se cargaba con éxito en los exosomas, la DNasa sería incapaz de digerir el ADN ya que es incapaz de acceder al interior de los exosomas; por el contrario, si el ADN no se encuentra dentro de los exosomas, la presencia de DNasa dará como resultado la degradación del ADN y la pérdida de una señal plasmídica. Cuando se realizó un ensayo de protección de DNasa en ADN plasmídico, la electroporación con exosomas parece proteger el plásmido circular de ADN de la degradación pero no el ADN lineal (Figura 3a) y esa capacitancia más baja parece aumentar la captación de ADN en los exosomas (Figura 3b). Para excluir la posibilidad de que los factores liberados de los exosomas mediante electroporación inhiban la actividad de la DNasa, se añadió ADN a los exosomas sometidos previamente a electroporación como control. Además de eso, parece que la fracción superenrollada está protegida preferentemente (banda superior). Esto puede deberse a que los exosomas son en sí mismos de 20-30 nm, pero un plásmido circular abierto de 1868 nt de longitud puede tener más de 100 nm de diámetro, mientras que un plásmido superenrollado es más compacto y ocupa un volumen significativamente menor [34], por lo tanto, los plásmidos superenrollados están preferentemente protegidos.

La dificultad de encontrar un protocolo de electroporación adecuado se destaca por resultados inconsistentes y, a menudo, bajo nivel de protección incluso cuando tiene éxito (resultados no mostrados). La condensación artificial de ADN con espermina dio como resultado una protección reducida de DNasa (resultados no mostrados), posiblemente porque la concentración de espermina usada es extremadamente crítica en la producción de condensados del tamaño correcto [35]. Se da demasiada poca condensación y nada, pero se forman demasiados agregados y grandes, lo cual puede ser la razón por la cual la adición de espermina en realidad disminuyó los niveles de protección de DNasa.

Un enfoque separado que utiliza la transfección en lugar de la electroporación dio como resultado protección significativa de DNasa para plásmidos circulares abiertos. 1 µg del plásmido pEGFP-NAD se mezcló con 1 µl del reactivo de transfección, exosomas (3 µg) y hasta 100 µl con DMEM. La solución se incubó durante 3 horas a 37 ° C y, luego, se sometió a tratamiento con DNasa durante 10 minutos a 37 ° C con la adición de 1 µl de RQ DNasa I (Promega) y 10 µl de tampón RQ DNasa. La DNasa fue inactivada por 10 µl de tampón STOP (Promega) antes del ensayo de protección de DNasa o la adición directa de la solución completa a las células Neuro2A o C2C12 en un formato de 24 pocillos. Se usaron tres reactivos de transfección diferentes (I: Lipofectamina 2000 (Invitrogen); 2: TransIT LT1 (Mirus Bio) 3: TurboFect (Fermantas)) para entregar pEGFP-NAD circular abierto en exosomas y los resultados preliminares sugieren que el Reactivo 3 dio como resultado protección significativa de DNasa (Figura 3d), lo que sugiere que los reactivos de transfección se pueden usar para cargar la carga genética en los exosomas. Los experimentos de control con el reactivo de transfección solo parecen indicar que el reactivo de transfección no confiere protección por sí mismo (Figura 3c). A pesar del hecho de que se predice que los plásmidos circulares abiertos son demasiado grandes para los exosomas, la adición del reactivo de transfección puede servir para condensar los plásmidos así como para proporcionar moléculas hidrófobas adicionales para aumentar el tamaño de los exosomas.

Para el ensayo de protección de DNasa, se añadió 20 µl de la solución electroporada a 70 µl de agua destilada, 10 µl de tampón RQ DNasa y 1 µl de RQ DNasa I (Promega) y se incubó a 37 ° C durante 10 min antes de inhibir la reacción con 10 µl de tampón STOP. Se corrieron 10 µl de cada muestra en cada calle en un gel de TAE con agarosa al 0,8%.

Protocolo: Entrega de material genético por exosomas en células Neuro2A y C2C12

Puesto que se descubrió que los exosomas captan plásmidos de ADN fácilmente tras la electroporación y la transfección, planteamos la hipótesis de que los exosomas cargados con pEGFP-NAD sería capaces de someter a transfección células *in vitro*. Añadimos el reactivo de transfección 3 (Figura 3c) a pEGFP-NAD sin exosomas, con

exosomas de tipo silvestre, o con exosomas recolectados de células dendríticas sometidas a transfección con pLamp2b-RVG (exosomas de RVG) o pLamp2b-MSP (exosomas de MSP) y la DNasa trató la mezcla después de la incubación, incluyendo la muestra con pEGFP-NAD y solo reactivo de transfección. Luego, las células se sometieron a transfección directamente con la mezcla durante 2 días y los resultados sugieren que tanto al nivel de ARN a través de qRT-PCR (Figura 4b y 4c) como al nivel de proteína a través de fluorescencia de GFP (Figura 4a), los exosomas transfirieron eficientemente pEGFP-NAD en celdas diana. Además, los resultados sugieren que los péptidos RVG y MSP mejoran la captación de pEGFP-NAD al aumentar la afinidad a las células Neuro2A y C2C12 exclusivamente y este fenómeno depende del tipo de célula.

Dado que los exosomas eran capaces de captar plásmidos de ADN y contener ARN de forma natural [26], los ARNip también deberían ser fácilmente captados por los exosomas. Planteamos la hipótesis de que los exosomas también serían capaces de entregar ARNip. Por lo tanto, un ARNip marcado con Cy5 bien caracterizado contra GAPDH (Ambion) se sometió a electroporación en exosomas de RVG y MSP tipo silvestre y se aplicó directamente a las células Neuro2A y C2C12. Luego, se tomaron imágenes de las células después de 2 días y mostraron una fluorescencia más alta en comparación con las células control tratadas con ARNip y exosomas no sometidos a electroporación solos (Figura 5a y b). Se siguieron protocolos similares para la transfección de células con exosomas y la qRT-PCR de GAPDH normalizada a ARN 18S (Figura 5c y d) demostró atenuación significativa en exosomas dirigidos en comparación con los controles después de 2 días, lo que sugiere que los ARNip se liberaron en el citoplasma después de la transfección para reprimir activamente la diana endógena y que el resto dirigido entregó efectivamente el ARNip al tipo de célula deseado, es decir, RVG específico de neurona a células neuronales Neuro2A y MSP específico de músculo a mioblastos C2C12. Esta atenuación se confirmó aún más con la transferencia Western de la proteína GAPDH (Figura 5 e y f).

Como evidencia adicional de entrega específica, un segundo ARNip contra ciclofilina B murina (PPIB) (Ambion) también se sometió a transfección de manera similar y demostró patrones similares de atenuación (Figura 6) medida por qPCR y transferencias Western.
Para cuantificar la eficiencia de carga de diferentes protocolos de electroporación, se mezclaron 3 µg de ARNip de PPIB murino marcado con un fluoróforo Cy3 y uno Cy5 en cualquiera de las cadenas con 3 µg p.e. de exosomas de RVG, se añadieron a un tampón de electroporación basado en tampón hipoosmolar de Eppendorf y se sometieron a electroporación en un Biorad GenePulsar II en una cubeta de 4 mm. La mezcla se diluyó luego con PBS y se centrifugó a 120.000 g durante 60 minutos para purificar los exosomas. El sedimento resultante se resuspendió en 100 µl de agua doblemente destilada, que se predice que lisa los exosomas por la presión osmótica y libera el ARNip encapsulado dentro. El contenido de ARNip se midió luego con un lector de placa de fluorescencia con excitación de 560 nm y emisión de 610 nm y el ARNip retenido se cuantificó frente a una curva estándar de ARNip puro en agua. Como se muestra en la Figura 7, más del 20% del ARNip inicial (0,73 µg) se retuvo después de la electroporación a 400 V y 125 µF, la configuración óptima de electroporación. Además, concentrar la mezcla disminuyendo la cantidad de tampón de electroporación parecía aumentar la carga hasta cierto nivel.

Por último, se intentaron la transfección de oligonucleótidos 2'-OMe marcados (100 pmoles) y PMO (100 pmoles) con exosomas normales en células C2C12 y se tomaron imágenes un día después de la aplicación. De los dos tipos de pequeñas especies de oligonucleótidos, el oligonucleótido 2'-OMe parece administrarse eficazmente en las células C2C12 (Figura 8a), mientras que la entrega de morfolino (PMO) no parece mejorarse mediante la entrega mediada por exosoma con exosomas no modificados (Figura 8b). A partir de este experimento, creemos que es posible para nosotros cargar una diversidad de oligonucleótidos no naturales en el exosoma para la entrega, incluyendo 2'-OMe, morfolino, tio-nucleótidos, ARNip químicamente modificados y ácidos nucleicos peptídicos.

Materiales

A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich UK y todas las enzimas usadas se obtuvieron de New England Biolabs.

Cultivo celular

Las células dendríticas se cultivaron en medio de CD (DMEM Glutamax, 10 % de FBS, aminoácidos no esenciales N.º y antibióticos). Las células C2C12 se cultivaron en DMEM Glutamax complementado con 20% de FBS y antibióticos. Las células Neuro2A se cultivaron en EMEM complementado con 10% de FBS. Todas las células se cultivaron a 37 °C en CO_2 al 5 %.

Plásmidos

Se clonó Lamp2b con ADNc de células C2C12 y se insertaron sitios de restricción XhoI y BspEI después de la secuencia del péptido señal junto con enlazadores de glicina. Luego, la construcción completa se clonó en dirección 3' del promotor CMV con sitios de restricción NheI y HindIII en un vector pEGFP-C1, separando la eGFP en el proceso. Se usaron cebadores diseñados para codificar RVG [32], MSP [33] y la etiqueta FLAG para introducir los ligandos dirigidos entre XhoI y BspEI en el extremo N de Lamp2b (Figura 6a). Las secuencias cebador para los péptidos fueron

RVG (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG):

Directo

5'-tcgatacaccatttggatgcccgagaatccgagaccagggacaccttgtgacatttttaccaatagcagagg gaagagagcatccaacgggt-3'

Inverso

5'-ccggacccgttggatgctctcttccctctgctattggtaaaaatgtcacaaggtgtccctggtctcggattctc gggcatccaaatggtgta-3'

MSP (ASSLNIA):

Directo *5'-tcgagccagcagcctgaacatcgcct-3 '*
Inverso *5'-ccggaggcgatgttcaggctgctggc-3 '*

FLAG (DYKDDDDK):

Directo *5'-tcgagattacaaggatgacgatgacaagt-3 '*
Inverso
5'-ccggacttgtcatcgtcatccttgtaatc-3'

<u>Isoforma 2 de la glucoproteína 2 de membrana asociada a lisosoma murino (Lamp 2)</u>

Secuencia de aminoácidos no modificada (SEQ ID NO 1)

```
MCLSPVKGAKLILIFLFLGAVQSNALIVNLTDSKGTCLYAEWEMNFTITYETTNQTN
<--  Péptido señal          -->
KTITIAVPDKATHDGSSCGDDRNSAKIMIQFGFAVSWAVNFTKEASHYSIHDIVLSY

NTSDSTVFPGAVAKGVHTVKNPENFKVPLDVIFKCNSVLTYNLTPVVQKYWGIHLQA

FVQNGTVSKNEQVCEEDQTPTTVAPIIHTTAPSTTTTLTPTSTPTPTPTPTPTVGNY
                        <--          región bisagra        -->
SIRNGNTTCLLATMGLQLNITEEKVPFIFNINPATTNFTGSCQPQSAQLRLNNSQIK

YLDFIFAVKNEKRFYLKEVNVYMYLANGSAFNISNKNLSFWDAPLGSSYMCNKEQVL

SVSRAFQINTFNLKVQPFNVTKGQYSTAQECSLDDDTILIPIIVGAGLSGLIIVIVI
                                      <--      Transmembrana
AYLIGRRKTYAGYQTL
  -->
```

Secuencia de aminoácidos modificada (secuencia añadida subrayada)

MCLSPVKGAKLILIFLFLGAVQSNALIVNLTDSKGTCLYA <etiqueta péptido>
GGAEWEMNFTITYETTNQTNKTITIAVPDKATHDGSSCGDDRNSAKIMIQFGFA...

Secuencia de nucleótidos no modificada

atgtgcctctctccggttaaaggcgcaaagctcatcctgatctttctgttcctaggagc
cgttcagtccaatgcattgatagttaatttgacagattcaaagggtacttgcctttatg

cagaatgggagatgaatttcacaataacatatgaaactacaaaccaaaccaataaaact
ataaccattgcagtacctgacaaggcgacacacgatggaagcagttgtggggatgaccg
gaatagtgccaaaataatgatacaatttggattcgctgtctcttgggctgtgaatttta
ccaaggaagcatctcattattcaattcatgacatcgtgctttcctacaacactagtgat
agcacagtatttcctggtgctgtagctaaaggagttcatactgttaaaaatcctgagaa
tttcaaagttccattggatgtcatctttaagtgcaatagtgttttaacttacaacctga
ctcctgtcgttcagaaatattggggtattcacctgcaagcttttgtccaaaatggtaca
gtgagtaaaaatgaacaagtgtgtgaagaagaccaaactcccaccactgtggcacccat
cattcacaccactgccccgtcgactacaactacactcactccaacttcaacacccactc
caactccaactccaactccaaccgttggaaactacagcattagaaatggcaatactacc
tgtctgctggctaccatggggctgcagctgaacatcactgaggagaaggtgcctttcat
ttttaacatcaaccctgccacaaccaacttcaccggcagctgtcaacctcaaagtgctc
aacttaggctgaacaacagccaaattaagtatcttgactttatctttgctgtgaaaaat
gaaaaacggttctatctgaaggaagtgaatgtctacatgtatttggctaatggctcagc
tttcaacatttccaacaagaaccttagcttctgggatgcccctctgggaagttcttata
tgtgcaacaaagagcaggtgctttctgtgtctagagcgtttcagatcaacacctttaac
ctaaaggtgcaacctttttaatgtgacaaaaggacagtattctacagcccaggagtgttc
gctggatgatgacaccattctaataccaattatagttggtgctggtctttcaggcttga
ttatcgttatagtgattgcttacctaattggcagaagaaagacctatgctggatatcag
actctgtaa

Secuencia de nucleótidos modificada (secuencia añadida en cursiva y los sitios de restricción usados para la clonación subrayados)

atgtgcctctctccggttaaaggcgcaaagctcatcctgatctttctgttcctaggagc
cgttcagtccaatgcattgatagttaatttgacagattcaaagggtacttgcctttat*G*
*CTCGAGGTCACATCCGGAGGT*gcagaatgggagatgaatttcacaataacatatgaaac
tacaaaccaaaccaataaaactataaccattgcagtacctgacaaggcgacacacgatg
gaagcagtt...

Transfección

La transfección de células dendríticas se realizó con 5 µg de pEGFP-NAD o derivados de pLamp2b y 5 µl de reactivo de transfección TransIT LT1 (Mirus Bio) en una placa de 6 pocillos con 10^6 células el día 4 después la recolección y el aislamiento de los exosomas se realiza el día 8.

qPCR con transcripción inversa

La transcripción inversa se realizó con 500 ng de ARN y cebador aleatorio usando el kit de transcripción inversa de precisión (Primer Design) según las instrucciones del fabricante. Los experimentos por qPCR se realizaron en un termociclador ABI7000 en reacciones de 20 µl, con 0,5 nM de cada cebador y 2 µl de cada preparación de ADNc, usando la Mezcla maestra de qPCR de Precisión (Primer Design) según las instrucciones del fabricante.

secuencias del cebador de qPCR

Ciclofilina-B humana

Directo 5'-AAAGTCACCGTCAAGGTGTATTT-3 '
Inverso 5'-TCACCGTAGATGCTCTTTCCTC-3 '

GAPDH humana

Directo 5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3 '
Inverso 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3 '

GAPDH de ratón

Directo 5'-CAATGTGTCCGTCGTGGATCT-3 '
Inverso 5'-TAGCCCAAGATGCCCTTCAGT-3 '

EGFP

Directo 5'-TCTTCAAGTCCGCCATGCC-3 '
Inverso 5'-TGTCGCCCTCGAACTTCAC-3 '

18S

Directo 5'-GTAACCCGTTGAACCCCATT-3 '
Inverso 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3 '

Ciclofilina B de ratón: Ensayo de cebador Mm_PPIB_1_SG_Quantitect (Qiagen)

Transferencia Western

Las muestras celulares y los exosomas se lisaron en un tampón Tris pH 7,4 10 mM que contenía SDS al 0,1%, un cóctel inhibidor de proteasa y DNasa. Las muestras se separaron en NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen), y se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Biosciences). Luego, se bloqueó la membrana con leche al 10% en PBS durante 1 hora, incubada con anticuerpo primario durante 90 minutos a una dilución de 1:5.000 para el anticuerpo anti-Lamp2 (Abcam), 1:10.000 para anti-GAPDH (Abcam) y anti-ciclofilina B (Abcam). Las membranas se incubaron con dilución 1:5.000 de anticuerpo secundario conjugado con HRP durante 45 minutos a temperatura ambiente antes de la exposición a la película. Todas las etapas fueron seguidas por 3 lavados con PBST durante 10 minutos cada uno.

Transfección y electroporación con exosomas y ensayo de protección de DNasa

Se mezcló 1 µg del plásmido pEGFP-NAD con 1 µl del reactivo de transfección, 3 µg de exosomas y se completó hasta 100 µl con DMEM. La solución se incubó durante 3 horas a 37 ° C y luego se sometió a tratamiento con DNasa durante 10 minutos a 37 ° C con la adición de 1 µl de RQ DNasa I (Promega) y 10 µl de tampón RQ DNasa. La DNasa fue inactivada por 10 µl de tampón STOP (Promega) antes de la adición directa de la solución completa a las células Neuro2A en un formato de 24 pocillos.

Los exosomas se cargaron a una concentración de proteína de 6 µg en 200 µl de tampón de electroporación (fosfato de potasio 1,15 mM pH 7,2, KCl 25 mM, 21% de Optiprep) y se añadieron 2 µg de pEGFP-NAD o 100 pmol de ARNip de ciclofilina, se mezclaron y se sometieron a electroporación en una cubeta de 4 mm. Para el ensayo de protección de DNasa, se añadieron 20 µl de la solución electroporada a 70 µl de agua destilada, 10 µl de tampón RQ DNasa y 1 µl RQ DNasa I (Promega) y se incubaron a 37 ° C durante 10 minutos antes de inhibir la reacción con 10 µl de tampón STOP. Se corrieron 10 µl de cada muestra en cada calle en un gel de TAE con agarosa al 0,8%.

Transfección de células con exosomas

Se añadieron 100 ul (electroporación) o la mezcla completa (transfección) a las células Neuro2A en medio completo. Para ARNip, el medio se cambia después de 24 horas. Las células se recolectaron 48 horas después de la adición de los exosomas.

Ensayo de precipitación (*pulldown*) de exosomas

Se incubaron 20 µl de perlas de proteína A Sefarosa (Sigma P9424) durante la noche a 4 ºC en 500 µl de PBS y 2 mg/ml de BSA. En el protocolo, las perlas se aglomeraron durante las etapas mediante centrifugación a 100 g durante 2 minutos a 4 ºC. Las perlas se lavaron posteriormente 3 veces con 1 ml de PBS durante 5 minutos cada lavado. Se cargó 1 µl de anti-FLAG de conejo (Sigma F2555) o 1 µl de anti-Agol de conejo (Upstate 07-599) en las perlas en 100 µl de PBS con 2 mg/ml de BSA durante 4 horas a 4 ° C y las perlas posteriormente se lavaron 3 veces como se ha descrito anteriormente. Los exosomas normales y los exosomas de FLAG se centrifugaron a 200 g durante 10 minutos para separar los desechos contaminantes y se añadieron a las perlas a una concentración de proteína de 10 µg/ml en 200 µl de PBS. Después de la incubación, las perlas se lavaron posteriormente 3 veces como se ha descrito anteriormente, luego, se eluyeron en SDS al 0,1% y el sobrenadante completo se cargó en un gel de poliacrilamida. Se usó una transferencia Western contra Lamp-1, una proteína exosómica para detectar la presencia de exosomas precipitados por los anticuerpos.

Estadística

Todos los experimentos, a menos que se indique lo contrario, todos se realizaron por triplicado. Todas las barras de error usadas en este informe son desviaciones estándar. Los análisis estadísticos de los datos se realizaron utilizando el programa SPSS 16.0 usando la prueba no paramétrica de Krusckal Wallis seguida de la prueba U de Mann-Whitney.

Entrega sistémica dirigida mediada por exosoma de ARNip al cerebro

Se recolectaron exosomas inmunológicamente inertes de células dendríticas derivadas de médula ósea murina y restos dirigidos: péptido específico de músculo (MSP) y glucoproteína viral de la rabia específica de neurona (RVG), se modificaron genéticamente sobre Lamp2b, una proteína de membrana exosómica, para alterar la especificidad tisular de estos exosomas, como se ha descrito anteriormente. Para investigar el potencial de entrega de ARNip sistémica mediada por exosomas *in vivo* y caracterizar la distribución del tejido, el gen de GAPDH constitutivo ubicuamente altamente expresado fue elegido como diana. Sometimos a electroporación 150 µg de ARNip de GAPDH optimizado con 150 µg de exosomas sin modificar, de RVG o MSP, luego purificamos los exosomas mediante ultracentrifugación y separamos el ARNip no encapsulado en el sobrenadante. Los exosomas se resuspendieron en 80 µl de glucosa al 5% antes de la inyección intravenosa en ratones C57BL/6. La inyección de ARNip desnudo (150 µg) dio como resultado un silenciamiento detectable de GAPDH en el bazo, hígado y riñón, correspondiente al secuestro de ARNip informado después de la entrega de la vena de la cola [42] (Fig. 9a). Por el contrario, los ARNip encapsulados en exosoma parecían no tener afinidad natural con estos órganos y eran resistentes a la captación no específica. La administración sistémica de exosomas no modificados no indujo el silenciamiento de GAPDH en ningún órgano analizado (Fig. 9b). La inyección de exosomas de MSP produjo un ligero, pero no significativo silenciamiento de GAPDH en cerebro y riñón (Fig. 9c), mientras que la inyección de exosomas de RVG dio como resultado atenuación significativa del ARNm de GAPDH en varias regiones del cerebro (Fig. 9d), un tejido que expresa la diana del ligando RVG - receptores de acetilcolina nicotínicos [32]. También observamos una disminución no significativa del nivel de ARNm de GAPDH en el riñón 3 días después de la inyección. Aunque no se observó especificidad tisular *in vivo*con exosomas de MSP, las capacidades de dirigir relativamente débiles de MSP [43] y la abundancia de tejido muscular pueden haber dado como resultado una concentración de ARNip promedio mucho más baja dentro de las células musculares y, por lo tanto, correspondientemente menor atenuación de genes.

A continuación, investigamos si la readministración de exosomas conduce a una eficiencia de la entrega de transgenes disminuida descrita previamente en virus [44, 45] y liposomas. Diseñamos dos experimentos diferentes para evaluar esta cuestión. En primer lugar, estudiamos si inocular previamente a los animales con exosomas de RVG vacíos

reduciría la eficacia de entrega. Se inyectó a los animales exosomas de RVG vacíos a la misma dosis 3 y 2 semanas antes de la inyección de exosomas de RVG sometidos a electroporación que contenían ARNip de GAPDH. Luego, los animales se sacrificaron 3 días después y se evaluó la atenuación de GAPDH cerebral. Los resultados indicaron una disminución mínima en la eficacia del silenciamiento entre ratones no estimulados y estimulados (Fig. 9d frente a 9e), demostrando que los exosomas dirigidos se pueden volver a administrar varias veces sin pérdida de la eficacia de la entrega. Por último, para confirmar los resultados, inyectamos a tres ratones con dos dosis de exosomas de RVG que contenían ARNip de GAPDH a la misma concentración. Los animales fueron inyectados 7 y 3 días antes de recolectar los tejidos y se evaluaron el ARNm de GAPDH y la atenuación proteica en el cerebro. Se observó la atenuación con ARNm de GAPDH (50,2 % ± 9,1 %, p <0,05) y niveles de proteína (19,6 % ± 2,3 %, no significativo) en el córtex (Fig. 9f, g). Estos experimentos validaron los resultados anteriores y demostraron que los exosomas de RVG se pueden volver a administrar varias veces sin pérdida de eficacia de entrega permitiendo el silenciamiento de la diana a largo plazo.

Dado el éxito de la atenuación con GAPDH, BACE-1, una enzima clave en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (EA), fue dirigida para evaluar el potencial terapéutico de esta tecnología. Estudios previos en ratones transgénicos que sobreexpresan APP [46, 47] y ratones normales [48] sugirieron que BACE-1 es un fuerte candidato para la intervención terapéutica anti-EA. Administramos dos ARNip de BACE-1, previamente validados *in vitro,* a ratones C57BL/6 normales. Se sometieron a electroporación 150 µg de exosomas de RVG- y 150 µg de cada ARNip de BACE-1, se purificaron y resuspendieron en glucosa al 5% antes de la entrega. Atenuación significativa de ARNm (72 % ± 18 %) y proteína (60 % ± 13 %) en la corteza 3 días después de la administración (Fig. 9 h, i). Además, demostramos una disminución del 20 % en el contenido total de β-amiloide 1-42, un componente principal de las placas amiloides en la patología de Alzheimer (Fig. 9j). Este resultado fue comparable a la disminución de β-amiloide 1-40 demostrada en ratones normales después de la inyección intraventricular de inhibidores de BACE-1 [48]. Este experimento demostró el potencial terapéutico de esta tecnología, que es potencialmente ideal para el silenciamiento a largo plazo de genes relacionados con enfermedades neurodegenerativas.

[1] Smith A.J., Schlichtenbrede F.C., Tschernutter M., Bainbridge J.W., Thrasher A.J., Ali RR (2003), "AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa", *Mol. Ther.* 8 (2): 188-95.

[2] Ely A., Naidoo T., Mufamadi S., Crowther C., Arbuthnot P. (2008), "Expressed anti-HBV primary microRNA shuttles inhibit viral replication efficiently *in vitro* and *in vivo*", *Mol. Ther.* 16 (6): 1105-12.

[3] White M.D., Farmer M., Mirabile I., Brandner S., Collinge J-, Mallucci G.R. (2008), "Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease", *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 105 (29):10.238-43.

[4] Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W.S., Khvorova A. (2004), "Rational siRNA design for RNA interference", *Nat. Biotechnol*. 22 (3):326-30.

[5] Takakura Y., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M. (2001), "Development of gene drug delivery systems based on pharmacokinetic studies", *Eur. JPharm. Sci*. 13 (1):71-76.

[6] Kawabata K., Takakura Y., Hashida M. (1995), "The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake", *Pharm. Res.* 12 (6):825-30.

[6a] Documento WO2007126386A1 (Lötvall y Valadi).

[6b] Temchura V.V., Tenbusch M., Nchinda G., Nabi G., Tippler B., Zelenyuk M., Wildner O., Uberla K., Kuate S., "Enhancement of immunostimulatory properties of exosomal vaccines by incorporation of fusion-competent G protein of vesicular stomatitis virus". *Vaccine* 4 de julio de 2008; 26 (29-30):3.662-72. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.04.069.

[6c] Cho I.S., Kim J., Lim D.H., Ahn H.C., Kim H., Lee K.B., Lee Y.S., "Improved serum stability and biophysical properties of siRNAs following chemical modifications". *Biotechnol Lett*. Noviembre de 2008; 30 (11): 1901-8. doi: 10.1007/s10529-008-9776-4.

[6d] Documento WO2003016522A2 (Delcayre y Le Pecq).

[7] http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/ Consultado el 09 de septiembre de 2008.

[8] Lowenstein P.R., Mandel R.J., Xiong W.D., Kroeger K., Castro M.G. (2007), "Immune responses to adenovirus and adeno-associated vectors used for gene therapy of brain diseases: the role of immunological synapses in understanding the cell biology of neuroimmune interactions", *Curr. Gene Ther.* 7 (5):347-60.

[9] Alexander I.E., Cunningham S.C., Logan G.J., Christodoulou J. (2008), "Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease", *Gene Ther.;* 15 (11):831-9.

[10] Hasbrouck N.C., High K.A. (2008), "AAV-mediated gene transfer for the treatment of hemophilia B: problems and prospects", *Gene Ther* 15 (11):870-5.

[11] Daniel R., Smith J.A. (2008), "Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences", *Hum. Gene Ther.* 19 (6):557-68.

[12] Zhang J.S., Liu F., Huang L. (2005), "Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity", *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 57 (5): 689-98.

[13] Ishida T., Masuda K., Ichikawa T., Ichihara M., Irimura K., Kiwada H. (2005), "Accelerated clearance of a second injection of PEGylated liposomes in mice", *Int. J. Pharm*. 255:167-74.

[14] Ishida T., Ichihara M., Wang X., Yamamoto K., Kimura J., Majima E., Kiwada H. (2006), "Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes", *J. Control Release* 112:15-25.

[15] Ishida T., Ichihara M., Wang X., Yamamoto K., Kimura J., Majima E., Kiwada H. (2006), "Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes", *J. Control Release* 112:15-25.

[16] Jiang H., Couto L.B., Patarroyo-White S., Liu T., Nagy D., Vargas J.A., y col., (2006), "Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy", *Blood* 108 (10):3.321-8.

[17] Wang Z., Kuhr C.S., Allen J.M., Blankinship M., Gregorevic P., Chamberlain J.S., y col. (2007), "Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression", *Mol. Ther.* 15 (6): 1160-6.

[18] Li J.Z., Li H., Hankins G.R., Dunford B., Helm G.A. (2005), "Local immunomodulation with CD4 and CD8 antibodies, but not cyclosporine A, improves osteogenesis induced by ADhBMP9 gene therapy", *Gene Ther.* 12 (16):1.235-41.

[19] Zaiss A.K., Muruve D.A. (2005), "Immune responses to adeno-associated viral vectors", *Curr. Gene Ther.* 5 (3):323-31.

[20] Taylor N., Uribe L., Smith S., Jahn T., Kohn D.B., Weinberg K. (1996), "Correction of interleukin-2 receptor function in X-SCID lymphoblastoid cells by retrovirally mediated transfer of the gamma-c gene", *Blood* 87 (8):3.103-7.

[21] Oh Y.K., Sohn T., Park J.S., Kang M.J., Choi H.G., Kim J.A., y col. (2004), "Enhanced mucosal and systemic immunogenicity of human papillomavirus-like particles encapsidating interleukin-2 gene adjuvant", *Virology* 328 (2):266-73.

[22] Williams D.A. (2007), "RAC reviews serious adverse event associated with AAV therapy trial", *Mol. Ther.* 15 (12): 2053-4.

[23] Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W., Liejendekker R., Harding C.V., Melief D.J. Geuze H.J. (1996), "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles", *J. Exp. Med.* 183: 1.161-1.172.

[24] Zitvogel L., Regnault A., Lozier A., Wolfers J., Flament C., Tenza D., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Amigorena S. (1998), "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes", *Nat. Med.* 4:594-600.

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

[26] Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. (2007), "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells", *Nat. Cell. Biol*. 9 (6):654-9.

[27] Skog J., Würdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Esteves M., Curry W.T. Jr., Carter B.S., Krichevsky A.M., Breakefield X.O. (2008), "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers", *Nat. Cell. Biol*. 10 (12):1470-6.

[28] Quah B.J., O'Neill H.C. (2005), "The immunogenicity of dendritic cell-derived exosomes", *Blood Cells Mol. Dis.* 35:94-110.

[29] Thery C., Zitvogel L., Amigorena S. (2002), "Exosomes: composition, biogenesis and function", *Nat. Rev. Immunol* 2 (8):569-79.

[30] Jooss K., Yang Y., Fisher K.J., Wilson J.M. (1998), "Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers", *J. Virol.* 72 (5):4.212-23.

[31] Reis e Sousa C (2006), "Dendritic cells in a mature age", *Nat. Rev. Immunol* 6 (6):476-83.

[32] Kumar P., Wu H., McBride J.L., Jung K.E., Kim M.H., Davidson B.L., Lee S.K., Shankar P., Manjunath N. (2007), "Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system", *Nature* 448 (7149):39-43.

[33] Flint P.W., Li Z.B., Lehar M., Saito K., Pai S.I. (2005), "Laryngeal muscle surface receptors identified using random phage library", *Laryngoscope* 115 (11):1.930-7.

[34] Rippe K., Mücke N., Langowski J. (1997), "Superhelix dimensions of a 1868 base pair plasmid determined by scanning force microscopy in air and in aqueous solution", *Nucleic Acids Res*. 25 (9):1.736-44.

[35] Vijayanathan V., Thomas T., Shirahata A., Thomas T.J. (2001), "DNA condensation by polyamines: a laser light scattering study of structural effects", *Biochemistry* 40 (45):13.644-51.

[36] Lentz, T. L. "Rabies virus binding to an acetylcholine receptor alpha-subunit peptide (1990)". *J. Mol. Recognit.* 3, 82-88.

[37] Zeng J., Too H.P., Ma Y., Luo ESE, Wang S. "A synthetic peptide containing loop 4 of nerve growth factor for targeted gene delivery (2004)". *J. Gene Med*.; 6:1.247-1.256.

[38] McKay T., Reynolds P., Jezzard S., Curiel D., Coutelle C. "Secretin-mediated gene delivery, a specific targeting mechanism with potential for treatment of biliary and pancreatic disease in cystic fibrosis (2002)". *Mol. Ther.*; 5:447-454.

[39] C. Thery, S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton, "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids". *Curr. Protoc. Cell Biol. Ed.* (Wiley, Nueva York, Abril de 2006) Capítulo 3, Unidad 3.22 (2006).

[40] V.R. Simhadri, K.S. Reiners, H.P. Hansen, D. Topolar, V.L. Simhadri y col., "Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function". *PLoS One*. 3 (10), e3377 (2008), doi: 10.1371 / journal.pone.0003377.

[41] Y.C. Wang, X.B. Hu, F. He, F. Feng, L. Wang *y col*., "Lipopolysaccharide-induced maturation of bone marrow-derived dendritic cells is regulated by notch signaling through the up-regulation of CXCR4". *J. Biol. Chem*. 284(23), 15.993-6.003 (2009).

[42] S.D. Larson, L.N. Jackson, L.A. Chen, P.G. Rychahou, B.M. Evers, "Effectiveness of siRNA uptake in target tissues by various delivery methods". *Surgery*. 142(2):262-9 (2007).

[43] H. Yin, H.M. Moulton, C. Betts, Y. Seow, J. Boutilier y col., "A fusion peptide directs enhanced systemic dystrophin exon skipping and functional restoration in dystrophin-deficient mdx mice". *Hum. Mol. Genet*. 18(22):4.405-14 (2009).

[44] F.A. Nunes, E.E. Furth, J.M. Wilson, S.E. Raper, "Gene transfer into the liver of nonhuman primates with E1-deleted recombinant adenoviral vectors: safety of readministration". *Hum. Gene Ther.* 10(15), 2.515-26 (1999).

[45] S.C. Gonzalez, M.M. McMenamin, H.M. Charlton, J. Goodman, T. Lantos, "Readministration of adenoviral gene delivery to dopamine neurons". *Neuroreport*. 18(15), 1.609-14 (2007).

[46] F. M. Laird, H. Cai, A.V. Savonenko A. V. M.H. Farah, K. He y col., "BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions". *J. Neurosci.* 25(50), 11.693-11.709 (2005).

[47] O. Singer, R.A. Marr, E. Rockenstein, L. Crews, N.G. Coufal y col., "Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model". *Nat. Neurosci.* 8(10), 1.343-1.349 (2005).

[48] K. Nishitomi, G. Sakaguchi, Y. Horikoshi, A. J. Gray, M. Maeda y col., "BACE1 inhibition reduces endogenous Abeta and alters APP processing in wild-type mice". *J. Neurochem*. 99(6), 1.555-63 (2006).

Listado de secuencias

<110> ISIS INNOVATION LIMITED

<120> COMPOSICIÓN PARA ENTREGA DE MATERIAL GENÉTICO

<130> N107302A

<150> GB 0906693.7
<151> 17-04-2009

<150> GB 0906692.9
<151> 17-04-2009

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

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

<400> 1

```
Met Cys Leu Ser Pro Val Lys Gly Ala Lys Leu Ile Leu Ile Phe Leu
1               5                   10                  15

Phe Leu Gly Ala Val Gln Ser Asn Ala Leu Ile Val Asn Leu Thr Asp
            20                  25                  30

Ser Lys Gly Thr Cys Leu Tyr Ala Glu Trp Glu Met Asn Phe Thr Ile
        35                  40                  45

Thr Tyr Glu Thr Thr Asn Gln Thr Asn Lys Thr Ile Thr Ile Ala Val
    50                  55                  60

Pro Asp Lys Ala Thr His Asp Gly Ser Ser Cys Gly Asp Asp Arg Asn
65                  70                  75                  80

Ser Ala Lys Ile Met Ile Gln Phe Gly Phe Ala Val Ser Trp Ala Val
                85                  90                  95

Asn Phe Thr Lys Glu Ala Ser His Tyr Ser Ile His Asp Ile Val Leu
            100                 105                 110

Ser Tyr Asn Thr Ser Asp Ser Thr Val Phe Pro Gly Ala Val Ala Lys
        115                 120                 125

Gly Val His Thr Val Lys Asn Pro Glu Asn Phe Lys Val Pro Leu Asp
    130                 135                 140
```

Val Ile Phe Lys Cys Asn Ser Val Leu Thr Tyr Asn Leu Thr Pro Val
145 150 155 160

Val Gln Lys Tyr Trp Gly Ile His Leu Gln Ala Phe Val Gln Asn Gly
165 170 175

Thr Val Ser Lys Asn Glu Gln Val Cys Glu Glu Asp Gln Thr Pro Thr
180 185 190

Thr Val Ala Pro Ile Ile His Thr Thr Ala Pro Ser Thr Thr Thr Thr
195 200 205

Leu Thr Pro Thr Ser Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
211: 1248,
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 2

atgtgcctct ctccggttaa aggcgcaaag ctcatcctga tctttctgtt cctaggagcc 60

gttcagtcca atgcattgat agttaatttg acagattcaa agggtacttg cctttatgca 120

gaatgggaga tgaatttcac aataacatat gaaactacaa accaaaccaa taaaactata 180

accattgcag tacctgacaa ggcgacacac gatggaagca gttgtgggga tgaccggaat 240

agtgccaaaa taatgataca atttggattc gctgtctctt gggctgtgaa ttttaccaag 300

gaagcatctc attattcaat tcatgacatc gtgctttcct acaacactag tgatagcaca 360

gtatttcctg gtgctgtagc taaaggagtt catactgtta aaaatcctga gaatttcaaa 420

gttccattgg atgtcatctt taagtgcaat agtgttttaa cttacaacct gactcctgtc 480

gttcagaaat attggggtat tcacctgcaa gcttttgtcc aaaatggtac agtgagtaaa 540

aatgaacaag tgtgtgaaga agaccaaact cccaccactg tggcacccat cattcacacc 600

actgccccgt cgactacaac tacactcact ccaacttcaa cacccactcc aactccaact 660

ccaactccaa ccgttggaaa ctacagcatt agaaatggca atactacctg tctgctggct 720

accatggggc tgcagctgaa catcactgag gagaaggtgc ctttcatttt taacatcaac 780

cctgccacaa ccaacttcac cggcagctgt caacctcaaa gtgctcaact taggctgaac 840

aacagccaaa ttaagtatct tgactttatc tttgctgtga aaaatgaaaa acggttctat 900

ctgaaggaag tgaatgtcta catgtatttg gctaatggct cagctttcaa catttccaac 960

aagaacctta gcttctggga tgcccctctg ggaagttctt atatgtgcaa caaagagcag 1020

gtgctttctg tgtctagagc gtttcagatc aacaccttta acctaaaggt gcaacctttt 1080

aatgtgacaa aaggacagta ttctacagcc caggagtgtt cgctggatga tgacaccatt 1140

ctaataccaa ttatagttgg tgctggtctt tcaggcttga ttatcgttat agtgattgct 1200

tacctaattg gcagaagaaa gacctatgct ggatatcaga ctctgtaa 1248

<210> 3
<211> 40
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de la secuencia de aminoácidos modificada de la isoforma 2 de Lamp 2 murina: N-terminal a la etiqueta peptídica

<400> 3

```
Met Cys Leu Ser Pro Val Lys Gly Ala Lys Leu Ile Leu Ile Phe Leu
1               5                   10                  15

Phe Leu Gly Ala Val Gln Ser Asn Ala Leu Ile Val Asn Leu Thr Asp
            20                  25                  30

Ser Lys Gly Thr Cys Leu Tyr Ala
        35                  40
```

<210> 4
<211> 378
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de la secuencia de aminoácidos modificada de la isoforma 2 de Lamp 2 murina: C-terminal a la etiqueta peptídica

<400> 4

```
Gly Gly Ala Glu Trp Glu Met Asn Phe Thr Ile Thr Tyr Glu Thr Thr
1               5                   10                  15

Asn Gln Thr Asn Lys Thr Ile Thr Ile Ala Val Pro Asp Lys Ala Thr
            20                  25                  30

His Asp Gly Ser Ser Cys Gly Asp Asp Arg Asn Ser Ala Lys Ile Met
        35                  40                  45

Ile Gln Phe Gly Phe Ala Val Ser Trp Ala Val Asn Phe Thr Lys Glu
    50                  55                  60

Ala Ser His Tyr Ser Ile His Asp Ile Val Leu Ser Tyr Asn Thr Ser
65                  70                  75                  80

Asp Ser Thr Val Phe Pro Gly Ala Val Ala Lys Gly Val His Thr Val
                85                  90                  95

Lys Asn Pro Glu Asn Phe Lys Val Pro Leu Asp Val Ile Phe Lys Cys
            100                 105                 110
```

Asn Ser Val Leu Thr Tyr Asn Leu Thr Pro Val Val Gln Lys Tyr Trp
115 120 125

Gly Ile His Leu Gln Ala Phe Val Gln Asn Gly Thr Val Ser Lys Asn
130 135 140

Glu Gln Val Cys Glu Glu Asp Gln Thr Pro Thr Thr Val Ala Pro Ile
145 150 155 160

Ile His Thr Thr Ala Pro Ser Thr Thr Thr Thr Leu Thr Pro Thr Ser
165 170 175

Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Val Gly Asn Tyr Ser
180 185 190

Ile Arg Asn Gly Asn Thr Thr Cys Leu Leu Ala Thr Met Gly Leu Gln
195 200 205

Leu Asn Ile Thr Glu Glu Lys Val Pro Phe Ile Phe Asn Ile Asn Pro
210 215 220

Ala Thr Thr Asn Phe Thr Gly Ser Cys Gln Pro Gln Ser Ala Gln Leu
225 230 235 240

Arg Leu Asn Asn Ser Gln Ile Lys Tyr Leu Asp Phe Ile Phe Ala Val
245 250 255

Lys Asn Glu Lys Arg Phe Tyr Leu Lys Glu Val Asn Val Tyr Met Tyr
260 265 270

Leu Ala Asn Gly Ser Ala Phe Asn Ile Ser Asn Lys Asn Leu Ser Phe
275 280 285

Trp Asp Ala Pro Leu Gly Ser Ser Tyr Met Cys Asn Lys Glu Gln Val
290 295 300

Leu Ser Val Ser Arg Ala Phe Gln Ile Asn Thr Phe Asn Leu Lys Val
305 310 315 320

Gln Pro Phe Asn Val Thr Lys Gly Gln Tyr Ser Thr Ala Gln Glu Cys
325 330 335

Ser Leu Asp Asp Asp Thr Ile Leu Ile Pro Ile Ile Val Gly Ala Gly
340 345 350

Leu Ser Gly Leu Ile Ile Val Ile Val Ile Ala Tyr Leu Ile Gly Arg
355 360 365

Arg Lys Thr Tyr Ala Gly Tyr Gln Thr Leu
370 375

<210> 5
211: 1270,
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos modificada de la isoforma 2 de Lamp 2 murina

<400> 5

atgtgcctct ctccggttaa aggcgcaaag ctcatcctga tctttctgtt cctaggagcc 60

gttcagtcca atgcattgat agttaatttg acagattcaa agggtacttg cctttatgct 120

cgaggtcaca tccggaggtg cagaatggga gatgaatttc acaataacat atgaaactac 180

aaaccaaacc aataaaacta taaccattgc agtacctgac aaggcgacac acgatggaag 240

cagttgtggg gatgaccgga atagtgccaa aataatgata caatttggat tcgctgtctc 300

ttgggctgtg aattttacca aggaagcatc tcattattca attcatgaca tcgtgctttc 360

ctacaacact agtgatagca cagtatttcc tggtgctgta gctaaaggag ttcatactgt 420

taaaaatcct gagaatttca aagttccatt ggatgtcatc tttaagtgca atagtgtttt 480

aacttacaac ctgactcctg tcgttcagaa atattggggt attcacctgc aagcttttgt 540

ccaaaatggt acagtgagta aaaatgaaca agtgtgtgaa gaagaccaaa ctcccaccac 600

tgtggcaccc atcattcaca ccactgcccc gtcgactaca actacactca ctccaacttc 660

aacacccact ccaactccaa ctccaactcc aaccgttgga aactacagca ttagaaatgg 720

caatactacc tgtctgctgg ctaccatggg gctgcagctg aacatcactg aggagaaggt 780

gcctttcatt tttaacatca accctgccac aaccaacttc accggcagct gtcaacctca 840

aagtgctcaa cttaggctga acaacagcca aattaagtat cttgacttta tctttgctgt 900

gaaaaatgaa aaacggttct atctgaagga agtgaatgtc tacatgtatt tggctaatgg 960

ctcagctttc aacatttcca acaagaacct tagcttctgg gatgcccctc tgggaagttc 1020

ttatatgtgc aacaaagagc aggtgctttc tgtgtctaga gcgtttcaga tcaacacctt 1080

taacctaaag gtgcaacctt ttaatgtgac aaaaggacag tattctacag cccaggagtg 1140

ttcgctggat gatgacacca ttctaatacc aattatagtt ggtgctggtc tttcaggctt 1200

gattatcgtt atagtgattg cttacctaat tggcagaaga aagacctatg ctggatatca 1260

gactctgtaa 1270

<210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> glucoproteína viral de la rabia específica de neurona (RVG)

<400> 6

```
Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg Pro Gly Thr Pro Cys Asp
1               5                   10                  15


Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala Ser Asn Gly
            20                  25
```

<210> 7
211: 92,
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de RVG

<400> 7

```
tcgatacacc atttggatgc ccgagaatcc gagaccaggg acaccttgtg acatttttac      60

caatagcaga gggaagagag catccaacgg gt                                    92
```

<210> 8
211: 92,
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de RVG

<400> 8

```
ccggacccgt tggatgctct cttccctctg ctattggtaa aaatgtcaca aggtgtccct      60

ggtctcggat tctcgggcat ccaaatggtg ta                                    92
```

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido específico de músculo (MSP) identificado por presentación en fagos *in vivo*

<400> 9

```
Ala Ser Ser Leu Asn Ile Ala

1               5
```

<210> 10
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de MSP

<400> 10
tcgagccagc agcctgaaca tcgcct 26

<210> 11
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso de MSP

<400> 11
ccggaggcga tgttcaggct gctggc 26

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> FLAG

<400> 12

```
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1               5
```

<210> 13
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de FLAG

<400> 13
tcgagattac aaggatgacg atgacaagt 29

<210> 14
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de FLAG

<400> 14
ccggacttgt catcgtcatc cttgtaatc 29

<210> 15
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo humano de ciclofilina-B

<400> 15
aaagtcaccg tcaaggtgta ttt 23

<210> 16
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso humano de ciclofilina-B

<400> 16
tcaccgtaga tgctctttcc tc 22

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo humano de GAPDH

<400> 17
aaggtgaagg tcggagtcaa 20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso humano de GAPDH

<400> 18
gaagatggtg atgggatttc 20

<210> 19
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de ratón de GAPDH

<400> 19
caatgtgtcc gtcgtggatc t 21

<210> 20
211: 0,
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de ratón de GAPDH

400, 20(000),

<210> 21
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de eGFP

<400> 21
tcttcaagtc cgccatgcc 19

<210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso de eGFP

<400> 22
tgtcgccctc gaacttcac 19

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de 18S

<400> 23
gtaacccgtt gaaccccatt 20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de 18S

<400> 24
ccatccaatc ggtagtagcg 20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un exosoma, en donde el exosoma comprende un resto dirigido expresado en su superficie, en donde el resto dirigido se expresa como una proteína de fusión con una proteína transmembrana exosómica, en donde el exosoma se carga con material genético exógeno.

2. La composición según la reivindicación 1, en donde el exosoma se deriva de células dendríticas.

3. La composición según la reivindicación 1 o 2, en donde el material genético exógeno es un plásmido de ADN que codifica una proteína terapéutica.

4. La composición según la reivindicación 1 o 2, en donde el material genético exógeno es un ARNip.

5. La composición según la reivindicación 3, en donde el plásmido codifica una proteína terapéutica para su uso en un método de terapia génica.

6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el resto dirigido comprende un péptido que se une a un resto presente en una célula a ser dirigida.

7. La composición según la reivindicación 6, en donde el resto dirigido es de menos de 100 aminoácidos de longitud.

8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína transmembrana exosómica se selecciona de Lamp-1, Lamp-2, CD13, CD86, Flotillin, Sintaxin-3.

9. La composición según la reivindicación 8, en donde la proteína transmembrana exosómica es Lamp-2b.

10. Un método para cargar exosomas con material genético que comprende proporcionar una composición de exosomas, y cargar los exosomas con material genético mediante electroporación, en donde los exosomas son tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. El procedimiento según la reivindicación 10, en donde la electroporación se lleva a cabo a un voltaje entre 20v/cm a 100v/cm.

12. Un método para cargar exosomas con material genético que comprende proporcionar una composición de exosomas y cargar los exosomas con ácido nucleico mediante transfección, usando un agente catiónico de transfección de liposomas, en donde los exosomas son tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde los exosomas se derivan de células dendríticas.

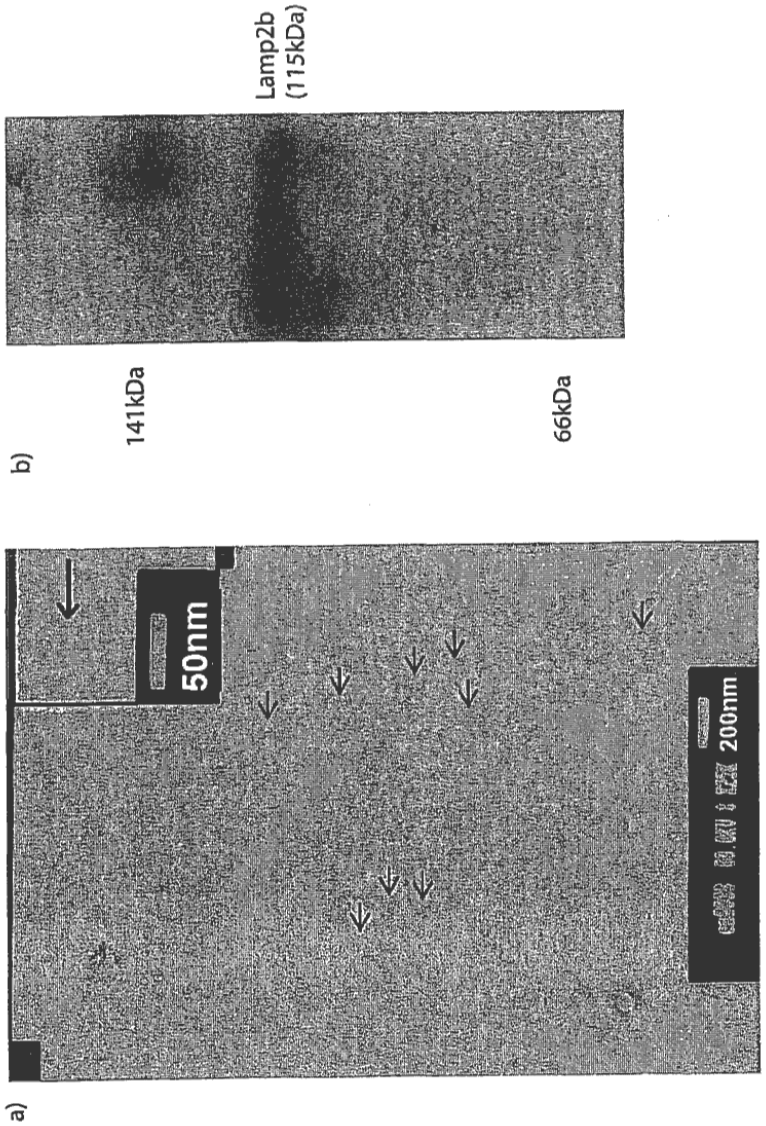


Figura 1

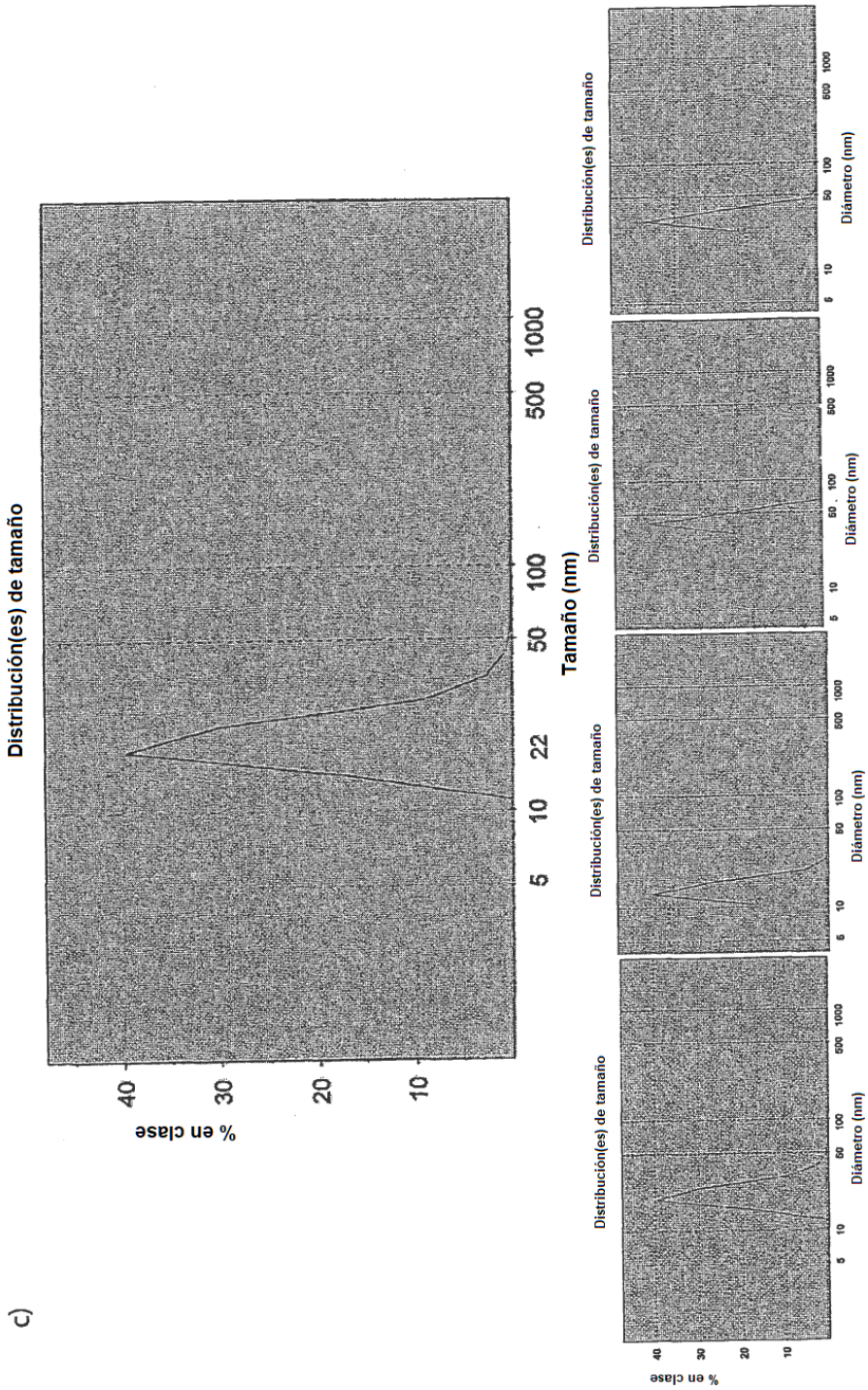

c)
Distribución(es) de tamaño
% en clase
40
30
20
10
5
10
22
50
100
500
1000
Tamaño (nm)
Distribución(es) de tamaño
Diámetro (nm)

Figura 1

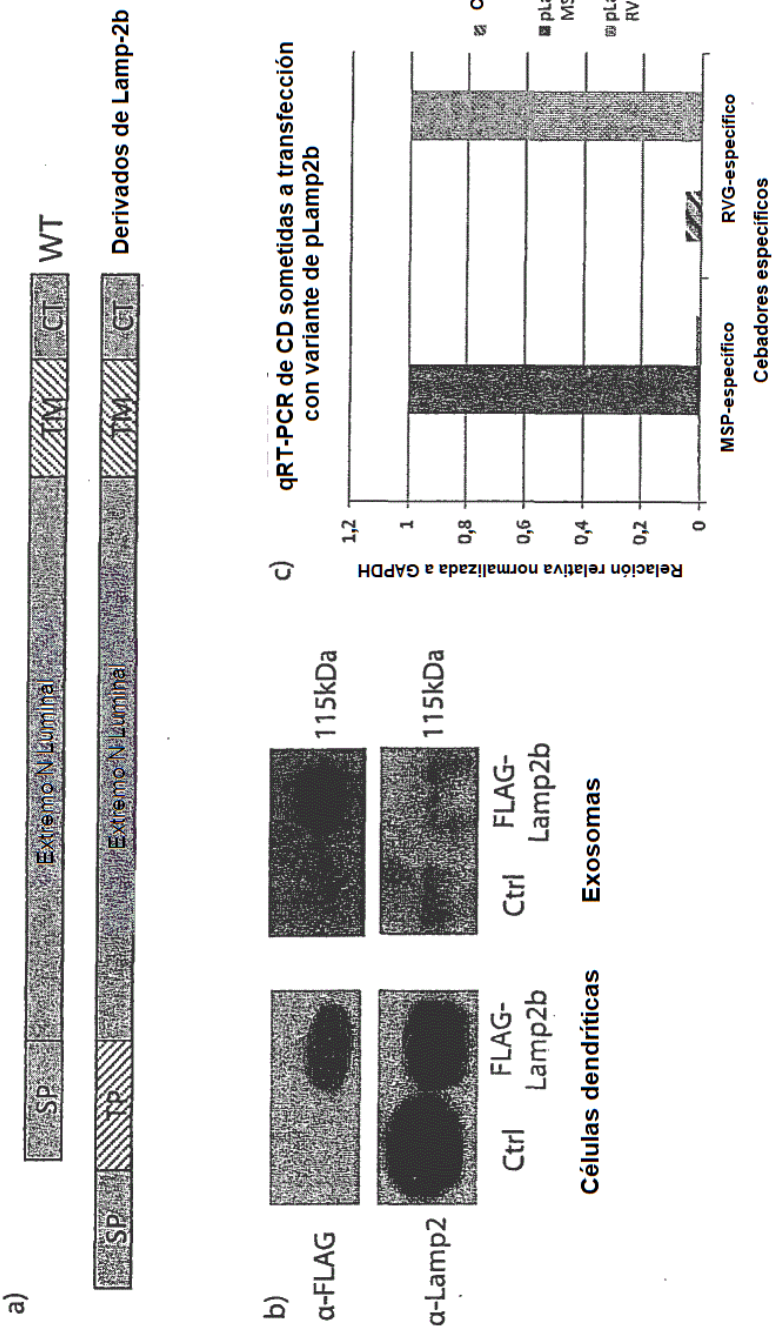
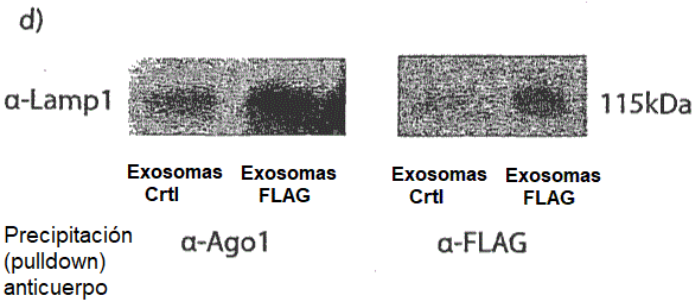

a)
SP
Extremo N Luminal
TM
CT
WT
SP
TR
Extremo N Luminal
TM
CT
Derivados de Lamp-2b
b)
α-FLAG
α-Lamp2
115kDa
115kDa
Ctrl
FLAG-Lamp2b
Ctrl
FLAG-Lamp2b
Células dendríticas
Exosomas
c)
qRT-PCR de CD sometidas a transfección con variante de pLamp2b
Relación relativa normalizada a GAPDH
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Control
pLamp2b-MSP
pLamp2b-RVG
MSP-específico
RVG-específico
Cebadores específicos

Figura 2


d)
α-Lamp1
115kDa
Exosomas Crtl
Exosomas FLAG
Exosomas Crtl
Exosomas FLAG
Precipitación (pulldown) anticuerpo
α-Ago1
α-FLAG

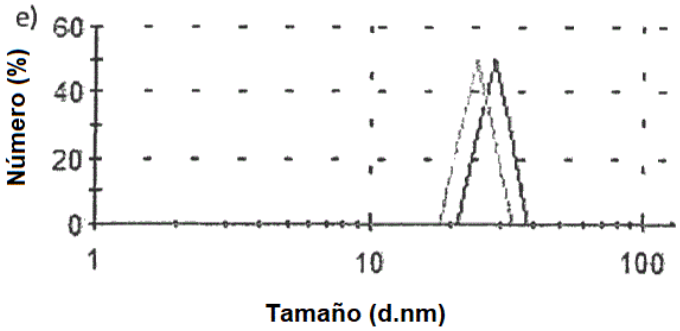

e)
Número (%)
60
40
20
0
1
10
100
Tamaño (d.nm)

Figura 2

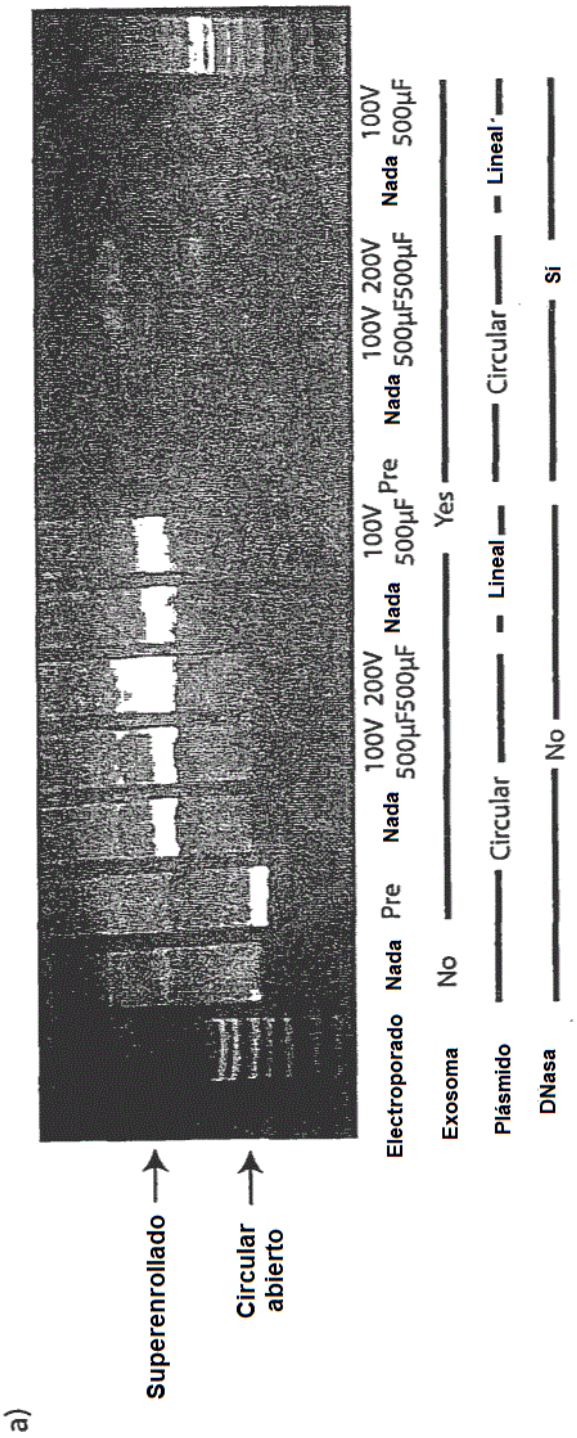
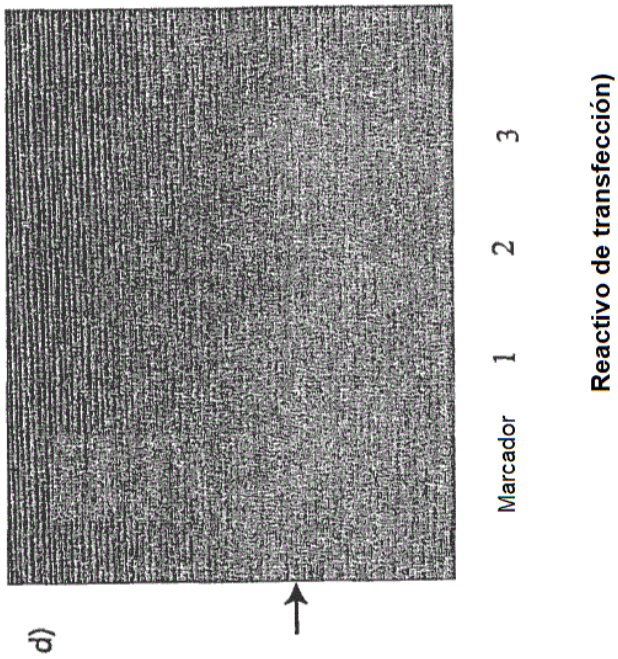
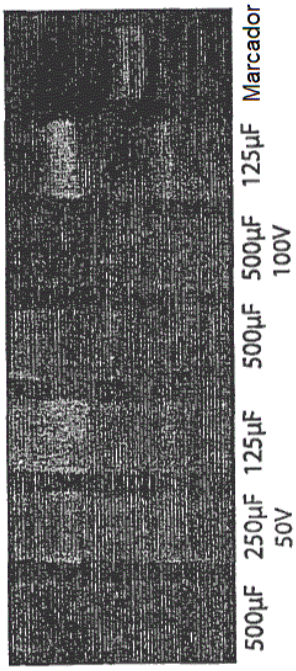

a)
Superenrollado
Circular abierto
Electroporado
Nada
Pre
Nada
100V 500µF
200V 500µF
Nada
100V 500µF
Pre
Nada
100V 500µF
200V 500µF
Nada
100V 500µF
Exosoma
No
Yes
Plásmido
Circular
Lineal
Circular
Lineal
DNasa
No
Si

Figura 3


d)
Marcador
1
2
3
Reactivo de transfección)


b)
500µF
250µF
50V
125µF
500µF
500µF
100V
125µF
Marcador

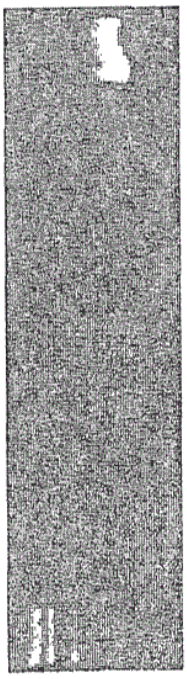

c)
Marcador
ADN
4
5
6
1
2
3
No digerido
Solo
Reactivos de transfección
ADN

Figura 3

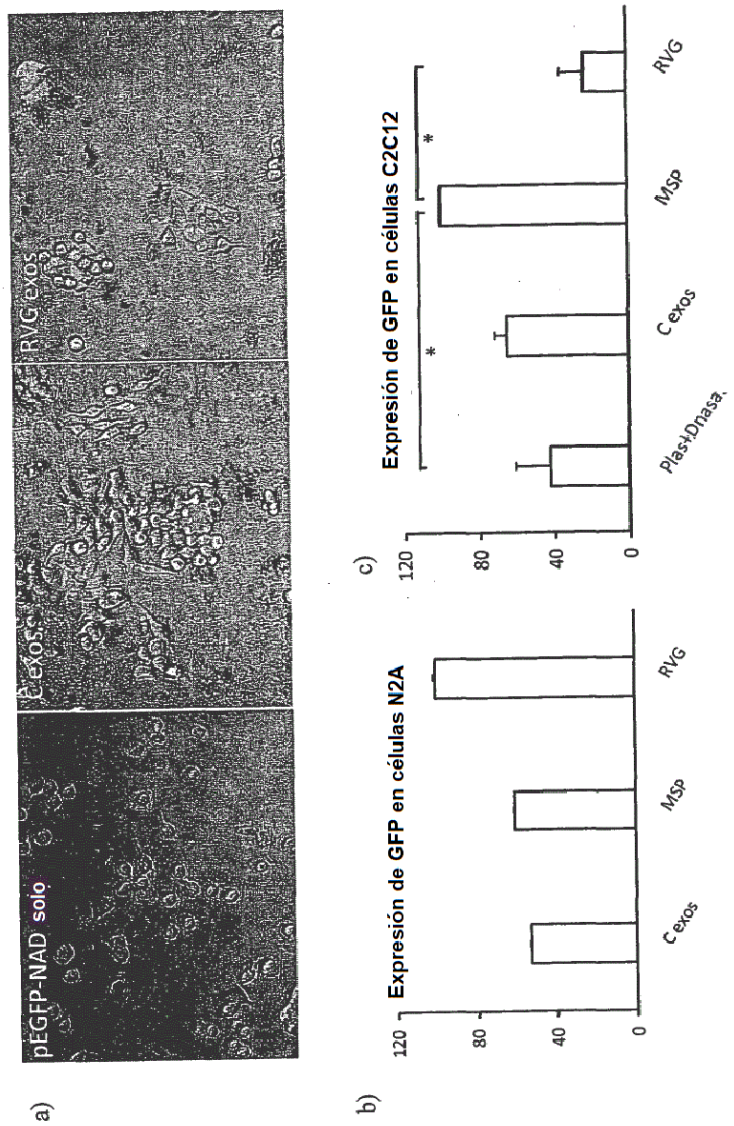

a)
pEGFP-NAD solo
C exos
RVG exos
b)
Expresión de GFP en células N2A
120
80
40
0
C exos
MSp
RVG
c)
Expresión de GFP en células C2C12
120
80
40
0
*
*
Plas+Dnasa
C exos
MSp
RVG

Figura 4

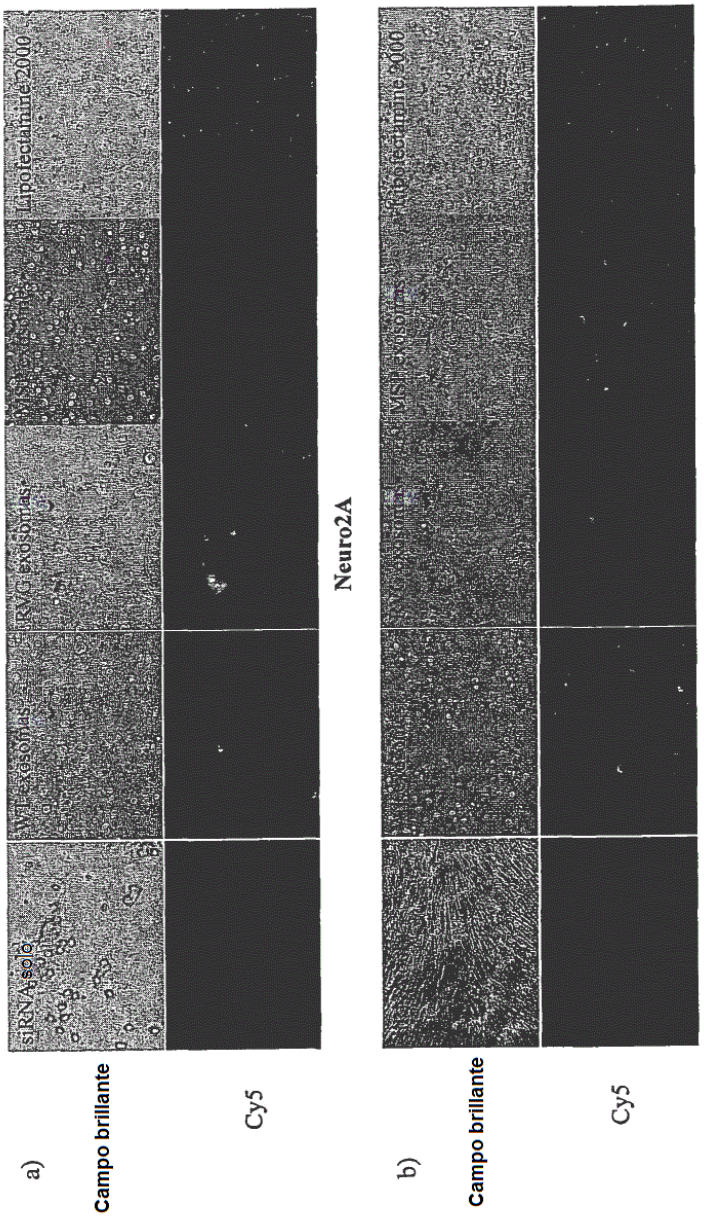

a)
Campo brillante
Cy5
siRNA solo
MVE exosomas
hPVC exosomas
MSC exosomas
Lipofectamine 2000
Neuro2A
b)
Campo brillante
Cy5
C2C12

Figura 5

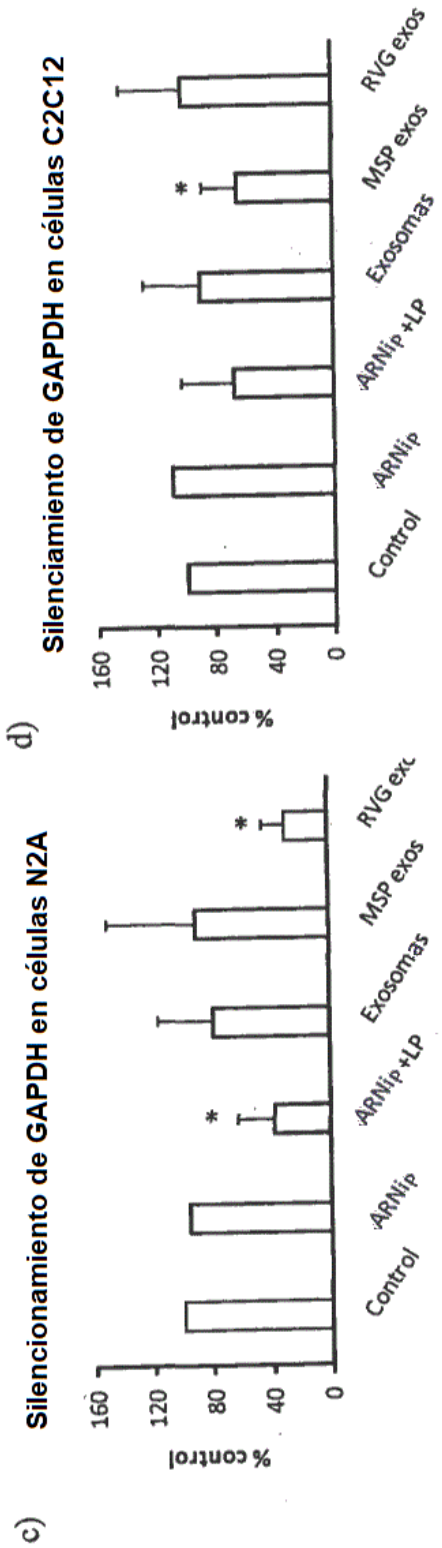

c)
Silencionamiento de GAPDH en células N2A
% control
160
120
80
40
0
*
*
Control
ARNip
ARNip +LP
Exosomas
MSP exos
RVG exos
d)
Silenciamiento de GAPDH en células C2C12
% control
160
120
80
40
0
*
Control
ARNip
ARNip +LP
Exosomas
MSP exos
RVG exos

Figura 5

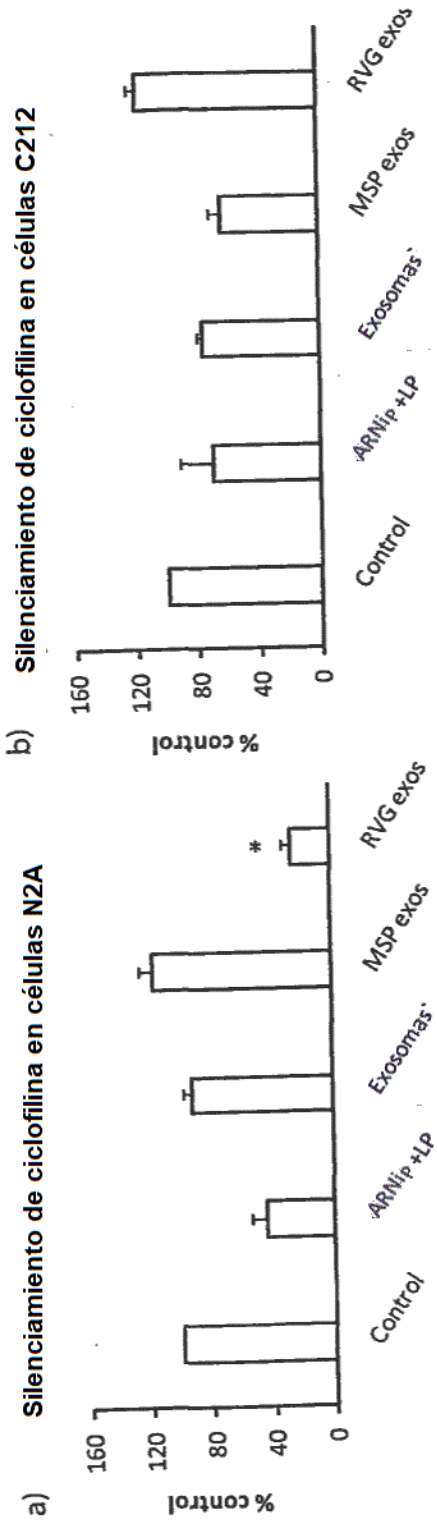

a)
Silenciamiento de ciclofilina en células N2A
% control
160
120
80
40
0
*
Control
ARNip +LP
Exosomas
MSP exos
RVG exos
b)
Silenciamiento de ciclofilina en células C212
% control
160
120
80
40
0
Control
ARNip +LP
Exosomas
MSP exos
RVG exos

Figura 6

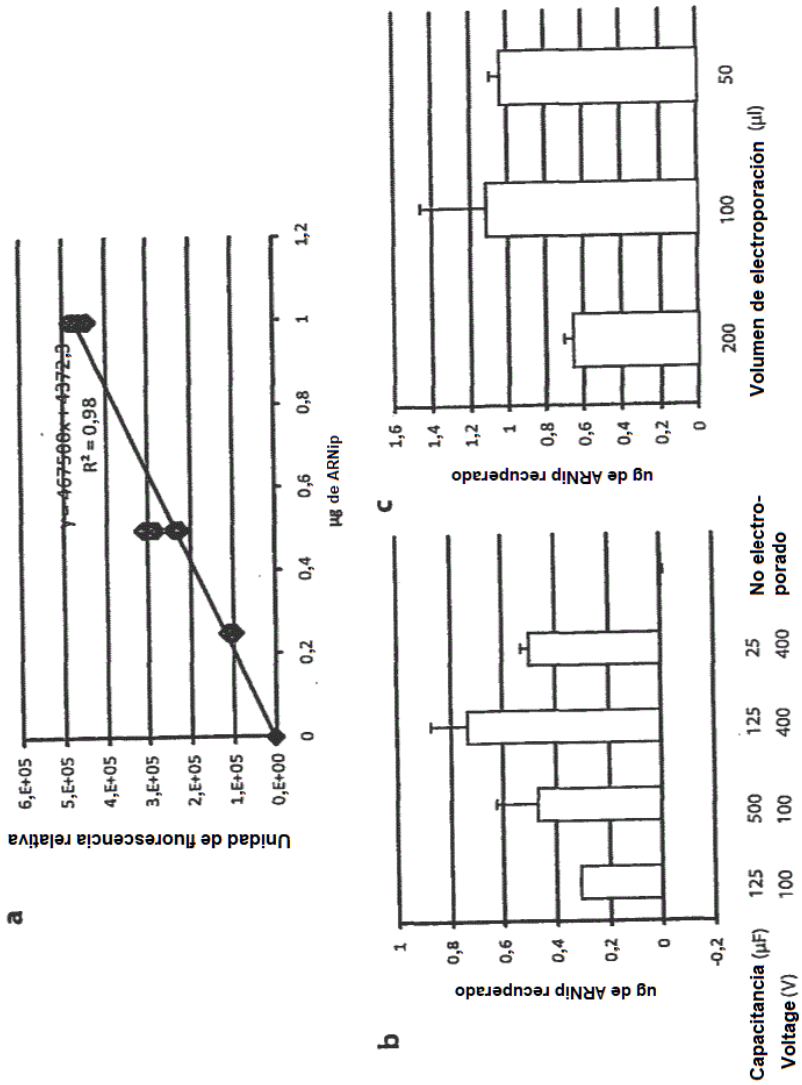

a
Unidad de fluorescencia relativa
6,E+05
5,E+05
4,E+05
3,E+05
2,E+05
1,E+05
0,E+00
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
1,2
µg de ARNip
y = 467500x + 4372,2
R² = 0,98
b
ng de ARNip recuperado
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
-0,2
Capacitancia (µF)
Voltage (V)
125
500
125
25
No electro-porado
100
100
400
400
c
ng de ARNip recuperado
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
200
100
50
Volumen de electroporación (µl)

Figura 7

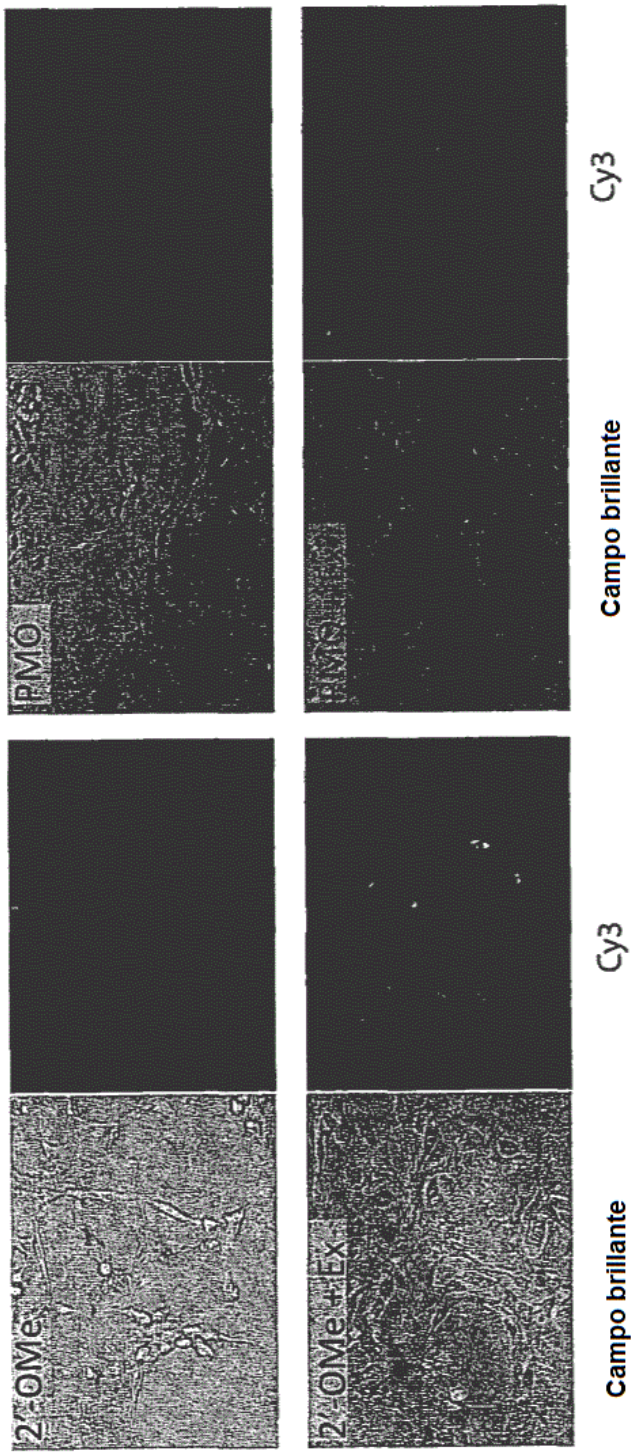

2'-OMe
2'-OMe +Ex
PMO
PMO
Campo brillante
Cy3
Campo brillante
Cy3

Figura 8

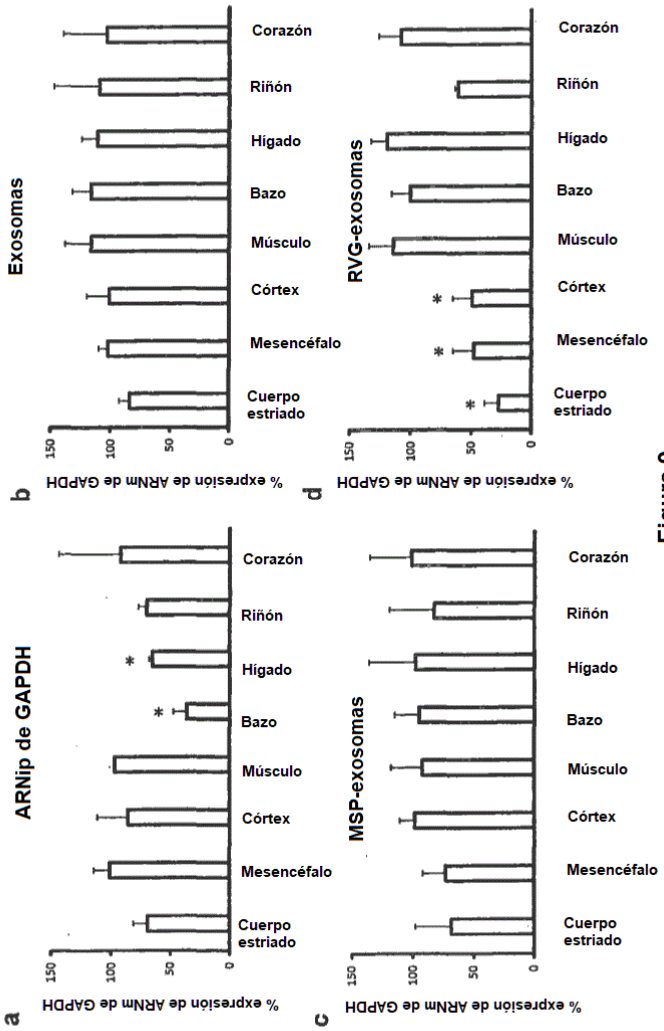

a
ARNip de GAPDH
% expresión de ARNm de GAPDH
150
100
50
0
Cuerpo estriado
Mesencéfalo
Córtex
Músculo
Bazo
Hígado
Riñón
Corazón
b
Exosomas
% expresión de ARNm de GAPDH
150
100
50
0
Cuerpo estriado
Mesencéfalo
Córtex
Músculo
Bazo
Hígado
Riñón
Corazón
c
MSP-exosomas
% expresión de ARNm de GAPDH
150
100
50
0
Cuerpo estriado
Mesencéfalo
Córtex
Músculo
Bazo
Hígado
Riñón
Corazón
d
RVG-exosomas
% expresión de ARNm de GAPDH
150
100
50
0
Cuerpo estriado
Mesencéfalo
Córtex
Músculo
Bazo
Hígado
Riñón
Corazón

Figura 9

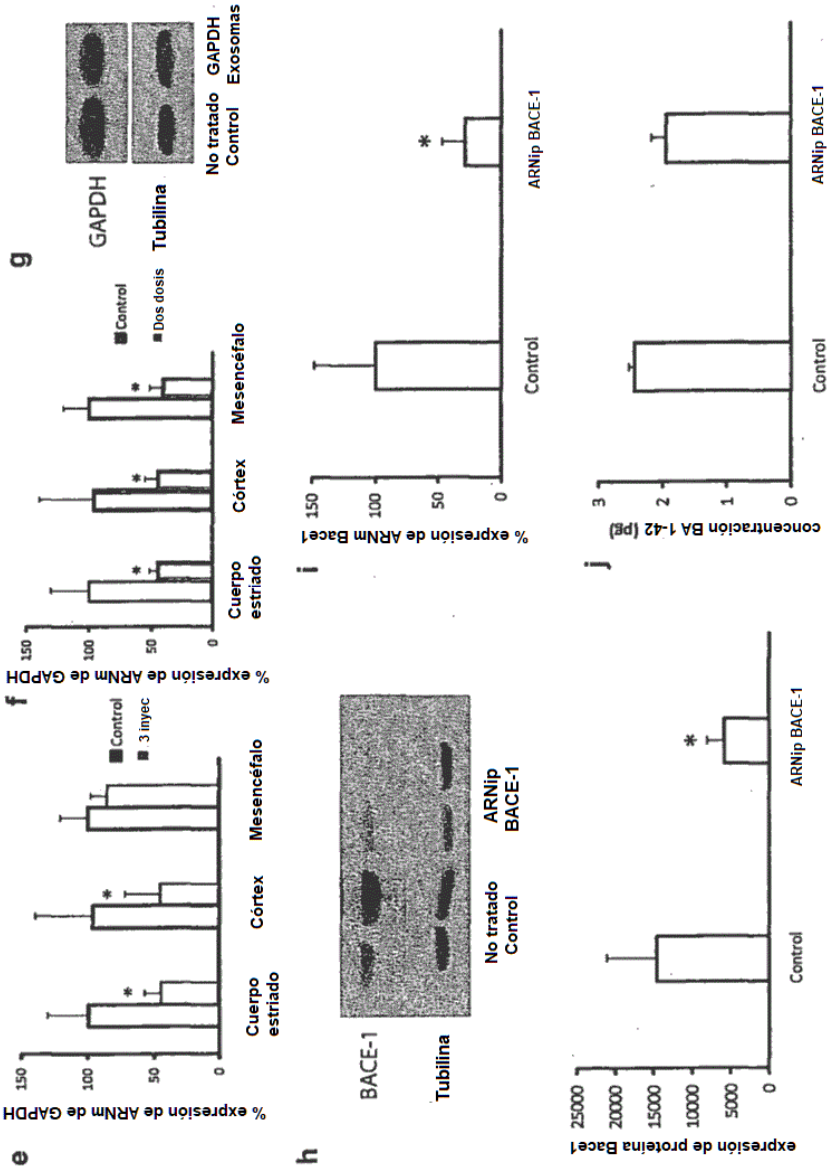

e
% expresión de ARNm de GAPDH
150
100
50
0
Control
3 inyec
Cuerpo estriado
Córtex
Mesencéfalo
f
% expresión de ARNm de GAPDH
150
100
50
0
Control
Dos dosis
Cuerpo estriado
Córtex
Mesencéfalo
g
GAPDH
Tubilina
No tratado
Control
GAPDH
Exosomas
h
BACE-1
Tubilina
No tratado
Control
ARNip BACE-1
i
% expresión de ARNm Bace1
150
100
50
0
Control
ARNip BACE-1
j
concentración BA 1-42 (pg)
3
2
1
0
Control
ARNip BACE-1
expresión de proteína Bace1
25000
20000
15000
10000
5000
0
Control
ARNip BACE-1

Figura 9