

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere a composiciones y métodos que comprenden vesículas extracelulares que albergan ácido nucleico que se dirige a genes, lo que conduce a la polarización de macrófagos de macrófagos asociados a tumores.

ANTECEDENTES

[0002] La inmunoterapia es el tratamiento de la enfermedad al inducir, mejorar o suprimir la respuesta inmune. La inmunoterapia contra el cáncer generalmente tiene menos efectos secundarios que las terapias tradicionales contra el cáncer, como la quimioterapia y la radioterapia. En un enfoque, la inmunoterapia contra el cáncer se ha utilizado para estimular a los propios macrófagos del paciente para que ataquen a las células cancerosas. Los macrófagos muestran diferentes fenotipos, por ejemplo, pueden promover el cáncer o pueden poseer actividad anticancerígena. El fenotipo M2, o «macrófagos activados alternativamente», exhibe típicamente actividades promotoras de cáncer, tales como la supresión del sistema inmune y la producción de actividades extracelulares de remodelación de la matriz y los tejidos. El fenotipo M1, o «macrófagos activados clásicamente», exhibe típicamente actividades anticancerígenas como la fagocitosis de las células tumorales y la estimulación de la inmunidad adaptativa para que las células tumorales puedan ser reconocidas y atacadas. Se necesitan mejoras en los métodos y composiciones inmunomoduladores que promueven la polarización de los macrófagos (es decir, la conversión al fenotipo M1).

COMPENDIO

[0003] Los aspectos de la divulgación abarcan una vesícula extracelular que comprende uno o más componentes inmunomoduladores que, al entrar en contacto con un macrófago, repolarizan selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1. En algunos aspectos, la divulgación abarca una vesícula extracelular que es un exosoma que comprende uno o

más componentes inmunomoduladores que, al entrar en contacto con un macrófago, repolarizan selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1.

[0004] En algunos aspectos, la vesícula extracelular, por ejemplo, el exosoma, comprende uno o más componentes inmunomoduladores que, al entrar en contacto con un macrófago, repolarizan selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1, y el componente o componentes inmunomoduladores es un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN inhibidor, por ejemplo, un ARN antisentido, un siRNA, un shRNA, un miRNA, un lncRNA, un pri-miRNA o un pre-miRNA, o, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido (ASO) o, por ejemplo, el componente inmunomodulador es un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:1-6.

[0005] En algunos aspectos, la vesícula extracelular, por ejemplo, el exosoma, comprende uno o más componentes inmunomoduladores que, al entrar en contacto con un macrófago, repolarizan selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1, y el (componente o componentes) inmunomoduladores, por ejemplo, un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN inhibidor, por ejemplo, un ARN antisentido, un siRNA, un shRNA, un miRNA, un lncRNA, un pri-miRNA o un pre-miRNA, o, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido (ASO) o, por ejemplo, el componente inmunomodulador es un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:1-6, inhibe al menos un gen diana de macrófago, por ejemplo, al menos un gen se selecciona del grupo que consiste en: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-alfa, HIF1-beta, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, Arginasa, Glutaminasa, CEBP/β, Pi3Ky, y PKM2, por ejemplo, STAT3, STAT6, CEBP/β, Pi3Ky, KRAS y HIF1-alfa, por ejemplo, STAT3, por ejemplo, KRAS.

[0006] En algunos aspectos, la vesícula extracelular, por ejemplo, el exosoma, comprende uno o más componentes inmunomoduladores que, al entrar en contacto con un macrófago, repolarizan selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1 y el componente inmunomodulador es un oligonucleótido antisentido que se dirige a STAT3.

[0007] En algunos aspectos, la vesícula extracelular, por ejemplo, el exosoma, comprende uno o más componentes inmunomoduladores que, al entrar en contacto con un macrófago, repolarizan selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1 y el componente inmunomodulador es un oligonucleótido antisentido que se dirige a KRAS.

[0008] En algunos aspectos, la vesícula extracelular, por ejemplo, el exosoma, comprende uno o más componentes inmunomoduladores que, al entrar en contacto con un macrófago, repolarizan selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1 y el componente inmunomodulador es un ARN inmunomodulador, por ejemplo, un ARN antisentido, un siRNA, un shRNA, un miRNA, un lncRNA, un pri-miRNA o un pre-miRNA que se dirige a KRAS, por ejemplo, KRAS humano de tipo salvaje, o KRAS humano de tipo salvaje y también KRAS^{G12D} de ratón.

[0009] En cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, la vesícula extracelular, por ejemplo, el exosoma, comprende uno o más componentes inmunomoduladores, por ejemplo, un ácido nucleico, un ARN inhibidor, ARN antisentido, un siRNA, un shRNA, un miRNA, un lncRNA, un pri-miRNA o un pre-miRNA, o un ASO que, al entrar en contacto con un macrófago, repolarizan selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1 y el macrófago es un macrófago residente en un tumor (por ejemplo, tumor pancreático).

[0010] En cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, la vesícula extracelular, por ejemplo, el exosoma, comprende uno o más componentes inmunomoduladores, por ejemplo, un ácido nucleico, ARN inhibidor, ARN antisentido, siRNA, un shRNA, un miRNA, un lncRNA, un pri-miRNA o un pre-miRNA, o un ASO que, al entrar en contacto con un macrófago, repolariza selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1, y comprende además un componente inmunomodulador adicional, por ejemplo, un fármaco de molécula pequeña, un anticuerpo o fragmento activo de este, por ejemplo, un inhibidor del punto de control inmunitario que se une a CTLA-4, PD-1 o PD-L1, o un inhibidor que se une a CSF1-R, o una proteína terapéutica o fragmento activo de esta.

[0011] En cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, la vesícula extracelular, por ejemplo, el exosoma, comprende uno o más componentes inmunomoduladores, por ejemplo, un ácido nucleico, ARN inhibidor, ARN antisentido, siRNA, un shRNA, un miRNA, un lncRNA, un pri-miRNA o un pre-miRNA, o un ASO que, al entrar en contacto con un macrófago, repolariza selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1, y comprende además un componente inmunomodulador adicional, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento activo de este, por ejemplo, un inhibidor del punto de control inmunitario que se une a CTLA-4, PD-1 o PD-L1, o un inhibidor que se une a CSF1-R, en donde el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 95 % idénticas a las CDR de Ipilimumab, o al menos

95 % idénticas a las CDR de Nivolumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Cemiplimab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Pembrolizumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Atezolizumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Avelumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Durvalumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Pexidartinib, o al menos 95 % idénticas a las CDR de PLX7486, o al menos 95 % idénticas a las CDR deARRY-382, o al menos 95 % idénticas a las CDR de JNJ-40346527, o al menos 95 % idénticas a las CDR de BLZ945, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Emactuzumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de AMG820, o al menos 95 % idénticas a las CDR de IMC-CS4, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Cabiralizumab, o donde el anticuerpo o fragmento activo de este es al menos un anticuerpo que se selecciona del grupo que consiste en Ipilimumab, Nivolumab, Cemiplimab, Pembrolizumab, Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, Pexidartinib, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, Emactuzumab, AMG820, IMC-CS4 y Cabiralizumab, o donde el anticuerpo o fragmento activo de este es al menos un anticuerpo que compite por unirse con un anticuerpo que se selecciona del grupo que consiste en Ipilimumab, Nivolumab, Cemiplimab, Pembrolizumab, Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, Pexidartinib, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, Emactuzumab, AMG820, IMC-CS4 y Cabiralizumab.

[0012] En cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, en donde la vesícula extracelular, por ejemplo, el exosoma, comprende uno o más componentes inmunomoduladores, por ejemplo, un ácido nucleico, ARN inhibidor, ARN antisentido, siRNA, un shRNA, un miRNA, un lncRNA, un pri-miRNA o un pre-miRNA, o un ASO que, al entrar en contacto con un macrófago, repolariza selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1, y comprende además un componente inmunomodulador adicional, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento activo de este, por ejemplo, un inhibidor del punto de control inmunitario que se une a CTLA-4, PD-1 o PD-L1, o un inhibidor que se une a CSF1-R, en donde el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 95 % idénticas a las CDR de Ipilimumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Nivolumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Cemiplimab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Pembrolizumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Atezolizumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Avelumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Durvalumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Pexidartinib, o al menos 95 % idénticas a las CDR de

- PLX7486, o al menos 95 % idénticas a las CDR deARRY-382, o al menos 95 % idénticas a las CDR de JNJ-40346527, o al menos 95 % idénticas a las CDR de BLZ945, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Emactuzumab, o al menos 95 % idénticas a las CDR de AMG820, o al menos 95 % idénticas a las CDR de IMC-CS4, o al menos 95 % idénticas a las CDR de Cabiralizumab, o donde el anticuerpo o fragmento activo de este es al menos un anticuerpo que se selecciona del grupo que consiste en Ipilimumab, Nivolumab, Cemiplimab, Pembrolizumab, Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, Pexidartinib, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, Emactuzumab, AMG820, IMC-CS4 y Cabiralizumab, o donde el anticuerpo o fragmento activo de este es al menos un anticuerpo que compite por unirse con un anticuerpo que se selecciona del grupo que consiste en Ipilimumab, Nivolumab, Cemiplimab, Pembrolizumab, Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, Pexidartinib, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, Emactuzumab, AMG820, IMC-CS4 y Cabiralizumab, comprende además PTGFRN o un fragmento de este y el anticuerpo o fragmento de este puede opcionalmente fusionarse con el PTGFRN o el fragmento de este.
- 15 **[0013]** En cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, la comparación se determina usando un ensayo que se selecciona del grupo que consiste en un ensayo de captación de vesículas extracelulares, un ensayo de expresión génica diana, un ensayo de expresión génica posterior, un ensayo de liberación de citocinas y un ensayo de proteína de superficie celular de macrófagos.
- 20 **[0014]** En cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, el macrófago M2 es un macrófago asociado a tumores que se selecciona del grupo que consiste en un macrófago M2a, M2b y M2c.
- 25 **[0015]** En cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, el macrófago M1 exhibe una mayor secreción de citocinas y quimiocinas inflamatorias que se seleccionan del grupo que consiste en INF γ , IL-12, IL-23, TNF α , IL-6, IL-1, CSCL9, CXCL10 y CXCL11 en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización, y/o exhibe una secreción disminuida de citocinas y quimiocinas inmunosupresoras seleccionadas del grupo que consiste en IL-10, TGF β , PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 y CCL24 en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización, y/o expresa un mayor antígeno asociado al tumor en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización, y/o aumenta la estimulación de células T CD8⁺ y/o células asesinas naturales en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización.
- 30

[0016] En aspectos, la divulgación abarca una composición farmacéutica que comprende la vesícula extracelular, por ejemplo, exosoma, que comprende uno o más componentes inmunomoduladores que, al entrar en contacto con un macrófago, repolarizan selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1.

- 5 [0017] En algunos aspectos, la divulgación abarca un método para tratar una enfermedad (por ejemplo, cáncer tal como, por ejemplo, cáncer de páncreas) en un paciente (por ejemplo, un ser humano) que lo necesite, que comprende administrar (por ejemplo, a través de una vía seleccionada del grupo que consiste en la administración intravenosa, intraperitoneal e intratumoral) la vesícula extracelular de cualquiera de los aspectos descritos anteriormente,
- 10 por ejemplo, el exosoma que comprende uno o más componentes inmunomoduladores (por ejemplo, un ARN inhibidor dirigido a un protooncogén (por ejemplo, KRAS)) que, al entrar en contacto con un macrófago, repolariza selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1 de cualquiera de los aspectos descritos anteriormente, o que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende la vesícula extracelular de cualquiera de los
- 15 aspectos descritos anteriormente, por ejemplo , el exosoma que comprende uno o más componentes inmunomoduladores que, al entrar en contacto con un macrófago, repolarizan selectivamente el macrófago de un fenotipo M2 a uno M1 de cualquiera de los aspectos descritos anteriormente.

- [0018] En algunos aspectos, la divulgación abarca los métodos de tratamiento descritos anteriormente y además comprende una segunda terapia, por ejemplo, una terapia quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, crioterapia, terapia hormonal o inmunoterapia.
- 20

- [0019] En algunos aspectos, la divulgación abarca métodos de modulación de la expresión génica en un macrófago que comprenden poner en contacto el macrófago con una vesícula extracelular que comprende uno o más componentes inmunomoduladores que inhiben al
- 25 menos un gen y, por lo tanto, aumentan la polarización de macrófagos de un fenotipo M2 a uno M1, en comparación con el contacto del macrófago con la o las cantidades equimolares de los componentes inmunomoduladores solos.

- [0020] En algunos aspectos, los métodos de modulación de la expresión génica en un macrófago comprenden poner en contacto el macrófago *ex vivo* o *in vitro* con una vesícula extracelular que comprende uno o más componentes inmunomoduladores que inhiben al
- 30 menos un gen y, por lo tanto, aumentan la polarización de macrófagos de un fenotipo M2 a

uno M1, en comparación con el contacto del macrófago con la o las cantidades equimolares de los componentes inmunomoduladores solos.

[0021]

5 **[0022]** En algunos aspectos, los métodos de modulación de la expresión génica en un macrófago comprenden poner en contacto el macrófago *in vivo*, con una vesícula extracelular (por ejemplo, mediante la administración de la vesícula extracelular al sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, por ejemplo, por una vía que se selecciona del grupo que consiste en administración intravenosa, intraperitoneal e intratumoral) que comprende uno o más componentes inmunomoduladores que inhiben al menos un gen y, por lo tanto, aumentan la polarización de macrófagos de un fenotipo M2 a uno M1, en comparación con el contacto del macrófago con la o las cantidades equimolares de los componentes inmunomoduladores solos.

15 **[0023]** En algunos aspectos, el sujeto de los métodos descritos anteriormente de modulación de la expresión génica en un macrófago, padece una afección seleccionada de cáncer (por ejemplo, cáncer de páncreas) y fibrosis.

20 **[0024]** En algunos aspectos, la vesícula extracelular utilizada en cualquiera de los métodos descritos anteriormente de modulación de la expresión génica en un macrófago es un exosoma, y el componente inmunomodulador es un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN inhibidor, como, por ejemplo, un ARN antisentido, un siRNA, un shRNA, un miRNA, un lncRNA, un pri-miRNA o un pre-miRNA.

[0025] En algunos aspectos, la vesícula extracelular utilizada en cualquiera de los métodos descritos anteriormente de modulación de la expresión génica en un macrófago es un exosoma, y el componente inmunomodulador es un ácido nucleico, por ejemplo, un ASO.

25 **[0026]** En algunos aspectos, la vesícula extracelular utilizada en cualquiera de los métodos descritos anteriormente de modulación de la expresión génica en un macrófago es un exosoma, y el componente inmunomodulador es un ácido nucleico, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:1-6 o un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:1-6 y el al menos un gen se selecciona del grupo
30 que consiste en KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-alfa, HIF1-beta, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, Arginasa, Glutaminasa, CEBP/β,

Pi3K γ , y PKM2, o del grupo que consiste en: STAT3, STAT6, CEBP/ β , Pi3K γ , KRAS, y HIF1- α , o es un STAT3, o es KRAS, y si es KRAS, el componente inmunomodulador puede opcionalmente ser un ARN inhibidor que se dirige a KRAS humano de tipo salvaje.

[0027] En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar el cáncer de páncreas en un sujeto que comprende: administrar al sujeto una vesícula extracelular que comprende un ARN inhibidor dirigido a KRAS de tipo salvaje humano; en donde el tratamiento aumenta el porcentaje de polarización de macrófagos residentes en tumores de un fenotipo M2 a uno M1 a un nivel mayor que el observado en un paciente tratado con un ARN inhibidor dirigido a KRAS^{G12D} humano.

[0028] En algunos aspectos, la divulgación proporciona el método descrito anteriormente para tratar el cáncer de páncreas en un sujeto, en donde el porcentaje de polarización de macrófagos residentes en tumores se determina usando un ensayo *ex vivo* de macrófagos residentes en tumores obtenidos a partir de una muestra de tumor.

[0029] En el presente documento se proporcionan composiciones y métodos que comprenden vesículas extracelulares seleccionadas, enriquecidas o manipuladas con uno o más componentes inmunomoduladores que pueden modificar la actividad de los macrófagos, promoviendo el cambio de los macrófagos del fenotipo M2 al M1 (polarización de macrófagos) y estimulando el sistema inmune del paciente para combatir el cáncer.

[0030] Por consiguiente, en un primer aspecto, en el presente documento se proporciona una vesícula extracelular que comprende uno o más componentes inmunomoduladores, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que inhiben al menos un gen en una célula diana. En ciertas modalidades, la célula diana es un macrófago y la inhibición génica aumenta la polarización de macrófagos del fenotipo M2 al M1 en comparación con una cantidad equimolar del componente o componentes inmunomoduladores solos. En ciertas modalidades, la vesícula extracelular es un exosoma. En ciertas modalidades, el ácido nucleico es un ARN inhibidor. En ciertas modalidades, el ARN inhibidor es un ARN antisentido, un siRNA, un shRNA, un miRNA, un lncRNA, un pri-miRNA o un pre-miRNA. En ciertas modalidades, el al menos un gen se selecciona del grupo que consiste en: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1- α , HIF1- β , Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, Arginasa, Glutaminasa, CEBP/ β , Pi3K γ , y PKM2. En ciertas

modalidades, el gen es KRAS. En ciertas modalidades, el ácido nucleico es un ARN inhibidor que se dirige a KRAS humano de tipo salvaje. En ciertas modalidades, el ARN inhibidor también se dirige a Kras^{G12D} de ratón. En ciertas modalidades, el macrófago es un macrófago residente del tumor. En ciertas modalidades, el tumor es un tumor pancreático. En ciertas modalidades, la vesícula extracelular comprende además un componente inmunomodulador adicional. En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un fármaco de molécula pequeña, un anticuerpo o una proteína terapéutica. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un inhibidor del punto de control inmune. En ciertos aspectos, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las vesículas extracelulares mencionadas anteriormente.

[0031] En ciertos aspectos, se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad en un paciente que lo necesita que comprende administrar las vesículas extracelulares o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento al paciente, tratando así la enfermedad en el paciente. En ciertas modalidades, la enfermedad es un cáncer. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer pancreático. En algunas modalidades, la enfermedad es una afección fibrótica. En algunas modalidades, la afección fibrótica es fibrosis pulmonar, fibrosis hepática o fibrosis pancreática. En ciertas modalidades, la fibrosis hepática es esteatohepatitis no alcohólica, o NASH. En ciertas modalidades, el paciente es humano. En ciertas modalidades, el ácido nucleico es un ARN inhibidor que se dirige a un protooncogén. En ciertas modalidades, el protooncogén es KRAS humano. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer pancreático. En ciertas modalidades, los métodos comprenden además realizar al menos una segunda terapia. En ciertas modalidades, la segunda terapia comprende una terapia quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, crioterapia, terapia hormonal o inmunoterapia.

[0032] En ciertas modalidades, el macrófago M2 de célula diana es un macrófago asociado a tumores que se selecciona del grupo que consiste en un macrófago M2a, M2b y M2c. En ciertas modalidades, el macrófago M1 exhibe una mayor secreción de citocinas y quimiocinas inflamatorias seleccionadas del grupo que consiste en INF γ , IL-12, IL-23, TNF α , IL-6, IL-1, CSCL9, CXCL10 y CXCL11 en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización. En ciertas modalidades, el macrófago M1 exhibe una mayor secreción de citocinas y

quimiocinas inmunosupresoras seleccionadas del grupo que consiste en IL-10, TGF β , PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 y CCL24 en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización. En ciertas modalidades, el macrófago M1 expresa un mayor antígeno asociado al tumor en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización. En ciertas modalidades, el macrófago M1 aumenta la estimulación de células T CD8⁺ y/o células asesinas naturales en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización.

[0033] En ciertos aspectos, en el presente documento se describe un método para tratar el cáncer de páncreas en un sujeto que comprende administrar al sujeto una vesícula extracelular que comprende un ARN inhibidor dirigido a KRAS de tipo salvaje humano; en donde el tratamiento aumenta el porcentaje de polarización de macrófagos residentes en tumores del fenotipo M2 al M1 a un nivel mayor que el observado en un paciente tratado con un ARN inhibidor dirigido a KRAS^{G12D} humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0034] La **FIGURA 1** muestra los niveles de expresión génica de Stat 3, Stat 6, Cebp β -1, Pi3K γ , CEBP β -2 y Kras después de la transfección de cantidades crecientes de siRNA dirigidas a cada uno de los genes.

[0035] La **FIGURA 2** muestra la expresión de Arg1 después de la transfección de cantidades crecientes de siRNA dirigidas a Stat 3, Stat 6, Cebp β -1, Pi3K γ , CEBP β -2, y Kras respectivamente. Los macrófagos transfectados con siRNA entremezclado se usaron como control.

[0036] La **FIGURA 3** muestra la captación de exosomas según lo determinado por la intensidad celular total de GFP de seis subpoblaciones de macrófagos (M0, M1, M2a, M2c, M2++ y TAM).

[0037] La **FIGURA 4** muestra la captación de oligos antisentido libres (ASO libre) y exosomas cargados de ASO (Exo-ASO) por los macrófagos M2 o M0 medida por la intensidad de fluorescencia total.

[0038] La **FIGURA 5A** muestra la captación de exosomas por los macrófagos in vivo después de la inyección intraperitoneal de 1×10^{11} o 1×10^{12} exosomas que contienen GFP en ratones sin tratamiento previo. La **FIGURA 5B** muestra la actualización del exosoma nativo y Exo-ASO por células tumorales y macrófagos in vivo después de la inyección de una dosis única de exosomas nativos no marcados o Exo-ASO marcado con Cy5 en ratones con tumor B16F10.

[0039] La **FIGURA 6** muestra la expresión de Stat 3 en células RAW264.7 murinas polarizadas M2 después de la incubación con ASO libre marcado con colesterol $5 \mu\text{M}$ o 1×10^5 o 1×10^6 exosomas cargados con el ASO marcado con colesterol. Se probaron cinco ASO diferentes marcados con colesterol dirigidos a STAT3: ASO 4.1, química de MOE de cadena doble; ASO 5.1 y ASO 5.2, química de O-metilo de cadena simple; ASO 5.3 y ASO 5.4, química de MOE de cadena simple. Los macrófagos polarizados no tratados y los macrófagos polarizados incubados con exosomas no modificados se usaron como control negativo. Los macrófagos transfectados con siRNA stat 3 se usaron como control positivo.

[0040] La **FIGURA 7** muestra el nivel de transcripción de Arg1 en células RAW264.7 murinas polarizadas M2 después de la incubación con ASO libre marcado con colesterol $5 \mu\text{M}$ o 1×10^5 o 1×10^6 exosomas cargados con el ASO marcado con colesterol. Se probaron cinco ASO diferentes marcados con colesterol dirigidos a STAT3: ASO 4.1, química de MOE de cadena doble; ASO 5.1 y ASO 5.2, química de O-metilo de cadena simple; ASO 5.3 y ASO 5.4, química de MOE de cadena simple. Los macrófagos polarizados no tratados y los macrófagos polarizados incubados con exosomas no modificados se usaron como control negativo. Los macrófagos transfectados con siRNA stat 3 se usaron como control positivo.

[0041] La **FIGURA 8A** muestra la expresión de STAT3 en células RAW264.7 murinas polarizadas M2 después de la incubación con dosis altas ($4 \mu\text{M}$) de ASO o dosis altas ($4 \mu\text{M}$) y bajas ($0,4 \mu\text{M}$) de Exo-ASO para STAT3. La **FIGURA 8B** muestra la expresión de KRAS en células RAW264.7 murinas polarizadas M2 después de la incubación con dosis altas ($4 \mu\text{M}$) de ASO o Exo-ASO para KRAS. La **FIGURA 8C** muestra la expresión de C/EBP β en células M2 RAW264.7 murinas polarizadas M2 después de la incubación con dosis altas ($4 \mu\text{M}$) y bajas ($0,4 \mu\text{M}$) de ASO o Exo-ASO para C/EBP β .

[0042] La **FIGURA 9A** muestra el nivel de transcripción de STAT3 en macrófagos humanos primarios de tres donantes separados después del tratamiento con dosis variables de STAT3 ASO libre o STAT3 Exo-ASO. Se presenta la IC50 de cada tratamiento y la mejora múltiplo de STAT3 Exo-ASO en comparación con STAT3 ASO libre. La **FIGURA 9B** muestra el nivel de CD163 en macrófagos humanos primarios de tres donantes separados después del tratamiento con dosis variables de STAT3 ASO libre o STAT3 Exo-ASO. Se presenta la IC50 de cada tratamiento y la mejora múltiplo de STAT3 Exo-ASO en comparación con STAT3 ASO libre.

[0043] La **FIGURA 10** muestra la expresión del gen diana en macrófagos M2 humanos después del tratamiento con 4 μ M de ASO libre o Exo-ASO para HIF1 α , Pi3K γ , CEBP/ β , STAT6 y STAT3 respectivamente. Los macrófagos M2 humanos no tratados y los macrófagos M2 humanos tratados con 4 μ M de Exo ASO entremezclado se utilizaron como control.

[0044] La **FIGURA 11** muestra la expresión de CD163 en macrófagos M2 humanos después del tratamiento con 4 μ M de ASO libre o Exo-ASO para HIF1 α , Pi3K γ , CEBP/ β , STAT6 y STAT3 respectivamente. Los macrófagos M2 humanos no tratados y los macrófagos M2 humanos tratados con 4 μ M de Exo ASO entremezclado se utilizaron como control.

[0045] La **FIGURA 12A** muestra la inducción de IL-12 después del tratamiento con 4 μ M de STAT3 ASO libre, 4 μ M de STAT3 Exo-ASO, 4 μ M de Exo-ASO entremezclado, exosomas nativos o C188-9, un inhibidor de molécula pequeña de STAT3 en presencia o ausencia de LPS. La **FIGURA 12B** muestra la inducción de IL-23 después del tratamiento con 4 μ M de STAT3 ASO libre, 4 μ M de STAT3 Exo-ASO, 4 μ M de Exo-ASO entremezclado, exosomas nativos o C188-9, un inhibidor de molécula pequeña de STAT3 en presencia o ausencia de LPS.

[0046] La **FIGURA 13A** muestra el nivel de transcripción de STAT3 después del tratamiento con exosomas no modificados (solo EV) y Stat 3 ASO libre y Stat 3 Exo-ASO emparejados por concentración. La **FIGURA 13B** muestra el nivel de transcripción de CD163 después del tratamiento con exosomas no modificados (solo EV) y Stat 3 ASO libre y Stat 3 Exo-ASO emparejados por concentración. La **FIGURA 13C** muestra el nivel de transcripción de TGF β después del tratamiento con exosomas no modificados (solo EV) y Stat 3 ASO libre y Stat 3

Exo-ASO emparejados por concentración. La **FIGURA 13D** muestra el nivel de transcripción de STAT6 después del tratamiento con exosomas no modificados (solo EV) y Stat 3 ASO libre y Stat 3 Exo-ASO emparejados por concentración.

[0047] La **FIGURA 14** muestra el nivel de expresión de TGF β después del tratamiento con exosomas cargados con ASO contra STAT3 (química tanto de MOE como LNA), STAT6 (química de MOE) y CEBP β (química de MOE) respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0048] La polarización de los macrófagos es un proceso mediante el cual los macrófagos adoptan diferentes programas funcionales en respuesta a las señales de su microambiente. Esta capacidad está relacionada con sus múltiples funciones en el organismo: son células efectoras poderosas del sistema inmune innato, pero también importantes en la eliminación de restos celulares, desarrollo embrionario y reparación de tejidos.

[0049] Los fenotipos de macrófagos se dividen ampliamente en 2 grupos: M1 (macrófagos activados de forma clásica) y M2 (macrófagos activados de forma alternativa). Esta amplia clasificación se basa en estudios *in vitro*, en los que los macrófagos cultivados se trataron con moléculas que estimulaban su cambio de fenotipo a un estado particular. Los macrófagos M1 son proinflamatorios, importantes en la defensa directa del huésped contra el patógeno, como la fagocitosis y la secreción de citocinas proinflamatorias y moléculas microbicidas. Los macrófagos M2 tienen una función bastante opuesta: la regulación de la fase de resolución de la inflamación y la reparación de los tejidos dañados. véase, por ejemplo, Wynn, T. A., Chawla, A., y Pollard, J. W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature*, 496(7446), 445–455; Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173. Muchos tumores sólidos se caracterizan por un infiltrado celular rico en mieloides, que a menudo comprende un tipo de macrófago M2 conocido como macrófagos asociados a tumores (TAM). Los macrófagos M2 (como los TAM) expresan altos niveles de STAT3 y STAT6 fosforilados, que promueven la expresión de la enzima metabólica Arginasa (Arg1). Los TAM median una serie de actividades promotoras de tumores, tales como, por ejemplo, la promoción de la motilidad de las células cancerosas, la

formación de metástasis y la angiogénesis, y la formación de TAM depende de factores microambientales que están presentes en el desarrollo del tumor. Los TAM producen citocinas inmunosupresoras como, por ejemplo, IL-10, TGF β , PGE2 y una cantidad muy pequeña de NO o ROI y bajos niveles de citocinas inflamatorias (IL-12, IL-1 β , TNF α , IL-6). En comparación con los macrófagos M1 «activados de forma clásica», la presentación de antígenos asociados a tumores por TAM disminuye, al igual que la estimulación de las funciones antitumorales de las células T y NK. A diferencia de los macrófagos M1, los TAM no pueden lisar las células tumorales.https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_polarization-cite_note-Sica2008-31 Por lo tanto, el direccionamiento de TAM y otros macrófagos M2 proporciona una estrategia terapéutica novedosa contra el cáncer, como se ha demostrado a través de la administración de agentes para alterar el reclutamiento y la distribución de TAM, agotar las TAM existentes o inducir la reeducación de TAM de un fenotipo M2 a uno M1.

[0050] La terapéutica del exosoma de la presente invención tiene efectos selectivos sobre los macrófagos M2 para promover un microambiente residente en tejidos para tratar enfermedades como el cáncer y la fibrosis al «repolarizar» los macrófagos aberrantes a un fenotipo M1 en el contexto de esta enfermedad. Los exosomas descritos en este documento están diseñados con precisión con varias moléculas biológicamente activas en la superficie del exosoma o dentro de la cavidad del exosoma para crear candidatos que comprometan las vías que repolarizan los macrófagos M2 al fenotipo M1 para tratar la enfermedad humana.

[0051] Los macrófagos polarizados M2 asociados a tumores, o TAM, pueden suprimir eficazmente la proliferación de células T y la función efectora y promover el crecimiento tumoral. También se ha informado la reversión de TAM a un fenotipo M1 utilizando un anticuerpo que agota los macrófagos dirigidos contra el receptor CSF-1. Estos enfoques han demostrado un éxito limitado en los ensayos clínicos debido a una ventana terapéutica estrecha y la falta de especificidad debido al direccionamiento de todos los macrófagos y no solo los macrófagos M2 aberrantes como se pretende. Se esperaría que el agotamiento total de los macrófagos produzca un mayor riesgo de infección y otros problemas de seguridad. Los exosomas de la presente invención se dirigen más selectivamente a los macrófagos M2 debido al tropismo exosómico natural para los macrófagos e inclinan el equilibrio de la función hacia el fenotipo M1 deseado. Estos exosomas repolarizan los macrófagos, lo que resulta en la producción del espectro deseado de citocinas inflamatorias necesarias para las respuestas

inmunes antitumorales. Como se muestra en los ejemplos a continuación, los exosomas han reprogramado los macrófagos M2 inmunosupresores al fenotipo M1 *in vitro*.

[0052] Además de la supresión inmune inducida en el microambiente tumoral, los macrófagos polarizados M2 secretan grandes cantidades de factor de crecimiento transformante beta, o TGF β , una citocina importante implicada en la señalización celular, que induce la acumulación de fibroblastos que conduce a la deposición de colágeno y la remodelación del tejido, lo que finalmente resulta en fibrosis tisular. Se ha demostrado que la reprogramación de estos macrófagos M2 para reducir la producción de TGF β al dirigirse a moléculas de señalización clave, como STAT3, tiene actividad beneficiosa en modelos preclínicos de fibrosis pulmonar.

Se han empleado varios enfoques de moléculas pequeñas para dirigirse a STAT3, pero la falta de especificidad de inhibición solo dentro de los macrófagos M2 aberrantes ha impedido que este enfoque de tratamiento sea viable. Ciertos exosomas descritos en el presente documento se dirigen selectivamente a las vías clave en los macrófagos M2, lo que les permite dirigirse a STAT3 y otras vías celulares en el pulmón y otros síndromes de fibrosis tisular.

[0053] En el presente documento se describen vesículas extracelulares útiles para modular los macrófagos del sistema inmune. Estas vesículas extracelulares comprenden uno o más componentes inmunomoduladores que, al entrar en contacto con un macrófago, inhiben al menos un gen diana de macrófago y, por lo tanto, aumentan la polarización de macrófagos de un fenotipo M2 a uno M1, en comparación con la o las cantidades equimolares de uno o más componentes inmunomoduladores solos. También se proporcionan métodos para producir las vesículas extracelulares, y métodos para utilizar estas vesículas extracelulares para tratar el cáncer y otras enfermedades relacionadas con el sistema inmune tales como, por ejemplo, afecciones fibróticas.

[0054] Antes de que la presente invención se describa con mayor detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a modalidades particulares descritas, ya que estas, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

[0055] Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto claramente establezca otra cosa, entre el límite superior e inferior de dicho intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, queda comprendido en la invención.

5 Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también están incluidos en la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno de los límites o ambos, los intervalos que excluyen cualquiera de estos límites incluidos, o ambos, también están incluidos en la
10 invención.

[0056] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que normalmente les atribuye el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Si bien se pueden utilizar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente para llevar a la práctica o
15 analizar la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales ilustrativos.

[0057] Todas las publicaciones y patentes citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente como referencia como si se indicara que cada publicación o patente individual se incorpora específica e individualmente como referencia y se incorporan en la presente como referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con
20 los cuales se citan las publicaciones.

[0058] Cabe destacar que, tal como se usan en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular «un», «una», y «el/la» incluyen referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la expresión «al menos uno» incluye referentes plurales (es decir, es equivalente a la frase «uno o más», a menos
25 que el contexto indique claramente lo contrario). Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. De este modo, esta declaración tiene la intención de servir como base antecedente para el uso de una terminología exclusiva como «únicamente», «solo» y similares en relación con la recitación de elementos de reivindicación, o el uso de una limitación negativa.

[0059] El término «aproximadamente», cuando se usa para modificar valores numéricos, pretende abarcar variaciones en los valores establecidos que son funcionalmente equivalentes a los valores establecidos a efectos de poner en práctica la tecnología descrita, como puede ser determinado fácilmente por el experto en la técnica. En ciertas modalidades, el término «aproximadamente» incluye +/- 5 %, +/- 10 %, +/- 20 %, +/- 30 %, +/- 40 % o +/- 50 % de variación de los valores indicados.

[0060] Como será evidente para los expertos en la técnica al leer esta divulgación, cada una de las modalidades individuales descritas e ilustradas en este documento tiene componentes y características discretas que pueden separarse fácilmente o combinarse con las características de cualquiera de las otras modalidades sin apartarse del alcance o espíritu de la presente invención. Cualquier método recitado puede llevarse a cabo en el orden de los eventos recitados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

[0061] Al describir adicionalmente la presente invención, los presentes sistemas para su uso en la práctica de los presentes métodos se discutirán con mayor detalle, seguido de una revisión de los métodos asociados.

[0062] Como se usa en el presente documento, el término «vesícula extracelular» se refiere a una vesícula derivada de células que comprende una membrana que encierra un espacio interno. Las vesículas extracelulares comprenden todas las vesículas unidas a la membrana que tienen un diámetro menor que la célula de la que derivan. En general, las vesículas extracelulares varían en diámetro de 20 nm a 1000 nm, y pueden comprender varias cargas macromoleculares dentro del espacio interno, que se muestran en la superficie externa de la vesícula extracelular y/o que abarcan la membrana. La carga puede comprender ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, moléculas pequeñas y/o combinaciones de estos. A modo de ejemplo y sin limitación, las vesículas extracelulares incluyen cuerpos apoptóticos, fragmentos de células, vesículas derivadas de células por manipulación directa o indirecta (por ejemplo, por extrusión en serie o tratamiento con soluciones alcalinas), organelos vesiculados y vesículas producidas por células vivas (por ejemplo, mediante la gemación directa de la membrana plasmática o la fusión del endosoma tardío con la membrana plasmática). Las vesículas extracelulares pueden derivarse de un organismo vivo o muerto, tejidos u órganos explantados y/o células cultivadas. Las especies de vesículas extracelulares

incluyen exosomas y nanovesículas, como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. de propiedad conjunta n.º 10,195,290, incorporada aquí como referencia a todos los efectos.

[0063] Como se usa en el presente documento, el término «exosoma» se refiere a una pequeña vesícula derivada de células (entre 20-300 nm de diámetro, más preferentemente 40-200 nm de diámetro) que comprende una membrana que encierra un espacio interno y que se genera a partir de la célula por gemación directa de la membrana plasmática o por fusión del endosoma tardío con la membrana plasmática. El exosoma es una especie de vesícula extracelular. El exosoma comprende lípidos o ácidos grasos y polipéptidos y, opcionalmente, comprende una carga útil (p. ej., un agente terapéutico), un receptor (p. ej., un resto de direccionamiento), un polinucleótido (p. ej., un ácido nucleico, ARN o ADN), un azúcar (p. ej., un azúcar simple, polisacárido o glicano) u otras moléculas. El exosoma puede derivarse de una célula productora y aislarse de la célula productora en función de su tamaño, densidad, parámetros bioquímicos o una combinación de estos.

[0064] Como se usa en el presente documento, el término «nanovesícula» se refiere a una pequeña vesícula derivada de células (entre 20-250 nm de diámetro, más preferentemente 30-150 nm de diámetro) que comprende una membrana que encierra un espacio interno y que se genera a partir de la célula por manipulación directa o indirecta de tal manera que la célula productora no produzca la nanovesícula sin la manipulación. Las manipulaciones apropiadas de la célula productora incluyen, pero no se limitan a extrusión en serie, tratamiento con soluciones alcalinas, sonicación o combinaciones de estos. La producción de nanovesículas puede, en algunos casos, provocar la destrucción de la célula productora. Preferentemente, las poblaciones de nanovesículas están sustancialmente libres de vesículas que se derivan de las células productoras a través de la gemación directa de la membrana plasmática o la fusión del endosoma tardío con la membrana plasmática. La nanovesícula es una especie de vesícula extracelular. La nanovesícula comprende lípidos o ácidos grasos y polipéptidos y, opcionalmente, comprende una carga útil (p. ej., un agente terapéutico), un receptor (p. ej., un resto de direccionamiento), un polinucleótido (p. ej., un ácido nucleico, ARN o ADN), un azúcar (p. ej., un azúcar simple, polisacárido o glicano) u otras moléculas. La nanovesícula, una vez que se deriva de una célula productora de acuerdo con la

manipulación, puede aislarse de la célula productora en función de su tamaño, densidad, parámetros bioquímicos o una combinación de estos.

[0065] El término «fenotipo M2», como se usa en el presente documento, se refiere a macrófagos que exhiben una o más actividades promotoras de tumores o expresan marcadores conocidos en la técnica que están asociados con el fenotipo M2, tales como, pero sin limitarse a, reducción o falta de estimulación de células T CD8⁺ y/o células asesinas naturales; falta de fagocitosis de células tumorales; secreción y/o expresión de citocinas asociadas a M2 (p. ej., IL-10, TGFβ, PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 y CCL24); secreción y/o expresión de factores de crecimiento (p. ej., VEGF-A, VEGF-C, EGF y TGF-β); secreción y/o expresión de enzimas metastásicas (p. ej., metaloproteinasas de matriz MMP2, MMP9, cisteína catepsina proteasas); secreción/expresión de factores inmunosupresores (p. ej., Arginasa I (ArgI), que extrae el sustrato L-arginina de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)); expresión de marcadores de superficie celular YM1, FIZZ1, Dectina-1, MGL, expresión de miRNA asociados con M2 (p. ej., miRNA146a, miRNA let 7b y miR-223) (véase, por ejemplo, Mosser, DM, y Edwards, JP (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–96; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20; y Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10 (5), 520–5299, y referencias citadas allí, cada una incorporada como referencia a todos los efectos) y/o expresión/secreción reducida de factores asociados a M1 o actividades asociadas a M1 reducido enumeradas a continuación en comparación con al menos una muestra de referencia, en donde la muestra de referencia comprende una población de macrófagos activados por M1. La activación de M1 *in vitro* es evocada por el tratamiento con ligandos de TLR tales como lipopolisacáridos bacterianos (LPS), típicos para bacterias Gram-negativas y ácido lipoteicoico (LTA), típico para bacterias Gram -positivas, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o combinación de LPS e interferón-gamma (IFN-γ). Véase Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173;

Krausgruber, Thomas, *et ál.* «IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses.» *Nature immunology* 12.3 (2011): 231-238 y Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6 (marzo), 1–13, y referencias citadas allí, cada una incorporada en la presente como referencia a todos los efectos.

[0066] El término «fenotipo M1», como se usa en el presente documento, se refiere a macrófagos que exhiben actividades o marcadores antitumorales conocidos en la técnica que están asociados con el fenotipo M1, tales como, pero sin limitarse a, estimulación de células T CD8⁺ y/o células asesinas naturales, fagocitosis de células tumorales, secreción y/o expresión de citocinas asociadas a M1 (p. ej., INF γ , IL-12, IL-23, TNF α , IL-6, IL-1, CCL5, CSCL9, CXCL10 y CXCL11), expresión de miRNA asociados a M1 (p. ej., miRNA155, miR-33) (véase, por ejemplo, Mosser, DM, & Edwards, JP (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–96; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20; y Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10 (5), 520–5299, y referencias citadas allí, cada una incorporada como referencia a todos los efectos) y/o expresión/secreción reducida de factores asociados a M2 o actividades asociadas a M2 reducido enumeradas anteriormente en comparación con al menos una muestra de referencia, en donde la muestra de referencia comprende una población de macrófagos activados por M2. La activación de M2 *in vitro* se evoca mediante el tratamiento con IL-4 e IL-13 (véase, por ejemplo, Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 520–529, incorporada por referencia a todos los efectos).

[0067] La expresión «polarización de macrófagos» como se usa en el presente documento, se refiere al cambio de un macrófago de un fenotipo M2 a uno M1y/o se refiere a un aumento en el porcentaje de una población de macrófagos encontrados en un paciente (p. ej., macrófagos asociados con un tumor o macrófagos circulantes) de macrófagos que exhiben el fenotipo M1 en comparación con al menos una muestra de referencia (p. ej., una muestra

tomada del mismo paciente antes de la muestra de prueba o datos históricos). Véase, p. ej., Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173; Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969; y Xue, J., Schmidt, S. V. y Schultze, J. L. (2014), Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity*, 40(2) 274-288, cada uno incorporado por referencia a todos los efectos.

[0068] La expresión «suministro de vesículas extracelulares» se refiere a la administración y localización de vesículas extracelulares a tejidos, células, y/u órganos diana del sujeto. En algunas modalidades, el componente inmunomodulador puede administrarse al citoplasma de una célula diana. En otras modalidades, el componente inmunomodulador se administra a la membrana de la célula diana. En algunas modalidades, la membrana de la vesícula extracelular se fusiona con una membrana de una célula diana.

[0069] Como se usa en este documento, el término «célula productora» se refiere a cualquier célula de la que se puede aislar una vesícula extracelular. Una célula productora es una célula que sirve como fuente para la vesícula extracelular. Una célula productora puede compartir un componente de proteína, lípidos, azúcar o ácido nucleico con la vesícula extracelular. En algunas modalidades, la célula productora es una célula modificada o sintética. En algunas modalidades, la célula productora es una célula cultivada o aislada. En ciertas modalidades, la célula productora es una línea celular. En algunas modalidades, la línea celular productora es una línea celular de riñón embrionario humano. En algunas modalidades, la línea celular productora es una línea celular HEK293SF. En ciertas modalidades, la célula productora es una célula primaria. En algunas modalidades particulares, la célula productora es una célula inmune, tal como, por ejemplo, un linfocito B, un linfocito T, una célula dendrítica, un mastocito, un macrófago, una célula asesina natural (célula NK), una célula presentadora de antígeno, una célula T auxiliar o una célula T reguladora (célula Treg).

[0070] «Membrana», como se usa en el presente documento, es una capa límite que separa un espacio interior de un espacio exterior que comprende uno o más compuestos biológicos,

típicamente lípidos, y opcionalmente polipéptidos y/o carbohidratos. En algunas modalidades, la membrana comprende lípidos y ácidos grasos. En algunas modalidades, la membrana comprende fosfolípidos, glicolípidos, ácidos grasos, esfingolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, colesterol y fosfatidilserinas. En algunas de estas modalidades, la membrana comprende además uno o más polipéptidos y/o uno o más polisacáridos, como el glicano. La vesícula extracelular comprende una membrana como se define en la presente.

[0071] Como se usa en el presente documento, el término «componente inmunomodulador» se refiere a un agente terapéutico que actúa sobre una diana (por ejemplo, un gen diana, que incluye a modo de ejemplo, pero sin limitación, KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-alfa, HIF1-beta, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, Arginasa, Glutaminasa, CEBP/β, Pi3Kγ, y PKM2) que se pone en contacto con el agente y modifica una célula inmune (por ejemplo, un macrófago u otras células inmunes). El componente inmunomodulador que se puede introducir en una vesícula extracelular y/o una célula productora incluye agentes terapéuticos tales como un polinucleótido, tal como un ácido nucleico inhibidor (por ejemplo, oligonucleótido antisentido (ASO), siRNA, miRNA, ARN antisentido, shRNA, lncRNA, pri-miRNA y pre-miRNA), un agonista, un antagonista, un anticuerpo, y/o un fragmento de unión al antígeno, moduladores de inhibidores de punto de control inmunitario o ligandos de inhibidores de punto de control inmunitario, antígenos de superficie y derivados de estos y/o citocinas y derivados de estas. En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador es un ácido nucleico inhibidor (por ejemplo, oligonucleótido antisentido (ASO), siRNA, miRNA, ARN antisentido, shRNA, lncRNA, pri-miRNA y pre-miRNA). Véase, por ejemplo, Weiss, B. (ed.): *Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001). «Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells». *Nature*. **411** (6836): 494–988; Bartel DP (enero 2004). «MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function». *Cell*. **116** (2): 281–97; Paddison, PJ; Caudy, AA; Bernstein, E; Hannon, GJ; Conklin, DS (15 de abril de 2002). «Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells». *Genes & Development*. **16** (8): 948–58; Ma L, Bajic VB, Zhang Z (junio de 2013). «On the classification of long non-coding RNAs». *RNA Biology*. 10 (6): 925–33; y

Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (marzo de 2003). «A uniform system for microRNA annotation». *RNA*. 9 (3): 277–9, cada uno de los cuales se incorpora en la presente a todos los efectos.

5 [0072] Como se usa en el presente documento, la frase «molécula de ácido nucleico que inhibe» o «ácido nucleico inhibidor» se refiere a cualquier ácido nucleico que, cuando se introduce en una célula para que interactúe con un gen diana, produce la inhibición de la expresión o actividad de ese gen diana. Una molécula de ácido nucleico que inhibe, es decir, un ácido nucleico inhibidor puede ser ADN o un ARN inhibidor (p. ej., siRNA, miRNA, ARN antisentido, shRNA, lncRNA, pre-miRNA o mRNA), en donde dicho ARN es de cadena simple, de cadena doble, o contiene regiones tanto de cadena simple como de cadena doble. En algunas modalidades, un ácido nucleico inhibidor es un oligonucleótido antisentido (ASO). El ASO puede ser un ADN, ARN o híbrido de ADN/ARN de cadena simple o de cadena doble. Véase, por ejemplo, *Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA: Novel Pharmacological and Therapeutic Agents*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997, incorporado en la presente como referencia a todos los efectos. Un «EXO ASO» es un ASO que está físicamente asociado con una vesícula extracelular como, por ejemplo, un exosoma, a través de interacciones con la membrana de la vesícula (por ejemplo, como ocurre con los ASO derivados de colesterol o acilo graso), o mediante carga dentro de la cavidad vesicular usando técnicas como la electroporación, o mediante ingeniería genética de una célula productora, como por ejemplo, por transfección o transducción para introducir en la célula productora una construcción que codifica el ASO deseado, seguido del aislamiento de vesículas extracelulares de la célula productora modificada.

25 [0073] El término «receptor» se refiere a una molécula que dirige la vesícula extracelular a una diana y/o promueve la interacción de la vesícula extracelular con la diana en el sujeto. En algunas modalidades, el receptor es un polipéptido, a veces también denominado en el presente documento «polipéptido receptor». En algunas modalidades, el receptor es capaz de aumentar la concentración del componente inmunomodulador en el tejido del sujeto, tal como por tráfico dirigido al tejido diana del sujeto. Los ejemplos de receptores incluyen, entre otros, los ejemplos enumerados en la Tabla 3.

[0074] El término «diana» puede referirse a un gen, cuya actividad debe ser modulada por un componente inmunomodulador de la presente divulgación (es decir, un gen diana). En ciertas modalidades, el gen diana es inhibido por una molécula de ácido nucleico asociada con (es decir, unida a la superficie de la membrana, intercalada dentro de la bicapa lipídica o encapsulada dentro del volumen cerrado de la vesícula) vesículas extracelulares, como, por ejemplo, un ASO inhibidor. Ejemplos de genes diana incluyen, entre otros, KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-alfa, HIF1-beta, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, Arginasa, Glutaminasa, CEBP/β, Pi3Ky, y PKM2. «Diana» también puede referirse a una célula a la que se dirigen las vesículas extracelulares de la presente divulgación (es decir, una célula diana). En ciertas modalidades, la célula diana es una célula inmune (por ejemplo, un macrófago). En ciertas modalidades, la célula diana es una célula madre hematopoyética o una célula madre pluripotente. En ciertas modalidades, la célula diana es un macrófago circulante. En ciertas modalidades, la célula diana es un macrófago residente del tumor (es decir, un macrófago ubicado en el microambiente del tumor, en el tejido tumoral o cerca de la superficie del tumor). Además, «diana» también puede referirse a una proteína en una célula diana, cuya actividad se modula por contacto con un componente inmunomodulador de la presente divulgación, o una proteína que actúa como un ligando para unir las vesículas extracelulares de la presente divulgación (es decir, una proteína diana). Por lo tanto, en ciertas modalidades, la proteína diana está en la célula diana e interactúa con la vesícula extracelular.

[0075] Un «agente terapéutico» o «molécula terapéutica» incluye un compuesto o molécula que, cuando está presente en una cantidad eficaz, produce un efecto terapéutico deseado, efecto farmacológico y/o fisiológico en un sujeto que lo necesita. Incluye cualquier compuesto, por ejemplo, un fármaco de molécula pequeña, o un producto biológico (por ejemplo, un fármaco polipeptídico o un fármaco de ácido nucleico) que cuando se administra a un sujeto tiene un efecto medible o transportable en el sujeto, por ejemplo, alivia o disminuye un síntoma de una enfermedad, trastorno o afección.

[0076] La expresión «inhibidor del punto de control inmunitario» o «inhibidor del punto de control» como se usa en el presente documento, se refiere a un agente terapéutico que estimula la actividad de las células inmunes al reducir las vías del punto de control

inmunosupresor que suprimen las células inmunes (por ejemplo, agentes que inhiben PD-1/PD-L1 (como Nivolumab Cemiplimab y Pembrolizumab dirigidos a PD-1, y Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, cada uno dirigido a PD-L1) y CTLA-4/B7-1/B7-2, como Ipilimumab). Véase, por ejemplo, Pardoll DM (marzo 2012). «The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy». *Nature Reviews. Cancer*. 12 (4): 252–64.

[0077] Como se usa en el presente documento, el término «anticuerpo» abarca una inmunoglobulina ya sea natural o producida de forma parcial o totalmente sintética y fragmentos de esta. El término también cubre cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo a un dominio de unión a inmunoglobulina. «Anticuerpo» incluye además un polipéptido que comprende una región marco de un gen de inmunoglobulina o fragmentos de este que se unen y reconocen específicamente un antígeno. El uso del término anticuerpo está destinado a incluir anticuerpos completos, anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes, fragmentos de estos, y además incluye anticuerpos de cadena simple, anticuerpos humanizados, anticuerpos murinos, quiméricos, anticuerpos monoclonales humanos de ratón, primates de ratón, de primates y humanos, anticuerpos anti-idiotipo, fragmentos de anticuerpos, tales como, por ejemplo, scFv, (scFv)₂, Fab, Fab 'y F (ab')₂, F (ab1)₂, Fv, dAb y fragmentos de Fd, diacuerpos y polipéptidos relacionados con anticuerpos. El anticuerpo incluye anticuerpos biespecíficos y anticuerpos multiespecíficos siempre que exhiban la actividad o función biológica deseada. Las composiciones de anticuerpos ilustrativas incluyen anticuerpos que inhiben CTLA-4, tales como, por ejemplo, Ipilimumab, aquellas que inhiben PD-1, tales como, por ejemplo, Nivolumab Cemiplimab y Pembrolizumab, aquellas que inhiben PD-L1, tales como, por ejemplo, Atezolizumab, Avelumab , Durvalumab, y aquellas que inhiben CSFR1, tales como, por ejemplo, Pexidartinib, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, Emactuzumab, AMG820, IMC-CS4 y Cabiralizumab. El término «fragmento de unión al antígeno» usado en el presente documento se refiere a fragmentos de una inmunoglobulina intacta, y cualquier parte de un polipéptido que incluye regiones de unión al antígeno que tienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Por ejemplo, el fragmento de unión al antígeno puede ser un fragmento F(ab')₂ , un fragmento Fab', un fragmento Fab, un fragmento Fv o un fragmento scFv, pero no está limitado a estos. Un fragmento Fab tiene un sitio de unión al antígeno y

contiene las regiones variables de una cadena ligera y una cadena pesada, la región constante de la cadena ligera y la primera región constante CH1 de la cadena pesada. Un fragmento Fab' difiere de un fragmento Fab en que el fragmento Fab' incluye adicionalmente la región bisagra de la cadena pesada, que incluye al menos un residuo de cisteína en el extremo C de la región CH1 de la cadena pesada. El fragmento $F(ab')_2$ se produce mediante el cual los residuos de cisteína del fragmento Fab' se unen mediante un enlace disulfuro en la región bisagra. Un fragmento Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que tiene solo regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera, y una técnica recombinante para producir el fragmento Fv es bien conocida en la técnica. Los fragmentos Fv de dos cadenas pueden tener una estructura en la que las regiones variables de la cadena pesada están unidas a las regiones variables de la cadena ligera mediante un enlace no covalente. Los fragmentos Fv de cadena simple (scFv) generalmente pueden tener una estructura de dímero como en los fragmentos Fv de dos cadenas en los que las regiones variables de la cadena pesada se unen covalentemente a las regiones variables de la cadena ligera a través de un conector peptídico o las regiones variables de la cadena pesada y ligera están directamente unidas entre sí en el extremo C de este. El fragmento de unión al antígeno se puede obtener usando una proteasa (por ejemplo, un anticuerpo completo se digiere con papaína para obtener fragmentos Fab, y se digiere con pepsina para obtener fragmentos $F(ab')_2$) y puede prepararse mediante una técnica recombinante genética. Un fragmento dAb consiste en un dominio VH. Las moléculas de anticuerpos de cadena simple pueden comprender un polímero con varias moléculas individuales, por ejemplo, dímero, trímero u otros polímeros.

[0078] La frase «molécula de ácido nucleico» se refiere a un polímero de cadena simple o doble de desoxirribonucleótidos o bases de ribonucleótidos. Incluye ADN cromosómico y plásmidos autorreplicantes, vectores, mRNA, tRNA, siRNA, miRNA, etc. La molécula de ácido nucleico puede ser recombinante y los polipéptidos exógenos pueden expresarse cuando el ácido nucleico se introduce en una célula. El término abarca ácidos nucleicos químicamente modificados, como los descritos en, por ejemplo, Selvam C, Mutisya D, Prakash S, Ranganna K, Thilagavathi R. «Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends,» *Chem Biol Drug Des.* noviembre de 2017;90(5):665-678, Locked Nucleic Acids (LNAs) como se

describe en, por ejemplo, Petersen M, Wengel J (febrero de 2003). «LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics». *Trends Biotechnol.* 21 (2): 74–81; y otros tipos de ácidos nucleicos químicamente modificados y clínicamente relevantes como los descritos en, por ejemplo, Summerton, J; Weller, D (1997). «Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation and Properties». *Antisense & Nucleic Acid Drug Development.* 7 (3): 187–195; Goodchild, J (2011). Therapeutic oligonucleotides. *Methods in Molecular Biology.* 764. pp. 1–15, cada una incorporada en la presente como referencia a todos los efectos.

[0079] El término «agonista» se refiere a una molécula que se une a un receptor y activa el receptor para producir una respuesta biológica. Los receptores pueden ser activados por un agonista endógeno o exógeno. Ejemplos no limitantes de agonista endógeno incluyen hormonas y neurotransmisores. Los ejemplos no limitantes de agonistas exógenos incluyen varias clases de compuestos que incluyen moléculas pequeñas, anticuerpos, péptidos sintéticos, etc. El agonista puede ser un agonista completo, parcial o inverso.

[0080] El término «antagonista» se refiere a una molécula que bloquea o amortigua una respuesta mediada por agonista en lugar de provocar una respuesta biológica en sí misma al unirse a un receptor. Muchos antagonistas alcanzan su potencia al competir con ligandos o sustratos endógenos en sitios de unión estructuralmente definidos en los receptores. Los ejemplos no limitantes de antagonistas incluyen bloqueadores alfa, bloqueadores beta y bloqueadores de los canales de calcio. El antagonista puede ser un antagonista competitivo, no competitivo o incompetitivo.

[0081] Como se usa en el presente documento, el término «composición farmacéutica» se refiere a uno o más de los compuestos descritos en el presente documento, tales como, por ejemplo, una vesícula extracelular mezclada o entremezclada o suspendida en uno o más componentes químicos diferentes, tales como portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables. Un propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de preparaciones de vesículas extracelulares a un sujeto. El término «farmacéuticamente aceptable» y las variaciones gramaticales de este, se refieren a composiciones, portadores, diluyentes y reactivos capaces de administración a un sujeto sin producir efectos fisiológicos indeseables en un grado que prohíba la administración de la composición. El término «excipiente» o «portador» se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición

farmacéutica para facilitar aún más la administración de un compuesto. La expresión «portador farmacéuticamente aceptable» o «excipiente farmacéuticamente aceptable» abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de los EE. UU. O enumerados en la Farmacopea de los EE. UU. para su uso en animales, incluidos seres humanos, así como cualquier portador o diluyente que no causa irritación significativa a un sujeto y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Se incluyen excipientes y portadores que son útiles en la preparación de una composición farmacéutica y generalmente son seguros, no tóxicos y deseables.

[0082] Como se usa en este documento, los términos «aislar», «aislado» y «aislamiento» o «purificar», «purificado» y «purificación», así como «extraído» y «extracción» se usan indistintamente y se refieren al estado de una preparación (por ejemplo, una pluralidad de cantidad y/o concentración conocida o desconocida) de vesículas extracelulares deseadas, que han sufrido uno o más procesos de purificación, por ejemplo, una selección o un enriquecimiento de la preparación de vesículas extracelulares deseadas. En algunas modalidades, aislar o purificar como se usa en el presente documento es el proceso de eliminación, eliminación parcial (por ejemplo, de una fracción) de las vesículas extracelulares de una muestra que contiene células productoras. En algunas modalidades, una composición de vesícula extracelular aislada no tiene actividad indeseada detectable o, alternativamente, el nivel o la cantidad de la actividad indeseada es igual o inferior a un nivel o cantidad aceptable. En otras modalidades, una composición de vesícula extracelular aislada tiene una cantidad y/o concentración de vesículas extracelulares deseadas en o por encima de una cantidad y/o concentración aceptable. En otras modalidades, la composición de vesícula extracelular aislada se enriquece en comparación con el material de partida (por ejemplo, preparaciones de células productoras) a partir de las cuales se obtiene la composición. Este enriquecimiento puede ser por 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 %, 99,999 %, 99,9999 %, o superior al 99,9999 % en comparación con el material de partida. En algunas modalidades, las preparaciones de vesícula extracelular aislada están sustancialmente libres de productos biológicos residuales. En algunas modalidades, las preparaciones de vesícula extracelular aislada son 100 % libres, 99 % libres, 98 % libres, 97 % libres, 96 % libres o 95 % libres de cualquier materia biológica

contaminante. Los productos biológicos residuales pueden incluir materiales abióticos (incluidos productos químicos) o ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o metabolitos no deseados. Sustancialmente libre de productos biológicos residuales también puede significar que la composición de vesícula extracelular no contiene células productoras detectables y que solo las vesículas extracelulares son detectables.

[0083] Los términos «administración», «administrar» y sus variantes se refieren a la introducción de una composición, como una vesícula extracelular o agente en un sujeto e incluye la introducción simultánea y secuencial de una o más composiciones o agentes adicionales en cualquier programa consistente con la producción de un efecto terapéutico. El momento de la administración de la dosis se puede seleccionar para lograr niveles constantes dentro de un sujeto (por ejemplo, niveles plasmáticos) del agente administrado, o para una exposición episódica, por ejemplo, para reducir la toxicidad o prevenir la desensibilización. Los métodos para lograr estos resultados son bien conocidos por el profesional ordinariamente calificado, basados en los principios farmacocinéticos conocidos como se establece en, por ejemplo, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Macmillan Publishing Co. 13^a Ed.). La introducción de una composición o agente en un sujeto se realiza por cualquier vía adecuada, incluyendo oral, pulmonar, intranasal, parenteral (intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea), rectal, intralifáticamente, intratecalmente, periocularmente, intratumoralmente o tópicamente. La administración incluye la autoadministración y la administración por parte de otro. Una vía de administración adecuada permite que la composición o el agente realicen su función prevista. Por ejemplo, si una vía adecuada es intravenosa, la composición se administra introduciendo la composición o agente en una vena del sujeto.

[0084] Como se usa en este documento, el término «modular», «modulación», «modificar» y/o «modulador» generalmente se refiere a la capacidad de alterar, aumentando o disminuyendo, por ejemplo, directa o indirectamente promoviendo/estimulando/regulando por aumento o interfiriendo con/inhibiendo/regulando por disminución una concentración específica, nivel, expresión, función o comportamiento, como, por ejemplo, actuar como antagonista o agonista. En algunos casos, un modulador puede aumentar y/o disminuir una cierta concentración, nivel, actividad o función en relación con un control, o en relación con el

nivel de actividad promedio que generalmente se esperaría o en relación con un nivel de actividad de control. Los términos «inhibición», «represión», «modulación» se usan en el presente documento para describir los cambios en la expresión o actividad del gen diana en comparación con las condiciones sin el o los componentes inmunomoduladores. Inhibición se refiere a la eliminación o eliminación sustancial de la expresión o actividad del gen. Represión significa una reducción, pero no una eliminación completa o una eliminación sustancial, de la expresión o actividad del gen. Modulación significa cualquier alteración, hacia arriba o hacia abajo, de la expresión o actividad del gen.

[0085] El término «cantidad suficiente» significa una cantidad suficiente para producir un efecto deseado, por ejemplo, una cantidad suficiente para modular una afección en el sujeto.

[0086] El término «cantidad terapéuticamente eficaz» es una cantidad que es eficaz para mejorar un síntoma de una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una «cantidad profilácticamente eficaz», ya que la profilaxis puede considerarse terapia.

[0087] El porcentaje de «identidad» entre una secuencia de nucleótidos y una secuencia de referencia se define como el porcentaje de nucleótidos individuales en la secuencia de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos individuales en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de nucleótidos puede lograrse de varias maneras conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible al público, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, CLUSTAL OMEGA o MUSCLE. Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para alinear las secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para obtener más detalles sobre el algoritmo BLAST, véase Mount, DW (2004). Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis (2a ed.). Cold Spring Harbor Press. ISBN 978-0-87969-712-9.

[0088] Porcentaje de «identidad» entre una secuencia de polipéptidos y una secuencia de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia,

después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible al público, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, CLUSTAL OMEGA, o MUSCLE. Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para alinear las secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para obtener más detalles sobre el algoritmo BLAST, véase Mount, DW (2004). Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis (2a ed.). Cold Spring Harbor Press. ISBN 978-0-87969-712-9.

[0089] Como se usa en este documento, el término «sustancialmente» o «sustancial» se refiere, por ejemplo, a la presencia, nivel o concentración de una entidad en un espacio particular, el efecto de una entidad en otra entidad o el efecto de un tratamiento. Por ejemplo, una actividad, nivel o concentración de una entidad aumenta sustancialmente si el aumento es de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces o 1000 veces respecto de una referencia. Una actividad, nivel o concentración de una entidad también aumenta sustancialmente si el aumento es de 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 % o 500 % respecto de una referencia.

[0090] El término «*in vivo*» se refiere a procesos que ocurren en un organismo vivo.

[0091] El término «mamífero» como se usa en el presente documento incluye tanto mamíferos humanos como no humanos.

[0092] Las abreviaturas utilizadas en esta solicitud incluyen lo siguiente: «mRNA» se refiere al ARN mensajero; «miRNA» se refiere a microRNA; «siRNA» se refiere a ARN interferente pequeño; «ARN antisentido» se refiere a ARN de cadena simple que es complementario a un mRNA, que puede comprender adicionalmente nucleótidos de ADN, y a menudo se denomina oligonucleótido antisentido o «ASO»; «shRNA» se refiere a ARN de horquilla pequeña o corto; «lncRNA» se refiere a ARN largo no codificante; y «dsDNA» se refiere a ADN de cadena doble.

Composiciones

[0093] Los aspectos de la presente divulgación incluyen composiciones capaces de regular el sistema inmune. La composición comprende una vesícula extracelular que comprende una membrana celular, y al menos un componente inmunomodulador asociado con la membrana celular o encerrado dentro del volumen cerrado unido a la membrana. El encerramiento dentro del volumen unido a la membrana se puede lograr usando técnicas que incluyen electroporación, liofilización o mediante ingeniería de células productoras (como, por ejemplo, células HEK293, células de ovario de hámster chino (CHO) y células madre mesenquimales (MSC)) para introducir construcciones que codifican el componente inmunomodulador tal como un ácido nucleico (que codifica un ASO) o una proteína. La asociación con la membrana celular abarca la unión a la lámina lipídica interior o exterior de la membrana y la inserción transmembrana en la bicapa lipídica. En algunos casos, la asociación de membrana se logra usando una proteína (por ejemplo, una proteína de andamiaje o un fragmento de esta) tal como, por ejemplo, el regulador negativo del receptor de prostaglandina F2 (PTGFRN); basigina (BSG); miembro 2 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF2); miembro 3 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF3); miembro 8 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF8); integrina beta-1 (ITGB1); integrina alfa-4 (ITGA4); cadena pesada de antígeno de superficie celular 4F2 (SLC3A2); y una clase de proteínas transportadoras de ATP (ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4) que se han identificado como altamente enriquecidas en la superficie de los exosomas (como se describe en la Patente de EE. UU. de propiedad conjunta n.º 10,195,290)) que puede proporcionar un elemento de una proteína de fusión que comprende el andamiaje y el componente inmunomodulador. Estas vesículas extracelulares y técnicas ilustrativas se describen en detalle en la Patente de EE. UU. de propiedad conjunta n.º 10,195,290, incorporada en la presente como referencia a todos los efectos. Como se describe en la Patente de EE. UU. de propiedad conjunta n.º 10,195,290, los exosomas de ingeniería de superficie pueden generarse por métodos químicos y/o físicos, como la fusión inducida por PEG y/o fusión ultrasónica para introducir estas proteínas de andamiaje (y fragmentos de estas) en los exosomas o las células productoras. Se puede generar un complejo entre una proteína terapéutica exógena y la proteína de andamiaje. Alternativamente, se puede producir

una proteína de fusión conjugando una proteína de andamiaje y una proteína terapéutica exógena, tal como, por ejemplo, una proteína inmunomoduladora, y produciendo un exosoma modificado que contiene el complejo o la proteína de fusión en la superficie, usando los métodos químicos y/o físicos mencionados anteriormente. Un fragmento nativo completo o biológicamente activo de la proteína terapéutica puede transportarse a la superficie de los exosomas al conjugarse con la proteína de andamiaje. Tales exosomas también se pueden obtener de una célula productora que comprende la secuencia exógena insertada en un genoma de la célula. Por ejemplo, la secuencia exógena se puede insertar en un sitio genómico ubicado en el extremo 3' o 5' de una secuencia genómica que codifica PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 o el transportador ATP. Por ejemplo, la secuencia exógena se puede insertar en un sitio genómico que codifica PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2 o el transportador ATP. La asociación con la membrana celular abarca la unión del componente inmunomodulador a la superficie de la membrana interna o externa, el anclaje del componente inmunomodulador dentro de la bicapa lipídica o la extensión del componente inmunomodulador a través de la bicapa lipídica. El componente inmunomodulador puede estar atado a una proteína de andamiaje, o expresarse como una proteína de fusión con una proteína de andamiaje como se describe en la Patente de EE. UU. de propiedad conjunta n.º 10,195,290.

La vesícula extracelular

[0094] En diversas modalidades, la composición comprende una vesícula extracelular. En ciertas modalidades, la vesícula extracelular es una vesícula derivada de células que comprende una membrana que encierra un espacio interno, como se describe en la Patente de EE. UU. de propiedad conjunta n.º 10,195,290.

[0095] En varias modalidades, la vesícula extracelular puede ser una vesícula unida a la membrana que tiene un diámetro menor que la célula de la que deriva. En algunas modalidades, la vesícula extracelular tiene una dimensión más larga entre aproximadamente 20-1000 nm, como entre aproximadamente 20-100 nm, 20-200 nm, 20-300 nm, 20-400 nm, 20-500 nm, 20-600 nm, 20-700 nm, 20-800 nm, 20-900 nm, 30-100 nm, 30-200 nm, 30-300 nm, 30-400 nm, 30-500 nm, 30-600 nm, 30-700 nm, 30-800 nm, 30-900 nm, 40-100 nm, 40-

200 nm, 40-300 nm, 40-400 nm, 40-500 nm, 40-600 nm, 40-700 nm, 40-800 nm, 40-900 nm, 50-150 nm, 50-500 nm, 50-750 nm, 100-200 nm, 100-500 nm o 500-1000 nm.

[0096] En ciertas modalidades, la vesícula extracelular es un exosoma. En ciertas modalidades, la vesícula extracelular es una nanovesícula. En ciertas modalidades, la vesícula extracelular es un cuerpo apoptótico. En ciertas modalidades, la vesícula extracelular es un fragmento de una célula. En ciertas modalidades, la vesícula extracelular es una vesícula derivada de la célula por manipulación directa o indirecta. En ciertas modalidades, la vesícula extracelular es una organelo vesiculado. En diversas modalidades, la vesícula extracelular es una vesícula producida por células vivas.

10 [0097] En algunas modalidades, la vesícula extracelular se deriva de un organismo vivo. En algunas modalidades, la vesícula extracelular se deriva de un organismo muerto. En algunas modalidades, la vesícula extracelular se deriva de un tejido explantado. En algunas modalidades, la vesícula extracelular se deriva de un órgano explantado. En algunas modalidades, la vesícula extracelular se deriva de células cultivadas. En algunas de estas
15 modalidades, cuando la vesícula extracelular se genera en un sistema de cultivo celular, la vesícula extracelular se aísla adicionalmente (por ejemplo, separando la vesícula extracelular de las células cultivadas). La separación se puede lograr por sedimentación. Por ejemplo, la vesícula extracelular puede tener una densidad específica entre 0,5-2,0, 0,6-1,0, 0,7-1,0, 0,8-1,0, 0,9-1,0, 1,0-1,1, 1,1-1,2, 1,2-1,3, 1,4-1,5, 1,0-1,5, 1,5-2,0 y 1,0-2,0 kg/m³. La separación
20 también se puede lograr mediante purificación por afinidad. Por ejemplo, la vesícula extracelular se puede purificar uniendo una población que comprende vesículas extracelulares a una resina, dicha resina comprende una pluralidad de ligandos que tienen afinidad específica por una o más proteínas en la superficie de la vesícula extracelular. Las proteínas pueden ser una tetraspanina (p. ej., CD63, CD81, CD9), una proteína/miembro de
25 la superfamilia de inmunoglobulina EWI (p. ej., PTGFRN, IGSF8, IGSF3), una integrina (p. ej., ITGB1, ITGA4), una proteína transportadora de ATP (p. ej., ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4), SLC3A2, BSG o CD98hc.

[0098] En diversas modalidades, la vesícula extracelular comprende lípidos o ácidos grasos y polipéptidos. En ciertas modalidades, la vesícula extracelular comprende además un azúcar.

30 En ciertas modalidades, la vesícula extracelular comprende además un polinucleótido.

[0099] En diversas modalidades, la membrana de la vesícula extracelular comprende una superficie interior y una superficie exterior y encierra un espacio interno. En algunas modalidades, la vesícula extracelular comprende además una carga útil, tal como un componente inmunomodulador como se describe en la presente. En ciertas modalidades, la carga útil está encerrada dentro del espacio interno. En ciertas modalidades, la carga útil se muestra en la superficie externa de la vesícula extracelular. En ciertas modalidades, la carga útil abarca la membrana de la vesícula extracelular. En varias modalidades, la carga útil comprende ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, moléculas pequeñas y/o combinaciones de estos. Los métodos para producir vesículas extracelulares con cargas útiles incluyen electroporación, liofilización e ingeniería genética de células productoras a partir de las cuales se pueden aislar vesículas extracelulares. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. de propiedad conjunta n.º 10,195,290 y *supra*. En algunas modalidades, la vesícula extracelular comprende además un receptor, es decir, un resto de direccionamiento que puede ser específico para un órgano, un tejido o una célula como se describe en la Patente de EE. UU. de propiedad conjunta n.º 10,195,290. Se usan proteínas de fusión que tienen un resto de direccionamiento. Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden comprender PTGFRN, BSG, IGSF2, IGSF3, IGSF8, ITGB1, ITGA4, SLC3A2, transportador ATP, o un fragmento o una variante de estos, y un resto de direccionamiento. El resto de direccionamiento puede usarse para dirigir el exosoma a un órgano, tejido o célula específico para un tratamiento usando el exosoma. En algunas modalidades, el resto de direccionamiento es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos incluyen anticuerpos completos, anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes, fragmentos de estos, y además incluye anticuerpos de cadena simple, anticuerpos humanizados, anticuerpos murinos, quiméricos, anticuerpos monoclonales humanos de ratón, primates de ratón, de primates y humanos, anticuerpos anti-idiotipo, fragmentos de anticuerpos, tales como, por ejemplo, scFv, (scFv)₂, Fab, Fab 'y F (ab')₂, F (ab1)₂, Fv, dAb y fragmentos de Fd, diacuerpos y polipéptidos relacionados con anticuerpos. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos también incluyen anticuerpos biespecíficos y anticuerpos multiespecíficos siempre que exhiban la actividad o función biológica deseada.

El exosoma

[00100] En diversas modalidades, la vesícula extracelular es un exosoma. En ciertas modalidades, el exosoma es una pequeña vesícula unida a la membrana secretada por las células productoras.

- 5 **[00101]** En algunas modalidades, el exosoma de la célula productora tiene una dimensión más larga entre aproximadamente 20-300 nm, tal como entre aproximadamente 20-290 nm, 20-280 nm, 20-270 nm, 20-260 nm, 20-250 nm, 20-240 nm, 20-230 nm, 20-220 nm, 20-210 nm, 20-200 nm, 20-190 nm, 20-180 nm, 20-170 nm, 20-160 nm, 20-150 nm, 20-140 nm, 20-130 nm, 20-120 nm, 20-110 nm, 20-100 nm, 20-90 nm, 20-80 nm, 20-70 nm, 20-60 nm, 20-50 nm, 20-40 nm, 20-30 nm, 30-300 nm, 30-290 nm, 30-280 nm, 30-270 nm, 30-260 nm, 30-250 nm, 30-240 nm, 30-230 nm, 30-220 nm, 30-210 nm, 30-200 nm, 30-190 nm, 30-180 nm, 30-170 nm, 30-160 nm, 30-150 nm, 30-140 nm, 30-130 nm, 30-120 nm, 30-110 nm, 30-100 nm, 30-90 nm, 30-80 nm, 30-70 nm, 30-60 nm, 30-50 nm, 30-40 nm, 40-300 nm, 40-290 nm, 40-280 nm, 40-270 nm, 40-260 nm, 40-250 nm, 40-240 nm, 40-230 nm, 40-220 nm, 40-210 nm, 40-200 nm, 40-190 nm, 40-180 nm, 40-170 nm, 40-160 nm, 40-150 nm, 40-140 nm, 40-130 nm, 40-120 nm, 40-110 nm, 40-100 nm, 40-90 nm, 40-80 nm, 40-70 nm, 40-60 nm, 40-50 nm, 50-300 nm, 50-290 nm, 50-280 nm, 50-270 nm, 50-260 nm, 50-250 nm, 50-240 nm, 50-230 nm, 50-220 nm, 50-210 nm, 50-200 nm, 50-190 nm, 50-180 nm, 50-170 nm, 50-160 nm, 50-150 nm, 50-140 nm, 50-130 nm, 50-120 nm, 50-110 nm, 50-100 nm, 50-90 nm, 50-80 nm, 50-70 nm, 50-60 nm, 60-300 nm, 60-290 nm, 60-280 nm, 60-270 nm, 60-260 nm, 60-250 nm, 60-240 nm, 60-230 nm, 60-220 nm, 60-210 nm, 60-200 nm, 60-190 nm, 60-180 nm, 60-170 nm, 60-160 nm, 60-150 nm, 60-140 nm, 60-130 nm, 60-120 nm, 60-110 nm, 60-100 nm, 60-90 nm, 60-80 nm, 60-70 nm, 70-300 nm, 70-290 nm, 70-280 nm, 70-270 nm, 70-260 nm, 70-250 nm, 70-240 nm, 70-230 nm, 70-220 nm, 70-210 nm, 70-200 nm, 70-190 nm, 70-180 nm, 70-170 nm, 70-160 nm, 70-150 nm, 70-140 nm, 70-130 nm, 70-120 nm, 70-110 nm, 70-100 nm, 70-90 nm, 70-80 nm, 80-300 nm, 80-290 nm, 80-280 nm, 80-270 nm, 80-260 nm, 80-250 nm, 80-240 nm, 80-230 nm, 80-220 nm, 80-210 nm, 80-200 nm, 80-190 nm, 80-180 nm, 80-170 nm, 80-160 nm, 80-150 nm, 80-140 nm, 80-130 nm, 80-120 nm, 80-110 nm, 80-100 nm, 80-90 nm, 90-300 nm, 90-290 nm, 90-280 nm, 90-270 nm, 90-260 nm, 90-250 nm, 90-240 nm, 90-230 nm, 90-220 nm, 90-210 nm, 90-200 nm, 90-190 nm, 90-180 nm, 90-170 nm, 90-160

nm, 90-150 nm, 90-140 nm, 90-130 nm, 90-120 nm, 90-110 nm, 90-100 nm, 100-300 nm, 110-290 nm, 120-280 nm, 130-270 nm, 140-260 nm, 150-250 nm, 160-240 nm, 170-230 nm, 180-220 nm o 190-210 nm.

[00102] En modalidades particularmente preferidas, el exosoma de la célula productora descrito en este documento tiene una dimensión más larga entre aproximadamente 30-100 nm. En otra modalidad preferida, el exosoma de la célula productora tiene una dimensión más larga entre aproximadamente 20-300 nm. En otra modalidad preferida, el exosoma de la célula productora tiene una dimensión más larga entre aproximadamente 40-200 nm. En otra modalidad, una población de los exosomas descritos en el presente documento comprende una población en la que el 90 % de los exosomas tienen una dimensión más larga de 20-300 nm. En otra modalidad, una población de los exosomas descritos en el presente documento comprende una población en la que el 95 % de los exosomas tienen una dimensión más larga de 20-300 nm. En otra modalidad, una población de los exosomas descritos en el presente documento comprende una población en la que el 99 % de los exosomas tienen una dimensión más larga de 20-300 nm. En otra modalidad, una población de los exosomas descritos en el presente documento comprende una población en la que el 90 % de los exosomas tienen una dimensión más larga de 40-200 nm. En otra modalidad, una población de los exosomas descritos en el presente documento comprende una población en la que el 95 % de los exosomas tienen una dimensión más larga de 40-200 nm. En otra modalidad, una población de los exosomas descritos en el presente documento comprende una población en la que el 99 % de los exosomas tienen una dimensión más larga de 40-200 nm. En otras modalidades preferidas, el tamaño del exosoma o población de exosomas descritos en este documento se mide de acuerdo con los métodos descritos, *infra*.

[00103] En algunas modalidades, el exosoma es generado por una célula productora. En algunas modalidades, la membrana del exosoma comprende una o más moléculas derivadas de la célula productora. En algunas modalidades, el exosoma se genera en un sistema de cultivo celular y se aísla (por ejemplo, separando el exosoma de la célula productora). La separación se puede lograr por sedimentación. Por ejemplo, el exosoma puede tener una densidad específica entre 0,5-2,0, 0,6-1,0, 0,7-1,0, 0,8-1,0, 0,9-1,0, 1,0-1,1, 1,1-1,2, 1,2-1,3, 1,4-1,5, 1,0-1,5, 1,5-2,0 y 1,0-2,0 kg/m³. La separación también se puede lograr mediante

purificación por afinidad. Por ejemplo, la vesícula extracelular se puede purificar uniendo una población que comprende vesículas extracelulares a una resina, dicha resina comprende una pluralidad de ligandos que tienen afinidad específica por una o más proteínas en la superficie de la vesícula extracelular. La o las proteínas en la superficie de la vesícula extracelular pueden ser una tetraspanina (p. ej., CD63, CD81 y/o CD9), una proteína/miembro de la superfamilia de inmunoglobulina EWI (p. ej., PTGFRN, IGSF8 y/o IGSF3), una integrina (p. ej., ITGB1 y/o ITGA4), una proteína transportadora de ATP (p. ej., ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3 y/o ATP2B4), SLC3A2, BSG o CD98hc. La proteína también puede tener actividad como un componente inmunomodulador que se muestra en la superficie de los exosomas, opcionalmente mediante fusión a un resto de polipéptido que tiene una actividad farmacológica deseada, tal como, por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, scFv, *etc.* con actividad de inhibición del punto de control. Dichos anticuerpos son conocidos en la técnica, por ejemplo, Ipilimumab, dirigido a CTLA-4, Nivolumab Cemiplimab y Pembrolizumab dirigido a PD-1, y Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, cada uno dirigido a PD-L1 (*véase, por ejemplo*, Pardoll DM (marzo de 2012). «The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy». *Nature Reviews. Cáncer*. 12 (4): 252–64, incorporado en la presente como referencia.

[00104] En algunas modalidades, la membrana del exosoma comprende una superficie interior y una superficie exterior. En ciertas modalidades, la superficie interior mira hacia el núcleo interno del exosoma. En ciertas modalidades, la superficie exterior puede estar en contacto con el endosoma, los cuerpos multivesiculares o la membrana/citoplasma de una célula productora o una célula diana.

[00105] En algunas modalidades, la membrana del exosoma comprende lípidos y ácidos grasos. En algunas modalidades, la membrana del exosoma comprende fosfolípidos, glicolípidos, ácidos grasos, esfingolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, colesterol y fosfatidilserinas. En algunas modalidades, el lípido y el ácido graso pueden ser uno o más de los enumerados en la Tabla 1.

[00106] En ciertas modalidades, el exosoma comprende una bicapa lipídica compuesta de una lámina interior y una lámina exterior. La composición de la lámina interior y exterior se puede determinar mediante ensayos de distribución transbicapa conocidos en la técnica,

véase, por ejemplo, Kuypers *et ál.* Biochim Biophys Acta 1985 819:170. En algunas modalidades, la composición de la lámina exterior es entre aproximadamente 70-90 % de fosfolípidos de colina, entre aproximadamente 0-15 % de fosfolípidos ácidos y entre aproximadamente 5-30 % de fosfatidiletanolamina. En algunas modalidades, la composición de la lámina interior es entre aproximadamente 15-40 % de fosfolípidos de colina, entre aproximadamente 10-50 % de fosfolípidos ácidos y entre aproximadamente 30-60 % de fosfatidiletanolamina.

[00107] En algunas modalidades, la membrana del exosoma comprende además uno o más polipéptidos. En ciertas modalidades, el exosoma comprende uno o más polipéptidos seleccionados de la siguiente lista que incluyen, pero no se limitan a, espectrina, polipéptido similar a miosina, banda 3, SLC4A1, actina, polipéptido similar a actina, gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (G3PD), tetraspaninas (p. ej. , CD63, CD81 y/o CD9), Alix y TSG101, integrinas (p. ej. , ITGB1 y/o ITGA4), selectinas, CR1, TNFRI, enzimas proteolíticas, proteínas o histonas ligadas a glucosilfosfatidilinositol (GPI), proteína/miembros de la superfamilia de inmunoglobulina EWI (p. ej., PTGFRN, IGSF8 y/o IGSF3), proteínas transportadoras de ATP (por ejemplo, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3 y/o ATP2B4), SLC3A2, BSG o CD98hc). En algunas modalidades, el exosoma comprende al menos un polipéptido seleccionado de la Tabla 2.

[00108] En algunas modalidades, el exosoma comprende polipéptidos en su superficie. En algunas modalidades, el exosoma se modifica para contener uno o más polipéptidos. En algunas modalidades, la célula productora se modifica para contener uno o más polipéptidos. En algunas modalidades, la célula productora contiene naturalmente uno o más polipéptidos y los exosomas derivados de estos también contienen los polipéptidos. Los niveles de cualquier marcador de superficie deseado se pueden modificar directamente en el exosoma (por ejemplo, al poner en contacto el complejo con polipéptidos producidos de forma recombinante para lograr la inserción en o conjugación con la membrana del complejo). Alternativamente o además, los niveles de cualquier marcador de superficie deseado se pueden modificar directamente en la célula productora (por ejemplo, al poner en contacto el complejo con polipéptidos producidos de forma recombinante para lograr la inserción en o conjugación con la membrana de la célula). Alternativamente, la célula productora puede modificarse mediante

la transducción de un ácido nucleico exógeno en la célula productora para expresar un marcador de superficie deseado. El marcador de superficie ya puede estar presente naturalmente en la célula productora, en cuyo caso la construcción exógena puede conducir a una sobreexpresión del marcador y a una mayor concentración del marcador en o sobre la célula productora. Alternativamente, un marcador de superficie expresado naturalmente puede eliminarse de la célula productora (por ejemplo, al inducir el silenciamiento génico en la célula productora). Los polipéptidos pueden conferir diferentes funcionalidades al exosoma (p. ej., capacidades específicas de direccionamiento, funciones de administración (p. ej., moléculas de fusión), funciones enzimáticas, vida media aumentada o disminuida *in vivo*, etc.). En algunas modalidades, los polipéptidos incluyen, pero no se limitan a CD47, CD55, CD49, CD40, CD133, CD59, glipicano-1, CD9, CD63, CD81, integrinas, selectinas, lectinas y cadherinas.

[00109] En modalidades específicas, los exosomas comprenden uno o más polipéptidos en su superficie, en donde dichos polipéptidos se seleccionan de un grupo de proteínas que se identificó recientemente por enriquecerse en la superficie de los exosomas (descrito en detalle en la Solicitud de Patente de EE.UU. 62/550,543 y PCT/US2018/048026, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Este grupo de polipéptidos incluye el regulador negativo del receptor de prostaglandina F2 (PTGFRN); basigina (BSG); miembro 3 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF3); miembro 8 de la superfamilia de inmunoglobulina (IGSF8); integrina beta-1 (ITGB1); integrina alfa-4 (ITGA4); cadena pesada de antígeno de superficie celular 4F2 (SLC3A2); y una clase de proteínas transportadoras de ATP (ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4, ATP1B3, ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3, ATP2B4)).

[00110] En diversas modalidades, uno o más polipéptidos en la superficie del exosoma comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede derivarse de fuentes naturales, o producirse de forma parcial o totalmente sintética. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas de estas modalidades, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgG. En ciertas modalidades, el anticuerpo monoclonal es una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas otras modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En ciertas modalidades, el fragmento de unión al antígeno se selecciona de los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, F(ab)₂, Fv, dAb y

Fd. En ciertas modalidades, el fragmento de unión al antígeno es un fragmento scFv o (scFv)₂. En ciertas otras modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un Nanobody® (anticuerpo de dominio único). En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico. En diversas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une a mesotelina.

[00111] En algunas modalidades, los exosomas comprenden en su superficie una proteína de fusión que comprende (1) PTGFRN o un fragmento de este y (2) un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une a PD-1, PD-1L, CSF1-R u otro componente inmunomodulador.

10 [00112] En algunas modalidades, la membrana del exosoma comprende además uno o más polisacáridos, como glicano.

[00113] En algunas modalidades, el exosoma administra la carga útil (agente terapéutico) a una diana. La carga útil es un agente terapéutico que actúa sobre una diana (p. ej., una célula diana) que se pone en contacto con el exosoma. En ciertas modalidades, la carga útil es un componente inmunomodulador, por ejemplo, un ARN inhibidor. El contacto puede ocurrir *in vitro* o en un sujeto. Las cargas útiles que se pueden introducir en un exosoma y/o una célula productora incluyen agentes terapéuticos tales como nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos que comprenden un resto detectable o una toxina o que interrumpen la transcripción), ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ADN o mRNA que codifican un polipéptido como una enzima o moléculas de ARN que tienen función reguladora como miRNA, dsDNA, lncRNA o siRNA), aminoácidos (p. ej., aminoácidos que comprenden un resto detectable o una toxina que interrumpe la traducción), polipéptidos (p. ej., enzimas), lípidos, carbohidratos, moléculas pequeñas (p. ej., fármacos de moléculas pequeñas y toxinas) y combinaciones de estos. En ciertas modalidades, el exosoma administra más de un agente terapéutico. En ciertas modalidades, los agentes terapéuticos son uno o más ácidos nucleicos que inhiben uno o más genes diana. En ciertas modalidades, los agentes terapéuticos comprenden un anticuerpo y un ácido nucleico. En ciertas modalidades, los agentes terapéuticos comprenden un ácido nucleico y una molécula pequeña. En ciertas modalidades, el agente terapéutico comprende un inhibidor de CSF1R, tal como candidatos clínicos Pexidartinib, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, Emactuzumab, AMG820 e IMC-CS4 y otros descritos en,

por ejemplo, Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Rüttinger D (2017). «Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy». *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 5 (1): 53; véase también, p. ej., Patel S, Player MR (2009). «Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease». *Curr Top Med Chem*. 9: 599–610, Cabiralizumab (cabira; FPA-008), que es un anticuerpo monoclonal y se encuentra en ensayos clínicos tempranos para el cáncer de páncreas metastásico (véase Un estudio de fase I/II de aumento de dosis y expansión de cabiralizumab (cabira; FPA-008), un anticuerpo anti-CSF1R, en tumor de células gigantes tenosinoviales (TGCT, sinovitis villonodular pigmentada difusa D-PVNS; un estudio de cabiralizumab administrado solo o con nivolumab en cáncer avanzado o cáncer que se ha diseminado; y la combinación novedosa muestra respuestas prometedoras en el cáncer de páncreas noviembre de 2017). En ciertas modalidades, el agente terapéutico comprende un inhibidor del punto de control inmunitario. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmune es un anticuerpo tal como, por ejemplo, Ipilimumab, dirigido a CTLA-4, Nivolumab Cemiplimab y Pembrolizumab dirigido a PD-1, y Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, cada uno dirigido a PD-L1.

[00114] El exosoma puede interactuar con la célula diana a través de la fusión de membrana y administrar cargas útiles (p. ej., agentes terapéuticos) en una composición de exosoma a la superficie o al citoplasma de una célula diana. En algunas modalidades, la fusión de membrana se produce entre el exosoma y la membrana plasmática de una célula diana. En otras modalidades, la fusión de membrana se produce entre el exosoma y una membrana endosomal de una célula diana.

[00115] En algunas modalidades, el exosoma comprende un polipéptido receptor. El polipéptido receptor puede ser sintético. En algunas modalidades, el polipéptido receptor se introduce en la célula productora (por ejemplo, un ácido nucleico exógeno que codifica el polipéptido receptor se introduce en la célula productora) o un polipéptido receptor recombinante que se produce fuera de la célula productora (por ejemplo, sintetizado por un sistema de expresión de proteínas). En algunas modalidades, el polipéptido receptor (por ejemplo, un polipéptido producido recombinantemente) se introduce en el exosoma directamente (por ejemplo, después de que el exosoma se aísla de la célula productora). En algunas modalidades, el polipéptido receptor puede estar en la superficie de los exosomas.

En algunas modalidades, el polipéptido receptor es capaz de dirigir el exosoma a una diana específica (por ejemplo, una diana como un patógeno, un metabolito, una proteína, un complejo de polipéptidos o una célula como una célula no funcional o una célula cancerosa) que circula en el sistema circulatorio del sujeto, como la sangre, o una diana que reside en un tejido (como un tejido enfermo).

[00116] En algunas modalidades, el exosoma es sintético. Es decir que se realizan modificaciones en los exosomas después de su recuperación de la célula productora para agregar componentes adicionales. Por ejemplo, el exosoma puede comprender una carga útil, como, por ejemplo, un polipéptido terapéutico, ácido nucleico (como ADN o ARN) u otro polinucleótido, polisacárido o glicano, lípido o ácido graso, producto biológico grande, molécula pequeña o toxina no encontrada en exosomas al recuperarse de la célula productora. En algunas modalidades, el exosoma se modifica (por ejemplo, introduciendo una carga útil o modificando de otra forma el contenido del complejo, tal como cambiando el contenido de proteínas, lípidos o glicanos de la membrana). Por ejemplo, los exosomas se aíslan primero de una célula productora y luego se modifican según se desee, generando de este modo exosomas sintéticos. En algunas modalidades, la célula productora se modifica. Por ejemplo, se puede introducir un ácido nucleico exógeno, un polipéptido exógeno o una molécula pequeña o toxina en la célula productora. Alternativamente o además, la célula productora puede modificarse de otro modo (por ejemplo, modificando el contenido celular o de membrana, como cambiando el contenido de lípidos o glicanos de la membrana celular). Los exosomas generados a partir de las células productoras modificadas comprenden una o más de las modificaciones de la célula productora. El proceso produce exosomas sintéticos. En algunas modalidades, tanto la célula productora como el exosoma aislado de la célula productora se modifican como se describe en la presente.

Nanovesícula

[00117] En diversas modalidades, la vesícula extracelular es una nanovesícula. En ciertas modalidades, la nanovesícula es una pequeña vesícula derivada de células que comprende una membrana que encierra un espacio interno y que se genera a partir de la célula por manipulación directa o indirecta de tal manera que la célula productora no produzca la

nanovesícula sin la manipulación. Las manipulaciones apropiadas de la célula incluyen, pero no se limitan a extrusión en serie, tratamiento con soluciones alcalinas, sonicación o combinaciones de estos y puede, en algunos casos, resultar en la destrucción de la célula productora.

- 5 **[00118]** En diversas modalidades, la nanovesícula tiene una dimensión más larga entre aproximadamente 20-250 nm, tal como entre aproximadamente 20-100 nm, 20-150 nm, 20-200 nm, 30-100 nm, 30-150 nm, 30-200 nm, 30-250 nm, 40-100 nm, 40-150 nm, 40-200 nm, 40-250 nm, 50-100 nm, 50-150 nm, 50-200 nm, 50-250 nm, 100-200 nm o 150-250 nm.

- 10 **[00119]** En diversas modalidades, la nanovesícula se deriva de una célula productora. En ciertas modalidades, la nanovesícula es generada de una célula productora por manipulación directa o indirecta. Las manipulaciones apropiadas incluyen, pero no se limitan a extrusión en serie, tratamiento con soluciones alcalinas, sonicación o combinaciones de estos. En algunas de estas modalidades, la manipulación puede provocar la destrucción de la célula productora. En algunas modalidades preferidas, la población de la nanovesícula está sustancialmente
15 libre de vesículas que se derivan de células productoras a través de la gemación directa de la membrana plasmática o la fusión del endosoma tardío con la membrana plasmática.

- [00120]** En algunas modalidades, la nanovesícula se aísla de la célula productora en función de su tamaño, densidad, parámetros bioquímicos o una combinación de estos. En ciertas modalidades, el aislamiento se puede lograr por sedimentación. Por ejemplo, la nanovesícula
20 puede tener una densidad específica entre 0,5-2,0, 0,6-1,0, 0,7-1,0, 0,8-1,0, 0,9-1,0, 1,0-1,1, 1,1-1,2, 1,2-1,3, 1,4-1,5, 1,0-1,5, 1,5-2,0 y 1,0-2,0 kg/m³.

- [00121]** En diversas modalidades, la nanovesícula comprende lípidos o ácidos grasos y polipéptidos. En ciertas modalidades, la nanovesícula comprende además un azúcar. En ciertas modalidades, la nanovesícula comprende además un polinucleótido. En algunas
25 modalidades, la nanovesícula comprende además un receptor. En algunas modalidades, la nanovesícula comprende además una carga útil. En algunas de estas modalidades, la carga útil comprende ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, moléculas pequeñas y/o combinaciones de estos.

El componente inmunomodulador

[00122] En un aspecto, la vesícula extracelular, por ejemplo, un exosoma, comprende al menos un componente inmunomodulador que aumenta la polarización de los macrófagos de un fenotipo M2 a uno M1. En un aspecto, el aumento de un fenotipo M2 a uno M1 se evalúa con respecto a una muestra de referencia que comprende una población de macrófagos M2. En un aspecto, el aumento logrado por las vesículas extracelulares de la presente divulgación es mayor o igual que el logrado por una cantidad equimolar del componente inmunomodulador solo. En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador es un polinucleótido que aumenta la polarización de los macrófagos. En ciertas modalidades, el polinucleótido es un ácido nucleico que inhibe al menos un gen, tal como, *por ejemplo*, protooncogenes y otro tipo de genes, cuya inhibición promueve una mayor polarización de un fenotipo M2 a uno M1, incluyendo a modo de ejemplo, pero sin limitación, los siguientes genes: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-alfa, HIF1-beta, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, Arginasa, Glutaminasa, CEBP/β, Pi3Kγ, y PKM2. En ciertas modalidades, se contemplan combinaciones de polinucleótidos y componentes inmunomoduladores proteicos, que incluyen componentes inmunomoduladores proteicos como, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se dirigen a PD-1, PD-L1, CTLA-4 (como, por ejemplo, Ipilimumab, dirigido a CTLA -4, Nivolumab Cemiplimab y Pembrolizumab dirigidos a PD-1, y Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, cada uno dirigido a PD-L1), inhibidores de CSF1R (tales como, por ejemplo, candidatos clínicos como Pexidartinib, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, Emactuzumab, AMG820 e IMC-CS4 y otros descritos en, por ejemplo, Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Rüttinger D (2017). «Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy». *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 5 (1): 53; véase también, *p. ej.*, Patel S, Player MR (2009). «Colony-stimulating factor-1 receptor inhibitors for the treatment of cancer and inflammatory disease». *Curr Top Med Chem*. 9: 599–610, Cabiralizumab (cabira; FPA-008), que es un anticuerpo monoclonal y se encuentra en ensayos clínicos tempranos para el cáncer de páncreas metastásico (véase Un estudio de fase I/II de aumento de dosis y expansión de cabiralizumab (cabira; FPA-008), un anticuerpo anti-CSF1R, en tumor de células gigantes tenosinoviales (TGCT, sinovitis villonodular pigmentada difusa D-PVNS; un

estudio de cabiralzumab administrado solo o con nivolumab en cáncer avanzado o cáncer que se ha diseminado; y la combinación novedosa muestra respuestas prometedoras en el cáncer de páncreas noviembre de 2017, y otros componentes inmunomoduladores útiles en el tratamiento de cáncer y afecciones inflamatorias.

- 5 **[00123]** En algunas de estas modalidades, el ácido nucleico incluye, pero no se limita a, un mRNA, un miRNA, un siRNA, un ARN antisentido, un shRNA, un lncRNA y un dsDNA. En algunas de estas modalidades, el ácido nucleico es un ARN (por ejemplo, un mRNA, un miRNA, un siRNA, un ARN antisentido, un shRNA, o un lncRNA). En algunas de estas modalidades, cuando el polinucleótido es un mRNA, puede traducirse en un polipéptido deseado. En algunas modalidades, el polinucleótido es una molécula de microRNA (miRNA), pri-miRNA o pre-miRNA. En algunas de estas modalidades, el miRNA se entrega al citoplasma de la célula diana, de modo que la molécula de miRNA puede silenciar un mRNA nativo en la célula diana. En algunas modalidades, el polinucleótido es un ARN pequeño interferente (siRNA) o un ARN horquillado corto (shRNA) capaz de interferir con la expresión de un oncogén u otros polipéptidos desreguladores. En algunas de estas modalidades, el siRNA se entrega al citoplasma de la célula diana, de modo que la molécula de siRNA puede silenciar un mRNA nativo en la célula diana. En algunas modalidades, el polinucleótido es un ARN antisentido que es complementario a un mRNA. En algunas modalidades, el polinucleótido es un ARN largo no codificante (lncRNA) capaz de regular la expresión génica y modular enfermedades. En algunas modalidades, el polinucleótido es un oligonucleótido antisentido (ASO). En varias modalidades, el ASO es un ADN, ARN o híbrido de ADN/ARN de cadena simple o de cadena doble. Véase, por ejemplo, Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA : Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997, incorporado en la presente como referencia a todos los efectos.
- 25 **[00124]** En algunas modalidades, el polinucleótido es un ADN que puede transcribirse en un ARN. En algunas de estas modalidades, el ARN transcrito puede traducirse en un polipéptido deseado. En ciertas modalidades, el ácido nucleico inhibe al menos un gen que consiste en: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-alfa, HIF1-beta, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, Arginasa, CEBP/β, Pi3Ky, Glutaminasa, y PKM2. En 30 ciertas modalidades, el ácido nucleico inhibe al menos un gen que consiste en: STAT3,

- STAT6, CEBP/ β , Pi3K γ , KRAS y HIF1-alfa. En ciertas modalidades, el ácido nucleico es un ARN inhibidor que inhibe al menos un gen que consiste en: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-alfa, HIF1-beta, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, Arginasa, Glutaminasa, CEBP/ β , Pi3K γ , y PKM2. En ciertas modalidades, el ácido nucleico es un ARN inhibidor que inhibe al menos un gen que consiste en: STAT3, STAT6, CEBP/ β , Pi3K γ , KRAS y HIF1-alfa. En ciertas modalidades, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido (ASO) que inhibe al menos un gen que consiste en: KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-alfa, HIF1-beta, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC, c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, Arginasa, CEBP/ β , Pi3K γ , Glutaminasa, y PKM2. En ciertas modalidades, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido (ASO) que inhibe al menos un gen que consiste en: STAT3, STAT6, CEBP/ β , Pi3K γ , KRAS y HIF1-alfa. En ciertas modalidades, el ácido nucleico inhibe el protooncogén de KRAS humano. En ciertas modalidades, el ácido nucleico es un ARN inhibidor que inhibe el protooncogén de KRAS humano. En ciertas modalidades, el ácido nucleico inhibe STAT3.
- 15 **[00125]** En algunas modalidades de la presente invención, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido (ASO) conocido, cuyos ejemplos se enumeran en la Tabla 0. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % a 99 % idéntica a un ASO conocido, por ejemplo, las enumeradas en la Tabla 0. En ciertas modalidades, el ASO inhibe STAT3. En diversas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % a 99 % idéntica a TAAGCTGATAATTCAACTCA (SEQ ID NO:1). En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:1. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:1. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 92 % idéntica a la SEQ ID NO:1. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:1. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO:1. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO:1. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 96 % idéntica a la SEQ ID NO:1. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la SEQ ID NO:1. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO:1. En ciertas

modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:1. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia de SEQ ID NO:1. En algunas modalidades, el ASO se modifica por química de MOE, O-metilo o LNA. En algunas modalidades, el ASO comprende además una etiqueta de colesterol en el extremo 5' o 3'.

- 5 **[00126]** En algunas modalidades, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido (ASO) que inhibe STAT6. En diversas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % a 99 % idéntica a TGAGCGAATGGACAGGTCTT (SEQ ID NO:2). En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:2.
- 10 En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 92 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En ciertas modalidades, el ASO comprende una
- 15 secuencia al menos 96 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia de SEQ ID NO:2. En algunas
- 20 modalidades, el ASO se modifica por química de MOE, O-metilo o de LNA. En algunas modalidades, el ASO comprende además una etiqueta de colesterol en el extremo 5' o 3'.
- [00127]** En algunas modalidades, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido (ASO) que inhibe CebpB. En diversas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % a 99 % idéntica a TGGATTTAAAGGCAGGCGGC (SEQ ID NO:3). En ciertas modalidades,
- 25 el ASO comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:3. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:3. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 92 % idéntica a la SEQ ID NO:3. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:3. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 94 %
- 30 idéntica a la SEQ ID NO:3. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO:3. En ciertas modalidades, el ASO comprende una

secuencia al menos 96 % idéntica a la SEQ ID NO:3. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la SEQ ID NO:3. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO:3. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:3.

- 5 En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia de SEQ ID NO:3. En algunas modalidades, el ASO se modifica por química de MOE, O-metilo o LNA. En algunas modalidades, el ASO comprende además una etiqueta de colesterol en el extremo 5' o 3'.

[00128] En algunas modalidades, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido (ASO) que inhibe Pi3K γ . En diversas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % a 99 % idéntica a TTGGGTAAAGTCGTGCAGCA (SEQ ID NO:4). En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:4. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:4. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 92 % idéntica a la SEQ ID NO:4. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:4. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO:4. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO:4. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 96 % idéntica a la SEQ ID NO:4. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la SEQ ID NO:4. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO:4. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:4. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia de SEQ ID NO:4. En algunas modalidades, el ASO se modifica por química de MOE, O-metilo o LNA. En algunas modalidades, el ASO comprende además una etiqueta de colesterol en el extremo 5' o 3'.

25 [00129] En algunas modalidades, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido (ASO) que inhibe HIF1 α . En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % a 99 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 92 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas

modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 96 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia de SEQ ID NO:5. En algunas modalidades, el ASO se modifica por química de MOE, O-metilo o LNA. En algunas modalidades, el ASO comprende además una etiqueta de colesterol en el extremo 5' o 3'.

[00130] En algunas modalidades, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido (ASO) que inhibe HIF1 α . En diversas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % a 99 % idéntica a GTGCAGTATTGTAGCCAGGC (SEQ ID NO:5). En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 92 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 96 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:5. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia de SEQ ID NO:5. En algunas modalidades, el ASO se modifica por química de MOE, O-metilo o LNA. En algunas modalidades, el ASO comprende además una etiqueta de colesterol en el extremo 5' o 3'.

[00131] En algunas modalidades, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido (ASO) que inhibe Kras. En diversas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % a 99 % idéntica a GTAGCATGTAAATATAGCCC (SEQ ID NO:6). En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En ciertas

modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 91 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 92 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 93 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 94 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 96 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 97 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:6. En ciertas modalidades, el ASO comprende una secuencia de SEQ ID NO:6. En algunas modalidades, el ASO se modifica por química de MOE, O-metilo o LNA. En algunas modalidades, el ASO comprende además una etiqueta de colesterol en el extremo 5' o 3'.

[00132] En ciertas modalidades, la composición comprende una vesícula extracelular, por ejemplo, un exosoma, que comprende además un componente inmunomodulador adicional que es una molécula pequeña, anticuerpo o fragmento de anticuerpo conocido por promover la polarización de macrófagos. En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor del receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1R).

[00133] En ciertas modalidades, la composición comprende un componente inmunomodulador adicional que tiene actividad antitumoral. En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional regula la respuesta inmune innata. En algunas de estas modalidades, el componente inmunomodulador adicional se dirige a las células asesinas naturales. En algunas otras modalidades, el componente inmunomodulador adicional regula la respuesta inmune adaptativa. En algunas de estas modalidades, el componente inmunomodulador adicional se dirige a las células T citotóxicas.

[00134] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional está ubicado en la superficie de la vesícula extracelular. En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional está ubicado dentro de la vesícula extracelular. En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional está ubicado en la superficie de la vesícula extracelular y dentro de esta.

- [00135] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional se expresa en la célula productora en su forma de longitud completa. En otras modalidades, el componente inmunomodulador adicional se expresa como una proteína de fusión traduccional a una proteína de la superficie del exosoma, lo que da como resultado un mayor nivel de expresión de la parte biológicamente activa del compuesto inmunomodulador en la superficie del exosoma. En algunas modalidades, el compuesto inmunomodulador adicional es una proteína soluble que se expresa como una proteína de fusión traduccional a una proteína de la superficie del exosoma, de modo que dicha proteína soluble se retiene en la superficie del exosoma.
- 10 [00136] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor para un regulador de punto de control negativo, tal como, por ejemplo, A2AR, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, NOX2, PD-1, TIM-3, VISTA, SIGLEC7 (CD328) y SIGLEC9 (CD329). En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor para un compañero de unión de un regulador de punto de control
- 15 negativo, tal como, por ejemplo, PD-L1 y PD-L2.
- [00137] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor de la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). En algunas de estas modalidades, el inhibidor de CTLA-4 es un anticuerpo monoclonal de CTLA-4. En algunas de estas modalidades, el inhibidor es un fragmento de un anticuerpo monoclonal de CTLA-4. En
- 20 ciertas modalidades, el fragmento de anticuerpo es un scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' y F (ab')₂, F (ab)₁₂, Fv, dAb o Fd de un anticuerpo monoclonal de CTLA-4. En ciertas modalidades, el inhibidor es un nanocuerpo, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico contra CTLA-4. En algunas modalidades específicas, el anticuerpo monoclonal es ipilimumab. En algunas modalidades específicas, el anticuerpo monoclonal es tremelimumab.
- 25 [00138] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1). En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor del ligando 1 de muerte programada (PD-L1). En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor del ligando 2 de muerte programada (PD-L2). En algunas modalidades, el inhibidor de PD-1,
- 30 PD-L1 o PD-L2 es un anticuerpo monoclonal de PD-1, PD-L1 o PD-L2. En ciertas

modalidades, el inhibidor es un fragmento de un anticuerpo monoclonal de PD-1, PD-L1 o PD-L2. En ciertas modalidades, el fragmento de anticuerpo es un scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' y F (ab')₂, F (ab1)₂, Fv, dAb o Fd de un anticuerpo monoclonal de PD-1, PD-L1 o PD-L2. En ciertas modalidades, el inhibidor es un nanocuerpo, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico contra PD-1, PD-L1 o PD-L2. En algunas modalidades específicas, el anticuerpo monoclonal es nivolumab. En algunas modalidades específicas, el anticuerpo monoclonal es pembrolizumab. En algunas modalidades específicas el anticuerpo monoclonal es pidilizumab. En algunas modalidades específicas, el anticuerpo monoclonal es atezolizumab. En algunas modalidades específicas, el anticuerpo monoclonal es avelumab.

10 **[00139]** En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor del gen 3 activado por linfocitos (LAG3). En algunas de estas modalidades, el inhibidor de LAG3 es un anticuerpo monoclonal de LAG3, como, por ejemplo, BMS-986016 (*véase el* número de ensayo clínico NCT01968109 para «Safety Study of Anti-LAG-3 With and Without Anti-PD-1 in the Treatment of Solid Tumors» en ClinicalTrials.gov).

15 **[00140]** En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor de la proteína 3 que contiene inmunoglobulina y mucina de células T (TIM-3). En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor del atenuador de linfocitos B y T (BTLA). En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor del inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT). En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor del supresor Ig del dominio V de la activación de células T (VISTA). En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor del receptor A2a de adenosina (A2aR). En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor del receptor tipo inmunoglobulinas de células asesinas (KIR). En ciertas modalidades, el componente
20 inmunomodulador adicional es un inhibidor de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un inhibidor de CD20, CD39 o CD73.

[00141] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador para una molécula coestimuladora positiva. En algunas modalidades, el
25 componente inmunomodulador adicional es un activador de un compañero de unión de una molécula coestimuladora positiva.

30

[00142] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador de un miembro de la superfamilia del receptor de TNF, tal como un anticuerpo agonista o un ligando natural o un miembro de la superfamilia del receptor de TNF. En ciertas modalidades, el miembro de la superfamilia del receptor de TNF se selecciona del grupo que consiste en: CD120a, CD120b, CD18, OX40, CD40, receptor Fas, M68, CD27, CD30, 4-1BB, TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, RANK, OCIF, receptor TWEAK, TACI, receptor BAFF, ATAR, CD271, CD269, GITR, TROY, CD358, TRAMP y XEDAR. En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un miembro de la superfamilia de TNF. En ciertas modalidades, el miembro de la superfamilia de TNF se selecciona del grupo que consiste en: TNF α , TNF-C, OX40L, CD40L, FasL, LIGHT, TL1A, CD27L, Siva, CD153, ligando 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, ligando GITR y EDA-2.

[00143] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador del miembro 4 de la superfamilia del receptor de TNF (OX40). En algunas de estas modalidades, el activador de OX40 es un anticuerpo agonista de OX40. En algunas de estas modalidades, el activador de OX40 es el ligando OX40 (OX40L).

[00144] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador de CD27. En algunas de estas modalidades, el activador de CD27 es un anticuerpo agonista de CD27. En algunas otras de estas modalidades, el activador de CD27 es el ligando de CD27 (CD27L).

[00145] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador de CD40. En algunas de estas modalidades, el activador de CD40 es un anticuerpo agonista de CD40. En algunas otras de estas modalidades, el activador de CD40 es el ligando de CD40 (CD40L).

[00146] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador de la proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR). En algunas de estas modalidades, el activador de GITR es un anticuerpo agonista de GITR. En algunas otras de estas modalidades, el activador de GITR es un ligando natural de GITR.

[00147] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador de 4-1BB. En algunas de estas modalidades, el activador de 4-1BB es un anticuerpo agonista

de 4-1BB. En algunas otras de estas modalidades, el activador de 4-1BB es un ligando natural de 4-1BB.

[00148] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es receptor Fas (Fas). En algunas de estas modalidades, el receptor Fas se muestra en la superficie de la vesícula extracelular. En algunas otras modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un ligando Fas (FasL). En ciertas modalidades, el ligando Fas se muestra en la superficie de la vesícula extracelular. En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un anticuerpo del receptor Fas. En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un anticuerpo del ligando Fas.

[00149] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador de una molécula coestimuladora de la superfamilia de CD28. En ciertas modalidades, la molécula coestimuladora de la superfamilia de CD28 es ICOS o CD28. En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es ICOSL, CD80 o CD86.

[00150] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador del coestimulador de células T inducible (ICOS). En algunas de estas modalidades, el activador de ICOS es un anticuerpo agonista de ICOS. En algunas otras de estas modalidades, el activador de ICOS es el ligando de ICOS (ICOSL).

[00151] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador de CD28. En algunas de estas modalidades, el activador de CD28 es un anticuerpo agonista de CD28. En algunas otras de estas modalidades, el activador de CD28 es un ligando natural de CD28. En ciertas modalidades, el ligando de CD28 es CD80.

[00152] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es una citocina. En algunas modalidades, la citocina es una citocina soluble que se ha fusionado traduccionalmente a una proteína de la superficie del exosoma o fragmento de esta. En algunas modalidades, la citocina es IL-2. En algunas modalidades, la citocina es IL-7. En algunas modalidades, la citocina es IL-12. En algunas modalidades, la citocina es IL-15.

[00153] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un receptor de células T (TCR) o un derivado de este. En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es una cadena α de TCR o un derivado de esta. En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es una cadena β de TCR o un

derivado de esta. En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un correceptor de células T o un derivado de este.

5 [00154] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un antígeno tumoral. En ciertas modalidades, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en: alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno tumoral
epitelial (ETA), mucina 1 (MUC1), Tn-MUC1, mucina 16 (MUC16), tirosinasa, antígeno
asociado a melanoma (MAGE), proteína tumoral p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86,
ligando 1 de muerte programada (PD-L1), ligando 2 de muerte programada (PD-L2), NY-
ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, Mesotelina, VEGFR, receptor de alfa-
10 folato, CE7R, IL-3, antígeno de cáncer de testículo, MART-1 gp100 y ligando inductor de
apoptosis relacionado con TNF.

[00155] En ciertas modalidades, el antígeno tumoral es un antígeno carcinoembrionario (CEA). En ciertas modalidades, el antígeno tumoral es un antígeno tumoral epitelial (ETA).

15 [00156] En ciertas modalidades, el antígeno tumoral es una mucina. En algunas de estas modalidades, la mucina es una mucina secretada. En algunas otras de estas modalidades, la mucina es una mucina transmembrana. En modalidades específicas, el antígeno tumoral es mucina 1 (MUC1). En modalidades específicas, el antígeno tumoral es Tn-MUC1. En modalidades específicas, el antígeno tumoral es mucina 16 (MUC16).

20 [00157] En ciertas modalidades, el antígeno tumoral es un antígeno asociado a melanoma (MAGE). En algunas de estas modalidades, el MAGE es un MAGE de tipo I. En algunas otras de estas modalidades, el MAGE es un MAGE de tipo II. En modalidades específicas, el MAGE de tipo I es MAGE-A2. En modalidades específicas, el MAGE de tipo I es MAGE-A4.

25 [00158] En ciertas modalidades, el antígeno tumoral es alfa-fetoproteína (AFP). En ciertas modalidades, el antígeno tumoral es una proteína tumoral p53 (p53). En ciertas modalidades, el antígeno tumoral es tirosinasa. En ciertas modalidades, el antígeno tumoral es una proteína relacionada con tirosinasa (TRP). En algunas modalidades, el antígeno tumoral es el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) o el ligando 2 de muerte programada (PD-L2). En diversas modalidades, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en CD4, CD8, CD45, CD80 y CD86.

[00159] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador es un receptor del antígeno quimérico (CAR) o un derivado de este. En algunas modalidades, el CAR se une a uno o más de alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno tumoral epitelial (ETA), mucina 1 (MUC1), Tn-MUC1, mucina 16 (MUC16), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), proteína tumoral p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, ligando 1 de muerte programada (PD-L1), ligando 2 de muerte programada (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, Mesotelina, VEGFR, receptor de alfa-folato, CE7R, IL-3, antígeno de cáncer de testículo, MART-1 gp100 y ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF.

[00160] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador de un receptor o correceptor de células T. En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador de CD3. En ciertas modalidades, el activador es un fragmento de un anticuerpo monoclonal de CD3. En ciertas modalidades, el fragmento de anticuerpo es un scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' y F (ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb o Fd de un anticuerpo monoclonal de CD3. En ciertas modalidades, el activador es un nanocuerpo, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico contra CD3. En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un activador de CD28. En ciertas modalidades, el activador es un fragmento de un anticuerpo monoclonal de CD28. En ciertas modalidades, el fragmento de anticuerpo es un scFv, (scFv)₂, Fab, Fab' y F (ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb o Fd de un anticuerpo monoclonal de CD28. En ciertas modalidades, el activador es un nanocuerpo, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico contra CD28.

[00161] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un complejo principal de histocompatibilidad (MHC) o un derivado de este. En algunas de estas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un MHC de clase I o un derivado de este. En algunas de estas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un MHC de clase II o un derivado de este. En algunas de estas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un MHC de clase III o un derivado de este.

[00162] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un antígeno leucocitario humano (HLA) o un derivado de este. En algunas de estas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un HLA-A, HLA-B, HLA-C o un derivado de

este. En algunas de estas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un HLA-E, HLA-F, HLA-G o un derivado de este. En algunas de estas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR o un derivado de este.

- 5 **[00163]** En diversas modalidades, el componente inmunomodulador puede ser un polipéptido, un polinucleótido, un polisacárido, un lípido, una molécula pequeña o una toxina.

[00164] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador puede ser una proteína, un péptido, un glicolípido o una glicoproteína.

- [00165]** En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador es un agonista. En
 10 algunas de estas modalidades, el agonista es un agonista endógeno, tal como una hormona o un neurotransmisor. En algunas otras de estas modalidades, el agonista es un agonista exógeno, tal como un fármaco. En algunas modalidades, el agonista es un agonista físico, que puede crear una respuesta agonista sin unirse al receptor. En algunas modalidades, el agonista es un superagonista, que puede producir una respuesta máxima mayor que el
 15 agonista endógeno. En ciertas modalidades, el agonista es un agonista completo con total eficacia en el receptor. En ciertas otras modalidades, el agonista es un agonista parcial que tiene solo una eficacia parcial en el receptor con respecto a un agonista completo. En algunas modalidades, el agonista es un agonista inverso que puede inhibir la actividad constitutiva del receptor. En algunas modalidades, el agonista es un coagonista que trabaja con otros
 20 coagonistas para producir un efecto sobre el receptor. En ciertas modalidades, el agonista es un agonista irreversible que se une permanentemente a un receptor mediante la formación de un enlace covalente. En ciertas modalidades, el agonista es un agonista selectivo para un tipo específico de receptor.

- [00166]** En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador es un antagonista. En
 25 algunas de estas modalidades, el antagonista es un antagonista competitivo, que se une reversiblemente al receptor en el mismo sitio de unión que el agonista o ligando endógeno sin activar el receptor. El antagonista competitivo puede afectar la cantidad de agonista necesaria para lograr una respuesta máxima. En algunas otras de estas modalidades, el antagonista es un antagonista no competitivo, que se une a un sitio activo del receptor o un sitio alostérico
 30 del receptor. El antagonista no competitivo puede reducir la magnitud de la respuesta máxima

que puede lograrse por cualquier cantidad de agonista. En algunas otras modalidades, el antagonista es un antagonista no competitivo, que requiere la activación del receptor por un agonista antes de su unión a un sitio de unión alostérico separado.

[00167] En diversas modalidades, el componente inmunomodulador comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno. El componente inmunomodulador puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento de esta. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede derivarse de fuentes naturales, o producirse de forma parcial o totalmente sintética. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas de estas modalidades, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de IgG. En ciertas modalidades, el anticuerpo monoclonal es una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas otras modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En ciertas modalidades, el fragmento de unión al antígeno se selecciona de los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, F(ab)₁, Fv, dAb y Fd. En ciertas modalidades, el fragmento de unión al antígeno es un fragmento scFv o (scFv)₂. En ciertas otras modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un Nanobody[®] (anticuerpo de dominio único). En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico.

[00168] En diversas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es completamente humano. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es quimérico. En algunas de estas modalidades, el anticuerpo quimérico tiene dominios de la región V no humana y dominios de la región C humana. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es no humano, tal como murino o veterinario.

[00169] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador es una proteína, un péptido, un glicolípido o una glicoproteína.

[00170] En diversas modalidades, la composición comprende dos o más componentes inmunomoduladores mencionados anteriormente, que incluyen mezclas, fusiones, combinaciones y conjugados, de átomos, moléculas, etc. En ciertas modalidades, la composición comprende un ácido nucleico combinado con un polipéptido. En ciertas modalidades, la composición comprende dos o más polipéptidos conjugados entre sí. En

ciertas modalidades, la composición comprende una proteína conjugada con una molécula biológicamente activa. En algunas de estas modalidades, la molécula biológicamente activa es un profármaco.

La composición farmacéutica

- 5 [00171] Las composiciones farmacéuticas generalmente comprenden una pluralidad de vesículas extracelulares y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable en una forma adecuada para la administración a un sujeto. Los excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables se determinan en parte mediante la composición particular que se administra, así como mediante el método particular usado para administrar la composición.
- 10 Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas que comprenden una pluralidad de vesículas extracelulares. (Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 21^a ed. (2005)). Las composiciones farmacéuticas generalmente se formulan estériles y cumplen totalmente con todas las regulaciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de la
- 15 Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU.
- [00172] En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende uno o más agentes terapéuticos y la vesícula extracelular descrita en el presente documento. En algunas modalidades, las vesículas extracelulares se administran conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos separados, en donde la administración conjunta incluye la
- 20 administración del agente terapéutico separado antes, después o simultáneamente con la administración de las vesículas extracelulares.
- [00173] Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen excipientes que generalmente son seguros, no tóxicos y deseables, incluidos los excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano.
- 25 [00174] Los ejemplos de portadores o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5 %. El uso de tales medios y compuestos para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o compuesto convencional sea incompatible con las vesículas extracelulares descritas en el presente

documento, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar agentes terapéuticos suplementarios en las composiciones. Típicamente, una composición farmacéutica se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Las vesículas extracelulares pueden administrarse por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intradérmica, transdérmica, rectal, intracraneal, intraperitoneal, intranasal, intramuscular o como inhalantes. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica que comprende vesículas extracelulares se administra por vía intravenosa, por ejemplo, por inyección. Las vesículas extracelulares pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes terapéuticos que son al menos parcialmente efectivos en el tratamiento de la enfermedad, trastorno o afección para la cual están destinadas las vesículas extracelulares.

[00175] Las soluciones o suspensiones pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; compuestos antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; compuestos quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones como acetatos, citratos o fosfatos, y compuestos para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

[00176] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (si son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). La composición es generalmente estéril y fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de estos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y

mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos compuestos antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Si se desea, se pueden agregar a la composición compuestos isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un compuesto que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[00177] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando las vesículas extracelulares en una cantidad eficaz y en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en la presente, según se desee. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando las vesículas extracelulares en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y cualquier otro ingrediente deseado. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril de este. Las vesículas extracelulares pueden administrarse en forma de inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil de las vesículas extracelulares.

[00178] La administración sistémica de composiciones que comprenden vesículas extracelulares también puede ser por medios transmucosos. Para la administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera que se desea atravesar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede lograr mediante el uso de, por ejemplo, aerosoles nasales.

[00179] En ciertas modalidades, la composición farmacéutica que comprende vesículas extracelulares se administra por vía intravenosa a un sujeto que se beneficiaría de la composición farmacéutica. En ciertas otras modalidades, la composición se administra al sistema linfático, por ejemplo, mediante inyección intralinfática o mediante inyección intranodal (véase, por ejemplo, Senti *et ál.*, PNAS 105 (46): 17908 (2008)), o mediante inyección

intramuscular, mediante administración subcutánea, por inyección directa en el timo o en el hígado.

5 [00180] En ciertas modalidades, la composición farmacéutica que comprende vesículas extracelulares se administra como una suspensión líquida. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica se administra como una formulación que es capaz de formar un depósito después de la administración. En ciertas modalidades preferidas, el depósito libera lentamente las vesículas extracelulares en la circulación, o permanece en forma de depósito.

10 [00181] Típicamente, las composiciones farmacéuticamente aceptables están altamente purificadas para estar libres de contaminantes, son biocompatibles y no tóxicas, y son adecuadas para la administración a un sujeto. Si el agua es un componente del portador, el agua está altamente purificada y procesada para estar libre de contaminantes, por ejemplo, endotoxinas.

15 [00182] El portador farmacéuticamente aceptable puede ser lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma acacia, fosfato de calcio, alginatos, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y/o aceite mineral pero no se limita a estos. La composición farmacéutica puede incluir además un lubricante, un agente humectante, un edulcorante, un potenciador del sabor, un agente emulsionante, un agente de suspensión y/o un conservante.

20 [00183] Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden las vesículas extracelulares descritas en el presente documento y opcionalmente un agente farmacéuticamente activo o terapéutico. El agente terapéutico puede ser un agente biológico, un agente de molécula pequeña o un agente de ácido nucleico.

25 [00184] Se proporcionan formas de dosificación que comprenden una composición farmacéutica que comprende las vesículas extracelulares descritas en este documento. En algunas modalidades, la forma de dosificación se formula como una suspensión líquida para inyección intravenosa.

[00185] En ciertas modalidades, la preparación de vesículas extracelulares se somete a radiación, por ejemplo, rayos X, rayos gamma, partículas beta, partículas alfa, neutrones,

protones, núcleos elementales, rayos UV para dañar los ácidos nucleicos residuales competentes en replicación.

[00186] En ciertas modalidades, la preparación de vesículas extracelulares se somete a irradiación gamma usando una dosis de irradiación de más de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 kGy.

[00187] En ciertas modalidades, la preparación de vesículas extracelulares se somete a irradiación de rayos X usando una dosis de irradiación de más de 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 o más de 10000 mSv.

10 **Métodos**

[00188] Los aspectos de la presente divulgación también incluyen métodos para producir la composición que comprende la vesícula extracelular y el componente inmunomodulador. En algunas modalidades, el método comprende: obtener la vesícula extracelular de la célula productora, en donde la célula productora contiene naturalmente el componente inmunomodulador y opcionalmente aislar la vesícula extracelular obtenida. En algunas modalidades, el método comprende: modificar una célula productora con el componente inmunomodulador; obtener la vesícula extracelular de la célula productora modificada y opcionalmente aislar la vesícula extracelular obtenida. En algunas otras modalidades, el método comprende: obtener la vesícula extracelular de la célula productora; aislar las vesículas extracelulares obtenidas y modificar la vesícula extracelular obtenida con el componente inmunomodulador. En ciertas modalidades, el método comprende además formular las vesículas extracelulares aisladas en una composición farmacéutica.

Métodos de producción de las vesículas extracelulares.

Métodos de modificación de la célula productora con el componente inmunomodulador

25 [00189] En diversas modalidades, el método comprende modificar una célula productora con el componente inmunomodulador.

- [00190] La célula productora puede ser una línea celular de mamífero, una línea celular de planta, una línea celular de insecto, una línea celular de hongos o una línea celular procariota. En ciertas modalidades, la célula productora es una línea celular de mamífero. Las líneas celulares de mamífero incluyen, entre otras, una línea celular de riñón embrionario humano (HEK), una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), una línea celular HT-1080, una línea celular HeLa, una línea celular PERC-6, una línea celular CEVEC, una línea celular de fibroblastos, una línea celular de amniocitos, una línea celular epitelial y una línea celular de células madre mesenquimales (MSC). En algunas modalidades preferidas, la línea celular de mamífero puede ser células HEK-293, células BJ de fibroblastos de prepucio humano, células fHDF de fibroblastos, células precursoras neuronales AGE.HN®, células amniocitosCAP®, células madre mesenquimales adiposas, o células RPTEC/TERT1. La célula productora también puede ser una célula primaria. En diversas modalidades, la célula primaria puede ser una célula primaria de mamífero, una célula primaria vegetal, una célula primaria de insecto, una célula primaria de hongos o una célula primaria procariota.
- [00191] En ciertas modalidades preferidas, la célula productora es una célula inmune, tal como una célula dendrítica, una célula T, una célula B, una célula asesina natural (célula NK), una célula presentadora de antígeno, un macrófago, una célula T auxiliar o una célula T reguladora (célula Treg).
- [00192] En diversas modalidades, el componente inmunomodulador puede expresarse en una célula productora a partir de un transgén o mRNA introducido en la célula productora por transfección (véase, por ejemplo, Bacchetti S, Graham FL (abril de 1977). «Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74 (4): 1590–4; Kriegler M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. W. H. Freeman. pp. 96–97; Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (noviembre de 1987). «Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84 (21): 7413–7; Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL (enero de 1994). «Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations». *The*

Journal of Biological Chemistry. 269 (4): 2550–61), transducción viral (véase, por ejemplo, Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (2000). «*Transduction*». An Introduction to Genetic Analysis (7a ed.)), electroporación (véase, por ejemplo, Neumann, E; Schaefer-Ridder, M; Wang, Y; Hofschneider, PH (1982). «Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields». *The EMBO Journal*. 1 (7): 841–5)) extrusión (véase, por ejemplo, Sharei A, Zoldan J, Adamo A, Sim WY, Cho N, Jackson E, Mao S, Schneider S, Han MJ, Lytton-Jean A, Basto PA, Jhunjhunwala S, Lee J, Heller DA, Kang JW, Hartoularos GC, Kim KS, Anderson DG, Langer R, Jensen KF (febrero de 2013). «A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (6): 2082–7), sonicación (véase, por ejemplo, Yizhi Song (2007). «Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria». *Nucleic Acids Res*. 35 (19): e129.), fusión celular (véase, por ejemplo, Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (noviembre de 1987). «Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84 (21): 7413–), o cualquier otro método conocido por el experto en la técnica.

[00193] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la célula productora por transfección. En algunas modalidades, el componente inmunomodulador puede introducirse en células productoras adecuadas usando macromoléculas sintéticas tales como lípidos y polímeros catiónicos (Papapetrou *et ál.*, *Gene Therapy* 12: S118-S130 (2005)). En algunas modalidades, los lípidos catiónicos forman complejos con el componente inmunomodulador a través de interacciones de carga. En algunas de estas modalidades, los complejos cargados positivamente se unen a la superficie celular cargada negativamente y son captados por la célula por endocitosis. En algunas otras modalidades, se puede usar un polímero catiónico para transfectar células productoras. En algunas de estas modalidades, el polímero catiónico es polietilenimina (PEI). En ciertas modalidades, se pueden usar productos químicos tales como fosfato de calcio, ciclodextrina o polibreno, para introducir el componente inmunomodulador en las células productoras. El componente inmunomodulador también puede introducirse en una célula productora utilizando un método físico tal como transfección mediada por partículas, «pistola genética», biolística o tecnología de bombardeo de partículas

(Papapetrou *et ál.*, Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)) . Se puede usar un gen indicador como, por ejemplo, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa o proteína verde fluorescente para evaluar la eficiencia de transfección de la célula productora.

5 [00194] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la célula productora por transducción viral. Se pueden usar varios virus como vehículos de transferencia de genes, incluidos el virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), adenovirus, virus adenoasociado (AAV), virus del herpes simple (HSV), lentivirus y espumavirus. Los vehículos de transferencia génica mediados por virus comprenden vectores basados en virus de ADN, tales como adenovirus, virus adenoasociados y virus del herpes, 10 así como vectores basados en retrovirus.

[00195] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la célula productora por electroporación. La electroporación crea poros transitorios en la membrana celular, lo que permite la introducción de diversas moléculas en la célula. En algunas modalidades, el ADN y el ARN, así como los polipéptidos y los agentes terapéuticos no 15 polipeptídicos pueden introducirse en la célula productora por electroporación.

[00196] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la célula productora por microinyección. En algunas modalidades, se puede usar una micropipeta de vidrio para inyectar el componente inmunomodulador en la célula productora a nivel microscópico.

20 [00197] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la célula productora por extrusión.

[00198] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la célula productora por sonicación. En algunas modalidades, la célula productora está expuesta a ondas de sonido de alta intensidad, lo que provoca una interrupción transitoria de la 25 membrana celular que permite la carga de un componente inmunomodulador.

[00199] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la célula productora por fusión celular. En algunas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce por fusión celular eléctrica. En algunas otras modalidades, se usa polietilenglicol

(PEG) para fusionar las células productoras. En algunas otras modalidades, se usa virus sendai para fusionar las células productoras.

[00200] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la célula productora por lisis hipotónica. En algunas de estas modalidades, la célula productora está
5 expuesta a un tampón de baja fuerza iónica que hace que estallen permitiendo la carga de un componente inmunomodulador. En algunas modalidades alternativas, la diálisis controlada contra una solución hipotónica se usa para hinchar la célula productora y crear poros en la membrana de la célula productora. La célula productora se expone posteriormente a condiciones que permiten el resellado de la membrana.

10 [00201] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la célula productora por tratamiento de detergente. En ciertas modalidades, la célula productora se trata con un detergente suave que compromete transitoriamente la membrana de la célula productora creando poros que permiten la carga de un componente inmunomodulador. Una vez que se cargan las células productoras, el detergente se lava resellando de ese modo la
15 membrana.

[00202] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la célula productora por endocitosis mediada por receptor. En ciertas modalidades, las células productoras tienen un receptor de superficie que, al unirse al componente inmunomodulador, induce la internalización del receptor y el componente inmunomodulador asociado.

20 [00203] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la célula productora por filtración. En ciertas modalidades, las células productoras y el componente inmunomodulador pueden forzarse a través de un filtro de tamaño de poro más pequeño que la célula productora, provocando la interrupción transitoria de la membrana de la célula productora y permitiendo que el componente inmunomodulador entre en la célula productora.

25 [00204] En algunas modalidades, la célula productora se somete a varios ciclos de congelación-descongelación, lo que da como resultado una alteración de la membrana celular que permite la carga de un componente inmunomodulador.

Métodos de modificación de la vesícula extracelular con el componente inmunomodulador

[00205] En diversas modalidades alternativas, el componente inmunomodulador se introduce directamente en las vesículas extracelulares después del aislamiento de las vesículas extracelulares.

- 5 [00206] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la vesícula extracelular por transfección. En algunas modalidades, el componente inmunomodulador puede introducirse en las vesículas extracelulares usando macromoléculas sintéticas tales como lípidos y polímeros catiónicos (Papapetrou *et ál.*, Gene Therapy 12: S118-S130 (2005)). En ciertas modalidades, se pueden usar productos químicos tales como fosfato de calcio, 10 ciclodextrina o polibreno, para introducir el componente inmunomodulador en las vesículas extracelulares.

- [00207] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la vesícula extracelular por electroporación. En algunas modalidades, las vesículas extracelulares están expuestas a un campo eléctrico que causa agujeros transitorios en la membrana de la 15 vesícula extracelular, permitiendo la carga de un componente inmunomodulador.

[00208] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la vesícula extracelular por microinyección. En algunas modalidades, se puede usar una micropipeta de vidrio para inyectar el componente inmunomodulador directamente en la vesícula extracelular a nivel microscópico.

- 20 [00209] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la vesícula extracelular por extrusión.

- [00210] En ciertas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la vesícula extracelular por sonicación. En algunas modalidades, las vesículas extracelulares están expuestas a ondas de sonido de alta intensidad, lo que provoca una interrupción transitoria de 25 la vesícula extracelular que permite la carga de un componente inmunomodulador.

[00211] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador puede conjugarse a la superficie de la vesícula extracelular. La conjugación se puede lograr química o enzimáticamente, por métodos conocidos en la técnica.

[00212] En algunas modalidades, la vesícula extracelular comprende un componente inmunomodulador que está químicamente conjugado. La conjugación química se puede lograr mediante la unión covalente del componente inmunomodulador a otra molécula, con o sin el uso de un conector. La formación de tales conjugados está dentro de la habilidad de los artesanos y se conocen diversas técnicas para lograr la conjugación, y la elección de la técnica particular se guía por los materiales que se desea conjugar. En ciertas modalidades, los polipéptidos se conjugan con la vesícula extracelular. En ciertas otras modalidades, los no polipéptidos, tales como lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas, se conjugan con la vesícula extracelular.

10 [00213] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la vesícula extracelular por lisis hipotónica. En algunas de estas modalidades, las vesículas extracelulares están expuestas a un tampón de baja fuerza iónica que hace que estallen permitiendo la carga de un componente inmunomodulador. En algunas modalidades alternativas, la diálisis controlada contra una solución hipotónica se usa para hinchar la vesícula extracelular y crear poros en la membrana de la vesícula extracelular. La vesícula extracelular se expone posteriormente a condiciones que permiten el resellado de la membrana.

20 [00214] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la vesícula extracelular por tratamiento de detergente. En ciertas modalidades, las vesículas extracelulares se tratan con un detergente suave que compromete transitoriamente la membrana de la vesícula extracelular creando poros que permiten la carga de un componente inmunomodulador. Una vez que se cargan las vesículas extracelulares, el detergente se lava resellando de ese modo la membrana.

25 [00215] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la vesícula extracelular por endocitosis mediada por receptor. En ciertas modalidades, las vesículas extracelulares tienen un receptor de superficie que, al unirse al componente inmunomodulador, induce la internalización del receptor y el componente inmunomodulador asociado.

30 [00216] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la vesícula extracelular por encendido mecánico. En ciertas modalidades, las vesículas

extracelulares pueden bombardearse con un componente inmunomodulador unido a una partícula pesada o cargada tal como microportadores de oro. En algunas de estas modalidades, la partícula puede acelerarse mecánica o eléctricamente de modo que atraviese la membrana de la vesícula extracelular.

- 5 [00217] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador se introduce en la vesícula extracelular por filtración. En ciertas modalidades, las vesículas extracelulares y el componente inmunomodulador pueden forzarse a través de un filtro de tamaño de poro más pequeño que la vesícula extracelular, provocando la interrupción transitoria de la membrana de la vesícula extracelular y permitiendo que el componente inmunomodulador entre en la
- 10 vesícula extracelular.

[00218] En algunas modalidades, las vesículas extracelulares se someten a varios ciclos de congelación-descongelación, lo que da como resultado una alteración de la membrana de la vesícula extracelular que permite la carga de un componente inmunomodulador.

Métodos de aislamiento de las vesículas extracelulares

- 15 [00219] Las vesículas extracelulares pueden aislarse de las células productoras. En ciertas modalidades, la vesícula extracelular es liberada por la célula productora en el medio de cultivo celular. Se contempla que todas las formas conocidas de aislamiento de vesículas extracelulares se consideren adecuadas para su uso en el presente documento. Por ejemplo, las propiedades físicas de las vesículas extracelulares pueden emplearse para separarlas de
- 20 un medio u otro material fuente, incluida la separación en función de la carga eléctrica (por ejemplo, separación electroforética), el tamaño (por ejemplo, filtración, tamizado molecular, *etc.*), densidad (p. ej., centrifugación regular o de gradiente), constante de Svedberg (p. ej., sedimentación con o sin fuerza externa, *etc.*). Alternativamente, o adicionalmente, el aislamiento puede basarse en una o más propiedades biológicas e incluir métodos que
- 25 pueden emplear marcadores de superficie (por ejemplo, para precipitación, unión reversible a fase sólida, separación de FACS, unión de ligando específico, unión de ligando no específico, purificación por afinidad, *etc.*).

[00220] El aislamiento y el enriquecimiento se pueden hacer de manera general y no selectiva, típicamente incluyendo la centrifugación en serie. Alternativamente, el aislamiento y el enriquecimiento pueden realizarse de una manera más específica y selectiva, como mediante el uso de marcadores de superficie específicos de células productoras o vesículas extracelulares. Por ejemplo, se pueden usar marcadores de superficie específicos en inmunoprecipitación, clasificación por FACS, purificación por afinidad y separación magnética con ligandos unidos a perlas.

[00221] En algunas modalidades, la cromatografía de exclusión por tamaño puede utilizarse para aislar las vesículas extracelulares. Las técnicas de cromatografía de exclusión por tamaño son conocidas en la técnica. Ejemplos de técnicas no limitantes se proporcionan en el presente documento. En algunas modalidades, se aísla una fracción de volumen vacío y comprende las vesículas extracelulares de interés. Además, en algunas modalidades, las vesículas extracelulares pueden aislarse adicionalmente después de la separación cromatográfica mediante técnicas de centrifugación (de una o más fracciones de cromatografía), como se conoce generalmente en la técnica. En algunas modalidades, por ejemplo, la centrifugación en gradiente de densidad se puede utilizar para aislar adicionalmente las vesículas extracelulares. En ciertas modalidades, puede ser deseable separar adicionalmente las vesículas extracelulares derivadas de células productoras de las vesículas extracelulares de otro origen. Por ejemplo, las vesículas extracelulares derivadas de células productoras se pueden separar de las vesículas extracelulares derivadas de células no productoras mediante captura inmunosorbente usando un anticuerpo de antígeno específico para la célula productora.

[00222] En algunas modalidades, el aislamiento de vesículas extracelulares puede implicar combinaciones de métodos que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación diferencial, filtración por membrana basada en el tamaño, inmunoprecipitación, clasificación por FACS y separación magnética.

Métodos de medición del tamaño de las vesículas extracelulares

[00223] En algunas modalidades, los métodos descritos en el presente documento comprenden medir el tamaño de vesículas extracelulares y/o poblaciones de vesículas

extracelulares. Generalmente, el tamaño de la vesícula extracelular se mide como la dimensión medible más larga. Generalmente, la dimensión medible más larga de una vesícula extracelular también se denomina diámetro.

[00224] El tamaño de la vesícula extracelular se puede medir utilizando la dispersión
5 dinámica de la luz (DLS) y/o dispersión de luz multiángulo (MALS). Los métodos de uso de
DLS y/o MALS para medir el tamaño de las vesículas extracelulares son conocidos por los
expertos en la técnica e incluyen el ensayo de seguimiento de nanopartículas (NTA, por
ejemplo, utilizando un dispositivo de seguimiento de nanopartículas Malvern NanoSight
NS300). En una modalidad específica, el tamaño de la vesícula extracelular se determina
10 usando un Malvern NanoSight NS300. En algunas modalidades, las vesículas extracelulares
descritas en este documento tienen una dimensión más larga de aproximadamente 20-300
nm medida por NTA (por ejemplo, usando un Malvern NanoSight NS300). En algunas
modalidades, las vesículas extracelulares descritas en este documento tienen una dimensión
más larga de aproximadamente 40-200 nm medida por NTA (por ejemplo, usando un Malvern
15 NanoSight NS300). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares
descritas en este documento comprenden una población, en donde el 90 % de las vesículas
extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 20-300 nm medida por
NTA (por ejemplo, usando un Malvern NanoSight NS300). En otras modalidades, las
poblaciones de vesículas extracelulares descritas en este documento comprenden una
20 población, en donde el 95 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga
de aproximadamente 20-300 nm medida por NTA (por ejemplo, usando un Malvern
NanoSight NS300). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares
descritas en este documento comprenden una población, en donde el 99 % de las vesículas
extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 20-300 nm medida por
25 NTA (por ejemplo, usando un Malvern NanoSight NS300). En otras modalidades, las
poblaciones de vesículas extracelulares descritas en este documento comprenden una
población, en donde el 90 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga
de aproximadamente 40-200 nm medida por NTA (por ejemplo, usando un Malvern
NanoSight NS300). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares
30 descritas en este documento comprenden una población, en donde el 95 % de las vesículas

extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 40-200 nm medida por NTA (por ejemplo, usando un Malvern NanoSight NS300). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en este documento comprenden una población, en donde el 99 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 40-200 nm medida por NTA (por ejemplo, usando un Malvern NanoSight NS300).

[00225] El tamaño de las vesículas extracelulares se puede medir utilizando la detección de pulso resistivo sintonizable (TRPS). En una modalidad específica, el tamaño de la vesícula extracelular medido por TRPS se determina usando un iZON qNANO Gold. En algunas modalidades, las vesículas extracelulares descritas en este documento tienen una dimensión más larga de aproximadamente 20-300 nm medida por TRPS (por ejemplo, usando un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las vesículas extracelulares descritas en este documento tienen una dimensión más larga de aproximadamente 40-200 nm medida por TRPS (por ejemplo, usando un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en este documento comprenden una población, en donde el 90 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 20-300 nm medida por TRPS (por ejemplo, usando un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en este documento comprenden una población, en donde el 95 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 20-300 nm medida por TRPS (por ejemplo, usando un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en este documento comprenden una población, en donde el 99 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 20-300 nm medida por TRPS (por ejemplo, usando un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en este documento comprenden una población, en donde el 90 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 40-200 nm medida por TRPS (por ejemplo, usando un iZON qNano Gold). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en este documento comprenden una población, en donde el 95 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 40-200 nm medida por TRPS (por ejemplo, usando un iZON qNano

Gold). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en este documento comprenden una población, en donde el 99 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 40-200 nm medida por TRPS (por ejemplo, usando un iZON qNano Gold).

- 5 [00226] El tamaño de las vesículas extracelulares se puede medir mediante microscopía electrónica. En algunas modalidades, el método de microscopía electrónica utilizado para medir el tamaño de vesículas extracelulares es la microscopía electrónica de transmisión. En una modalidad específica, el microscopio electrónico de transmisión utilizado para medir el tamaño de las vesículas extracelulares es un Tecnai™ G² Spirit BioTWIN. Los expertos en la
10 técnica conocen bien los métodos para medir el tamaño de las vesículas extracelulares utilizando un microscopio electrónico, y cualquier método de este tipo puede ser apropiado para medir el tamaño de las vesículas extracelulares. En algunas modalidades, las vesículas extracelulares descritas en el presente documento tienen una dimensión más larga de aproximadamente 20-300 nm medida por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo,
15 un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G² Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las vesículas extracelulares descritas en el presente documento tienen una dimensión más larga de aproximadamente 40-200 nm medida por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G² Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en el presente documento
20 comprenden una población, en donde 90 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 20-300 nm medida por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G² Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en el presente documento comprenden una población, en donde 95 % de las vesículas extracelulares tienen
25 una dimensión más larga de aproximadamente 20-300 nm medida por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G² Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en el presente documento comprenden una población, en donde 99 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 20-300 nm medida por
30 un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido

Tecnai™ G² Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en el presente documento comprenden una población, en donde 90 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 40-200 nm medida por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G² Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en el presente documento comprenden una población, en donde 95 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 40-200 nm medida por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G² Spirit BioTWIN). En otras modalidades, las poblaciones de vesículas extracelulares descritas en el presente documento comprenden una población, en donde 99 % de las vesículas extracelulares tienen una dimensión más larga de aproximadamente 40-200 nm medida por un microscopio electrónico de barrido (por ejemplo, un microscopio electrónico de barrido Tecnai™ G² Spirit BioTWIN).

Métodos para determinar la polarización de macrófagos

[00227] En el presente documento se describen métodos y composiciones para aumentar la polarización de macrófagos de un fenotipo M2 a uno M1 usando una vesícula extracelular que comprende uno o más componentes inmunomoduladores que inhiben la expresión de un gen diana de macrófagos. Las composiciones son captadas preferentemente por los macrófagos (en comparación con otros tipos de células como las células T, las células B, los macrófagos o las células dendríticas), y son tan o más eficaces para aumentar la polarización de los macrófagos que una cantidad equimolar del componente inmunomodulador solo. Los métodos para determinar la polarización de macrófagos, incluida la detección de fenotipos M2 y M1 de macrófagos, se pueden realizar mediante cualquier método conocido en la técnica para la determinación de fenotipos M2 y M1. Las secciones de tejido (p. ej., de biopsias tumorales), muestras de sangre, etc. se pueden analizar (p. ej., teñirse) para detectar marcadores de pan-macrófagos, así como macrófagos M2 y M1, incluidos, entre otros, marcadores de superficie celular M2 (p. ej., YM1, FIZZ1, Dectina-1, MGL), citocinas asociadas a M2 (p. ej., IL-10, TGFβ, PGE2, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 y CCL24), citocinas asociadas a M1 (p. ej., INFγ, IL-12, IL-23, TNFα, IL-6, IL-1, CCL5, CSCL9, CXCL10 y CXCL11), factores de crecimiento (por ejemplo, VEGF-A, VEGF-C, EGF y TGF-β), enzimas

(por ejemplo, metaloproteinasas de matriz MMP2, MMP9, proteasas de cisteína cathepsina); *miRNA* asociados con M2 (por ejemplo, miRNA146a, miRNA let 7b y miR-223) y/o *miRNA* asociados con M1 (por ejemplo, miRNA155, miR-33). Véase, por ejemplo, Mosser, DM, & Edwards, JP (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969; Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20. Macrófagos y/o componentes de macrófagos, secreciones o actividad de macrófagos dentro de las muestras (véase, por ejemplo, Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Randolph, G. J. (2007). Los perfiles de expresión génica y las vías reguladoras transcripcionales que subyacen a la identidad y diversidad de macrófagos de tejido de ratón, *Nature Immunology* 13(11), 1118-1128) se pueden detectar mediante citometría de flujo, inmunohistoquímica, inmunotransferencia, PCR cuantitativa o cualquier otro método conocido en la técnica para detectar células o productos celulares en muestras biológicas.

15 *Métodos de tratamiento del cáncer*

[00228] Además, aquí se proporcionan métodos para tratar el cáncer en un sujeto.

[00229] En diversas modalidades, la composición de vesículas extracelulares, por ejemplo, exosomas, que comprende uno o más componentes inmunomoduladores que inhiben al menos un gen y de ese modo aumentan la polarización de macrófagos del fenotipo M2 al M1 se administra a un sujeto con cáncer. En algunas de estas modalidades, la composición puede regular por aumento una respuesta inmune y mejorar el direccionamiento tumoral del sistema inmune del sujeto. En algunos aspectos, el aumento de la polarización de los macrófagos del fenotipo M2 al M1 *per se* regula la respuesta inmune del sujeto y mejora el direccionamiento tumoral del sistema inmune del sujeto. Algunos autores mencionan la activación del subtipo M2d como respuesta a IL-6 y adenosinas, y estos macrófagos también se conocen como macrófagos asociados a tumores (TAM). Véase, por ejemplo, Röszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–16; Funes, S. C., Rios, M., Escobar-Vera, J., & Kalergis, A. M. (2018). Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*, 154(2), 186–195; y Q. Wang, H. Ni, L. Lan, X. Wei, R. Xiang, y.

Wang, «Fra-1 protooncogene regulates IL6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages», *Cell Research*, vol. 20, n.º 6, pp. 701–712, 2010. Los macrófagos asociados a tumores (TAM) son típicos por sus funciones protumorales como la promoción de la motilidad de las células cancerosas, la formación de metástasis y la angiogénesis y su formación depende de factores microambientales que están presentes en el desarrollo del tumor. Los TAM producen citocinas inmunosupresoras como IL-10, TGFβ, PGE2 y una cantidad muy pequeña de NO o ROI y bajos niveles de citocinas inflamatorias (IL-12, IL-1β, TNFα, IL-6). La capacidad de los TAM de presentar antígenos asociados con tumores disminuye, al igual que la estimulación de las funciones antitumorales de las células T y NK. Los TAM no pueden lisar las células tumorales. https://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage_polarization-cite_note-Sica2008-31. El direccionamiento de TAM puede ser una estrategia terapéutica novedosa contra el cáncer, como se ha demostrado a través de la administración de agentes para alterar el reclutamiento y la distribución de TAM, agotar los TAM existentes o inducir la reeducación de TAM de un fenotipo M2 a uno M1. Véase, por ejemplo, Lewis, Claire E. y Jeffrey W. Pollard. «Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments.» *Cancer research* 66.2 (2006): 605-612; Sica, Antonio et ál. «Macrophage polarization in tumour progression». *Seminars in Cancer Biology*. Vol. 18. n.º 5. Academic Press, 2008; Sica, Antonio, et ál. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol*. 15 enero 2000;164(2):762-7; Cuccarese, Michael F.; Dubach, J. Matthew; Pfirschke, Christina; Engblom, Camilla; Garriss, Christopher; Miller, Miles A.; Pittet, Mikael J.; Weissleder, Ralph (2017-02-08). «Heterogeneity of macrophage infiltration and therapeutic response in lung carcinoma revealed by 3D organ imaging». *Nature Communications*. 8: 14293; Zeisberger, S M; Odermatt, B; Marty, C; Zehnder-Fjällman, A H M; Ballmer-Hofer, K; Schwendener, R A (2006-07-11). «Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach». *British Journal of Cancer*. 95 (3): 272–281; Rodell, Christopher B.; Arlauckas, Sean P.; Cuccarese, Michael F.; Garriss, Christopher S.; Li, Ran; Ahmed, Maaz S.; Kohler, Rainer H.; Pittet, Mikael J.; Weissleder, Ralph (2018-05-21). «TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy». *Nature Biomedical Engineering*; Guerriero, Jennifer L.; Sotayo, Alaba;

Ponichtera, Holly E.; Castrillon, Jessica A.; Pourzia, Alexandra L.; Schad, Sara; Johnson, Shawn F.; Carrasco, Ruben D.; Lazo, Suzan (marzo de 2017). «Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages». *Nature*. 543 (7645): 428–432.

5 [00230] En algunas modalidades, el cáncer que se está tratando se caracteriza por la infiltración de leucocitos (células T, células B, macrófagos, células dendríticas, monocitos) en el microambiente tumoral, o los denominados «tumores calientes» o «tumores inflamatorios». En algunas modalidades, el cáncer que se está tratando se caracteriza por niveles bajos o niveles indetectables de infiltración de leucocitos en el microambiente tumoral, o los
10 denominados «tumores fríos» o «tumores no inflamatorios». En algunas modalidades, la composición se administra en una cantidad y durante un tiempo suficiente para convertir un «tumor frío» en un «tumor caliente», es decir, dicha administración da como resultado la infiltración de leucocitos (tales como células T) en el microambiente tumoral.

[00231] En algunas modalidades, las composiciones comprenden una vesícula extracelular y
15 una combinación de más de un componente inmunomodulador, que incluye un componente que promueve la polarización de macrófagos de un fenotipo M2 a uno M1, y un componente que mejora adicionalmente una respuesta inmune, tal como un inhibidor del bloqueo del punto de control, por ejemplo, Ipilimumab, dirigido a CTLA-4, Nivolumab Cemiplimab y Pembrolizumab dirigido a PD-1, y Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab, cada uno dirigido a
20 PD-L1, e inhibidores de CSFR-1, como Pexidartinib, PLX7486, ARRY-382, JNJ-40346527, BLZ945, Emactuzumab, AMG820, IMC-CS4 y Cabiralizumab. La administración de estas composiciones como tratamientos para sujetos con cáncer además puede regular por aumento una respuesta inmune y mejorar el direccionamiento tumoral del sistema inmune del sujeto a través de las acciones combinadas de los componentes inmunomoduladores.

25 [00232] En algunas modalidades, el componente inmunomodulador adicional es un anticuerpo o fragmento activo que se dirige a CTLA-4, PD-1, PD-L1 o CSF1-R. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de ipilimumab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que
30 son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %

idénticas a las CDR de Nivolumab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de Cemiplimab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de Pembrolizumab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de Atezolizumab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de Avelumab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de Durvalumab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de Pexidartinib. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de PLX7486. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de ARRY-382. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de JNJ-40346527. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de BLZ945. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de Emactuzumab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de AMG820. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de IMC-CS4. En modalidades, el anticuerpo o fragmento activo de este comprende

CDR que son al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las CDR de Cabiralizumab.

[00233] En algunas modalidades, la composición que comprende una vesícula extracelular y un componente inmunomodulador se administra a un sujeto como una vacuna contra el cáncer. En algunas de estas modalidades, la composición se administra a un sujeto como una vacuna personalizada contra el cáncer. En algunas modalidades, el componente inmunomodulador es un antígeno tumoral o un péptido derivado de un antígeno tumoral. Ejemplos de antígenos tumorales adecuados incluyen: alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno tumoral epitelial (ETA), mucina 1 (MUC1), Tn-MUC1, mucina 16 (MUC16), tirosinasa, antígeno asociado a melanoma (MAGE), proteína tumoral p53 (p53), CD4, CD8, CD45, CD80, CD86, ligando 1 de muerte programada (PD-L1), ligando 2 de muerte programada (PD-L2), NY-ESO-1, PSMA, TAG-72, HER2, GD2, cMET, EGFR, Mesotelina, VEGFR, receptor de alfa-folato, CE7R, IL-3, antígeno de cáncer de testículo, MART-1 gp100 y ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF. En ciertas modalidades, el antígeno tumoral se deriva de una secuencia del genoma de referencia. En ciertas modalidades, el antígeno tumoral se deriva de una secuencia del genoma del sujeto que recibe la composición.

[00234] Los cánceres que se pueden tratar con la composición incluyen, entre otros, los cánceres enumerados en la Tabla 5.

20 *Métodos de modulación de la expresión génica, redes transcripcionales y polarización en macrófagos*

[00235] Algunas modalidades proporcionan métodos de modulación de la expresión génica en un macrófago, que comprenden administrar a un sujeto una vesícula extracelular que comprende uno o más componentes inmunomoduladores, en donde el componente inmunomodulador está dirigido al gen, y en donde la modulación es igual o mayor que la modulación producida por la administración de una cantidad equimolar del componente inmunomodulador libre dirigido al gen. También se proporcionan métodos para inhibir la expresión génica en un macrófago, que comprende administrar a un sujeto una vesícula extracelular que comprende uno o más componentes inmunomoduladores, en donde el componente inmunomodulador está dirigido al gen, y en donde la inhibición es igual o mayor

que la inhibición producida por la administración de una cantidad equimolar de componente inmunomodulador libre dirigido al gen. Algunas modalidades proporcionan métodos para reprimir una diana posterior de un gen en un macrófago, que comprende administrar a un sujeto una vesícula extracelular que comprende uno o más componentes inmunomoduladores, en donde el componente inmunomodulador está dirigido al gen, y en donde la represión es igual o mayor que la represión producida por la administración de una cantidad equimolar de componente inmunomodulador libre dirigido al gen. Algunas modalidades proporcionan métodos para alterar la polarización de una población de macrófagos, que comprenden administrar a un sujeto una vesícula extracelular que comprende uno o más componentes inmunomoduladores, en donde el componente inmunomodulador está dirigido al gen, y en donde la alteración de la polarización es igual o mayor que la alteración de la polarización producida por la administración de una cantidad equimolar del componente inmunomodulador libre dirigido al gen. En algunas modalidades, la vesícula extracelular es un exosoma. En algunas modalidades, el componente inmunomodulador es un ASO. En algunas modalidades, la alteración en la polarización es un cambio de un fenotipo M2 a uno M1.

Métodos para tratar afecciones fibróticas

[00236] Además, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar una afección fibrótica en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una composición que comprende exosomas que comprenden un componente inmunomodulador que repolariza los macrófagos del fenotipo M2 al M1. En algunas modalidades, la afección fibrótica es fibrosis pulmonar, fibrosis hepática o fibrosis pancreática. En ciertas modalidades, la fibrosis hepática es esteatohepatitis no alcohólica, o NASH. véase, por ejemplo, Mayo Clinic Staff. «Definition [of pulmonary fibrosis]». Mayo Foundation for Medical Education and Research. Archivado desde el original el 15 de julio de 2014. Consultado el 26 de julio de 2014, disponible en todo el mundo en webmayoclinic.org/diseases-conditions/pulmonary-fibrosis/symptoms-causes/syc-20353690; Ferri FF. Idiopathic pulmonary fibrosis. En: Ferri's *Clinical Advisor* 2016. Philadelphia, Pa.: Mosby Elsevier; 2016; Gross TJ, Hunninghake GW (2001). «Idiopathic pulmonary fibrosis». *N Engl J Med.* 345 (7): 517–525; Friedman LS (2014). *Current medical diagnosis and treatment*

2014. [S.I.]: McGraw-Hill. pp. Chapter 16. Liver, Biliary Tract, & Pancreas Disorders; Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ (enero de 2018). «The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases». *Hepatology*. 67 (1): 328–357; Xue J, Sharma V, Hsieh MH, Chawla A, Murali R, Pandol SJ, Habtezion A. *Nat Commun*. 18 de mayo de 2015;6:7158.

Modos de administración

[00237] En algunas modalidades, la composición se administra por vía intravenosa al sistema circulatorio del sujeto. En algunas modalidades, la composición se infunde en un líquido adecuado y se administra en una vena del sujeto.

[00238] En algunas modalidades, la composición se administra por vía intraarterial al sistema circulatorio del sujeto. En algunas modalidades, la composición se infunde en un líquido adecuado y se administra en una arteria del sujeto.

[00239] En algunas modalidades, la composición se administra al sujeto por administración intratecal. En algunas modalidades, la composición se administra mediante una inyección en el canal espinal o en el espacio subaracnoideo para que llegue al líquido cefalorraquídeo (CSF).

[00240] En algunas modalidades, la composición se administra al sujeto por administración intranasal. En algunas modalidades, la composición puede insuflarse a través de la nariz en forma de administración tópica o administración sistémica. En ciertas modalidades, la composición se administra como aerosol nasal.

[00241] En algunas modalidades, la composición se administra al sujeto por administración intraperitoneal. En algunas modalidades, la composición se infunde en un líquido adecuado y se inyecta en el peritoneo del sujeto. En algunas modalidades, dicha administración intraperitoneal da como resultado la distribución de la composición (por ejemplo, las vesículas extracelulares en la composición) a los linfáticos. En algunas modalidades, dicha administración intraperitoneal da como resultado la distribución de la composición (por ejemplo, las vesículas extracelulares en la composición) al timo, bazo y/o médula ósea. En

algunas modalidades, dicha administración intraperitoneal da como resultado la distribución de la composición (por ejemplo, las vesículas extracelulares en la composición) a uno o más nódulos linfáticos. En algunas modalidades, dicha administración intraperitoneal da como resultado la distribución de la composición (por ejemplo, las vesículas extracelulares en la composición) a uno o más de nódulo linfático cervical, nódulo linfático inguinal, nódulo linfático mediastinal o nódulo linfático esternal. En algunas modalidades, dicha administración intraperitoneal da como resultado la distribución de la composición (por ejemplo, las vesículas extracelulares en la composición) al páncreas.

[00242] En algunas modalidades, la composición se administra al sujeto por administración periocular. En algunas modalidades, la composición se inyecta en los tejidos periorbitales. La administración periocular de fármacos incluye las vías de administración subconjuntival, subtoniana anterior, subtoniana posterior y retrobulbar.

[00243] En algunas modalidades, la composición se administra al mismo sujeto por múltiples vías de administración. En algunas modalidades, dichas múltiples vías de administración comprenden administración intravenosa, administración intraarterial, administración intratecal, administración intranasal, administración intraperitoneal y/o administración periocular. En una modalidad preferida, dichas múltiples vías de administración comprenden la administración intravenosa y la administración intraperitoneal.

[00244] En ciertas modalidades, la dosificación de las vesículas extracelulares está entre 1 ng y 10 ng, 10 ng y 100 ng, 100 ng y 1 µg, 1 µg y 5 µg, 5 µg y 10 µg, 10 µg y 50 µg, 50 µg y 75 µg, 75 µg y 100 µg, 100 µg y 150 µg, 150 µg y 200 µg, 200 µg y 300 µg, 300 µg y 500 µg, 500 µg y 1 mg o 1 mg y 10 mg.

[00245] Las composiciones pueden administrarse una vez al sujeto. Alternativamente, se pueden realizar múltiples administraciones durante un período de tiempo. Por ejemplo, se pueden dar dos, tres, cuatro, cinco o más administraciones al sujeto. En algunas modalidades, las administraciones se pueden administrar según sea necesario, por ejemplo, mientras persistan los síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o afección. En algunas modalidades, se pueden indicar administraciones repetidas durante el resto de la vida del sujeto. Los períodos de tratamiento pueden variar y pueden ser, por ejemplo, no más

de un año, seis meses, tres meses, dos meses, un mes, dos semanas, una semana, tres días, dos días o no más de un día.

[00246] En ciertas modalidades, las dosis de vesículas extracelulares se administran a intervalos tales como una vez al día, cada dos días, una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez al mes o dos veces al mes.

[00247] En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra a una frecuencia suficiente para aumentar efectivamente la concentración del componente inmunomodulador en la célula o tejido diana por encima de un nivel que está asociado con un síntoma de la enfermedad, trastorno o afección.

10 [00248] En algunas modalidades, las composiciones se administran al menos dos veces durante un período de tratamiento de manera que se trata la enfermedad, trastorno o afección, o se mejora un síntoma de esta. En algunas modalidades, las composiciones se administran al menos dos veces durante un período de tratamiento de manera que se trata la enfermedad, trastorno o afección, o se mejora un síntoma de esta. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un período de tratamiento de manera que se suministra una cantidad suficiente de componente inmunomodulador a la célula o tejido diana durante el período de tratamiento. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra un número suficiente de veces durante un período de tratamiento de manera que se suministra una cantidad suficiente de componente inmunomodulador a la célula o tejido diana durante el período de tratamiento de manera que uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o afección se prevenga, reduzca, mejore o retrase. En algunas modalidades, aumentar la concentración del componente inmunomodulador en la célula o tejido diana incluye aumentar la concentración máxima, mientras que en otras incluye aumentar la concentración promedio. En algunas modalidades, se puede determinar un aumento sustancial durante el período de tratamiento comparando un período de pretratamiento o postratamiento en el sujeto, o comparando mediciones realizadas en una población sometida a tratamiento con una población de control emparejada y no tratada.

[00249] En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra una cantidad suficiente de veces por período de tratamiento, de modo que la concentración del

componente inmunomodulador en la célula o tejido diana aumenta durante al menos aproximadamente una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más de seis meses. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra una cantidad suficiente de veces durante un período de tratamiento de manera que la concentración del componente inmunomodulador en la célula o tejido diana aumenta durante un período de tiempo al menos tan largo como el período de tratamiento.

[00250] En algunas modalidades, el intervalo de tiempo entre administraciones repetidas dentro de un período de tratamiento no es mayor que el período en el que el número de vesículas extracelulares en circulación se reduce a menos de aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la cantidad de vesículas extracelulares presentes en la composición farmacéutica administrada.

[00251] En algunas modalidades, los métodos de tratamiento comprenden además una o múltiples dosis de vesículas extracelulares no terapéuticas antes de la inyección de una dosis terapéutica adecuada de vesículas extracelulares que albergan un agente terapéutico. En ciertas modalidades, la vesícula extracelular no terapéutica se administra por separado y a una dosis diferente a la de las vesículas extracelulares terapéuticas. En ciertas modalidades, la dosificación de la vesícula extracelular no terapéutica es mayor que la dosificación de la vesícula extracelular terapéutica. En ciertas modalidades, la dosificación de la vesícula extracelular no terapéutica es menor que la dosificación de la vesícula extracelular terapéutica. En ciertas modalidades, la dosificación de la vesícula extracelular no terapéutica es igual que la dosificación de la vesícula extracelular terapéutica. En diversas modalidades, los métodos de vesículas extracelulares no terapéuticas antes de la inyección de una dosis adecuada de vesículas extracelulares terapéuticas reducen la actualización de las vesículas extracelulares terapéuticas en el hígado, pulmón y/o bazo. Véase la solicitud PCT de propiedad conjunta PCT/US2017/047794, incorporada en la presente como referencia a todos los efectos.

[00252] Se proporciona una cantidad eficaz de la composición basada, al menos en parte, en el tejido diana, el tipo de célula diana, los medios de administración, las características físicas

de la vesícula extracelular (p. ej., el tamaño y, en algunos casos, la extensión de las moléculas que se desea administrar) y otros determinantes. En general, una cantidad eficaz de la composición proporciona una respuesta celular eficiente de la célula diana. Se puede demostrar una mayor eficiencia mediante una mayor transfección celular (es decir, el porcentaje de células transfectadas con los constituyentes de las vesículas extracelulares), una mayor respuesta celular o una menor respuesta inmune innata del sujeto huésped.

[00253] La dosificación y la frecuencia de la administración de las vesículas extracelulares y las composiciones farmacéuticas de estas pueden determinarse, por ejemplo, por el médico tratante en función de diversos factores, como la gravedad de la enfermedad, la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier inflamación, el tiempo de administración y otros factores clínicos. En un ejemplo, se inicia una administración intravenosa a una dosis que es mínimamente eficaz y la dosis se incrementa durante un curso de tiempo preseleccionado hasta que se observa un efecto positivo. Posteriormente, los aumentos incrementales en la dosis se limitan a los niveles que producen un aumento correspondiente en el efecto, teniendo en cuenta los efectos adversos que pueden aparecer.

MODALIDADES ADICIONALES

[00254] Otros aspectos y modalidades se proporcionan en los siguientes artículos numerados.

1. Una vesícula extracelular que comprende una o más moléculas de ácido nucleico que inhibe al menos un gen y, por lo tanto, aumenta la polarización de macrófagos del fenotipo M2 al M1.
2. La vesícula extracelular de la modalidad 1, en donde la vesícula extracelular es un exosoma.
3. La vesícula extracelular de la modalidad 1 o 2, en donde el ácido nucleico es un ARN inhibidor.
4. La vesícula extracelular de cualquiera de las modalidades 1-3, en donde el ARN inhibidor es un ARN antisentido, siRNA, ShRNA, miRNA, un lncRNA o pre-miRNA.

5. La vesícula extracelular de cualquiera de las modalidades 1-4, en donde el al menos un gen se selecciona del grupo que consiste en:
KRAS, HRAS, NRAS, HIF1-alfa, HIF1-beta, Sp1, P300, LKB1, AMPK, STAT3, STAT6, n-MYC y c-MYC, HCAR1, A2AB, IDO, TDO, Arginasa, Glutaminasa y PKM2.
- 5 6. La vesícula extracelular de la modalidad 5, en donde el gen es KRAS.
7. La vesícula extracelular de la modalidad 6, en donde el ácido nucleico es un ARN inhibidor que se dirige a KRAS humano de tipo salvaje.
8. La vesícula extracelular de la modalidad 7, en donde el ARN inhibidor también se dirige a Kras^{G12D} de ratón.
- 10 9. La vesícula extracelular de cualquiera de las modalidades 1-8, en donde el macrófago es un macrófago residente del tumor.
10. La vesícula extracelular de modalidad 9, en donde el tumor es un tumor pancreático.
11. La vesícula extracelular de cualquiera de las modalidades 1-10, que comprende además un componente inmunomodulador adicional.
- 15 12. La vesícula extracelular de la modalidad 11, en donde el componente inmunomodulador adicional es un fármaco de molécula pequeña, un anticuerpo o una proteína terapéutica.
13. La vesícula extracelular de la modalidad 12, en donde el anticuerpo es un inhibidor del punto de control inmunitario.
- 20 14. Una composición farmacéutica que comprende la vesícula extracelular de cualquiera de las modalidades 1-13.
15. Un método para tratar una enfermedad en un paciente que lo necesita que comprende administrar la vesícula extracelular de cualquiera de las modalidades 1-13 o la composición farmacéutica de la modalidad 14 al paciente, tratando así la enfermedad en el paciente.
- 25 16. El método de la modalidad 15, en donde la enfermedad es un cáncer.
17. El método de la modalidad 15 o 16, en donde el paciente es humano.

18. El método de cualquiera de las modalidades 1-17, en donde el ácido nucleico es un ARN inhibidor que se dirige a un protooncogén.
19. El método de la modalidad 18, en donde el protooncogén es KRAS humano.
20. El método de la modalidad 19, en donde el cáncer es cáncer pancreático.
- 5 21. El método de cualquiera de las modalidades 15-20, que comprende además realizar al menos una segunda terapia.
22. El método de la modalidad 21, en donde la segunda terapia comprende una terapia quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, crioterapia, terapia hormonal o inmunoterapia.
- 10 23. La vesícula extracelular de cualquiera de las modalidades que anteceden, en donde el macrófago M2 es un macrófago asociado a tumores que se selecciona del grupo que consiste en un macrófago M2a, M2b y M2c.
- 15 24. La vesícula extracelular de cualquiera de las modalidades que anteceden, en donde el macrófago M1 exhibe una mayor secreción de citocinas y quimiocinas inflamatorias seleccionadas del grupo que consiste en INF γ , IL-12, IL-23, TNF α , IL-6, IL-1, CSCL9, CXCL10 y CXCL11 en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización.
- 20 25. La vesícula extracelular de cualquiera de las modalidades que anteceden, en donde el macrófago M1 exhibe una menor secreción de citocinas y quimiocinas inmunosupresoras seleccionadas del grupo que consiste en IL-10, TGF β , PGE $_2$, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 y CCL24 en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización.
- 25 26. La vesícula extracelular de cualquiera de las modalidades que anteceden, en donde el macrófago M1 expresa un mayor antígeno asociado al tumor en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización.
27. La vesícula extracelular de cualquiera de las modalidades que anteceden, en donde el macrófago M1 aumenta la estimulación de células T CD8 $^+$ y/o células asesinas naturales en comparación con el macrófago M2 antes de la polarización.
28. Un método para tratar el cáncer de páncreas en un sujeto que comprende: administrar al sujeto una vesícula extracelular que comprende un ARN inhibidor dirigido a KRAS de tipo salvaje humano; en donde el tratamiento aumenta el porcentaje de polarización de

macrófagos residentes en tumores del fenotipo M2 al M1 a un nivel mayor que el observado en un paciente tratado con un ARN inhibidor dirigido a KRAS^{G12D} humano.

EJEMPLOS

[00255] Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación completa y una descripción de cómo hacer y usar la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni están destinados a representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, *etc.*) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados Celsius y la presión es igual o cercana a la atmosférica. Se pueden usar abreviaturas estándar, por ejemplo, pb, par(es) de bases; kb, kilobase(s); pl, picolitro(s); s o seg, segundo(s); min, minuto(s); h o hr, hora(s); aa, aminoácido(s); nt, nucleótido(s) y similares.

[00256] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, *p. ej.*, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., adición actual); Sambrook, *et ál.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2a edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 21a edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2005); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3^a Ed. (Plenum Press) Vols A y B (1992).

Ejemplo 1: Inactivación de factores de transcripción en macrófagos M2

Métodos

Aislamiento de monocitos de PBMC:

- Se recibieron 50 ml de capa leucocitaria
 - Se pipetearon 15 ml de ficol en tubos SepMate STEMCELL de 50 ml
 - La capa leucocitaria se diluyó en PBS 2 mM EDTA, de modo que el volumen final fue ~250mL
- 5 • La muestra diluida de la capa leucocitaria se vertió en tubos Sepmate hasta que el volumen final del tubo fuera ~45-50 ml
- Los tubos se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos con freno en 1
 - Se aspiró plasma de los tubos centrifugados, y la capa leucocitaria se recogió con un pipetaid en un tubo cónico de 50 ml. Los tubos se llenaron de PBS/EDTA y se centrifugaron
- 10 para granular las células a 500 g durante 3 min.
- Si los glóbulos rojos estaban muy presentes, las células se volvieron a suspender en 10 ml de tampón de lisado ACK (ThermoFisher, n.º de catálogo A1049201) y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos (protocolo del fabricante). Los tubos se llenaron de PBS/EDTA y se centrifugaron a 500 g durante 3 minutos.
- 15 • Los tubos se centrifugaron 5 min a 400 xg y el sedimento se lavó con PBS EDTA una vez más y se volvieron a sedimentar
- El sedimento se volvió a suspender en tampón RoboSep (STEMCELL, catálogo n.º 20104) y las células se contaron usando un dilución 1:1 con azul tripán (Thermofisher) (~500 millones de PBMC producidos de una capa leucocitaria)
- 20 • Los monocitos CD14 + se aislaron usando el Kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep (STEMCELL, Catálogo n.º 19059RF), de acuerdo con el protocolo del fabricante (~10 % del total de células fueron aisladas como monocitos)
- Se sembraron 5 millones de monocitos en una placa en RPMI 10 % FBS 1 % Anti Anti+40 ng/ml M-CSF
- 25 *Diferenciación y polarización de macrófagos:*
(Adaptado de <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1165/rcmb.2015-0012OC>)

- Las células en placa se cultivaron en RPMI-1640 10 % FBS 1 % Anti Anti 1 % PenStrep + 40 ng/ml M-CSF (Biolegend) durante 5-6 días a 37 °C, 5 % CO₂. Se añadieron 5 ml de los mismos medios frescos el Día 1 y 3 después del colocarlos en placas. En el día 5, se agregaron las citocinas polarizantes de la siguiente manera (con 40 ng/ml MSCF; todas las citocinas agregadas en 20 ng/ml):
- M0: sin citocinas
- M2a: IL-4
- M2c: IL-10
- M2++: IL4, IL10, TGFb
- M1: IFN-g + LPS (100 ng/ml)
- TAM: 75 % de sobrenadante Panc-1
- Las células se incubaron con citocinas durante 24 horas.
- En el día 6, se aspiraron los medios, las células se lavaron con PBS y luego se añadieron 10 ml de PBS 5 mM EDTA (enfriado con hielo) por placa, y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos.
- Las células fueron raspadas suavemente de las placas y contadas.
- Luego se colocaron 50.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos en RPMI-1640 10 % FBS 1 % Anti Anti 1 % PenStrep + 40 ng/ml M-CSF (Biolegend) con las respectivas citocinas para diferentes poblaciones de macrófagos (véase arriba) durante 24 horas, después de lo cual se iniciaron los tratamientos.

Purificación de exosomas:

[00257] Se recogieron exosomas del sobrenadante de cultivos en suspensión de alta densidad de células HEK293 SF después de 9 días. El sobrenadante se filtró y fraccionó por cromatografía de intercambio aniónico y se eluyó en un gradiente escalonado de cloruro de sodio. La fracción pico con la concentración de proteína más alta contenía exosomas y

componentes celulares contaminantes. La fracción pico se aisló y se fraccionó adicionalmente en un Optiprep™ (60 % de yodixanol p/v) gradiente de densidad por ultracentrifugación.

[00258] La fracción de exosoma se concentró por ultracentrifugación en un tubo Ultra-Clear (344058) de 38,5 mL para un rotor SW 32 Ti a 133,900 x g durante 3 horas a 4 ° C. El material granulado se volvió a suspender en 1 mL de PBS y 3 mL de Optiprep™, llevando la concentración final de yodixanol al 45 %. Para el gradiente Optiprep™, se preparó un gradiente estéril de 4 niveles con 4 mL de yodixanol al 45 % que contenía el material resuspendido, 3 mL de yodixanol al 30 %, 2 mL de yodixanol al 22,5 %, 2 mL de yodixanol al 17,5 % y 1 mL de PBS en un tubo Ultra-clear de 12 mL (344059) para un rotor SW 41 Ti. El gradiente Optiprep™ se ultracentrifugó a 150.000 x g durante 16 horas a 4 ° C para separar la fracción de exosoma. La ultracentrifugación dio como resultado una fracción superior que se sabe que contiene exosomas, una fracción media que contiene desechos celulares de densidad moderada y una fracción inferior que contiene agregados de alta densidad y desechos celulares. Luego la capa de exosoma se recogió suavemente de los ~3 mL superiores del tubo.

[00259] La fracción de exosoma se diluyó en ~32 mL de PBS en un tubo Ultra Clear (344058) de 38,5 mL y se ultracentrifugó a 133,900 x g durante 3 horas a 4 °C para sedimentar los exosomas purificados. Luego los exosomas granulados se volvieron a suspender en un volumen mínimo de PBS (~200 µL) y se almacenaron a 4 °C.

20

[00260] Muchos tumores sólidos se caracterizan por un infiltrado celular rico en mieloides, que a menudo comprende macrófagos asociados a tumores, caracterizados por tener un fenotipo activado de manera alternativa o M2. Los macrófagos M2 expresan altos niveles de STAT3 y STAT6 fosforilados, que promueven la expresión de la enzima metabólica Arginasa (Arg1). Para demostrar que la inactivación de genes M2 críticos altera el fenotipo M2 de los macrófagos diferenciados *in vitro*, los macrófagos RAW264.7 murinos se polarizaron a un estado M2 como se describió anteriormente. Los macrófagos polarizados cultivados se transfectaron con cantidades crecientes de siRNA dirigido a STAT3, STAT6, CEBPβ-1, CEBPβ-2, Pi3Kγ o KRAS (12,5 nM, 25 nM, 50 nM y 100 nM). Cada uno de los genes fue reprimido de una manera dependiente de la dosis (Figura 1), y la inactivación de cada gen M2

30

condujo a la reducción concomitante de Arg1 (Figura 2), lo que demuestra que el fenotipo M2 podría ser alterado al reducir la expresión de reguladores anteriores.

Ejemplo 2: Captación diferencial de exosomas por subtipos de macrófagos

- [00261] Los subtipos de macrófagos se caracterizan por alteraciones en la actividad metabólica y otras actividades fenotípicas. Para comprender si ciertos subtipos de macrófagos captan preferentemente exosomas, seis subpoblaciones de macrófagos (M0, M1, M2a, M2c, M2++ y TAM) se incubaron con niveles crecientes de exosomas derivados de HEK293SF diseñados para expresar GFP luminal. La captación de exosomas se determinó midiendo la intensidad de GFP celular total durante 36 horas en un sistema de análisis de células vivas IncuCyte® (Essen Bioscience). Como se muestra en la Figura 3, si bien todos los subtipos de macrófagos mostraron captación de exosomas, los macrófagos M0 fueron los menos eficientes para captar exosomas, mientras que los macrófagos M2++ fueron sustancialmente más eficientes para absorber exosomas en comparación con otros subtipos de macrófagos.
- [00262] Dado que los macrófagos M2 son eficientes para captar exosomas, investigamos si los exosomas cargados con ASO serían más eficientes para dirigirse a dianas de macrófagos intracelulares (por ejemplo, más eficientes para inactivar la expresión del gen diana y las moléculas efectoras posterior dentro de la vía de señalización del gen) que los ASO solos. Se generaron ASO de ADN/ARN de cadena simple, 2'-metoxietil (MOE), dirigidos a STAT3 y portadores de un marcador fluorescente Cy5 y un conector de colesterol 5'. Los exosomas de HEK293SF se mezclaron con los ASO fluorescentes marcados con colesterol, y los ASO libres se eliminaron por ultracentrifugación y la eliminación del sobrenadante que contenía ASO. Los macrófagos M2 y M0 se sembraron en placas a igual densidad y se incubaron con concentraciones coincidentes de ASO libres o exosomas cargados de ASO (Exo-ASO), medidos por la intensidad de fluorescencia total. La fluorescencia celular total se midió durante 48 horas y se cuantificó usando un sistema de análisis en vivo de células IncuCyte®. Como se muestra en la Figura 4, los macrófagos M2 captaron más fácilmente los ASO libres y Exo-ASO en comparación con los macrófagos M0. Curiosamente, los macrófagos M0 y M2

absorbieron Exo-ASO de manera más eficiente, lo que sugiere que la entrega de ASO a los macrófagos M2 puede mejorarse mediante la carga en los exosomas.

[00263] Para determinar si los macrófagos absorbieron diferencialmente exosomas o Exo-ASO en comparación con otros tipos de células *in vivo*, se administró a ratones no tratados previamente, por vía intraperitoneal cualquiera de 1×10^{11} o 1×10^{12} exosomas que contienen GFP. Una hora después de la inyección, se aislaron las células peritoneales totales y se caracterizaron por citometría de flujo para la positividad de GFP entre diferentes subconjuntos de células inmunes, es decir, células B, células dendríticas, neutrófilos, células asesinas naturales (NK), células T y macrófagos. Como se muestra en la Figura 5A, a ambas dosis, los macrófagos fueron el tipo celular predominante para captar exosomas fluorescentes. Para determinar si esta diferencia se produjo en un contexto de enfermedad, los ratones con tumor B16F10 se inyectaron con una dosis única de Exo-ASO marcado con Cy5 o exosomas nativos sin marcar. Los tumores inyectados se aislaron, disociaron y midieron por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 5B, los macrófagos captaron Exo-ASO mucho más fácilmente que las células tumorales (señal general de Cy5 ~100 veces mayor), lo que sugiere que la administración de Exo-ASO puede alcanzar poblaciones de macrófagos en varias mezclas celulares complejas. Además, la captación preferencial de Exo-ASO por los macrófagos en comparación con los otros tipos de células probadas (células B, células dendríticas, neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y células T) permite métodos de suministro de ASO dirigidos a las células de macrófagos, que comprende administrar una composición Exo-ASO a un sujeto, en donde la composición administrada es captada preferentemente por los macrófagos presentes en el sujeto (en comparación con la captación por otros subconjuntos de células inmunes, por ejemplo, células B, células dendríticas, neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y células T). Esta especificidad de macrófagos mejorada de la composición Exo-ASO mejora la seguridad de la composición administrada al reducir los efectos en las células fuera del objetivo.

Ejemplo 3: La entrega mediada por exosomas de oligos antisentido desregula potencialmente las redes transcripcionales de macrófagos y altera la polarización

[00264] Los experimentos anteriores sugieren que la administración de ASO mediada por exosomas puede ser un método eficaz para alterar los patrones de expresión génica de macrófagos. Exosomas derivados de HEK293SF purificados de acuerdo con los métodos que anteceden se cargaron con uno de cinco ASO diferentes marcados con colesterol dirigidos a STAT3 (4.1, química de MOE de cadena doble; 5.1 y 5.2, química de O-metilo de cadena simple; 5.3 y 5.4, química de MOE de cadena simple). Las secuencias de ASO se muestran en la Tabla 0. Células RAW264.7 murinas polarizadas M2 se incubaron con ASO libre marcado con colesterol 5 μ M o 1×10^5 o 1×10^6 exosomas cargados con el ASO marcado con colesterol. Los niveles de transcripción de STAT3 se midieron 24 horas después del tratamiento, revelando una inactivación comparable o superior de STAT3 con el tratamiento con Exo-ASO en comparación con ASO libre. Los exosomas no modificados incubados con los macrófagos polarizados no tuvieron impacto en la expresión de STAT3 (Figura 6). Para examinar las dianas posteriores de STAT3, se midieron los niveles de transcripción de ARG1 48 horas después del tratamiento. Como se muestra en la Figura 7, la inactivación de STAT3 con ASO libre o Exo-ASO condujo a una fuerte represión de Arg1, en varios casos en más del 90 % (Figura 7). Las células RAW264.7 polarizadas con M2 se incubaron con ASO o Exo-ASO alto (4 μ M) y bajo (0,4 μ M) para STAT3, KRAS y C/EBP β . Como se muestra en las Figuras 8A-C, las muestras de Exo-ASO fueron igual (STAT3) o más potentes (KRAS, C/EBP β) en todas las dosis probadas (Figuras 8A-C). Las secuencias de ASO se muestran en la Tabla 0.

[00265] Este resultado demuestra que Exo-ASO es un potente modulador de las redes de expresión de macrófagos, y puede proporcionar una modalidad superior y diferenciada, en comparación con la administración de ASO libre para diversas aplicaciones terapéuticas. Uno de estos métodos de modulación de la expresión génica en un macrófago, que comprende administrar a un sujeto un Exo-ASO, en donde dicho ASO está dirigido al gen, y en donde la modulación es igual o mayor que la modulación producida por la administración de una cantidad equimolar de ASO libre dirigido al gen. Otra modalidad comprende un método para inhibir la expresión génica en un macrófago, que comprende administrar a un sujeto un Exo-

ASO, en donde dicho ASO está dirigido al gen, y en donde la inhibición es igual o mayor que la inhibición producida por la administración de una cantidad equimolar de ASO libre dirigido al gen. Otra modalidad comprende un método para reprimir una diana posterior de un gen en un macrófago, que comprende administrar a un sujeto un Exo-ASO, en donde dicho ASO está dirigido al gen, y en donde la represión es igual o mayor que la represión producida por la administración de una cantidad equimolar de ASO libre dirigido al gen. Aún otra modalidad comprende un método para alterar la polarización de una población de macrófagos, que comprende administrar a un sujeto un Exo-ASO, en donde dicho ASO está dirigido a un gen expresado en los macrófagos y en donde la alteración de la polarización es igual o mayor que la alteración de la polarización producida por la administración de una cantidad equimolar de ASO libre dirigido al gen. En algunas de estas modalidades, la alteración en la polarización puede ser un cambio de un fenotipo M2 a uno M1.

[00266] Para probar el papel de Exo-ASO en células humanas, los macrófagos humanos primarios se polarizaron a un fenotipo M2 y se trataron con dosis variables de un STAT3 ASO libre o STAT3 Exo-ASO. Usando macrófagos de tres donantes humanos separados, Exo-ASO fue consistentemente más potente en reprimir los niveles de transcripción de STAT3 24 horas después del tratamiento (Figura 9A). El marcador humano posterior de la polarización de M2, CD163, también fue modulado de manera más drástica por Exo-ASO en comparación con ASO libre (Figura 9B). Los macrófagos M2 humanos también fueron tratados con ASO libre de 4 μ M o Exo-ASO para HIF1 α , Pi3Ky, CEBP/ β , STAT6 y STAT3. Como se muestra en la Figura 10, todos los grupos de tratamiento resultaron en la represión del gen diana, pero en todos los casos Exo-ASO fue más potente que el tratamiento con ASO libre. Es importante destacar que la inactivación de Exo-ASO de cualquiera de las dianas de macrófagos condujo a una reducción sólida en la expresión de CD163 (Figura 11), lo que demuestra que la entrega de ASO mediada por exosomas interrumpe de forma potente y reproducible redes importantes de señalización de macrófagos.

[00267] Una consecuencia funcional de la polarización de macrófagos M2 es una reducción de las citocinas proinflamatorias, que contribuyen a un microambiente pro tumorigénico. La conversión de macrófagos del fenotipo M2 al M1 debería, por lo tanto, dar como resultado una señalización proinflamatoria mejorada. La conversión de los macrófagos M2 al estado M1

puede ser inducida por LPS, lo que conduce a la inducción de citocinas que incluyen IL-12 e IL-23. STAT3 es un regulador negativo de esta red de expresión de citocinas y, por lo tanto, se probó si la inhibición de STAT3 en presencia de LPS puede mejorar aún más la producción de citocinas proinflamatorias. Los macrófagos humanos polarizados con M2 se trataron con STAT3 ASO libre de 4 μ M, Exo-ASO STAT3 4 μ M, Exo-ASO entremezclado 4 μ M, exosomas nativos o C188-9, un inhibidor de molécula pequeña de STAT3. 24 horas después, el medio se intercambió por medio que contenía 10 ng/ml de LPS y el sobrenadante se aisló 24 horas después. Como se muestra en la Figura 12, LPS indujo la secreción de IL-12 e IL-23 (grupo de LPS 10 ng/ml vs. grupo sin LPS). El tratamiento con STAT3 Exo-ASO pero no STAT3 ASO libre mejoró aún más la expresión de cada citocina, lo que sugiere que Exo-ASO puede conducir de manera más potente a la promoción de un fenotipo M1 en respuesta a señales inmunomoduladoras relevantes.

[00268] La desregulación de STAT3, STAT6 y las otras vías moduladoras de macrófagos conduce a grandes cambios en los patrones de expresión génica. Para comprender el impacto global diferenciado del tratamiento con Exo-ASO, el análisis de mRNA de NanoString se llevó a cabo en macrófagos M2 humanos en su estado estacionario y en respuesta al tratamiento con exosomas no modificados (solo EV), y ASO y Exo-ASO coincidentes con la concentración. Los recuentos de mRNA normalizados utilizando el Panel de inmunidad mieloide humana innata nCounter[®] demostraron que las transcripciones de STAT3 se redujeron después del tratamiento con ASO libre y Exo-ASO (Figura 13A). Los marcadores posteriores CD163 (Figura 13D), TGF β (Figura 13C) y STAT6 (Figura 13D) se regularon todos a la baja después del tratamiento con ASO.

[00269] La represión sólida de TGF β (<85 %) es un regulador crítico de la polarización de macrófagos M2, (Yang y Zhang Journal of Hematology & Oncology (2017) 10:58). Examinamos el impacto del tratamiento con exo-ASO de STAT3, STAT6 y CEBP/ β en la expresión de TGF β . Los macrófagos polarizados con M2 humano se trataron con exosomas cargados con ASO contra STAT3 (química de MOE y LNA), STAT6 (química de MOE) y CEBP/ β (química de MOE). En todos los casos, los niveles de TGF β se redujeron drásticamente después del tratamiento con niveles submicromolares de ASO (Figura 14). Estos resultados demuestran que el suministro de ASO mediado por exosomas contra

5 numerosos reguladores de polarización de macrófagos puede conducir a una desregulación sólida y estable de los programas celulares que pueden tener un impacto en el tratamiento de numerosos tipos de cáncer. Es importante destacar que cada una de las dianas de macrófagos, incluido el novedoso reconocimiento de KRAS como regulador de este proceso, se han caracterizado como dianas «no administrables», en el sentido de que su papel en la enfermedad y otros procesos celulares es bien reconocido, pero un tratamiento seguro y efectivo ha eludido los enfoques clásicos del desarrollo de fármacos.

10 **Ejemplo 4: La inhibición de KRAS de tipo salvaje conduce a una mayor polarización de macrófagos y a un tamaño tumoral reducido in vivo en un modelo ortotópico de ratón de cáncer pancreático.**

Métodos:

15 [00270] *Producción y aislamiento de exosomas de KRAS*: Los métodos de electroporación se utilizan para insertar construcciones de siRNA de KRAS en exosomas sin dañar de forma funcional los exosomas. Los exosomas se aíslan de células de suspensión 293SF de riñón embrionario humano (HEK) cultivadas en medio químicamente definido utilizando métodos de ultracentrifugación establecidos (Kahlert *et ál.*, 2014). La pureza y la homogeneidad (partículas de 80-150 nm de diámetro) de los exosomas se validan mediante mediciones de Nanosight™, microscopía electrónica de transmisión y etiquetado de inmunogold CD9. La ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y qPCR también se realizan para validar la presencia y abundancia del siRNA de KRAS. También se generan exosomas que contienen siRNA entremezclado.

25 [00271] *Estrategias de RNAi*. La secuencia de siRNA de KRAS dirigida contra KRAS de tipo salvaje de ratón comprende un saliente de nucleótido TT para promover la eficacia del silenciamiento. El RNAi también está marcado con un fluoróforo Alexa Fluor® 647 en el extremo 3' en la hebra sentido para rastrear su entrega.

[00272] *Ratones e imágenes*. Ratones nu/nu atímicos hembra (Charles Rivers) de entre 4 y 6 semanas de edad se alojan en jaulas ventiladas individualmente en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h a 21-23 °C y 40 %-60 % de humedad. Los ratones tienen libre acceso a una dieta

irradiada y agua esterilizada. Bajo anestesia general, se inyectan células tumorigénicas páncreas humano Panc-1 (Kras^{asp12} (Rejiba *et ál.*, 2007; Sun *et ál.*, 2001)) o células BXPC-3 (10^6 , resuspendidas en 10 μ l de PBS) en la cola del páncreas con una jeringa de calibre 27. Para los análisis de tamaño/volumen tumoral ortotópico, se usa Living Image versión 4.4 (Caliper Life Sciences) para cuantificar todos los cálculos tumorales. Se define una región circular de interés (ROI) alrededor del páncreas y el tumor se define y se establece como estándar para comparar todas las imágenes dentro del mismo grupo experimental. Además, las condiciones de exposición (tiempo, apertura, posición de la etapa, clasificación) se mantienen idénticas para todas las mediciones en todos los grupos experimentales.

Mediciones tumorales posteriores ($\text{p/seg/cm}^2/\text{sr}$) luego se obtienen en las mismas condiciones para todos los grupos experimentales. Se toman imágenes de los ratones regularmente y se dividen al azar en grupos para tratamientos. Los ratones reciben 2×10^8 exosomas i.p. en 100 μ l de volumen de PBS cada dos días. Los exosomas se electroporan con 2 μ g de siRNA y se lavan con PBS antes de la inyección.

[00273] *Histología, histopatología e inmunohistoquímica.* Los tejidos se fijan en formalina y se procesan para inclusión en parafina. Secciones de tejido de 5 μ m de espesor se cortan y tiñen para hematoxilina y eosina (HyE) y el tricromo de Masson (MTS) (Leica). Para puntuación histopatológica, los portaobjetos teñidos con HyE se puntuaron en función de las etapas morfológicas del cáncer de páncreas: neoplasia intraepitelial pancreática normal (PaNIN) y adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC). Para cada sección de tejido, los expertos en histología del páncreas obtienen manualmente y en ciego una puntuación porcentual para cada una de las tres etapas (Normal, PaNIN, PDAC), que luego se promedió para dar una puntuación general de 100 para cada cohorte. Luego se toma un promedio de estos puntajes porcentuales para cada ratón en las cohortes respectivas. Las secciones de tejido tumoral también se tiñen para macrófagos (con marcadores pan-macrófagos (por ejemplo, anticuerpo F4/80 y/o marcadores celulares específicos M2 y M1 para la detección de macrófagos residentes en tumores).

[00274] *Ensayos para la caracterización del fenotipo de macrófagos.* Se recogen muestras de sangre y muestras de tumores de ratones. Los macrófagos se aíslan y tiñen para análisis de marcadores M1 y M2 mediante citometría de flujo. Los macrófagos se tiñen para marcadores

pan-macrófagos, así como marcadores de superficie celular de fenotipo M2 (por ejemplo, YM1, FIZZ1, Dectina-1 y/o MGL) y marcadores de superficie celular de fenotipo M1. Luego los macrófagos M2 y M1 se cuentan y clasifican para análisis adicionales, como PCR cuantitativa para detectar citocinas. y/o expresión de miRNA de miRNA asociados con el fenotipo M1 y/o M2).

[00275] Los resultados de los experimentos de xenoinjerto y los análisis de volumen de tumores ortotópicos confirman que los exosomas que comprenden siRNA de tipo salvaje KRAS reducen de manera eficaz el tamaño de los tumores pancreáticos y aumentan la cantidad de macrófagos asociados al tumor de fenotipo M1 en comparación con los exosomas que albergan un siRNA entremezclado, lo que indica que la administración de exosomas que comprenden ARN inhibidor dirigido contra KRAS de tipo salvaje humano es eficaz para el tratamiento del cáncer.

TABLAS

Tabla 0. Secuencias de oligonucleótidos antisentido (ASO)		
Diana	Secuencia	SEQ ID NO:
Stat3	TAAGCTGATAATTCAACTCA	SEQ ID NO:1
Stat6	TGAGCGAATGGACAGGTCTT	SEQ ID NO:2
CebpB	TGGATTTAAAGGCAGGCGGC	SEQ ID NO:3
Pi3Ky	TTGGGTAAAGTCGTGCAGCA	SEQ ID NO:4
HIF1- α	GTGCAGTATTGTAGCCAGGC	SEQ ID NO:5
Kras	GTAGCATGTAAATATAGCCC	SEQ ID NO:6
Todos los oligonucleótidos antisentido tienen un enlace fosforotioato entre cada nucleótido		

Tabla 1. Lípidos exosómicos	
Ácido lisobisfosfatídico	Gangliósido GM3 24:1
Esfingomielina (SM)	Gangliósido GM3 16:0
Gangliósido GM3	PE40:5
Fosfatidilserina (PS)	PE40:6
Fosfatidilinositol (PI)	PE38:3
Fosfatidilcolina (PC)	PE38:4
Fosfatidiletanolamina (PE)	PE36:1
Lisofosfatidilcolina (LPC)	PE36:2
Colesterol (col)	PE34:1
Diacilglicerol (DG)	PE34:2
PI18:0/20:3	PE-éter38:5
PI18:0/20:4	PE-éter38:6
PI18:0/18:1	PE-éter34:1
PI18:1/18:1	PE-éter34:2
PI18:0/16:0	PC34:1

PA18:0/18:1	PC36:4
PS18:0/18:1	PC34:3
BMP18:0/18:1	PC32:0
BMP18:1/18:1	PC30:0
BMP18:1/16:0	SM24:1
CL(18:1)3/16:1	SM16:0
CL(18:1)2/(16:1)2	Dihidroesfingomielina16:0

Tabla 2. Polipéptidos exosómicos

ACLY	TCP1	ACTR1A	LY75
ACTB	PRDX2	THOC4	ABCC1
ACTG1	TSPAN6	INADL	MYO1E
ALB	CCT3	CTDSPL	NACA
ALDOA	TSTA3	ZMPSTE24	NAP1L4
ALDOB	TUBA3C	DNAJA2	NCL
AKR1B1	HIST1H2AK	NDRG1	NEDD8
AMBP	HIST1H2AJ	RAPGEF3	YBX1
ANPEP	HIST1H2AB	SPON2	PA2G4
ANXA2	HIST2H2AC	UBAC1	PECAM1
ANXA3	IFITM1	N4BP2L2	PFAS
ANXA4	PDXK	CAP1	SERPINB9
ANXA5	LIN7A	VAT1	PI4KA
ANXA6	BUB3	NEBL	PLAT
ANXA7	MAP4K4	DCTN2	PLCG2
ANXA11	EDIL3	ARPC1A	PPA1
	ATP6AP2	C6orf108	PPP2CA
CAPZB	PSME3	SMC2	PRKCB
CD63	TUBB3	AHSA1	PSMA6
CD81	IFITM3	STAMBP	PSMA7

CKB	ACAA2	PMVK	PSMB8
CLU	CCT7	GIPC1	PSMB9
CLIC1	CCT4	HBS1L	PSMD7
TPP1	IFITM2	NCKAP1	PSME1
CLTC	GNA13	ALDH1L1	PTPRA
CNP	RUVBL2	FTCD	RAC2
COL6A1	PRSS23	FGL2	RPL3
CR1	ACOT7	CFHR3	RPL4
CTNND1	CCT5	MMP24	RPL5
ACE	DIP2C	COPS8	RPL11
DDT	ASCC3L1	CKAP4	RPL22
DEFA1	TNIK	C10orf116	RPL24
DEFA3	NEDD4L	SLC27A2	RPL27
DNAH8	NCSTN	MID2	RPL30
DPEP1	TSPAN15	KIF3A	RPL28
DPP4	PLXNB2	NUDT5	RPL31
EEF1A1	SDCBP2	TREH	RPL34
EEF2	IGKV1-5	CEP250	RPL35A
EGF	IGHV4-31	PDCD10	RPL37A
EIF5A	IGKV3-20	PADI2	RPS2
ENO1	IGKV2-24	PACSIN2	RPS3A
ENO3	MINK1	CHP	RPS5
ENPEP	IGK α	SNF8	RPS9
STOM	VPS36	DDX19B	RPS19
EPS8	DERA	SCN11A	RPS25
FABP3	GOLGA7	LYPLA2	RPS26
FGA	KRT76	PARK7	RPS28
MLANA	EIF3EIP	COBLL1	RPS29
FN1	LSR	CNKSRR2	RSU1
FTL	TUBA8	ENPP4	SARS

FUS	RAB4B	RAB3GAP1	SLAMF1
GAA	SETD4	AKR7A3	SLC1A4
GAPDH	TOLLIP	SPEN	SLC2A3
GDI2	PLEKHB2	GANAB	SNRPD2
GGT1	VPS37C	MGRN1	SPINK1
GLB1	LIN7C	CUX2	SPN
GLG1	H2AFJ	DNAJC13	STK10
GNA11	CAND1	ZCCHC11	STXBP3
GNAI1	PLSCR3	PHF15	TALDO1
GNAI2	KIAA1199	KIAA0841	TNFAIP3
GNAI3	GNB4	ARHGEF12	TPM3
GNAS	MYH14	COTL1	TPM4
GNB1	TSPAN14	ANGPTL2	TYK2
GNB2	NCALD	DDAH2	VIM
GNG7	REG4	HEBP2	WARS
SFN	VPS25	CD2AP	WAS
GPI	TUBB6	PLD3	LAT2
GSTA1	TUBA1C	TMEM2	HIST1H2BL
GSTA2	TNKS1BP1	SH3BP4	STX7
GSTA3	FAM125B	BHMT2	CPNE1
GSTM3	LRSAM1	GCA	RPL14
GSTP1	HIST3H2A	MXRA5	PDCD5
GUSB	TUBA3E	AHCTF1	SYNGR2
HIST1H2AD	TUBA3D	PTPN23	RPL23
HLA-A	DCD	DAK	RAB9A
HLA-B	HIST4H4	ACOT11	IGSF2
HLA-DQB1	ALDH16A1	APPL1	EEF1E1
HLA-DRA	RPS4Y2	PHGDH	SCAMP2
HLA-DRB1	MYL6B	TIAM2	SCAMP3
HLA-DRB5	BRI3BP	KCNG2	DPP3

HPGD	AGR3	CYFIP2	ARPC1B
HRAS	EEF1AL3	GHITM	PDIA6
HSPA1A	KRT28	C11orf54	WASF2
HSPA1B	KRT24	DBNL	ANP32B
HSPA8	tipo RPLP0	ATAD2	PAICS
HSP90AA1	RPSAP15	PHPT1	AHCYL1
	RANP1	C16orf80	VAMP5
KRT1	PCSK9	OLA1	41891
KRT9	METRNL	ZDHHC1	HSPH1
KRT10	LOC284889	SNX12	SUB1
LDHA	KRT6C	PSAT1	CDC37
LDHB	KRT79	NT5C	CORO1A
TACSTD1	RAB43	EHD2	CD300A
MCAM	KRT27	TAX1BP3	TMC6
MDH1	ACTBL2	CRNN	RFTN1
MEP1A	RP11-631M21.2	NOX3	SCRIB
MSN	TUBB2B	ATP6V0A4	SERBP1
2-Sep	KRT77	ITSN2	TTLL3
PGAM1	AGRN	GEMIN4	CACYBP
PGK1	RAB15	LAP3	SIT1
PKM2	LOC388524	CRYL1	SLC43A3
PPP1CA	LOC388720	MYO15A	PILRA
	HSP90AB2P	ATP6V1D	RPL26L1
PTPRC	ACTBL3	SNX9	MPP6
RAN	LOC442497	PCYOX1	GNG2
RDX	A26C1A	ANKFY1	TMED9
SDCBP	HIST2H4B	UFC1	DOCK10
STX3	hCG_1757335	FAM49B	C3orf10
STXBP1	HLA-A29.1	CUTA	MYO1G
STXBP2	LOC653269	ATP6V1H	FLJ21438

TPI1	A26C1B	VPS24	SLC38A1
EZR	LOC100128936	CMPK1	FERMT3
YWHAE	LOC100130553	UPB1	ITFG3
TUBA1A	LOC100133382	CLIC5	HIST1H2AH
WDR1	LOC100133739	MUPCDH	SLAMF6
PDCD6IP	AP2A2	CLIC6	TMC8
GPA33	ALDH3B1	SIAE	LOC153364
TUBA1B	FASLG	CPVL	SVIP
TUBB2C	ATP4A	RHOF	TMEM189- UBE2V1
CAPN7	CAPS	ARL15	hCG_16001
DDAH1	COL12A1	ZNHIT6	FABP5L7
PGLS	DMBT1	GIPC2	Del(X)1Brd
SAMM50	DSP	PCDH24	ABP1
CLIC4	EGFR	VPS13C	ACTN3
CHMP2B	EPHA5	CC2D1A	AFM
ULK3	EPHB1	EPS8L1	AKT1
RNF11	FAT	C10orf18	ALDH3A2
VPS4A	HSD17B4	CHCHD3	ALOX12P2
ARFIP1	L1CAM	C2orf18	ANXA2P1
CHMP2A	LAMA5	C17orf80	KRT33B
SMPDL3B	MUC4	EPN3	MYOC
PACSIN3	NOTCH1	UACA	SERPINE1
EHD4	PPP2R1B	VPS13D	PIK3CA
EHD3	PTPRF	APPL2	NRP1
HEBP1	SORT1	ARL8B	SPRY1
VPS28	SERPINB3	DDX19A	EMILIN1
DCXR	SELP	NAGK	LRG1
RHCG	FSCN1	ITLN1	AZGP1P1
CHMP5	TGFB1	CCDC132	LOC728533

VT A1	CLTCL1	OTUB1	ALDH7A1
RAB14	CHST1	CDK5RAP2	AXL
GPRC5B	EIF3I	MBD5	CFB
CAB39	TNFSF10	SLC22A11	C1S
RAB8B	MAP7	SUSD2	CAT
TM7SF3	COPB2	SUCNR1	CD47
MXRA8	HEPH	BDH2	CD151
C11orf59		NIT2	CDH13
MOBKL1B	CIB1	RPL23AP13	CFTR
UEVLD	SLC34A2	FAM20C	CEACAM8
TSNAXIP1	SLC6A14	SLC12A9	AP1S1
GPRC5C	DIP2A	RAB25	CLTA
GNG12	TNPO3	SMURF1	CNGB1
BAIAP2L1	FER1L3	TMEM27	COL1A1
MUC13	CNTLN	RAB22A	COL1A2
CHMP1B	TUBB4Q	NDRG3	COL2A1
SLC44A2	KIF15	ERMN	COL3A1
CPNE5	SERINC1	TAOK1	COL4A1
TMBIM1	PDIA2	KIAA1529	COL4A2
EPS8L3	EPS8L2	RNF213	COL4A3
MMRN2	PLVAP	WIZ	COL5A1
TTYH3	MYADM	ACE2	COL5A2
SLC44A4	MUC16	PLEKHA1	COL7A1
RAB1B	KRT25	SCPEP1	COMP
RAB33B	SERINC5	AASDHPPT	CPS1
RBP5	LOC440264	FIGNL1	CSF1
C5orf32	AGT	PBLD	VCAN
ABHD14B	ALPP	KIF9	SLC25A10
MOBKL1A	APOA2	LEPRE1	CTBP2
ARRDC1	APOB	RAB17	CTNNA2

	APOE	IKZF5	DCTN1
FAM125A	SERPING1	MMP25	DECR1
SNX18	C1QB	MPP5	DNASE1L1
CHMP4B	C1R	TEKT3	ENG
MITD1	C4A	ALDH8A1	STX2
S100A16	C4B	SLC13A3	ETFB
CPNE8	C4BPA	DUSP26	F2R
C1orf58	C4BPB	GGCT	F8
GLIPR2	CD5L	TMEM38A	ACSL1
TUBB	FCN1	C1orf116	FAP
ATP6V1C2	FCN2	GDPD3	FBLN1
FTLL1	FGB	OR2A4	FBN1
PEF1	FGG	FAM65A	FBN2
SERPINA3	GRIN1	NARG1L	FEN1
ACP2	MSH6	CHMP6	FLT1
ACPP	HBA1	DYNC2H1	FUCA2
ACTA2	HBA2	PRKRIP1	GAS6
ACTC1	ITGA2B	GSTCD	GDI1
ACTG2	PPARG	PIP4K2C	GLDC
ACY1	PDLIM7	CYBRD1	GNAL
APCS	CD274	FUZ	GRM2
ÁPOD	A1BG	ARMC9	GRM3
APRT	ACAT1	NAT13	GRM7
AQP1	ACO1	COASY	GSTM1
AQP2	ADCY1	UBXN6	GSTM5
ARF1	ADFP	COL18A1	H2AFX
ARF3	ADH5	BHLHB9	HBE1
ARF4	ADH6	WNT5B	HMGCS2
ARF5	PARP4	CAB39L	TNC
ARF6	AHSG	ITM2C	IDH3B

RHOA	AK1	LOC81691	IFRD1
ARL3	ALAD	AMN	ITGA5
ASAH1	ALCAM	SH3BGRL3	ITGB5
ASS1	ALDH2	C9orf58	ITPR2
FXVD2	ALDH9A1	BCL2L12	KRT84
BHMT	ALDOC	RAB34	LAMB1
BST2	ALK	TBC1D10A	LCN1
C3	ALOX12	GPR98	LGALS8
CA2	ALPL	HDHD2	LMNA
CA4	ANXA13	ARL6	LOXL2
CALB1	AOX1	IQCG	LTBP2
CALR	APAF1	C2orf16	MAP1A
CD9	APOA4	PARD6B	MAT1A
CD59	SHROOM2	TXNDC17	MC1R
HSPA5	RHOB	ABCC11	MCC
HSPA6	ARHGAP1	FAM40A	ME1
HSP90AB1	ARHGDIB	SCIN	MECP2
HSPD1	ARSE	SCRN2	MAP3K1
IDH1	ARSF	ZNF486	MFAP4
KNG1	ASL	ACY3	SCGB2A1
KRAS	ASNA1	C11orf52	ALDH6A1
LAMP1	ATIC	CRB3	MOS
LGALS3BP	ATP6V1A	C20orf114	CITED1
LRP2	ATP6V1B1	NAPRT1	NEFH
MAN1A1	ATP6V1B2	RG9MTD2	OPRM1
RAB8A	ATP6V0C	SAT2	OTC
MIF	ATP6V1C1	KIF12	OXTR
MME	ATP6V1E1	MAL2	PAPPA
MUC1	ATP6V0A1	OSBPL1A	PC
MYH9	ATP6AP1	VASN	PCOLCE

NAGLU	AZU1	SLC22A12	PDGFRB
NONO	BCR	ACSM1	PFKFB3
NPM1	BGN	TTC18	PGAM2
NRAS	BLMH	GSTO2	SERPINE2
P2RX4	BLVRA	CLRN3	PLP2
P4HB	BLVRB	LRRK2	PPP1CC
PEBP1	BPI	C12orf59	SRGN
SERPINA5	BTG1	LOC124220	MAP2K6
PFN1	BTN1A1	SLC5A10	PSMB7
PFN2	TSPO	CCDC105	PSMB10
ABCB1	C1QC	C1orf93	PTK7
SERPINA1	CAPN5	ARL8A	PTPRK
PIGR	C5	LOC128192	PZP
PIK3C2B	C9	GALM	RAD21
PKD1	PTTG1IP	LRRC15	RASA1
PLSCR1	CACNA2D1	LOC131691	RDH5
PODXL	CALML3	H1FOO	RPL18
CTSA	CAMK4	ENPP6	RPL29
PPIA	CAMP	CMBL	RPS10
PSAP	CAPG	MUM1L1	RPS24
PSMB3	CAPN1	C20orf117	S100A13
PTBP1	CAPN2	SIRPA	SAA4
PTPRJ	CAPZA2	PLEKHA7	ATXN1
RAB1A	CD14	A2ML1	CLEC11A
RAB2A	CD80	C16orf89	SDC2
RAB3B	CD36	TOM1L2	SMARCA4
RAB5A	SCARB2	KIF18B	SPOCK1
RAB5B	CD40	C19orf18	STAT1
RAB13	CDC2	PM20D1	STC1
RAB27B	CEL	PROM2	SURF4

RAB5C	CETP	GPR155	SYT1
RAC1	CTSC	SLC36A2	TAGLN
RALB	AP2M1	VPS37D	TCN1
RAP1B	CSN1S1	SLC5A12	TERF1
RBM3	CSN2	SLC5A8	TGFB2
RNASE2	CSN3	EML5	TSPAN4
S100A6	ACSL3	TBC1D21	TSN
S100A11	FOLR1	ZNF114	TSNAX
S100P	B4GALT1	ANO6	COL14A1
SLC1A1	GNAQ	SLC5A9	WNT5A
SLC2A5	HBB	CRTC2	ZNF134
SLC12A1	HBD	C20orf106	PXDN
SLC12A3	CFH	TMEM192	SMC1A
SNCG	HLA-G	ARMC3	OFD1
SNRPD1	HP	NAPEPLD	COPS3
SOD1	HPR	C10orf30	STC2
SRI	IGHA1	ATP6V0D2	ADAM9
TF	IG J	STXBP4	CREG1
THBS1	IGLC1	C17orf61	CDK5R2
THY1	IGLC2	TXNDC8	TNFSF18
TMPRSS2	IGLC3	LRRC57	MPZL1
TSG101	LAMC1	HSPA12A	SEMA5A
TUBB2A	LPA	MAGI3	CLDN1
UBE2N	LPL	C11orf47	RGN
UMOD	LRP1	SLC39A5	SLC16A3
UPK2	LTF	C12orf51	ARHGEF1
VTN	TACSTD2	SLC46A3	LRRFIP2
EIF4H	MBL2	VMO1	TAAR2
YWHAB	MYH8	SLC26A11	CRIP1
YWHAG	NEB	LOC284422	ENTPD4

YWHAZ	PON1	CRB2	IFT140
NPHS2	PKN2	HIST2H2AB	RNF40
RAB7A	PROS1	FAM151A	RB1CC1
PSCA	MASP1	SLC6A19	PSMD6
CUBN	RELN	PKD1L3	MRC2
BBOX1	PTX3	LOC342897	HDAC5
RAB11A	RARS	EGFL11	RASA4
NAPA	SILV	SERINC2	SLC25A13
PROM1	THBS2	PDDC1	PSMD14
FCGBP	TLR2	SLCO4C1	TFG
CPNE3	TTN	SFT2D2	CDIPT
MGAM	TTR	C9orf169	CRTAP
GPRC5A	TYRP1	LOC377711	UNC13B
RAB11B	VWF	OR11L1	ARL6IP5
VAMP3	CLIP2	RAB19	TGOLN2
SLC9A3R1	XDH	LOC440335	POSTN
ITM2B	APOL1	HIST2H2BF	CLPX
NAPSA	FCN3	LOC441241	TSPAN9
VPS4B	SELENBP1	KPRP	TMED10
RAB3D	SMC3	HSP90AB6P	SLC38A3
PRDX6	DDX21	LOC643751	IL1RAPL1
KIAA0174	CCPG1	LOC651536	GALNT5
PDCD6	ABCG2	LOC652968	PRR4
ARPC4	SFI1	AEBP1	ITGA11
TSPAN1	MVP	AMY1A	CLASP2
PDZK1IP1	AKAP9	AMY1B	EPB41L3
NUTF2	PRG4	AMY1C	KIAA0467
FLOT1	AKR1A1	AMY2A	DULLARD
HRSP12	ABCA7	ANGPT1	NOMO1
A2M	COLEC10	APLP2	KIAA0146

ACP1	GNB5	APP	SLC39A14
ACTA1	MMRN1	AQP5	DNPEP
ACTN4	CLASP1	AZGP1	CASP14
ACTN1	SYNE1	CEACAM1	STX12
ACTN2	NIPBL	BMP3	BRMS1
ADAM10	CHRD12	CA6	ABI3BP
AHCY	HSPB8	DDR1	PLEKHG3
ALDH1A1	ANGPTL4	CAPNS1	FBXW8
SLC25A4	NIN	COL6A2	GAPDHS
SLC25A5	ZNF571	COPA	GREM1
SLC25A6	LRP1B	CPD	DKK3
ANXA1	CNDP2	DLD	SRPX2
ANXA2P2	DNAH7	ETFA	IGHV3-11
APOA1	HCN3	GLUD1	IGHV3-7
ARHGDIA	EXOC4	HSD17B10	IGLV4-3
ARVCF	SNX25	IMPDH2	IGLV3-21
	TC2N	HTATIP2	IGLV1-40
	HAPLN3	MARVELD2	ST6GALNAC6
ATP1B1	CD163L1	CST4	COPS4
ATP5A1	HRNR	CST5	HERC5
ATP5B	P704P	CTSB	NUSAP1
ATP5I	CD24	DAG1	PLUNC
ATP5O	COL6A3	DSG2	PPME1
B2M	COL15A1	TOR1A	MBD3
CALM1	COMT	ECM1	SLC38A2
CALM2	CP	EIF4G1	FAM64A
CALM3	CPN2	EXT2	GTPBP2
CANX	CRABP2	FAT2	DIRAS2
CAPZA1	CRK	GPC4	DCHS2
CD2	CRYAB	FOLH1	QPCTL

CD247	CRYM	FUT2	PARP16
CD86	CSE1L	FUT3	TMEM51
CD37	CSK	FUT6	MCM10
CD44	CSTB	FUT8	CHST12
CD53	CTH	GLRX	LYAR
CDC42	CTNS	GPC1	ODZ3
CDH1	CTSD	GPX3	WDR52
CFL1	CTSG	IGHA2	ASH1L
CFL2	DDB1	IGHV α	UNC45A
COX4I1	DDC	IGL α	SLC7A10
COX5B	DDX3X	IVL	PNO1
CLDN3	DDX5	KRT12	CD248
CSPG4	CFD	LAMA4	AHRR
CSRP1	DNM2	LAMB2	ZBTB4
CST3	DPYS	LGALS7	SPTBN4
CTNNA1	DSC2	LMAN1	LGR6
CTNNB1	DSG3	LPO	RNF123
NQO1	ECE1	LTBP3	PRDM16
DYNC1H1	MEGF8	DNAJB9	PARVG
EEF1A2	ELA2	MEST	RMND5A
EFNB1	SERPINB1	MGAT1	FAT4
CTTN	EPHX2	MGP	FLJ13197
EPHB4	FBL	MUC5AC	TREML2
ERBB2	EVPL	MUC7	SVEP1
F5	F11	NEU1	OBFC1
FASN	FABP1	NUCB1	ZNF614
FKBP1A	ACSL4	NUCB2	FLJ22184
FLNA	FAH	FURIN	DBF4B
FLNB	EFEMP1	PAM	CD276
G6PD	FBP1	PLG	CMIP

GCNT2	FKBP4	FXVD3	ADAMTS12
PDIA3	FKBP5	PLOD2	SPACA1
GSN	FRK	PLTP	VANGL1
HADHA	FTH1	PON3	SPRY4
HLA-DMB	FUCA1	PPP1CB	HYI
HLA-E	GABRB2	PRELP	FAM108A1
HNRNPA2B1	GALK1	DNAJC3	TMEM47
HNRNPH2	GBE1	HTRA1	MYCBPAP
HSPA1L	GDF2	RARRES1	RAB6C
HSPA2	GFRA1	SAA1	FAM71F1
HSPA4	GK2	SAA2	ZNF503
HSPA7	GLO1	SEPP1	PARP10
HSPA9	GLUL	SFRP1	SHANK3
HSP90AA4P	GM2A	ST3GAL1	LACRT
HSP90AA2	GNG5	SLC5A5	TRIM41
HSP90AB3P	GOT1	SLC9A1	OXNAD1
HSPE1	GPD1	SLC20A2	LDHAL6B
HSPG2	GPM6A	SLPI	LOC92755
ICAM1	GPT	SRPR	CACNA2D4
ITGA6	GPX4	STAU1	ARHGAP18
ITGA2	GRB2	HSPA13	AHNAK2
ITGAV	GRID1	TGFB1	RPLP0P2
	GSR	TGM1	PGLYRP2
ITGB2	GSS	TGM3	RAB39B
ITGB4	GSTM2	YES1	GYLTL1B
JUP	HGD	HIST2H2AA3	KRT74
CD82	HINT1	HIST2H2BE	SLAIN1
KPNB1	HNMT	GALNT4	LOC122589
KRT2	HNRNPL	B4GALT3	NLRP8
KRT5	HPD	TNFSF13	PODN

KRT8	HPX	TNFSF12	C5orf24
KRT13	HRG	ANGPTL1	CD109
KRT14	DNAJA1	GCNT3	TRIM40
KRT15	HSPB1	TM9SF2	GPR112
KRT16	DNAJB1	DDX23	KRT72
KRT18	CFI	ADAMTS3	VTI1A
KRT19	IGF2R	GPR64	SYT9
LAMP2	IGFALS	LHFPL2	KRT80
LGALS4	IL1RN	ST3GAL6	CCDC64B
LYZ	IRF6	PRDX4	ATP8B3
	ITGA1	MAN1A2	C1orf84
MFGE8	EIF6	OS9	LOC149501
MMP7	ITGB8	MGAT4A	LOC150786
MYH10	ITIH4	TWF2	WDR49
MYL6	KHK	CLCA4	NEK10
MYO1C	KIFC3	TXNDC4	STOML3
MYO1D	KLK1	PLCB1	SASS6
NME1	LBP	CES3	DCLK2
NME2	LCN2	B3GAT3	FREM3
PRDX1	LCP1	TOR1B	C9orf91
PCBP1	LTA4H	IGHV3OR16-13	TREML2P
CHMP1A	BCAM	IGLV2-11	CCDC129
SERPINF1	MAN2A1	IGLV1-44	PAN3
PHB	MDH2	IGKV3D-15	MAMDC2
PPIB	MFI2	IGKV4-1	RCOR2
PRKAR2A	MLLT3	C1GALT1C1	LOC283412
PRKDC	MLLT4	RACGAP1	LOC283523
PSMA2	MNDA	EFEMP2	NOMO2
QSOX1	MPO	DUOX2	SEC14L4
PYGB	MPST	SDF4	LCN1L1

RAB6A	MYO1B	CYB5R1	LOC286444
RALA	MSRA	ERAP1	TAS2R60
RAP1A	MTAP	NUDT9	KRT18P19
RPL6	MTHFD1	FAM3B	LOC343184
RPL8	MYH3	FAM20A	LOC345041
RPLP1	MYO5B	FAM55D	GNAT3
RPLP2	MYO6	ANO1	POLN
RPN1	NID1	LRRC16A	LOC376693
RPS3	NKX6-1	TTC17	ARMS2
RPS7	NQO2	PDGFC	LOC387867
RPS13	NP	PCDHGB5	LOC388339
RPS14	NPC1	CCL28	FLG2
RPS15A	NPHS1	UGCGL1	LOC388707
RPS18	NRF1	SEMA3G	LOC389141
RPS20	NT5E	CORO1B	LOC390183
RPS21	PAFAH1B1	NDRG2	KRT8P9
RPS27A	PAFAH1B2	KIAA1324	LOC391777
RRAS	PCBD1	TXNDC16	LOC391833
S100A10	PCK1	ARHGAP23	LOC399942
SDC1	PDCD2	MUTED	LOC400389
SDC4	PDE8A	TINAGL1	LOC400578
SLC1A5	ENPP3	TOR3A	LOC400750
SLC2A1	SLC26A4	VWA1	LOC400963
	PDZK1	CHID1	FLJ21767
SLC12A2	PEPD	TMEM109	LOC401817
SLC16A1	PFKL	GAL3ST4	NOMO3
SPTBN1	PGD	THSD4	LOC439953
SSBP1	PGM1	UXS1	RPL12P6
SSR4	SLC25A3	TXNDC5	LOC440589
TBCA	SERPINA4	CRISPLD1	LOC440917

TCEB1	SERPINB6	LOXL4	LOC440991
TFRC	SERPINB13	GNPTG	LOC441876
TKT	PIK3C2A	SCGB3A1	LOC442308
TSPAN8	PIP	CHST14	DIPAS
TPM1	PKD2	C1QTNF1	LOC643300
HSP90B1	PKLR	C1QTNF3	LOC643358
TUBA4A	PKHD1	SLC26A9	LOC643531
TUFM	PLCD1	FAM129A	RPSAP8
TXN	PLOD1	HIST2H3C	LOC644464
UBA52	PLS1	TPRG1L	LOC644745
UBB	UBL3	TMPRSS11B	LOC645018
UBC	PPL	C20orf70	LOC645548
UBA1	PPP1R7	PPM1L	LOC646127
UBE2V2	PRCP	GBP6	LOC646316
UGDH	PRKCA	KRT78	LOC646359
UQCRC2	PRKCD	SLC37A2	LOC646785
VCP	PRKCH	NPNT	LOC646875
VIL1	PRKCI	KRT73	LOC646949
YHHAH	PRKCZ	HIST2H3A	LOC647000
CXCR4	PRNP	VWA2	LOC647285
SLC7A5	PRSS8	GSTK1	LOC650405
HIST1H4I	PRTN3	SBSN	LOC650901
HIST1H4A	PSMA1	C5orf46	LOC652493
HIST1H4D	PSMA3	LRRC26	LOC652797
HIST1H4F	PSMA4	C4orf40	LOC653162
HIST1H4K	PSMA5	LOC440786	PPIAL3
HIST1H4J	PSMB1	SCFV	LOC653232
HIST1H4C	PSMB2	LGALS7B	HSPBL2
HIST1H4H	PSMB5	HIST2H3D	LOC728002
HIST1H4B	PSMB6	ACAT2	LOC728088

HIST1H4E	PSMC5	ACTL6A	LOC728576
HIST1H4L	PSMD12	ADK	LOC728590
HIST2H4A	PSME2	ANXA8L2	LOC728791
TAGLN2	PTPN6		LOC728979
RUVBL1	PTPN13		ANG
VAMP8	PTPRO		BDNF
SNAP23	QDPR	CAV1	CALU
IQGAP1	RAB27A	CD70	CCR4
KRT75	RAP1GDS1	CS	CCR5
TJP2	RBL2	DARS	CSF2
ROCK2	RBP4	DHX9	CSF3
ARPC3	RENBP	DPYSL2	DCN
ACTR3	RFC1	EEF1D	EPO
LRPPRC	RHEB	EPRS	F3
TRAP1	RNH1	FDPS	GPC5
TUBB4	RNPEP	FLNC	GDF1
GNB2L1	ROBO2	XRCC6	GDF9
BAIAP2	RP2	GFPT1	GFRA3
HYOU1	RPS11	HIST1H1B	GRN
AGR2	RREB1	HIST1H2BB	CXCL2
OLFM4	RYR1	H3F3A	GZMA
CCT2	S100A4	H3F3B	HIST1H2BD
ATP5L	S100A8	HNRNPF	HGF
CCT8	S100A9	HNRNPK	IFNG
SLC12A7	SERPINB4	IARS	IGFBP3
MASP2	SCN10A	LAMA3	IGFBP4
IQGAP2	SEC13	LAMB3	IGFBP6
RAB10	SECTM1	LAMC2	IGFBP7
PRDX3	SH3BGRL	LGALS1	IL1RAP
EHD1	SHMT1	NBR1	IL3

TMED2	SHMT2	MARS	IL5
LMAN2	SLC3A1	MX1	IL6ST
YWHAQ	SLC4A1	PFKP	IL7
GCN1L1	SLC5A1	PLAU	IL8
RAB35	SLC5A2	PSMB4	IL10
DSTN	SLC6A13	PSMC2	IL11
UPK1A	SLC9A3	PSMC4	IL13
PHB2	SLC15A2	PSMD2	IL15RA
RRAS2	SLC25A1	PSMD13	INHBA
SEC31A	SLC22A2	PYGL	INHBB
CLSTN1	SLC22A5	RPL10	IPO5
PTGR1	SMO	RPL15	LIF
RAB21	SORD	STX4	LRP6
CYFIP1	SORL1	TARS	LTBP1
SLC44A1	SPAST	CLDN5	MMP1
CORO1C	SPR	TPBG	MMP2
MTCH2	SPRR3	XPO1	MMP3
QPCT	SRC	XRCC5	MMP10
PRDX5	ST13	BAT1	NBL1
SND1	STK11	HIST1H2BG	TNFRSF11B
F11R	VAMP7	HIST1H2BF	OSM
LIMA1	SYPL1	HIST1H2BE	PDGFA
RAB6B	SERPINA7	HIST1H2BI	PRKCSH
KRT20	TECTA	HIST1H2BC	CCL2
VPS35	TGM4	HIST1H4G	CCL7
TOMM22	TGFBR3	EIF3A	CCL20
AKR1B10	TGM2	EIF3B	SFRP4
S100A14	TLN1	EIF3C	SOD3
DIP2B	DNAJC7	SLC5A6	SPARC
RAP2C	UBE2G1	HIST2H2AA4	TIMP1

FAM129B	UPK1B	LOC728358	TIMP2
	UGP2	LOC730839	TIMP3
AHNAK	UPK3A	LOC100126583	ICAM5
VPS37B	UTRN	AARS	TNFRSF1A
TUBA4B	VASP	AK2	VEGFC
ARPC5L	VCL	APEH	GDF5
EPPK1	VDAC1	FAS	HIST3H3
ADSL	VDAC3	BAX	HIST1H2AI
AP2A1	XPNPEP2	FMNL1	HIST1H2AL
RHOC	BTG2	CASP9	HIST1H2AC
RHOG	GCS1	CD19	HIST1H2AM
ASNS	BAT2	MS4A1	HIST1H2BN
	PTP4A2	CD22	HIST1H2BM
CAD	DYSF	TNFRSF8	HIST1H2BH
CBR1	EEA1	SCARB1	HIST1H2BO
CBR3	STK24	ENTPD1	HIST1H3A
CCT6A	CUL4B	CD48	HIST1H3D
CDH17	CUL3	CD58	HIST1H3C
CEACAM5	ATRN	CD74	HIST1H3E
COPB1	CDC42BPA	CD79B	HIST1H3I
CLDN4	PPFIA2	CD97	HIST1H3G
CLDN7	AKR7A2	41889	HIST1H3J
CRYZ	PPAP2A	CR2	HIST1H3H
CD55	ABCB11	CSNK2B	HIST1H3B
EEF1G	MAP2K1IP1	DBI	FADD
EPHA2	EIF3H	DHCR7	IL1RL2
EIF4A1	SLC4A4	DLG1	FGF18
EIF4A2	SNX3	DOCK2	FGF16
ENO2	MYH13	DUT	HIST1H3F
SLC29A1	NAPG	ECH1	HIST1H2AG

EPHB2	FBP2	VAPA	HIST1H2BJ
EPHB3	SCEL	H2AFY	NRG2
ESD	SUCLA2	PDIA4	GDF3
F7	GGH	EIF4A3	FGF19
FLOT2	PROZ	ACTR1B	GDF11
GARS	SQSTM1	OPTN	FST
GMDS	AP1M1	NAMPT	LASS1
GNB3	RAB7L1	MPZL2	HPSE
HIST1H2AE	WASL	STIP1	ESM1
HLA-C	PLOD3	PKP3	DKK1
HLA-H	PGLYRP1	POFUT2	IL17B
HPCAL1	KALRN	QPRT	IL19
	CLIC3	WBP2	TNFRSF12A
IGH α	BAZ1B	ERO1L	IL23A
IGHG1	SPAG9	H2AFY2	FGFRL1
IGHG2	SLC13A2	RCC2	TREM1
IGHG3	ATP6V0D1	RTN4	IL1F9
IGHG4	HGS	GLT25D1	CXCL16
IGHM	AP4M1	RNASE7	IL22RA1
IGKC	ATP6V1F	FCRLA	HIST1H2BK
ITGA3	PTER	H2AFV	HIST3H2BB
KRT3	TRIP10	MRLC2	LOC440093
KRT4	SLC9A3R2	PAGE2	PGAM4
KRT6A	SLIT2	HIST1H2BA	PC-3
KRT6B	SLC22A6	SNX33	LOC729500
KRT7	KL	PTRF	KRT18P26
KRT17	KIF3B	HIST2H2BC	S100A11P
RPSA	SLC22A8	ANXA8	LOC729679
LFNG	GRHPR	NME1-NME2	KRT17P3
LGALS3	SLC22A13	EIF2S1	RCTP1

LRP4	TMPRSS11D	EIF2S3	LOC729903
CD46	GSTO1	EIF4E	RP11-556K13.1
MICA	NPEPPS	EPB41L2	LOC100129982
MYH11	TMEM59	EVI2B	LOC100130100
NARS	ATP6V1G1	FCER2	LOC100130446
NEDD4	CDC42BPB	FGR	LOC100130562
RPL10A	CREB5	FH	LOC100130624
PCNA	CROCC	GART	LOC100130711
PLEC1	DHX34	GOT2	LOC100130819
PLXNA1	TMEM63A	NCKAP1L	LOC100131713
PPP2R1A	SLK	HLA-DPB1	LOC100131863
PSMC6	RUSC2	HLA-DQA1	LOC100132795
PSMD3	OXSRI	HNRNPA1	LOC100133211
PSMD11	SLC23A1	HNRNPC	LOC100133690
RAC3	DOPEY2	HPRT1	SET
RAP2A	ABI1	ICAM3	CCT6B
RAP2B	GNPDA1	INSR	ACTR3B
RPL12	TOM1	EIF3E	PSMA8
RPLP0	ABCB6	ITGAL	ARP11
RPS4X	ABCC9	ITGB3	BCHE
RPS4Y1	HUWE1	ITGB7	H2AFZ
RPS8	ARPC5	ITIH2	SNRPE
RPS16	ACTR2	STMN1	TFPI
SPTAN1	TSPAN3	LCK	ADAMTS1
VAMP1	ARPC2	LSP1	GDF15

Tabla 3. Cargas útiles y receptores de polipéptidos

Clases generales			
Proteínas de repetición de anquirina		Fibronectinas	Liasas
Anticuerpos	Receptores de complemento	Polipéptidos unidos a GPI	Nanocuerpos
Aptámeros	Péptidos cíclicos	Proteínas de repetición de HEAT	Ácidos nucleicos
Proteínas de repetición de ARM	DARPin	Hidrolasas	Polipéptidos
Carbohidratos	ADNasas	Cinasas	Fragmentos variables de cadena sencilla (scFv)
Receptores de superficie celular	Enzimas	Lipoproteínas	Proteínas de repetición de tetratricopéptido
Complemento			
Inhibidor de C1	Proteína de unión a C4	CR3	Factor I
Receptor de cadena beta C3	CD59	CR4	Factor de restricción homólogo
C3aR	CR1	Factor de aceleración de la descomposición (DAF)	Proteína cofactor de membrana (MCP)
C3eR	CR2	Factor H	PRELP
Enzimas			
triacilglicerol lipasa	ácido bilis-CoA hidrolasa	feruloil esterasa	fosfatidato fosfatasa

(S -metilmalonil-CoA hidrolasa	bis(2-etilhexil)ftalato esterasa	formil-CoA hidrolasa	fosfatidilglicerofosfatasa
[acil-portador-proteína] fosfodiesterasa	bifosfoglicerato fosfatasa	fructosa-bisfosfatasa	fosfatidilinositol deacilasa
[fosforilasa] fosfatasa	Hidrolasas de éster carboxílico	fumarilacetoacetasa	fosfodiesterasa I
1,4-lactonasa	carboximetilenbutenolidasa	fusarinina-C ornitinesterasa	fosfoglicerato fosfatasa
11-cis-retinil-palmitato hidrolasa	celulosa-polisulfatasa	galactolipasa	fosfoglicolato fosfatasa
1-alkil-2-acetilglicerofosfolina esterasa	cefalosporina-C desacetilasa	gluconolactonasa	fosfoinositida fosfolipasa C
2'-hidroxibifenil-2-sulfonato desulfonasa	cerebrosida-sulfatasa	glucosa-1-fosfatasa	fosfolipasa A1
2-pirona-4,6-dicarboxilato lactonasa	cetraxato bencilesterasa	glucosa-6-fosfatasa	fosfolipasa A2
3',5'-bisfosfato nucleotidasa	hidrolasa de clorogenato	glutación tiolesterasa	fosfolipasa C
3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa	clorofilasa	glicerol-1-fosfatasa	fosfolipasa D
3'-nucleotidasa	colinesterasa	glicerol-2-fosfatasa	fosfonoacetaldehído hidrolasa
3-oxoadipato enol-lactonasa	colina-sulfatasa	glicerofosfocolina fosfodiesterasa	fosfonoacetato hidrolasa

3-fitasa	coloil-CoA hidrolasa	Glicosidasas, es decir, enzimas que hidrolizan compuestos de O- y S-glicosilo	fosfonopiruvato hidrolasa
4-hidroxibenzoil-CoA tioesterasa	condro-4-sulfatasa	glucosulfatasa	fosfoproteína fosfatasa
4-metiloxaloacetato esterasa	condro-6-sulfatasa	Glucosilasas	Hidrolasas de diéster fosfórico
4-fitasa	citrato-liasa desacetilasa	histidinol-fosfatasa	Hidrolasas de monoéster fosfórico
4-piridoxolactonasa	cocaína esterasa	lipasa sensible a las hormonas	Hidrolasas de triéster fosfórico
5'-nucleotidasa	cutinasa	Compuestos de N-glicosilo hidrolizante	fosforserina fosfatasa
6-acetilglucosa desacetilasa	ciclamato sulfohidrolasa	Compuestos de S-glicosilo hidrolizante	poli (3-hidroxibutirato) despolimerasa
6-fosfogluconolactonasa	Endopeptidasas de cisteína	hidroxiacilglutación hidrolasa	poli(3-hidroxibutirato) despolimerasa
α -aminoácido esterasa	Carboxipeptidasas de tipo cisteína	hidroxibutirato-dímero hidrolasa	polineuridina-aldehído esterasa
α -Amino-acil-péptido hidrolasas	D-arabinonolactonasa	hidroximetilglutaril-CoA hidrolasa	proteína-glutamato metilesterasa
acetoacetil-CoA	anillo de	iduronato-2-	N-acil-homoserina

hidrolasa	desoxilimonato A- lactonasa	sulfatasa	lactonasa que inactiva el quórum
acetoxibutinilbitio feno desacetilasa	dGTPasa	inositol-fosfato fosfatasa	retinil-palmitato esterasa
acetilajmalina esterasa	dihidrocumarina hidrolasa	hormona esterasa juvenil	Serina deshidratasa o serina hidroximetil transferasa
acetilalquilglicero l acetilhidrolasa	Dipeptidasas	quinureninasa	Endopeptidasas de serina
acetilcolinesteras a	Dipéptido hidrolasas	L- arabinonolactonasa	fosfato de serina- etanolamina fosfodiesterasa
acetil-CoA hidrolasa	Dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas	limonina-D-anillo- lactonasa	Carboxipeptidasas de tipo serina
acetilesterasa	Hidrolasas de monoéster difosfórico	lipoproteína lipasa	S-formilglutación hidrolasa
acetilpiruvato hidrolasa	disulfoglucosamina-6- sulfatasa	L-rhamnono-1,4- lactonasa	sialato O- acetilesterasa
acetilsalicilato desacetilasa	dodecanoil-[acil- proteína portadora] hidrolasa	lisofosfolipasa	esterasa de sinapina
acetilxilano esterasa	Endodesoxirribonucle asas que producen 3'- fosfomonoésteres	manitol-1-fosfatasa	Endodeoxirribonuc leasas específicas del sitio: la escisión no es específica de secuencia
fosfatasa ácida	Endodesoxirribonucle	Metalocarboxipepti	Endodesoxirribonu

	asas que producen 5'-fosfomonoésteres	dasas	cleasas específicas del sitio que son específicas para bases alteradas.
Actúa sobre los anhídridos de ácido para catalizar el movimiento transmembrana de sustancias	Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido	Metalloendopeptidasas.	Endodesoxirribonucleasas específicas del sitio: la escisión es específica de secuencia
Actúa sobre los anhídridos de ácido para facilitar el movimiento celular y subcelular	Endorribonucleasas que producen 3'-fosfomonoésteres	metilfosfotioglicerato fosfatasa	esfingomielina fosfodiesterasa
Actúa sobre GTP para facilitar el movimiento celular y subcelular	Endorribonucleasas que producen 5'-fosfomonoésteres	metilumbelliferil-acetato desacetilasa	S-succinilglutathion hidrolasa
Actúa sobre enlaces fósforo-nitrógeno	Endorribonucleasas que son activas con ácidos ribo o desoxirribonucleicos y producen 3'-fosfomonoésteres	monoterpeno e-lactona hidrolasa	esteroide-lactonasa

Actúa sobre enlaces azufre-nitrógeno	Endorribonucleasas que son activas con ácidos ribo o desoxirribonucleicos y producen 5'-fosfomonoésteres	N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa	esterol esterasa
actinomicina lactonasa	Enzimas que actúan sobre anhídridos de ácido	N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa	esteril-sulfatasa
acilcarnitina hidrolasa	Enzimas que actúan sobre enlaces carbono-carbono	N-acetilgalactosamino glicano desacetilasa	succinil-CoA hidrolasa
acetil-CoA hidrolasa	Enzimas que actúan sobre enlaces carbono-nitrógeno, distintos de los enlaces peptídicos	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	sucrosa-fosfato fosfatasa
acilglicerol lipasa	Enzimas que actúan sobre enlaces carbono-fósforo	N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa	azúcar-fosfatasa
aciloxiacil hidrolasa	Enzimas que actúan sobre enlaces carbono-azufre	oleoil-[acil-proteína portadora] hidrolasa	Hidrolasas de éster sulfúrico
acetilpiruvato hidrolasa	Enzimas que actúan sobre enlaces éter	Omega peptidasas	tanasa
ADAMTS13	Enzimas que actúan sobre enlaces haluro	hidrolasa de depsida de orsellinato	Hidrolasas de tioéster
Adenosina	Enzimas que actúan	oxaloacetasa	Tioéter y

desaminasa	sobre enlaces peptídicos (peptidasas)		trialquilsulfonio hidrolasas
adenilil- [glutamato— amoníaco ligasa] hidrolasa	Enzimas que actúan sobre enlaces fósforo- nitrógeno	palmitoyl[proteína] hidrolasa	Endopeptidasas de treonina
acil-CoA hidrolasa de cadena media dependiente de ADP	Enzimas que actúan sobre enlaces sulfuro- nitrógeno	palmitoil-CoA hidrolasa	timidina fosforilasa
acil-CoA hidrolasa de cadena corta dependiente de ADP	Enzimas que actúan sobre enlaces azufre- azufre	pectinesterasa	trehalosa- fosfatasa
ADP- fosfoglicerato fosfatasa	Hidrolasas de éter.	Péptidil péptido hidrolasas	triacetato- lactonasa
fosfatasa alcalina	Endodesoxirribonucle asas que producen 5'- fosfomonoésteres	Hidrolasas de peptidil- aminoácidos	Hidrolasas de monoéster trifosfórico
todo-trans-retinil- palmitato hidrolasa	Exonucleasas que son activas con ácidos ribo o desoxirribonucleicos y producen 3'- fosfomonoésteres	Peptidilaminoácido s hidrolasas o acilaminoácidos hidrolasas	tritionato hidrolasa
aminoacil-tRNA	Exonucleasas que	Peptidil-	tropinesterasa

hidrolasa	son activas con ácidos ribo o desoxirribonucleicos y producen 5'-fosfomonoésteres	dipeptidasas	
Aminopeptidasas	Exorribonucleasas que producen 3'-fosfomonoésteres	fenilacetil-CoA hidrolasa	ubiquitina tiolesterasa
arilesterasa	Exorribonucleasas que producen 5'-fosfomonoésteres	Fenilalanina amoniaco liasa	UDP-sulfoquinovosa sintasa
arilsulfatasa	Factor IX	Fenilalanina hidroxilasa	uricasa
Asparaginasa	Factor VIII	feoforbidasa	uronolactonasa
Endopeptidasas aspárticas	graso-acil-etil-éster sintasa	floretina hidrolasa	hidrolasa de éster de cera
b-dicetona hidrolasa		forbol-diéster hidrolasa	xilono-1,4-lactonasa

Tabla 4. Dianas			
Clases generales de dianas			
Microbios	Polipéptidos	ADN	Aminoácidos
Hongos	Toxinas	ARN	Priones
Bacterias	Lípidos	Parásitos	Citocinas
Virus	Células	Residuos celulares	
Dianas relacionadas con enfermedades infecciosas			
Lipopolisacáridos	Proteína de invasión celular	Intermedilisina	Proteína efectora secretada sptP

Toxina zona occludens	Enterotoxina del cólera	Proteína de invasión sipA	Seeligeriolisina
Proteína de polimerización de actina RickA	Cisteína proteasa	lota toxina componente la	Serina proteasa
Proteína de polimerización de actina RickA	Toxina citoletal de distensión	Ivanolisina	Toxina Shiga
Adenosina monofosfato-proteína transferasa vopS	Citolisina	LepB	Esfingomielinasa
adenilato ciclasa	Factor necrotizante citotóxico	Factor letal	Estafiloquinasa
adenilato ciclasa ExoY	Citotoxina	Leucotoxina	Estreptoquinasa
Componente enzimático ADP-ribosiltransferasa	Toxina dermonecrótica	Listeriolisina	Estreptolisina
Aerolisina	Deubiquitinasa	Colagenasa microbiana	Streptopain
Alfa-toxina	Toxina de la difteria	Autotransportador de proteína de membrana externa lcsA	Suilisina
Alveolisina	Enterohemolisina	Panton-Valentine Leucocidina F	Superantígeno
Alveolisina	Enterotoxina	Perfringolisina	Efector secretado T3SS EspF
Antrolisina O	Inhibidor de	Toxina pertussis	Toxina tetánica

	diferenciación celular epidérmica		
Proteína activadora del complejo Arp2/3 rickA	Exoenzima	fosfolipasa	Tir
Toxina binaria ADP-ribosiltransferasa CDT	Exotoxina	Activador de plasminógeno	TolC
Neurotoxina botulínica	Factor de intercambio de nucleótidos G	Neumolisina	Toxina del síndrome de shock tóxico
Toxina C2, componente II	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina sopE	Antígeno protector	Carboxipeptidasa Zink
CagA	Enterotoxina estable al calor	Proteína quinasa	Carboxipeptidasa Zink
Adenilato ciclasa sensible a la calmodulina	Autotransportador de serina endopeptidasa específica de IgA	Piolisina	Peptidasa dependiente de Zn
Factor inhibidor del ciclo celular	Inositol-fosfato fosfatasa sopB	Toxina RTX	
Dianas de lípidos y célula			
Células tumorales circulantes	lípidos de muy baja densidad (VLDL)	Triglicéridos	Ácidos grasos
Metástasis	lipoproteína de alta densidad	Quilomicrones	Colesterol
Células	lipoproteína de baja	Apolipoproteínas	

eucariotas	densidad	
------------	----------	--

Tabla 5. Cánceres			
Leucemia linfoblástica aguda (ALL)	Cáncer colorrectal	Macroglobulinemia, Waldenström	Blastoma Pleuropulmonar, Infancia
Leucemia mieloide aguda (AML)	Craneofaringioma, Infancia	Cáncer de mama masculino	Embarazo y Cáncer de Mama
Carcinoma adrenocortical	Linfoma cutáneo de células T	Histiocitoma fibroso maligno de hueso y osteosarcoma	Linfoma primario del sistema nervioso central (SNC)
Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA	Carcinoma ductal in situ (DCIS)	Melanoma	Cáncer de próstata
Linfoma relacionado con el SIDA	Tumores embrionarios, infancia	Carcinoma de células de Merkel	Cánceres raros
Cáncer anal	Cáncer endometrial	Mesotelioma	Cáncer rectal
Cáncer de apéndice	Ependimoma, Infancia	Cáncer de cuello escamoso metastásico con primario oculto	Carcinoma de células renales
Astrocitomas, Infancia	Cáncer epitelial	Carcinoma del tracto de la línea media que involucra el gen	Cáncer de células transicionales, de pelvis renal y

		NUT	uréter
Tumor teratoide/rabdoid e atípico, infancia	Cáncer de esófago	Embarazo molar	Retinoblastoma
Carcinoma de células basales	Estesioneuroblastoma, Infancia	Cáncer de boca y orofaringe	Rabdomiosarcoma
Cáncer de las vías biliares	Sarcoma de Ewing	Síndromes de neoplasia endocrina múltiple, infancia	Cáncer de glándulas salivales
Cáncer de vejiga	Tumor extragonadal de células germinales	Mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas	Sarcoma
Cáncer de hueso	Cáncer de conducto biliar extrahepático	Micosis fungoides	Cánceres secundarios
Cáncer intestinal	Cáncer de ojo	Síndromes mielodisplásicos	Síndrome de Sézary
Glioma del tallo cerebral, infancia	Cáncer de vesícula biliar	Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas	Cáncer de piel
Tumores cerebrales	Cáncer gástrico	Trastornos mieloproliferativos, crónicos	Cáncer de piel (no melanoma)
Cáncer de mama	Tumor carcinoide gastrointestinal	Cáncer de cavidad nasal y seno paranasal	Cáncer de pulmón microcítico
Tumores bronquiales, infancia	Tumor de células germinales	Cáncer de nasofaringe	Cáncer de intestino delgado
Linfoma de	Tumores	Neuroblastoma	Sarcoma de tejido

Burkitt	trofoblásticos gestacionales (GTT)		blando
Cáncer de primario desconocido	Glioma	Linfoma no-Hodgkin	Carcinoma de células escamosas
Cáncer extendido al hueso	Leucemia de células pilosas	Cáncer pulmonar no microcítico	Cáncer de cuello escamoso con primario oculto, metastásico
Cáncer extendido al cerebro	Cáncer de cabeza y cuello	Cáncer de esófago	Cáncer de estómago (gástrico)
Cáncer extendido al hígado	Cáncer de corazón, infancia	Cáncer oral	Cáncer de estómago
Cáncer extendido al pulmón	Cáncer hepatocelular (hígado)	Cáncer de la cavidad oral	Linfoma de células T, cutáneo: véase micosis fungoide y síndrome de Sézary
Tumor carcinoide	Histiocitosis, célula de Langerhans	Cáncer de orofaringe	Cancer testicular
Cáncer de primario desconocido	Linfoma de Hodgkin	Osteosarcoma (cáncer de hueso)	Cáncer de garganta
Tumores cardíacos (corazón), infancia	Cáncer de hipofaringe	Histiocitoma fibroso maligno de hueso y osteosarcoma	Timoma y carcinoma tímico

Tumor teratoide/rabdoid e del sistema nervioso central, infancia	Melanoma intraocular	Cáncer de ovarios	Cáncer de tiroides
Tumores embrionarios del sistema nervioso central, infancia	Tumores de células de islotes, tumores neuroendocrinos pancreáticos	Cáncer de páncreas	Cáncer de células transicionales, de pelvis renal y uréter
sistema nervioso central, infancia	Cancer de riñón	Tumores neuroendocrinos pancreáticos (tumores de células de islotes)	Cáncer primario desconocido
Cáncer de cuello uterino	Histiocitosis de célula de Langerhans	Papilomatosis, Infancia	Cáncer de células transicionales, de pelvis renal y uréter
Cordoma, Infancia	Cáncer de laringe	Paraganglioma	Cáncer uretral
Coriocarcinoma	Leucemia	Cáncer de paratiroides	Cáncer uterino, endometrial
Leucemia linfocítica crónica (CLL)	Cáncer de la cavidad oral y labios	Cáncer de pene	Sarcoma uterino
Leucemia mieloide crónica (CML)	Cáncer de hígado	Cáncer de faringe	Cáncer vaginal
Trastornos mieloproliferativo	Carcinoma lobular in situ (LCIS)	Feocromocitoma	Cáncer vulvar

s crónicos			
Cáncer de colon	Tumor de bajo potencial maligno	Tumor pituitario	Macroglobulinemia de Waldenström
Linfoma	Cáncer de pulmón	Mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas	Tumor de Wilms

- 5 [00276] La presente invención se ha descrito con respecto a ejemplos representativos que deben considerarse modalidades ilustrativas que no limitan el alcance de la invención que se define únicamente por las reivindicaciones. Todas las referencias a publicaciones, incluidas publicaciones científicas, tratados, libros de texto, solicitudes de patentes y patentes emitidas, se incorporan aquí como referencia a todos los efectos.