

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 861 586**

21 Número de solicitud: 202030272

51 Int. Cl.:

A61K 47/46 (2006.01)

A61K 35/20 (2006.01)

A61K 49/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

03.04.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.10.2021

71 Solicitantes:

**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (ISCIII) (40.0%)
Avda. Monforte de Lemos, 5
28029 Madrid (Madrid) ES;
INSTITUTO ARAGONÉS DE CIENCIAS DE LA
SALUD (IACS) (25.0%);
FUNDACIÓN AGENCIA ARAGONESA PARA LA
INVESTIGACIÓN Y EL DESARROLLO (ARAID)
(25.0%) y
FUNDACIÓN UNIVERSIDAD FRANCISCO DE
VITORIA (UFV) (10.0%)**

72 Inventor/es:

**DE LA VIEJA ESCOLAR, Antonio;
MARTÍN DUQUE, M^a Pilar y
CRESPO BARREDA, Alejandra**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **USO DE EXOSOMAS DE LECHE MATERNA COMO VEHÍCULO DE RADIOISÓTOPOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS**

57 Resumen:

Uso de exosomas de leche materna como vehículo de radioisótopos para el diagnóstico y tratamiento de neoplasias.

La invención se refiere al uso de vesículas extracelulares (EVs), preferiblemente exosomas, de leche preferiblemente materna, tanto humana como de otras especies, junto con isótopos radiactivos para visualizar nódulos tumorales y servir así para el diagnóstico y/o seguimiento de tumores, preferiblemente de masas tumorales sólidas. Adicionalmente, la invención propone el uso de dichas EVs, preferiblemente exosomas, para terapia antitumoral, ya que mediante la acumulación del radioyodo transportado por las EVs a los tumores se eliminan los nódulos tumorales de una manera específica.

ES 2 861 586 A1

DESCRIPCIÓN

USO DE EXOSOMAS DE LECHE MATERNA COMO VEHÍCULO DE RADIOISÓTOPOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS

5

La presente invención se encuadra dentro del campo de la medicina, específicamente dentro de los métodos teragnósticos (de diagnóstico y terapia) de tumores que emplean vehículos capaces de transportar específicamente a las zonas neoplásicas fármacos y agentes de contraste o de visualización, preferiblemente isótopos radiactivos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El principal problema para la aplicación de las terapias antitumorales radica en la dificultad de transportar eficazmente los agentes terapéuticos a las dianas patológicas.

15

Entre los vehículos propuestos para superar esta limitación, los más populares son las células de mamíferos y entre ellas, las células madre o células troncales. A diferencia de otros vehículos celulares, las células madre mesenquimales ó MSCS (del inglés “mesenchymal stem cells”) tienen ciertas características que las hacen superiores, como su capacidad de autorrenovación, el potencial de diferenciarse a diferentes tipos de células y su capacidad de migrar e integrarse en áreas inflamadas o dañadas, tales como los tumores. Aunque el mecanismo completo que media este fenómeno aún no está claro, se sabe que la liberación de citoquinas en el estroma tumoral y su interacción con receptores de superficie específicos, presentes en las MSCs desempeña un papel importante en el proceso de migración de estas células. El uso de MSCs como vehículos de diversas terapias se está desarrollando actualmente, y hay ensayos clínicos en los que se propone el uso de MSCs derivadas de pacientes como vectores de virus en el tratamiento de múltiples tipos de cáncer.

20

25

30

Resultados recientes muestran que la acción terapéutica de las células madre se debe a la señalización paracrina y se cree que estos efectos paracrinos están mediados principalmente por vesículas extracelulares (EVs), incluyendo los exosomas, que pueden transferir proteínas bioactivas y material genético a las células diana.

35

Las EVs, incluyendo los exosomas, son vesículas de tamaño micro o nanométrico derivadas de células y que transportan ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y otras moléculas. Los EVs transfieren material a las células con las que se fusionan y juegan

un papel importante en la comunicación de célula a célula. Estas vesículas son secretadas por una variedad de tipos celulares y recientemente han surgido como biomarcadores prometedores de una serie de enfermedades humanas que incluyen cáncer y neurodegeneración, y también como sistemas de suministro de medicamentos.

5

Por otro lado, el gen del transportador o simportador de yodo y sodio (Na^+/I^-) (NIS) se expresa en tiroides, donde media la entrada y acumulación del yodo procedente de la dieta para la producción de las hormonas tiroideas T3 y T4. También media el flujo de yodo en otros tejidos como intestino, estómago y glándulas salivares para llevar el yodo a la sangre y posteriormente al tiroides. NIS también se expresa en placenta durante el embarazo y en la glándula mamaria lactante, en ambos casos para aportar yodo al feto o bebé desde la madre. Así, se ha propuesto que NIS, como proteína transportadora, puede ser usada para concentrar radioisótopos en el interior celular. Por ello, la combinación de NIS y el uso de radioisótopos puede emplearse como reactivo en técnicas de visualización, tales como SPECT o PET con radioisótopos como ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I o $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, y/o como agente terapéutico en radioterapia para eliminar células tumorales con isótopos como ^{131}I , $^{188}\text{ReO}_4^-$ o ^{211}At (De la Vieja Antonio, Santisteban Pilar, 2018, Endocrine-Related Cancer, Vol. 25, N° 4, R225-R245).

10

15

20

25

30

Durante décadas, la terapia con radio-yodo por ^{131}I ha sido la terapia adyuvante esencial para el tratamiento del cáncer de tiroides, con un éxito considerable y efectos secundarios relativamente menores en comparación con otras terapias. La capacidad de NIS para acumular ^{131}I es la base de esta terapia y una de las opciones moleculares preferidas en teragnosis (diagnóstico + terapia). En las últimas décadas, los radioisótopos translocados por NIS representan uno de los principales avances en oncología nuclear terapéutica (Chung, J. K., G. J. Cheon, 2014, Endocrinol Metab, 29(3): 233-239). NIS tiene un papel único en este proceso, ya que actúa como reportero o como modalidad terapéutica. Es decir, NIS se puede usar como reportero para imágenes no invasivas por técnicas como PET y SPECT, con el añadido de que tiene algunas ventajas sobre otros genes reporteros utilizados mediante estas técnicas, y además tiene más resolución y penetración que los que emplean otras técnicas no nucleares como serían la bioluminiscencia y fluorescencia.

35

Sin embargo, uno de los problemas que quedan por resolver es cómo dirigir este gen específicamente al área tumoral.

Se sabe que las células madre mesenquimales humanas (hMSCs) de placenta y sus exosomas expresan de manera endógena NIS. Además, se ha demostrado que los exosomas de las MSCs de placenta tienen tropismo por los tumores, al igual que las células MSCs. Como consecuencia, pueden servir como vehículos radioacumuladores, característica que les permite ser utilizados en técnicas de visualización o para radioterapia, si se trata el cáncer con ^{131}I o con cualquier otro radioisótopo teragnóstico acumulable por NIS (Crespo-Barreda A., *et al.*, 2019, Journal of Extracellular Vesicles, Vol. 8, N° Supplement 1, 105 – 106; Crespo-Barreda A., *et al.*, 2016, Human Gene Therapy, Vol. 27, N° 11, página A91).

10

Se están empleando exosomas e EVs de diversas fuentes para llegar a la zona tumoral. Agrawal Ashish K. y colaboradores (Agrawal Ashish K., *et al.*, 2017, Nanomedicine, Vol. 13, N° 5, 1627-1636) describieron las ventajas de la administración oral de exosomas de leche bovina como vehículo para transportar paclitaxel a los tumores con una alta tasa de inhibición tumoral (60%) y menor toxicidad sistémica e inmunológica en comparación con la administración convencional (intravenosa) de paclitaxel, con lo que aunque no se visualiza su llegada, se asume que los exosomas han llegado al tumor, ejerciendo su efecto antitumoral..

20

La versatilidad de exosomas de leche como vehículos de sustancias antitumorales y su capacidad para llegar a las células tumorales ha sido también descrita en Munagala Radha, *et al.*, 2016, Cancer Letters, Vol. 371, N° 1, 48-61.

25

Por último, en el trabajo Tazebay Uygur H., *et al.*, 2000, Nature Medicine, Vol. 6, N° 8, 871-878 los autores muestran que el co-transportador de yodo y sodio hNIS media el transporte de yodo en lactantes sanos, pero no en no lactantes, al estar presente en la glándula mamaria, así como en tumores mamarios. También demuestran que *in vivo* los adenocarcinomas mamarios de ratones transgénicos acumulan yodo debido a NIS y que más del 80% de las muestras humanas de cáncer de mama expresan hNIS. Como resultado de su trabajo indican que hNIS se expresa en la glándula mamaria lactante y en ciertas circunstancias en cáncer de mama, y que el radioyodo podría acumularse en dichos tumores.

35

En resumen, además de los efectos secundarios, el principal problema para la aplicación de las terapias antitumorales radica en la dificultad de transportar eficazmente los

agentes terapéuticos a las dianas patológicas. Esto pone de manifiesto una clara necesidad de desarrollar nuevos vehículos de transporte eficaces y de fácil seguimiento, que permitan visualizar las regiones neoplásicas y asegurar que las terapias alcanzan los tumores de forma específica. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar
5 nuevas estrategias de vehiculización, más eficaces y seguras, capaces de alcanzar de manera específica y homogénea toda la masa tumoral, incluyendo las regiones hipóxicas centrales, para de esta manera mejorar la teragnosis en tumores.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10

Los inventores de la presente invención han demostrado que los exosomas y otras vesículas extracelulares (EVs) derivadas de leche materna presentan tropismo hacia los tumores y a su vez expresan altos niveles de NIS endógenamente, incluso más elevados que los mostrados por exosomas y otras EVs de células madre mesenquimales (MSCs)
15 de placenta. Esto permite el acúmulo de radioisótopos, preferiblemente isótopos de radioyoduro (pero también cualquier otro radioisótopo teragnóstico acumulable por NIS) en su interior, posibilitando así su uso como vehículo o captador/acumulador de dichos isótopos radiactivos, específicamente hacia las zonas neoplásicas para su visualización y/o tratamiento.

20

Así, la presente invención propone el uso de exosomas y otras EVs de leche (tanto humana como de otras especies) junto con isótopos radiactivos (i) para visualizar nódulos tumorales y servir así para el diagnóstico y seguimiento de tumores, preferiblemente de masas tumorales sólidas y del destino de estas EVs, y (ii) para
25 terapia antitumoral, ya que mediante la acumulación de radioisótopos acumulables por NIS (por ejemplo, ¹³¹I) en los tumores se eliminan los nódulos tumorales de una manera específica, con la ventaja adicional de que apenas aparecen efectos secundarios debido a su elevada selectividad tumoral.

30

Además, los inventores también demuestran que los exosomas y otras EVs de leche también migran hacia las metástasis, por lo que su combinación con radioisótopos también serviría para diagnosticar, seguir y tratar metástasis tumorales.

35

Por tanto, en la presente invención se demuestra que los exosomas y otras EVs de leche son un vehículo óptimo que permite transportar y acumular radioisótopos

específicamente en los tumores, debido a su altísimo tropismo hacia las zonas tumorales, mientras que no son detectados en otras regiones. Gracias a su expresión endógena del gen NIS acumulan radioisótopos (principalmente yodados), de manera que es posible (i) visualizar estos exosomas en las masas tumorales por técnicas de imagen tales como PET o SPECT, sirviendo esto para el diagnóstico de neoplasias y/o para el seguimiento de las terapias, y (ii) además eliminar los tumores por el acúmulo de terapia con radioisótopos acumulables por NIS (tales como ^{131}I). De hecho, los ejemplos mostrados más adelante evidencian, entre otras cosas, que esa acumulación de radioisótopos transportables y acumulables por NIS da lugar a reducción muy significativa del crecimiento tumoral.

La posibilidad de llevar a cabo el diagnóstico y seguimiento o bien la terapia de tumores mediante el abordaje aquí propuesto dependerá del tipo de radioisótopo que se emplee junto con el exosoma o vesícula. Así, por ejemplo, ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I o $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ pueden emplearse para visualización mediante PET y/o SPECT, mientras que ^{131}I , $^{188}\text{ReO}_4$ o ^{211}At pueden emplearse para terapia, aunque cualquier otro radioisótopo acumulable por NIS podría ser también empleado en el contexto de la presente invención.

Las ventajas que supone el objeto de la invención, frente al empleo de MSCs o sus exosomas como vehículo, son que aquí no se emplean células y que las EVs aquí utilizadas no proceden de células madre, con lo que se evitan conflictos éticos y posibles efectos perjudiciales (teratogénesis etc.). Además, la expresión de NIS endógena en los exosomas y otras EVs de leche es más elevada, y por tanto el efecto terapéutico mejor, que en exosomas de MSCs. También debe tenerse en cuenta que en la presente invención la sensibilidad alcanza incluso a las metástasis. Se obtiene mayor cantidad de exosomas y otras vesículas de la leche que de MSCs de placenta y su método de obtención es menos invasivo. Por último, la presente invención supone un método barato, reproducible y sencillo que es común a varias especies y que es de fácil implementación en clínica.

Por todo ello, un aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante “composición de la invención”, que comprende:

- (i) Vesículas extracelulares (EVs), preferiblemente exosomas, secretados, y posteriormente aislados, por células que expresan la proteína NIS, donde dichas EVs, preferiblemente exosomas,

expresan la proteína NIS, y

- (ii) al menos un isótopo radiactivo o radioisótopo, preferiblemente pero no exclusivamente, un isótopo de radioyoduro.

5 En una realización preferida de la composición de la invención, ésta comprende los dos elementos (i) y (ii) por separado. En otra realización preferida de la composición de la invención, las EVs, preferiblemente los exosomas, indicados en (i) han sido inyectados con el isótopo radiactivo indicado en (ii), de manera que lo comprenden internamente.

10 El “isótopo radiactivo” al que se refiere la presente invención puede ser cualquier radioisótopo transportable y acumulable por NIS. Preferiblemente, el isótopo radiactivo se selecciona de entre los radioisótopos más habituales transportables y acumulables por NIS. En una realización más preferida de la composición de la invención, el isótopo radiactivo se selecciona de la lista que consiste en: ^{131}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{211}At , $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$,
 15 $^{188}\text{ReO}_4^-$, y $^{18}\text{F-BF}_4^-$. En una realización más preferida, el isótopo radiactivo es (para terapia) ^{131}I o (para imagen) $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, aún más preferiblemente ^{131}I . El isótopo radiactivo ^{131}I también se denomina RAI o I-131, o radioyodo.

La “proteína NIS” (del inglés “Sodium/iodide symporter”) o “co-transportador/simportador
 20 de yodo y sodio” media la absorción de yoduro en células foliculares de la tiroides para la biosíntesis de las hormonas tiroideas (T3 y T4). Dicha proteína también se expresa en otros tejidos como la mucosa gástrica, las glándulas salivares o el tracto digestivo para captar el yodo circulante procedente de la dieta. Está codificada por el gen denominado *SLC5A5* (por *Solute Carrier family 5 member 5*). Existen 254 ortólogos
 25 de NIS humana en vertebrados, 130 de los cuales se encuentran en mamíferos. Todos estos ortólogos tienen potencialmente la capacidad de transportar yoduro dependiente de sodio así como cualquiera de los radioisótopos que transporta la proteína NIS humana. En el caso de las especies humana, varios tipos de primates, rata, ratón, cerdo, ballena, rana, y pez cebra esto está comprobado experimentalmente. Las regiones de
 30 la proteína implicadas en el transporte de yoduro están totalmente conservadas en todas las proteínas ortólogas de NIS humana. Por ello, la proteína NIS a la que se refiere la presente invención incluye la proteína NIS humana y cualquiera de sus ortólogos en otras especies, preferiblemente en primates (tales como por ejemplo, pero sin limitarnos, chimpancé o macaco), rata, ratón, cerdo, perro, vaca, hámster, ballena, rana y pez
 35 cebra.

Preferiblemente, la proteína NIS referida en la presente invención comprende, más preferiblemente consiste en, una secuencia aminoacídica que presenta al menos un 55%, 80%, 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 1 (proteína NIS humana o hNIS) y conserva los aminoácidos responsables del transporte de yoduro.

En otra realización preferida de la composición de la invención, la proteína NIS es humana, más preferiblemente la proteína NIS humana (hNIS) comprende, preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO: 1.

NIS es una proteína de la membrana plasmática, por lo que las EVs, preferiblemente los exosomas, de las células que expresan NIS también comprenderán (expresarán) NIS. Los métodos para detectar si dichas EVs, preferiblemente exosomas, expresan la proteína NIS son los comúnmente conocidos en la técnica, como por ejemplo western-blot, técnicas de inmunofluorescencia o ensayos enzimáticos tipo ELISA, entre otros.

Ejemplos de “células que expresan la proteína NIS” son, pero sin limitarnos, células productoras de la leche materna, células de la placenta (células MSCs de placenta entre otras), células presentes en los órganos donde se expresa endógenamente NIS (tales como, por ejemplo, pero sin limitarnos, tiroides, estómago, intestino, glándulas salivares, riñón, glándula mamaria lactante, placenta, ovario, trompas de Falopio, etc.), así como las líneas celulares generadas artificialmente mediante técnicas de ingeniería genética para comprender una secuencia de ácido nucleico codificante para la proteína NIS, preferiblemente NIS humana, y donde dichas líneas celulares, por tanto, expresan dicha proteína. En una realización preferida, las células que expresan la proteína NIS a las que se refiere la presente invención son células en las que se ha insertado, de manera artificial mediante técnicas de ingeniería genética, una secuencia de ácido nucleico codificante para la proteína NIS, preferiblemente hNIS. Las células que expresan la proteína NIS pueden ser procariotas o eucariotas, preferiblemente eucariotas.

Las “vesículas extracelulares” o “EVs” a las que se refiere la presente invención son microvesículas o nanovesículas, preferiblemente nanovesículas, más preferiblemente exosomas, secretados por las células. Las EVs son heterogéneas y su contenido es muy variado, desde ARN, hasta lípidos, glúcidos y proteínas, incluso ADN tanto nuclear como mitocondrial. En general estas vesículas contienen un gran surtido de proteínas,

tales como enzimas, elementos del citoesqueleto, factores de transcripción, proteínas asociadas integrales de membrana, complejos de histocompatibilidad, etc. Contienen también distintos tipos de ARN, tales como mensajeros, ARN de interferencia y pequeños ARN no codificantes, incluso se ha demostrado que algunos de estos ARNm se pueden traducir a proteínas en las células diana. Los lípidos forman parte de sus membranas, que pueden contener fosfatidil serina, lisofosfatidilcolina, esfingomielina y acilcarnitinas. Estas vesículas están enriquecidas en colesterol y esfingolípidos. La liberación de estas vesículas por parte de las células puede ser espontánea o inducida.

5

10

Los “exosomas” son nanovesículas extracelulares sólidas que son liberadas activamente por las células hacia la matriz extracelular y que contienen mezclas de proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas tales como lípidos y/o miRNAs. Los exosomas se liberan al espacio extracelular tras la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. Este mecanismo fue descrito, y el término “exosoma” acuñado, en los años 80 del siglo XX. Preferiblemente, los exosomas a los que se refiere la presente invención tienen un tamaño de entre 60 y 250 nm, más preferiblemente de entre 100 y 185 nm, y presentan una forma redondeada.

15

20

En otra realización preferida de la composición de la invención, las EVs, preferiblemente los exosomas, secretados por células que expresan la proteína NIS indicados en (i) han sido aislados de leche, más preferiblemente leche materna.

25

Los exosomas de la presente invención, preferiblemente los exosomas de leche, expresan la proteína NIS, preferiblemente la proteína NIS humana (hNIS), y más preferiblemente además expresan, al menos, los marcadores de exosomas ALIX, CD9 y CD63.

30

35

Los exosomas de leche se pueden aislar por cualquiera de los métodos conocidos en el arte para tal fin, por ejemplo, pero sin limitarnos, los descritos en: Drug Dev Ind Pharm. 2019 Mar;45(3):359-364. doi: 10.1080/03639045.2018.1539743; Reprod Biol. 2017 Dec;17(4):341-348. doi: 10.1016/j.repbio.2017.09.007.; o J. Vet. Med. Sci. 74(11): 1523–1525, 2012 doi: 10.1292/jvms.12-0032. Por ejemplo, pero sin limitarnos, dichos exosomas se aíslan mediante un primer paso de desengrasado de la leche materna, previo paso opcional de congelación/descongelación de la leche, un segundo paso en el que se incubaba el producto resultante del primer paso con cuajo, durante

preferiblemente 15 a 20 min, un tercer paso de centrifugación en el que se retiran los productos de la proteólisis como la caseína, y un cuarto paso que comprende varias, preferiblemente dos, ultracentrifugaciones. Finalmente, se puede lavar una o varias veces, preferiblemente dos veces, el producto resultante.

5

Las EVs, preferiblemente exosomas, aislados de leche han sido separados, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, de otros componentes de la leche, tales como lípidos, células o debris.

10

Dentro de las ventajas del uso clínico de las EVs, preferiblemente los exosomas, se puede destacar que su uso evita la transferencia de células al paciente, las cuales pueden tener ADN mutado o dañado. En segundo lugar, y para aplicaciones sistémicas como podría ser el caso en tratamientos terapéuticos, las EVs son pequeñas y circulan fácilmente por el organismo, mientras que en la terapia con células éstas pueden quedar retenidas ya que son demasiado grandes para circular a través de los capilares y su paso por algunos órganos, como los pulmones, podría causar daños graves, como sería una embolia. En tercer lugar, la dosis de EVs administrada puede circular por el organismo en mayor medida y con mayor facilidad en comparación con las células.

15

20

La “leche” a la que se refiere la presente invención puede ser leche materna, es decir leche procedente de una hembra de mamífero que se encuentra en periodo de lactancia, o bien leche procedente de una hembra de mamífero que no se encuentra en periodo de lactancia pero en la que se está estimulando la mama para la producción de leche y, por tanto para la expresión de NIS. Preferiblemente, la leche a la que se refiere la presente invención es leche materna. La procedencia de dicha leche puede ser de cualquier hembra de mamífero, por ejemplo, pero sin limitarnos, de las siguientes especies: humana, vaca, cabra, oveja, dromedario, camello, perro, gato, cerdo, rata, etc. En una realización más preferida, la leche es leche materna procedente de una hembra de mamífero que se encuentra en periodo de lactancia. En una realización aún más preferida, la leche es leche materna procedente de una hembra de humano que se encuentra en periodo de lactancia.

25

30

35

Los elementos comprendidos en la composición de la invención se pueden administrar de manera simultánea o secuencial, o bien, como se ha explicado anteriormente, las EVs, preferiblemente los exosomas, comprendidos en dicha composición pueden ir

cargados con el radioisótopo, es decir, el radioisótopo se puede haber incorporado en la EV, preferiblemente en el exosoma.

5 En otra realización preferida, la composición de la invención es una composición farmacéutica preferiblemente formulada para su administración intravenosa o intraperitoneal.

10 Otro aspecto se refiere al uso de las EVs, preferiblemente exosomas, descritos en la presente invención como vehículo para el transporte y/o acumulación *in vivo* de isótopos radiactivos hacia zonas neoplásicas en un sujeto.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a la composición de la invención para su uso como medicamento, donde dicho medicamento puede ser de uso humano o animal. Dicho medicamento puede estar destinado al tratamiento, prevención, diagnóstico y/o seguimiento de neoplasias en un sujeto o bien al seguimiento y visualización del vehículo (radioisótopo) dentro del organismo del sujeto.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a la composición de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de neoplasias. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición comprende el isótopo radiactivo ^{131}I , $^{188}\text{ReO}_4$ y/o ^{211}At , más preferiblemente ^{131}I .

25 Dentro del término “neoplasias” empleado en la presente invención se incluyen tanto los tumores benignos como los malignos (cáncer), así como las metástasis. Asimismo, dentro de los tumores malignos, y dentro del ámbito de la presente invención, se incluyen, pero sin limitarnos, tanto los tumores sólidos como los tumores hematológicos.

30 En otra realización preferida, la neoplasia a la que se refiere la presente invención es un tumor sólido o hematológico. Más preferiblemente, el tumor sólido es un cáncer. Aún más preferiblemente, dicho cáncer se selecciona de la lista que consiste en: melanoma, mieloma múltiple, leucemia, linfoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer colorectal, cáncer de cabeza y cuello, tumores cerebrales y cáncer de tiroides. En una realización particular, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en:
35 melanoma, adenocarcinoma de ovario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención en el diagnóstico y/o seguimiento *in vivo* de neoplasias.

5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención como reactivo o agente de imagen o contraste para la visualización de neoplasias en un sujeto.

El término “visualización”, tal y como se emplea en la presente invención, incluye el diagnóstico y/o el seguimiento de la evolución de neoplasias en el sujeto, así como el seguimiento de la terapia para determinar la seguridad y/o eficacia de la misma. Dicha
10 visualización se realiza preferiblemente *in vivo*.

El término “diagnóstico” se refiere al proceso para identificar la presencia o ausencia de neoplasias en un sujeto. El término “seguimiento” se refiere al proceso para identificar los eventos que ocurren durante el curso de las neoplasias, e incluye, pero sin limitarnos,
15 la determinación de la presencia o ausencia de metástasis, la determinación de la respuesta a un tratamiento terapéutico, así como la determinación de la progresión (empeoramiento) o retroceso (mejora) de la neoplasia.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la visualización de
20 neoplasias se realiza mediante la técnica PET o SPECT.

“PET” es la técnica conocida en el estado del arte como tomografía de emisión de positrones. “SPECT” es la técnica conocida en el estado del arte como tomografía
25 computerizada por emisión de fotones únicos. Puesto que son técnicas bien conocidas, el experto en la materia sabrá cómo aplicarlas según lo expuesto en la presente invención.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende un isótopo radiactivo que se selecciona de la lista que consiste
30 en: ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{211}At , $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$, $^{188}\text{ReO}_4$, y $^{18}\text{F-BF}_4$, preferiblemente ^{124}I y $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$.

Si la técnica de visualización elegida es PET, la composición de la invención preferiblemente comprende un isótopo radiactivo que se selecciona de la lista que
35 consiste en: ^{124}I , ^{211}At , $^{18}\text{F-BF}_4$.

Si la técnica de visualización elegida es SPECT, la composición de la invención preferiblemente comprende un isótopo radiactivo que se selecciona de la lista que consiste en: ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ y $^{188}\text{ReO}_4$.

5 En otra realización preferida, la neoplasia es un tumor sólido o hematológico, más preferiblemente un cáncer, aún más preferiblemente un cáncer seleccionado de la lista que consiste en: melanoma, mieloma múltiple, leucemia, linfoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer colorectal, cáncer de cabeza y cuello, tumores
10 cerebrales y cáncer de tiroides. En una realización particular, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: melanoma, adenocarcinoma de ovario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de visualización de neoplasias *in vivo* en un sujeto donde dicho método comprende el uso de la composición de la
15 invención. Preferiblemente, dicho método comprende las siguientes etapas: (a) administrar al sujeto, preferiblemente mediante inyectable, las EVs, preferiblemente los exosomas, descritos en la presente invención, (b) administrar al sujeto, simultánea o secuencialmente a la administración de la etapa (a), al menos un isótopo radiactivo, a
20 no ser que éste se haya incorporado previamente dentro de las EVs, en cuyo caso se hará una única administración, en la etapa (a), de las EVs cargadas con el isótopo radiactivo, y (c) visualizar el destino de las EVs a la neoplasia, examinándose así la presencia de neoplasias en el sujeto mediante la identificación de la localización del isótopo radiactivo administrado en la etapa (a o b). El paso (c) de este método se puede
25 realizar mediante las técnicas de visualización descritas anteriormente en la presente descripción.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para el tratamiento y/o prevención de neoplasias en un sujeto, donde dicho método comprende las siguientes etapas: (a)
30 administrar al sujeto, preferiblemente mediante inyección, las EVs, preferiblemente los exosomas, descritos en la presente invención, y (b) administrar al sujeto, simultánea o secuencialmente a la administración de la etapa (a), al menos un isótopo radiactivo. O bien dicho método comprende la etapa de administrar al sujeto, preferiblemente mediante inyección intravenosa o intraperitoneal, las EVs preferiblemente los
35 exosomas, descritos en la presente invención, donde a dichas EVs se les ha incorporado

previamente un isótopo radiactivo. En una realización preferida de este método, el isótopo radiactivo se selecciona de la lista que consiste en: ^{131}I , $^{188}\text{ReO}_4$ y/o ^{211}At , más preferiblemente ^{131}I .

5 En otra realización preferida de estos métodos, la neoplasia es un tumor sólido o hematológico. Más preferiblemente, el tumor sólido es un cáncer. Aún más preferiblemente, un cáncer seleccionado de la lista que consiste en: melanoma, mieloma múltiple, leucemia, linfoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer
10 colorectal, cáncer de cabeza y cuello, tumores cerebrales y cáncer de tiroides. En una realización particular, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: melanoma, adenocarcinoma de ovario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides.

El término "sujeto", tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a un
15 individuo humano o no humano, por ejemplo mamíferos tales como perros, gatos, caballos, conejos, ratones, vacas, cerdos, ovejas, cobayas, etc. Preferiblemente, el sujeto al que se refiere la presente invención es humano.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes
20 no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Caracterización de exosomas derivados de la leche materna humana (LMH). Exosomas aislados de leche materna humana obtenidos durante las 3^a, 9^a y 15^a
30 semanas de lactancia. **A)** Representación gráfica de la distribución del tamaño por análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). **B)** Tabla de distribución de tamaño y concentración obtenida por NTA y mediciones de potencial zeta por dispersión dinámica de luz (DLS). **C)** Evaluación de la morfología de los exosomas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), imágenes representativas, barra de escala de 50 nm.
35 **D)** Western blot representativo de marcadores de exosomas Alix, CD9 y CD63. **E)**

Imágenes de fluorescencia representativas de la captación de exosomas de LMH en diferentes tipos de células cancerosas (de izquierda a derecha Hela, B16F10 y 8505C). Los exosomas se marcaron con una sonda PKH67 y su internalización se visualizó usando un microscopio de fluorescencia (Leica DM4B).

5

Fig. 2. Caracterización de la expresión de hNIS en exosomas de leche materna humana. Determinación de la expresión de la proteína hNIS mediante western-blot (panel superior) en exosomas aislados de leche materna recogida a distintas semanas durante el periodo de lactancia. Se cargaron 50 µg de exosomas en cada pocillo. La expresión de la proteína hNIS de los exosomas se comparó con células control positivas que expresan NIS (MDCK-hNIS) y negativas que no expresan NIS (MDCK y Hela). Se cargaron 20 µg de las células control. Se muestran los niveles de expresión de la proteína actina (panel inferior) como control de carga de las muestras.

10

15

Fig. 3. Caracterización de la expresión funcional de hNIS en exosomas de leche materna. Ensayo de la captación de yodo de células Hela (1×10^5) incubadas durante 45 minutos con 20 µg de exosomas aislados de leche materna humana. Tras 48 horas de incubación se analizó la captación/transporte de yoduro al interior celular. El ensayo de transporte de yoduro se realizó en presencia de 20 µM de yoduro (barras negras) o 20 µM de yoduro más 80 µM de perclorato (barras blancas). El perclorato es un inhibidor competitivo del transporte de yoduro por NIS. Las células Hela se usaron como control negativo y las células Hela infectadas con 5 y 50 pfu del adenovirus Ad-CMV-hNIS como control positivo. La captación/transporte se expresa como picomoles y se normaliza para la cantidad de ADN celular en cada pocillo. Los datos representan la media \pm SE de al menos tres experimentos realizados por triplicado.

20

25

Fig. 4. Análisis de la biodistribución mediante Imágenes de Fluorescencia (FRI) de exosomas de leche materna marcados con sondas en modelos animales con tumor. Se utilizaron ratones inmunodeprimidos con tumores subcutáneos producidos por la inyección de 3×10^6 células tumorales Hela. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño aproximado de 0,5 cm² fueron inyectados de forma intravenosa con 20 µg de exosomas aislados de leche materna humana (LMH) previamente marcados con la sonda PKH67. Mediante el sistema IVIS Illumina II se observó señal fluorescente en los tumores *in vivo*. Los ratones fueron sacrificados, distintos tejidos y el tumor separados y se midió la señal que emitía la sonda en cada tejido con un IVIS Illumina II. Se muestran

30

35

imágenes representativas de los tumores de los animales inyectados con la sonda PKH67 (**A superior**), o con los exosomas de LMH marcados con la sonda (**A inferior**). Finalmente, se cuantificó la señal con el Software Xenogen-IVIS (**B**). Los datos representan la media \pm SD de al menos tres muestras de tumores o tejidos.

5

Fig. 5. Análisis de la biodistribución y expresión funcional de NIS *in vivo* mediante SPECT-CT. Ratones inmunodeprimidos con tumores subcutáneos producidos por la inyección de 3×10^6 células tumorales Hela fueron inyectados intravenosamente con PBS (**A**), o 20 μ g de exosomas de LMH (**B**). Tras 10 días los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis de 18,5 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4$ (pertechnetato) y se registraron imágenes mediante un nano-SPECT-CT. El círculo blanco indica la posición del tumor (T). También se indican la posición del estómago (E), y vejiga (V).

Fig. 6. Potencial terapéutico de los exosomas de leche materna humana. Como modelo *in vivo* se utilizaron ratones inmunodeprimidos a los que se implantaron subcutáneamente 3×10^6 células tumorales Hela. Cuando el tumor alcanzó el tamaño aproximado de 100 mm^3 , a los 7 días, se separaron aleatoriamente en 2 grupos, en uno se inyectó intravenosamente PBS (animales control representado con círculos), y en el segundo grupo 20 μ g de exosomas aislados de leche materna humana (Exo LMH) (representado con cuadrados). Al día 11 tras la implantación de células tumorales cada grupo a su vez se dividió en 2 subgrupos aleatoriamente, inyectando de forma intraperitoneal 200 μ l de PBS a los subgrupos no tratados (símbolos con fondo blanco) o 2 mCi de ^{131}I a los subgrupos tratados (símbolos con fondo negro). Posteriormente, se realizó el seguimiento del crecimiento de los tumores hasta el día 30 post-implantación de las células tumorales. Se utilizaron 6 animales por subgrupo. Los valores representan la media \pm error estándar. El análisis estadístico se realizó con un “two-sided Student’s t-test” y se indica como un * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Se indican los resultados de los ratones inyectados con exosomas y tratados, frente a los inyectados con exosomas pero no tratados.

30

Fig. 7. Potencial terapéutico de exosomas de leche materna humana para diagnóstico y tratamiento de las metástasis. Como modelo *in vivo* se utilizaron ratones inmunodeprimidos a los que se implantaron intraperitonealmente (IP) 1×10^6 células tumorales SKOV3-LUC. Cuando mediante el equipo IVIS-Illumina se observaron más de 2 nódulos tumorales, se inyectaron 20 μ g de exosomas de LMH

35

intraperitonealmente (IP). **A)** Imágenes de bioluminiscencia de animales con tumores e inyectados IP con exosomas de LMH (izquierda) o controles (derecha). **B)** Imágenes de fluorescencia de animales con tumores e inyectados IP con exosomas de LMH marcados con sonda fluorescente (izquierda) o controles (derecha). **C)** Imágenes de SPECT-CT de ratones a los que se implantaron intraperitonealmente 1×10^6 células tumorales SKOV3-LUC y posteriormente 20 μg de exosomas de LMH. Tras 10 días los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis de 18,5 MBq de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ (pertechnetato) y se registraron imágenes mediante un nano-SPECT/CT. **D)** Imágenes de SPECT-CT de ratones controles.

10

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de los exosomas que expresan la proteína NIS, preferiblemente de exosomas aislados de leche materna, para transportar radioisótopos específicamente a zonas neoplásicas en el organismo para su posterior visualización en diagnóstico o para su tratamiento terapéutico.

15

Ejemplo 1. Caracterización de los exosomas de leche materna humana (LMH).

20

Se obtuvieron y aislaron exosomas de leche materna humana (ver Ejemplo 9, Materiales y métodos) y se procedió a su caracterización. Para determinar las condiciones más adecuadas de obtención de exosomas, así como la validez funcional posterior de dichos exosomas, se procedió a caracterizar exosomas de leche materna humana (LMH) a las 3, 9 y 15 semanas de lactancia. Mediante el sistema NTA se vio que los exosomas tienen un rango de distribución de tamaño algo superior a lo observado en exosomas de células hPMSCs (MSCs de placenta humana), y que va principalmente entre 100 y 250 nm, con un tamaño promedio de entre 165 a 185 nm, y con un pico máximo de concentración principal de exosomas entre 160 a 185 nm (Fig. 1A). La concentración de exosomas fue mayor en leche cuando el periodo de lactancia fue más largo, así como un tamaño promedio inferior obtenidos con el análisis de dispersión dinámica de luz (DLS) (Fig. 1B). Mediante TEM se observó que los exosomas tienen una forma redonda con un diámetro de 140 nm (Fig. 1C).

25

30

La expresión de los marcadores de exosomas como ALIX, CD9 y CD63 se analizó mediante western-blot (Fig. 1D). Finalmente, se exploró la capacidad de captación de exosomas de LMH en varias líneas celulares tumorales de diferente origen: Hela (cervix), B16F10 (melanoma murino) y 8505C (tiroides) (Fig. 1E). Los exosomas se
5 marcaron con una sonda de fluorescencia verde de carbocianina lipofílica (PKH67). Los resultados mostraron que los exosomas de LMH son integrados eficientemente en diferentes tipos de células tumorales independientemente del origen celular.

Ejemplo 2. Caracterización de la expresión de hNIS en exosomas de LMH.

10

El papel de la expresión de NIS en la glándula mamaria lactante es la acumulación de yodo en la leche materna para que pase al bebé lactante y éste tenga yodo para la síntesis de sus propias hormonas tiroideas. También se ha definido que este yodo pudiera ejercer un papel protector de infecciones. NIS se expresa en las células de la
15 glándula mamaria solo durante el periodo de la lactancia materna. Aquí, el objetivo era determinar si se podían obtener exosomas de leche materna humana durante el periodo de lactancia, y analizar si esos exosomas tenían expresión endógena de NIS. Mediante western-blot (Fig. 2) se vio que los exosomas extraídos de LMH efectivamente expresan NIS independientemente del tiempo de lactancia que llevaran las donantes y dicha
20 expresión no decaía con el tiempo.

Ejemplo 3. Caracterización funcional de NIS en exosomas de leche materna humana.

25

El punto crítico para usar NIS como herramienta teragnóstica es su capacidad para acumular isótopos radioactivos. Para determinar la funcionalidad de la expresión endógena de NIS se realizaron experimentos *in vitro* de acumulación de yoduro radioactivo (Fig. 3).

30

Lo más interesante de los resultados es que las células tumorales Hela con incorporación de exosomas aislados de leche materna humana acumulan yoduro a niveles similares a los obtenidos en el control positivo (Fig. 3). El control son células Hela, que no expresan endógenamente NIS, infectadas con 5 y 50 pfu de un adenovirus para que expresen NIS (Ad-CMV-hNIS). Estos resultados indican que el hNIS presente
35 en los exosomas ha sido transferido a la célula diana, quedando incorporado en la

membrana plasmática de esta célula, y que es funcional. Estos resultados confirman que los exosomas de leche materna expresan NIS funcional y sugieren que éstos podrían usarse como vehículos terapéuticos.

5 **Ejemplo 4. Biodistribución de exosomas de LMH en modelos animales con tumor mediante Imágenes de Fluorescencia.**

El siguiente objetivo fue determinar la biodistribución *in vivo* de los exosomas de leche materna en tejidos no tumorales y el posible tropismo hacia tumores. Para esto se utilizaron técnicas de imagen no invasivas. La primera técnica utilizada fue mediante imágenes de fluorescencia (FLI, del inglés “Fluorescence imaging”). Para evaluar la biodistribución *in vivo* se utilizaron ratones atómicos en los que se inyectaron subcutáneamente células tumorales Hela. Una vez el tumor subcutáneo alcanzó un tamaño aproximado de 0,5 cm², se realizó la administración intravenosa de 20 µg de exosomas aislados de leche materna marcados con la sonda fluorescente PKH67 (Sigma-Aldrich). La señal emitida por la sonda en los ratones se detectó con un IVIS Illumina II 24 y 48 horas después de la inyección (Fig. 4). Como control experimental se utilizaron ratones a los que se les administró PBS y/o ratones a los que se les inyectó la misma cantidad de sonda fluorescente.

20 Posteriormente, los animales fueron sacrificados, los distintos órganos separados y se cuantificó *ex vivo* la señal de cada uno de ellos con el software Xenogen-IVIS. Se vio que la señal de los exosomas de leche materna se acumula mayoritariamente en los tumores (Fig. 4). Se observaron señales fluorescentes en otros tejidos, aunque en parte se debe a la retención de la propia sonda en esos tejidos como se puede observar en los controles (Fig. 4). El tratamiento con 40 µg de exosomas no dio lugar a una mejora significativa de la acumulación en los tumores, pero sí a un aumento considerable de la señal en otros tejidos no específicos (datos no mostrados). Resultados similares se obtuvieron al emplear EVs de LMH en lugar de exosomas (datos no mostrados), pero se eligieron los exosomas para realizar los siguientes experimentos por la mayor pureza y homogeneidad de las muestras.

35 **Ejemplo 5. Análisis de la biodistribución de exosomas de LMH *in vivo* mediante SPECT-CT.**

Utilizando el mismo modelo *in vivo* de tumores subcutáneos producidos por células Hela de los apartados anteriores, y tras 7 días de la inyección de los exosomas de leche materna, se inyectó de forma intraperitoneal a los animales 18,5 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4$. La distribución del radioisótopo y, por tanto, de la presencia de NIS *in vivo*, se obtuvo mediante un SPECT-CT (Fig. 5). Se puede observar la acumulación del radiotrazador en los tumores de los animales tratados con exosomas de LMH (Fig. 5B), y no en los controles (Fig. 5A).

Se puede ver que esta acumulación no es tan elevada como ocurre en tejidos como el estómago o la vejiga. Sin embargo, en estos últimos el trazador, a diferencia de lo que ocurre en el tumor, está de paso y no se acumula. La señal se mantuvo al menos durante 14 días en el tumor. Por tanto, los exosomas de LMH analizados tienen tropismo natural por los tumores y el hNIS endógeno es transferido al tumor demostrando que es funcional.

15

Ejemplo 6. Potencial terapéutico de los exosomas de leche materna.

En el apartado anterior se ve que la cantidad de radioisótopo que acumulan los tumores aparentemente no es muy elevada. Por lo que el siguiente paso fue explorar si esa expresión es suficiente para una terapia adecuada. Para ello, se utilizó nuevamente el modelo *in vivo* de los apartados anteriores. Se probó el efecto terapéutico de la terapia con radioyodo (RAI) cuando a los animales con tumor se les inyectaron exosomas aislados de leche materna humana (Fig. 6). A los 7 días de la implantación de las células tumorales se inyectaron intravenosamente a los animales 20 μg exosomas de leche materna. En los controles se inyectó PBS. Tras 4 días de esta inyección se realizó el tratamiento terapéutico con RAI ó con PBS como control. El tamaño tumoral aproximado pre-RAI fue de 200 mm^3 . En los subgrupos donde se inyectaron exosomas y se trataron con RAI el tumor creció algo más del doble, pero en el resto de grupos, tanto controles como no tratados con RAI, el tumor creció más de 5 - 7,5 veces. Estos resultados ponen de manifiesto la gran efectividad de la RAI como terapia antitumoral *in vivo* cuando se combina con los exosomas de leche materna.

Ejemplo 7. Potencial teragnóstico de los exosomas de leche materna humana en metástasis.

35

Para determinar si los exosomas de LMH se podrían utilizar como agentes teragnósticos en clínica tanto para el diagnóstico temprano de las metástasis, como para un posible tratamiento combinado con ^{131}I , se utilizó un modelo *in vivo* multinodular mediante la implantación de tumores intraperitonealmente con células SKOV3-LUC. Una vez observados los tumores mediante bioluminiscencia, se administraron 20 μg de exosomas de LMH marcados con una sonda fluorescente. Posteriormente, se adquirieron imágenes de los tumores por bioluminiscencia (Fig. 7A) y del acúmulo de los exosomas por fluorescencia (Fig. 7B). Se ve claramente que estos últimos se localizan en los tumores. Finalmente, se analizó si la expresión de NIS procedente de los exosomas de LMH acumulados en los tumores y en las metástasis era funcional mediante SPECTCT. Se observó una clara acumulación del radioisótopo $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ en los nódulos tumorales dispersos en el peritoneo (Fig. 7C y D). Esto confirma el poder diagnóstico (y posiblemente terapéutico) de los exosomas de LMH en metástasis.

15 **Ejemplo 8. Resumen de los resultados.**

Se ha identificado y caracterizado la expresión endógena de hNIS en exosomas de leche materna (Figura 2). Además, se ha demostrado:

- 20 - Que los exosomas de leche materna migran hacia las células tumorales mediante pruebas de imagen no radioactivas (Figura 4) y usando pruebas de imagen con radioisótopos acumulables por NIS (Figura 5).
- Que la transferencia de hNIS desde los exosomas de leche al tumor permite la acumulación de radioisótopos acumulables por NIS en el tumor (Figura 5 y 6).
- 25 - Que esa acumulación de radioisótopos transportables por NIS con altos niveles energéticos (en este caso ^{131}I) da lugar a una reducción muy significativa del crecimiento tumoral (Figura 6).
- 30 - Que los exosomas de leche también migran hacia las metástasis del tumor (Figura 7) y que son capaces de incorporar radioisótopos transportables por NIS (Figura 7).

35 **Ejemplo 9. Materiales y métodos.**

9.1. Cultivos celulares y tratamientos

Líneas celulares

- 5 Células Hela: las células HeLa (ATCC CCL-2) es una línea celular adherente inmortalizada que deriva de un adenocarcinoma de cérvix humano. Esta línea celular fue cultivada y mantenida en DMEM 4,5 g/l de glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 10%, con antibióticos/antimicóticos al 5% y con 200mM de L-glutamina
- 10 Células 8505C: las células 8505C son de un carcinoma de tiroides humano no diferenciado. Las 8505C fueron cultivadas y mantenidas en medio RPMI-1640 (Lonza) suplementado con suero fetal bovino al 10%, con antibióticos antimicóticos al 5% y con 200mM de L-glutamina.
- 15 Células B16F10: las células B16F10 son una línea celular de melanoma de ratón, caracterizadas por tener un crecimiento muy rápido y ser altamente invasivas o metastáticas. Fueron crecidas y mantenidas en medio DMEM 4,5 g/l de glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 10%, con antibióticos antimicóticos al 5% y con 200mM de L-glutamina, tal como se ha indicado anteriormente.

20

Mantenimiento de las células en cultivo

Las líneas celulares utilizadas fueron mantenidas en el interior de un incubador al 5% CO₂ y a 37°C en diferentes placas de cultivo de 60, 100 y/o 150 cm² de superficie, en
25 frascos de cultivo de 25, 75 y/o 150 cm² de superficie o en placas multipocillo de 6, 12, 24 y/o 96 pocillos en función del objetivo del experimento. Las células fueron crecidas en condiciones de semi-confluencia y fueron tripsinizadas cada 3-4 días.

Pase celular

30

Cuando las células alcanzaron la confluencia, fue necesario pasarlas a otra placa para permitir que siguieran creciendo. Para ello, se aspiró el sobrenadante y se lavó la placa con PBS-EDTA 1X (Lonza), eliminando cualquier resto del suero que pudiera inactivar la tripsina, se añadió tripsina 0,05% 1X (Lonza) a las células y se dejó actuar durante 3-
35 5 minutos. Cuando las células estuvieron despegadas, se añadió medio completo para

inactivar la tripsina, se recogió todo el medio añadiéndolo en un falcón y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min para que las células precipitasen. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet en medio fresco y se sembró el número de células deseadas en una placa nueva. Para conocer la densidad celular, se depositaron 10 µl de suspensión celular en una cámara de Neubauer (BRAND®), se hizo el recuento de células presentes en ella utilizando un microscopio de contraste de fases Leica DMi1 (Leica Microsystems) y se estimó la concentración celular.

Congelación y descongelación

Después de tripsinizar y centrifugar las células a 1.000 rpm, el pellet se resuspendió en medio de congelación, constituido por un 90% de suero fetal bovino o FBS (Lonza) y un 10% dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) y se introdujo en crioviales. La disminución de la temperatura durante el proceso de congelación se realizó de manera paulatina utilizando contenedores de congelación (Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers, ThermoScientific) y depositándolos en el congelador de -80°C. Transcurridas 48 horas, los crioviales pueden ser transferidos al contenedor de nitrógeno líquido donde se almacenarán hasta que se requiera su uso.

Para la descongelación, los crioviales extraídos del nitrógeno líquido se introdujeron rápidamente en un baño a 37°C. Cuando el medio de congelación estaba prácticamente descongelado, se diluyó en medio completo y se centrifugó a 1000 rpm. El pellet celular se resuspendió en medio completo y se sembró en una placa o flask de cultivo, cambiando el medio 24 horas después de la descongelación.

Vectores adenovirales e infecciones

El vector adenoviral utilizado fue Ad-hNIS (también conocido como Ad10), construido en base al adenovirus de serotipo 5 y el gen de NIS humano precedido por el promotor de citomegalovirus (CMV) mediante el sistema AdEasy. El Ad-hNIS fue diseñado y proporcionado por el Dr. George Vassaux (INSERM, Niza, Francia). El número de partículas virales infectivas por células (pfu/célula) presentes en el medio de cultivo fue expresado como multiplicidad de infección (MOI).

Para realizar la infección adenoviral, se sembraron las células a la concentración celular deseada y se mantuvieron en cultivo 24 horas hasta que la confluencia fuese del 70%. A continuación, el Ad-CMV-hNIS fue diluido en medio sin suero a diferentes multiplicidades de infección (5 y 50 pfu), se añadió a las células y se movió suavemente la placa para asegurar que se distribuyera bien por toda la superficie de cultivo. El volumen utilizado para infectar las células fue $\frac{1}{4}$ del volumen final total en el que se incuban las células en la placa o pocillo, con el que se consigue que cubra toda la superficie del cultivo y maximice el número de interacciones entre los virus y las células. Las células se incubaron con el medio de infección a 37°C durante 45 minutos, posteriormente se añadió medio fresco completo hasta completar el volumen final total y se incubaron a 37°C hasta que fueron utilizadas.

El volumen de virus utilizado fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen virus } (\mu\text{l}) = (\text{MOI} \times \text{número de células}) / (\text{Título viral})$$

Siendo MOI la multiplicidad de infección viral, es decir, el número de partículas infecciosas por célula (pfu/célula) a la que se hizo la infección y siendo el título viral el número de partículas virales en 1 ml.

20 Tratamientos con exosomas

Para los experimentos de captación e internalización de los exosomas *in vitro* se emplearon diferentes líneas celulares tumorales HeLa, B16F10 y 8505C. Las células se sembraron a la densidad deseada, en función de la superficie de cultivo utilizada, en medio DMEM completo y se incubaron durante 16-24 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, fueron lavadas dos veces con PBS 1X y se incubaron con diferentes cantidades de los exosomas de interés o de PBS, en el caso de los controles, diluidas en un volumen mínimo de medio DMEM completo sin exosomas durante 45 minutos a 37°C. El volumen mínimo utilizado permitió cubrir toda la superficie de cultivo y se corresponde con $\frac{1}{4}$ del volumen final total en el que se incuban las células en los pocillos o placas de cultivo empleados. Transcurrido ese tiempo, se realizaron 2 lavados. Se añadió medio fresco completo sin exosomas y se incubaron 48 horas antes de realizar los experimentos de interés. Se siguieron diferentes protocolos de administración de exosomas, añadiendo una única dosis 20 μg o de 40 μg de exosomas o añadiendo dos dosis seriadas de 20 μg separadas por un intervalo de tiempo de 24 horas.

9.2. Aislamiento y cuantificación de los exosomas

Aislamiento de exosomas de LMH

5 La leche de las diversas donantes fue congelada hasta la extracción. Para la extracción,
las muestras se descongelan a 4°C y se eliminó la grasa mediante doble centrifugación
a 3000g durante 10 min a temperatura ambiente. A 50 ml del sobrenadante se le
añadieron 500 µl de cuajo y se incubó durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se
centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 5000g para retirar la caseína y los otros productos
10 de la proteólisis.

El sobrenadante siguió un protocolo similar al del resto de extracciones de exosomas,
en el que se realizó una primera centrifugación de 30 minutos a 13.000g a 4°C en la que
las EVs quedan en el pellet. Tras una ultracentrifugación a 100.000 g y 4°C durante 60
15 minutos, seguida de otros dos lavados con PBS a 135.000g durante 90 minutos, se
obtuvieron los exosomas resuspendidos en HEPES (Centrifuga TL-100 Beckman
Coulter).

Cuantificación de los exosomas

20 La cuantificación de las vesículas extracelulares aisladas, exosomas y microvesículas,
se estimó determinando la concentración de proteína total utilizando el método
colorimétrico basado en el ácido bicínico o BCA (Pierce, Thermo Scientific). Con este
objetivo, se estableció una curva de calibrado o recta patrón utilizando concentraciones
25 conocidas de albúmina de suero bovina (BSA) comprendidas en un rango entre 0-8
µg/µl. La concentración de las muestras se determinó por triplicado. Para ello, se utilizó
una placa de 96 pocillos, donde se depositaron las muestras correspondientes con los
valores de la recta patrón y/o con las muestras de exosomas y se añadió 200 µl del
reactivo, siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se incubó en
30 oscuridad a 37°C durante 30 minutos y se realizó la medida de absorbancia de la placa
a 562 nm utilizando un equipo TECAN® (SPARK). La concentración de exosomas se
calculó extrapolando los valores de las absorbancias en la recta patrón previamente
establecida.

35 9.3. Caracterización de exosomas

El análisis morfológico de los exosomas se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando un microscopio de transmisión T20-FEI (Tecnai, Thermoionic transmission electron microscope).

5 La determinación del tamaño y la concentración de las vesículas extracelulares aisladas se realizaron a través del análisis de rastreo de nanopartículas (NTA). Se trata de una técnica que emplea la dispersión de la luz y el movimiento browniano para obtener la distribución de tamaño y la concentración de las partículas en suspensión. Para ello, los exosomas aislados se diluyeron en PBS y se analizaron usando un NanoSight NS500
10 (Malvern Instruments GmbH) equipado con cuatro láseres a una longitud de onda de 405 nm, 488 nm, 532 nm y 638 nm y una cámara sCMOS de alta sensibilidad. Las muestras se introdujeron manualmente y se grabaron tres videos de 30 segundos a una velocidad de fotogramas de 25 fotogramas por segundo. El software NTA 3.0 se utilizó para monitorear partículas individuales a un nivel de cámara 10, con el algoritmo de
15 Ajuste de la Longitud del Tramo Finito o FTLA (Finite Track Length Adjustment) establecido en una longitud mínima automática y un umbral de detección con desenfoque conservador.

El potencial zeta o potencial electrocinético es una media de la magnitud de las
20 interacciones electrostáticas, repulsión o atracción, de las partículas. Su medición aporta información sobre la estabilidad de las partículas y sobre su estado de agregación. Para determinar el potencial zeta, se midió la dispersión dinámica de la luz (DLS). Los exosomas aislados se diluyeron en PBS 1X y se introdujeron en un tubo fotomultiplicador situado a 90° del haz de luz incidente para su análisis. El equipo
25 empleado fue un Zetasizer NanoSERIES (Malvern Instruments GmbH) equipado con un láser de helio/neón de 20 mW a una longitud de onda de 633 nm.

9.4. Análisis de la expresión proteica

Inmunodetección por western-blot

30

Esta técnica fue utilizada para analizar la expresión de las diferentes proteínas de interés.

Tras su cuantificación con el método del BCA como se describe más arriba, los exosomas fueron directamente resuspendidos en buffer de carga Laemmli que contenía DTT (un agente reductor) y se calentaron a 37°C durante 30 minutos ocasionando la desnaturalización de las proteínas antes de cargarse en el gel discontinuo de poliacrilamida al 9%. El marcador de pesos moleculares empleado fue Prestained Protein Ladder –Mid-range molecular weight (Abcam). El gel superior o gel concentrador contuvo un porcentaje bajo de acrilamida constante para cada gel y un pH de 6,8. Mientras que el gel inferior o separador se caracterizó por poseer un mayor porcentaje de acrilamida, que oscilará en función del tamaño de la proteína que se quiera separar, y un pH de 8,8. La electroforesis se corrió durante 20-30 minutos a 40V para facilitar la entrada de las muestras en el gel y posteriormente a 100-120 V, permitiendo que las muestras migren hasta que el frente de azul bromofenol presente en el tampón de carga se saliese del gel. Para realizar la electroforesis se utilizó un sistema vertical Mini-PROTEAN (Bio Rad). Posteriormente, se realizó la transferencia a 100 V durante 1,5 horas en tampón de transferencia, se bloqueó la membrana durante 1 hora con solución de bloqueo, tampón Tween-TBS (T-TBS) con 5% (p/v) de leche desnatada en polvo y se incubó con el anticuerpo deseado a su concentración óptima en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavó la membrana con tampón T-TBS durante 10 minutos y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario asociado a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó la membrana 2 veces con T-TBS durante 10 minutos y una vez más con TBS durante otros 10 minutos, y se reveló la membrana utilizando un sistema de detección quimioluminiscente con ECL (Amersham Pharmacia Biotech). El sistema de captación de imagen utilizado fue el equipo Amersham Imager 680 (GE Healthcare Life Science). Después de la detección del anticuerpo de interés, las membranas de PVDF fueron incubadas con una solución de eliminación 1X Restore™ Western Blot Stripping Buffer en agitación durante 15 minutos, se bloqueó la membrana con solución de bloqueo durante 30 minutos y se continuó incubando las membranas con los anticuerpos siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

30

La inmunodetección de NIS humana se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal anti-NIS TE2A3 (1:500) generado en ratón y como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo anti-IgG de conejo unido a HRP (1:2000; Chemicon International).

35 Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Para los experimentos de captación e internalización de los exosomas *in vitro* se emplearon diferentes líneas celulares tumorales HeLa, B16F10 y 8505C. Se sembraron 2×10^4 células sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos durante 16-24 horas en medio DMEM completo, antes de ser lavadas dos veces con
5 PBS y ser incubadas con diferentes cantidades (20 μg , 40 μg o 20+20 μg) de los exosomas en un volumen mínimo de medio DMEM completo sin exosomas durante 45 minutos a 37°C. El volumen mínimo utilizado permite cubrir toda la superficie de cultivo y se corresponde con $\frac{1}{4}$ del volumen final total en el que se incuban las células en el pocillo. A continuación, se añadió medio fresco completo sin exosomas y se incubaron
10 48 horas. Posteriormente, se fijaron las células de los cubreobjetos y se continuó con el protocolo de inmunofluorescencia, para lo cual se incubó con el anticuerpo primario anti-NIS TE2A3 diluido en PBS-BSACMT a temperatura ambiente en una cámara húmeda durante 1 hora, se lavó con PBS tres veces, y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se analizó la tinción
15 inmunofluorescente utilizando un microscopio invertido Nikon ECLIPSE TS100 (Nikon Instruments Europeam B.V; Amsterdam, Holanda) conectado a una lámpara de luz UV.

Ensayo de captación de yodo

20 Los ensayos de captación de yodo permiten analizar la funcionalidad de NIS.

Para los experimentos sobre el estudio *in vitro* de la funcionalidad de NIS presente en los exosomas se empleó la línea celular HeLa. Tras haber sembrado las células en placas de 12 pocillos, se incubaron 24 horas a 37°C. Después, se lavaron las células un
25 par de veces con PBS 1X y se incubaron en un volumen mínimo de medio DMEM completo sin exosomas al cual se añadió una cantidad determinada de los exosomas durante 45 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se añadió medio fresco completo sin exosomas y se incubaron 48 horas. Posteriormente, se continuó con el protocolo del ensayo de captación.

30

Dicho ensayo de captación consistió en la incubación durante 1 hora a 37°C con PBS suplementado con 20 μM de IK y 100 μCi 125 I/ μmol I-. Como control adicional para determinar que el transporte de yoduro se debe específicamente a NIS, se incubaron las células con la solución anterior y con 80 μM de NaClO_4 , compuesto que inhibe
35 competitivamente el flujo de iones de yodo dependiente de NIS. Cuando el transporte

de yodo alcanzó el equilibrio, el medio radiactivo fue aspirado, los pocillos lavados dos veces e incubados con etanol absoluto frío a 4°C durante 20 minutos, para permitir que el yodo acumulado en las células salga al medio. La radiactividad fue cuantificada en un contador de centelleo gamma (Wallac Wizard 3' 1480 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer). Para normalizar los valores obtenidos por el número de células en cada pocillo, se precipitó el DNA con ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich) y se cuantificó con el método de la difenilamina. La captación de yodo se expresó como pmol de I-/µg de DNA en el pocillo. Los resultados son la media de al menos 3 experimentos diferentes realizando en cada experimento triplicados o cuadruplicados de cada una de las condiciones analizadas.

9.5. Métodos *in vivo*

Inducción del modelo tumoral *in vivo*

Para la realización de la experimentación *in vivo* se emplearon ratones hembras BALB/c nu/nu de entre 6-8 semanas de edad procedentes de Harlan-Ibérica (Harlan-Ibérica, Barcelona, España). Los animales fueron estabulados y mantenidos en jaulas individualmente ventiladas (IVC) en condiciones de esterilidad y la comida y agua proporcionada había sido previamente esterilizada. Antes de realizar cualquier procedimiento experimental, los ratones tuvieron cuatro días para aclimatarse. Transcurrido ese tiempo, se inyectó subcutáneamente (s.c.) 2×10^6 células HeLa resuspendidas en 100 µl de PBS para generar tumores subcutáneos en el flanco de los animales.

El seguimiento del crecimiento tumoral se realizó utilizando calibre para medir el ancho y el largo del tumor cada 2 días. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la superficie del tumor:

$V=4/3 * \pi * a^2 * b$ donde a y b son los radios ancho y largo, respectivamente.

Cuando los tumores alcanzaron el tamaño adecuado, en torno a 0,5 cm² de superficie, los ratones se separaron aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales y se procedió con la experimentación. Con la finalidad de establecer el tropismo natural *in vivo* de los exosomas, se inyectaron diferentes dosis de exosomas (20 µg, 40 µg o

20+20 µg) resuspendidos en 100 µl de PBS utilizando diferentes vías de administración como la intravenosa (i.v) o la intraperitoneal (i.p.) a cada ratón. Mientras que como control se administró exclusivamente PBS.

5 Estudio del tropismo mediante técnicas de imagen molecular

Se emplearon diferentes técnicas de imagen no invasivas, como la imagen por fluorescencia (FLI) y el SPECT/CT que permitieron realizar el seguimiento y la localización *in vivo* de los exosomas administrados gracias al marcaje realizado con sondas fluorescentes y por la expresión endógena de NIS.

Para realizar la imagen por fluorescencia o FLI (por sus siglas en inglés, Fluorescence Imaging) fue necesario realizar el marcaje de los exosomas con una sonda fluorescente. Por ello, se utilizó la sonda fluorescente PKH67 Fluorescent Cell Linker Kit que emite fluorescencia en el espectro del verde o Claret que emite en el rango del Rojo Lejano (Sigma-Aldrich). El marcaje con la sonda fluorescente se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los escáneres *in vivo* se realizaron a las 2, 24, 48, 72 horas y 7 días utilizando un IVIS Lumina II (Xenogen Corporation, EEUU).

Para obtener las imágenes fluorescentes, los animales fueron anestesiados en cajas de inducción de sellado hermético con una mezcla de oxígeno (1 l/minuto) e isoflurano al 3-4% (ISOVET). Cuando los ratones estuvieron completamente anestesiados, fueron trasladados al interior del escáner IVIS Lumina II previamente calentado a 37°C y colocados sobre boquillas individuales para mantener la anestesia, manteniendo la administración de isoflurano en un 2%.

Las adquisiciones se realizaron utilizando filtros de excitación y emisión específicos para cada zona, siendo necesario tomar una primera captura para eliminar la fluorescencia del interior del escáner. Las imágenes se realizaron con un tiempo de exposición de 2 minutos, binning pequeño y un F-Stop de 2. Para los animales o muestras con elevada intensidad fue necesario disminuir el tiempo de exposición a 1 minuto o incluso a 30 segundos. Se realizaron dos escáneres de cada animal, en posición dorsal y en posición ventral. Concluidas las adquisiciones, los animales fueron devueltos a sus jaulas IVC donde se recuperaron de la anestesia. Trascurridos los diversos tiempos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, los órganos procesados y escaneados ex

vivo. Adicionalmente, fueron analizados utilizando diferentes técnicas, como bioluminiscencia, inmunofluorescencia o inmunodetección, con el objetivo de analizar la biodistribución de los exosomas. Los datos fueron adquiridos y analizados con el software Living Image 4.0 (Xenogen Corporation). La cuantificación de la señal de fluorescencia se realizó delimitando la región de interés o ROI (por sus siglas en inglés, Region Of Interest) de cada animal u órgano durante cada uno de los escaneos.

El SPECT/CT es una tecnología de imagen molecular no invasiva que combina dos sistemas de imagen, la Tomografía Computerizada por Emisión de Fotón Único (SPECT) y la Tomografía Computerizada (CT), permitiendo obtener imágenes tridimensionales (3D) de la biodistribución del radioisotopo emisor de fotones (emisor gamma) administrado que se combinarán con las imágenes anatómicas obtenidas al aplicar rayos X. Para lograr estas imágenes, se utilizó hNIS como herramienta de visualización y un radioisótopo emisor de fotones como el $^{99m}\text{TcO}_4$, posibilitando la identificación de aquellas zonas donde se localiza la expresión de NIS gracias a la acumulación de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en ellas. La adquisición de imágenes se realizó utilizando una gamma cámara que rota alrededor del animal de estudio obteniendo proyecciones o imágenes bidimensionales (2D) en el plano sagital, coronal y transaxial, esto se debe a que la cámara se utiliza con una rotación completa de 360 grados para optimizar la reconstrucción de las imágenes obtenidas. La rotación se realiza en posiciones definidas, que generalmente varían entre 3 y 6 grados. Posteriormente, las imágenes o proyecciones 2D son procesadas y mediante la aplicación de algoritmos matemáticos se reconstruyen las imágenes o proyecciones 3D, que son fusionadas con las imágenes de CT aumentando la resolución espacial del estudio e incrementando la sensibilidad de la resolución.

La realización de estos experimentos se basó en el uso de la expresión endógena de hNIS en los exosomas de leche como herramienta terapéutica. Para ello, fue necesario inyectar los exosomas de leche en modelos tumorales xenograft en ratones siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Previamente a la administración del radioisotopo, los animales recibieron durante 7 días un tratamiento de L-tirosina (T4) (Sigma-Aldrich) en el agua a una dosis de 5 mg/l con la finalidad de bloquear la expresión de NIS en el tiroides de los animales. Los escáneres *in vivo* se realizaron 7, 10 y 15 días después de la inyección de los exosomas utilizando un equipo Albira II SPECT/CT de Brucker (Bruker Medical GmbH). Para ello, los animales recibieron la administración

intraperitoneal de 18,5 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4$ resuspendido en 200 μl de PBS. Trascurridos 5 minutos, los animales fueron anestesiados y se introdujeron en el interior del Albira II SPECT/CT sobre una cama térmica previamente atemperada a 37°C y se utilizó una sonda para monitorizar sus constantes vitales. Se realizó el SPECT y el CT del cuerpo entero del animal, tomando adquisiciones cada 100 segundos. La reconstrucción de las imágenes para obtener la imagen 3D se realizó utilizando el software MEDISO (MEDISO Medical Imaging System) y la fusión de las imágenes del SPECT y del CT se realizó utilizando el software PMDO (Biomedical Image Quantification, PMOD Technologies LLC). El cálculo de la acumulación del radioisótopo $^{99m}\text{TcO}_4$ se efectuó utilizando el software *in vivo* de Scope (Medical Image System).

Estudio del potencial terapéutico de la administración de ^{131}I

El estudio del potencial terapéutico de la expresión endógena de hNIS en exosomas de LMH se realizó administrando ^{131}I , un isótopo de radioyodo utilizado de manera rutinaria en los tratamientos de radioterapia de los hospitales. En los experimentos relacionados con el potencial terapéutico de la expresión, los animales recibieron una inyección intravenosa de exosomas y transcurridos 7 días se administró intraperitonealmente 2 mCi de (^{131}I)NaI resuspendido en 200 μl de PBS. Previamente a la inyección de dicho isótopo de radioyodo, los animales recibieron un tratamiento de L-tirosina (T4) en el agua a una concentración de 5mg/l para minimizar el daño tiroideo debido a la administración del radioisótopo. Para analizar el efecto terapéutico, se realizó el seguimiento del tamaño tumoral cada 2 días, durante los días posteriores a la administración del radioisótopo midiendo el largo y el ancho de los tumores. El seguimiento de los animales se realizó durante 42 días. Los resultados son la media de al menos 2 experimentos diferentes realizando en cada experimento triplicados o cuadruplicados de cada una de las condiciones analizadas.

30

REIVINDICACIONES

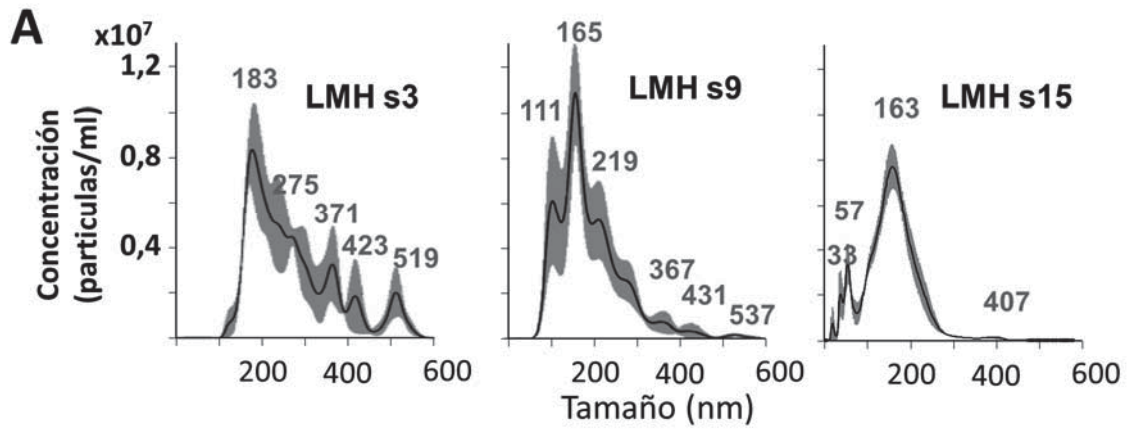
1. Composición que comprende:
 - (i) vesículas extracelulares, preferiblemente exosomas, secretados por células que expresan la proteína NIS, donde dichas vesículas extracelulares expresan la proteína NIS, y
 - (ii) al menos un isótopo radiactivo.
2. Composición según la reivindicación 1, donde las células que expresan la proteína NIS son células en las que se ha insertado de manera artificial una secuencia de ácido nucleico codificante para la proteína NIS.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el isótopo radiactivo se selecciona de la lista que consiste en: ^{131}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{211}At , $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, $^{188}\text{ReO}_4^-$, y $^{18}\text{F-BF}_4^-$.
4. Composición según la reivindicación 3, donde el isótopo radiactivo es ^{131}I o $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.
5. Composición según la reivindicación 4, donde el isótopo radiactivo es ^{131}I .
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la proteína NIS es humana.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde las vesículas extracelulares, preferiblemente los exosomas, secretados por células que expresan la proteína NIS han sido aislados de leche.
8. Composición según la reivindicación 7, donde la leche es leche materna procedente de una hembra, preferiblemente de humano, que se encuentra en periodo de lactancia.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es una composición farmacéutica preferiblemente formulada para su administración intravenosa o intraperitoneal.

10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como medicamento.
- 5 11. Composición según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento y/o prevención de neoplasias.
12. Composición según la reivindicación 11, donde dicha composición comprende el isótopo radiactivo ^{131}I .
- 10 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, donde la neoplasia es un tumor sólido o hematológico.
14. Composición según la reivindicación 13, donde el tumor sólido es un cáncer.
- 15 15. Composición según la reivindicación 14, donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: melanoma, mieloma múltiple, leucemia, linfoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer colorectal, cáncer de cabeza y cuello, tumores cerebrales y cáncer de tiroides.
- 20 16. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como agente de imagen para la visualización de neoplasias en un sujeto.
17. Uso de la composición según la reivindicación 16, donde dicha composición comprende un isótopo radiactivo que se selecciona de la lista que consiste en: ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{211}At , $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, $^{188}\text{ReO}_4^-$, y $^{18}\text{F-BF}_4^-$, preferiblemente ^{124}I y $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.
- 25 18. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, donde la neoplasia es un tumor sólido o hematológico.
- 30 19. Uso de la composición según la reivindicación 18, donde el tumor sólido es un cáncer.
20. Uso de la composición según la reivindicación 19, donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: melanoma, mieloma múltiple, leucemia, linfoma, cáncer de
- 35

ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer colorectal, cáncer de cabeza y cuello, tumores cerebrales y cáncer de tiroides.

- 5 21. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, donde la visualización de neoplasias se realiza mediante la técnica PET o SPECT.

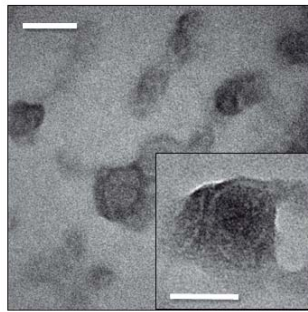
Fig. 1



B

	Tamaño (nm)	Concentración (partículas/ml)	Potencial Zeta (mV)
LMH Exo s3	184.3 ± 6.9 nm	1.06e+12 ± 3.25e+11	- 14.65 ± 3.41
LMH Exo s9	165.3 ± 1.3 nm	2.58e+11 ± 4.64e+10	- 15.65 ± 2.24
LMH Exo s15	169.0 ± 7.1 nm	3.68e+11 ± 2.07e+10	- 14.82 ± 2.68

C LMH exosomas



D LMH exosomas

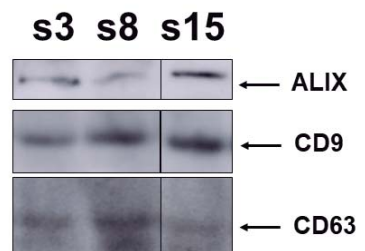


Fig. 1 (cont.)

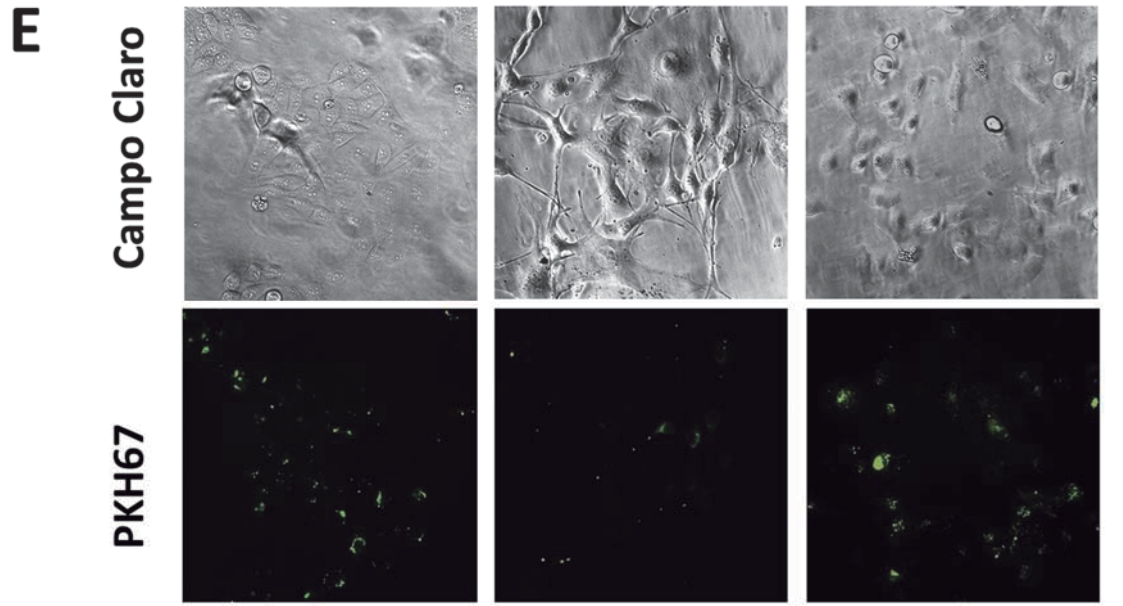


Fig. 2

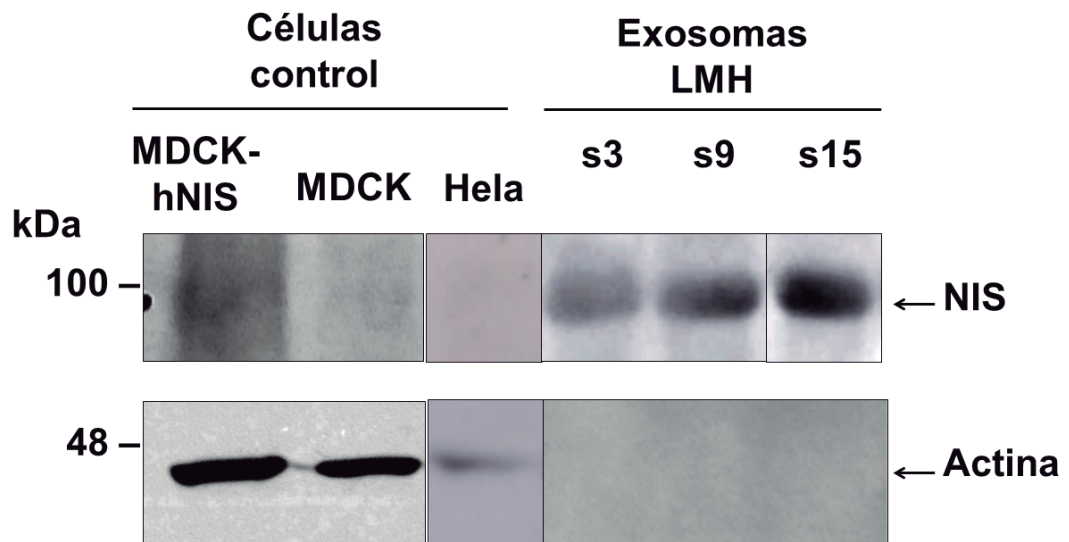


Fig. 3

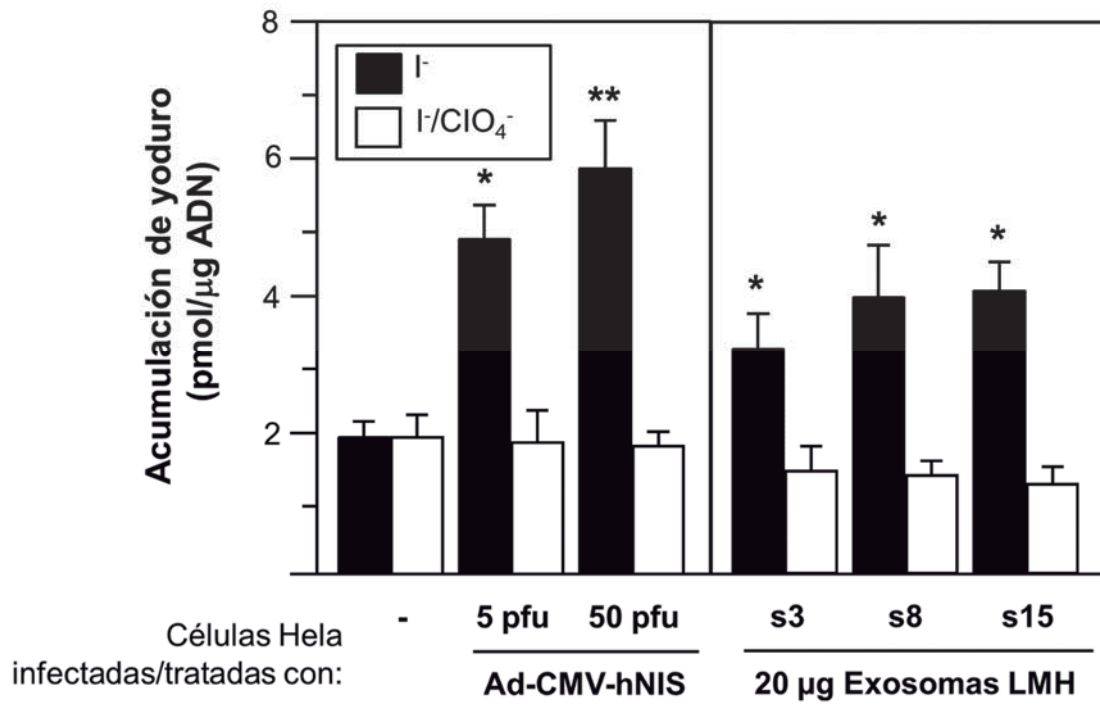


Fig. 4

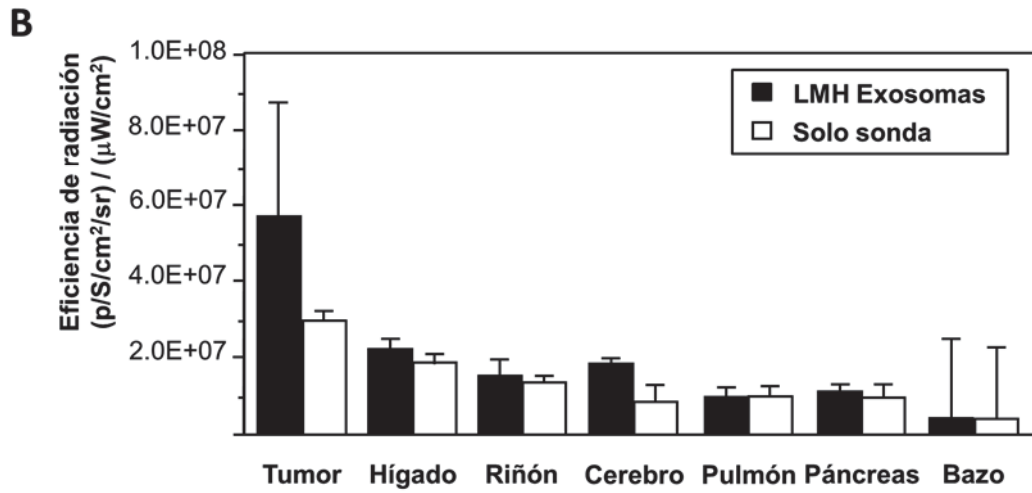
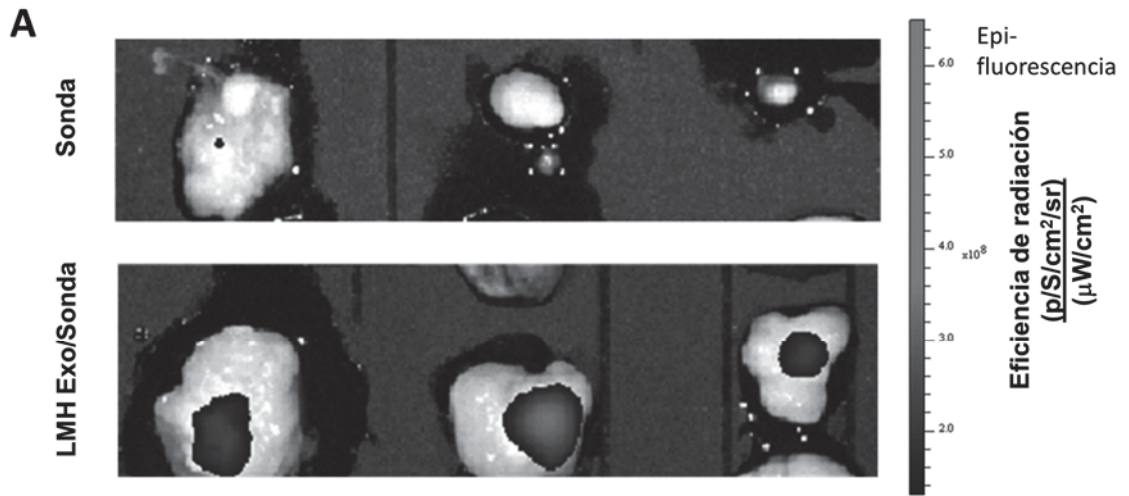
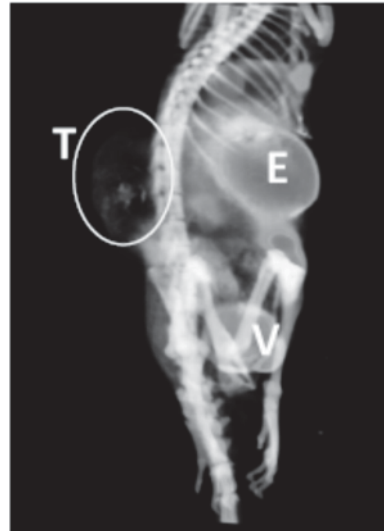


Fig. 5

A CONTROL



B LMH Exosomas



Fig. 6

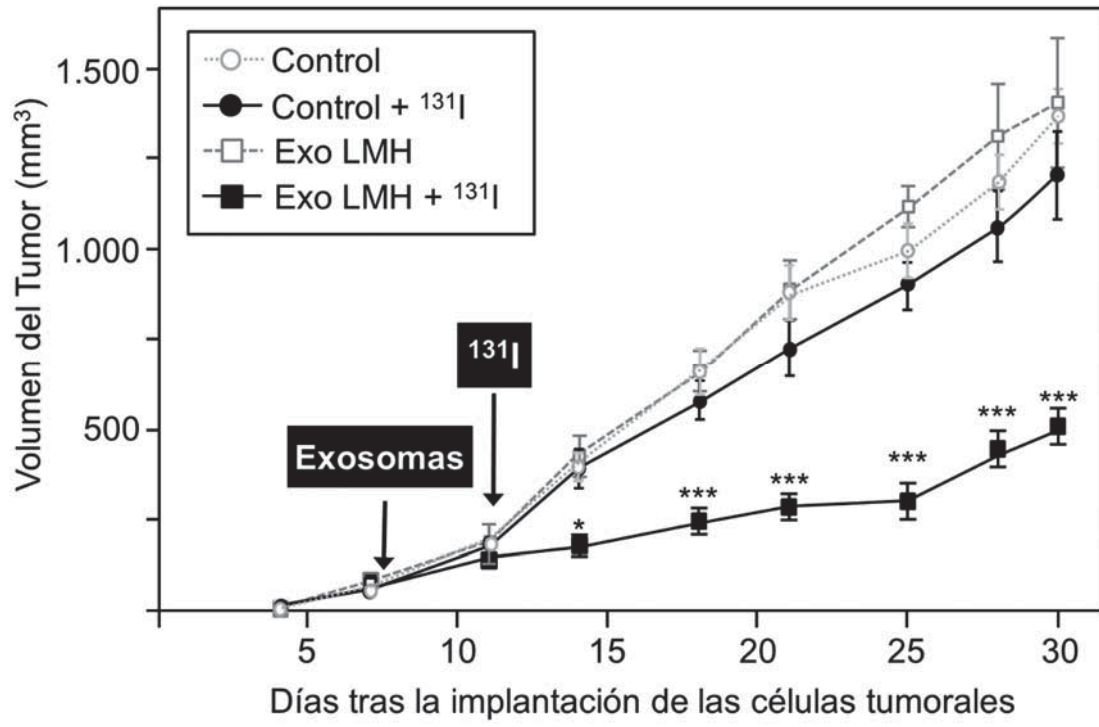
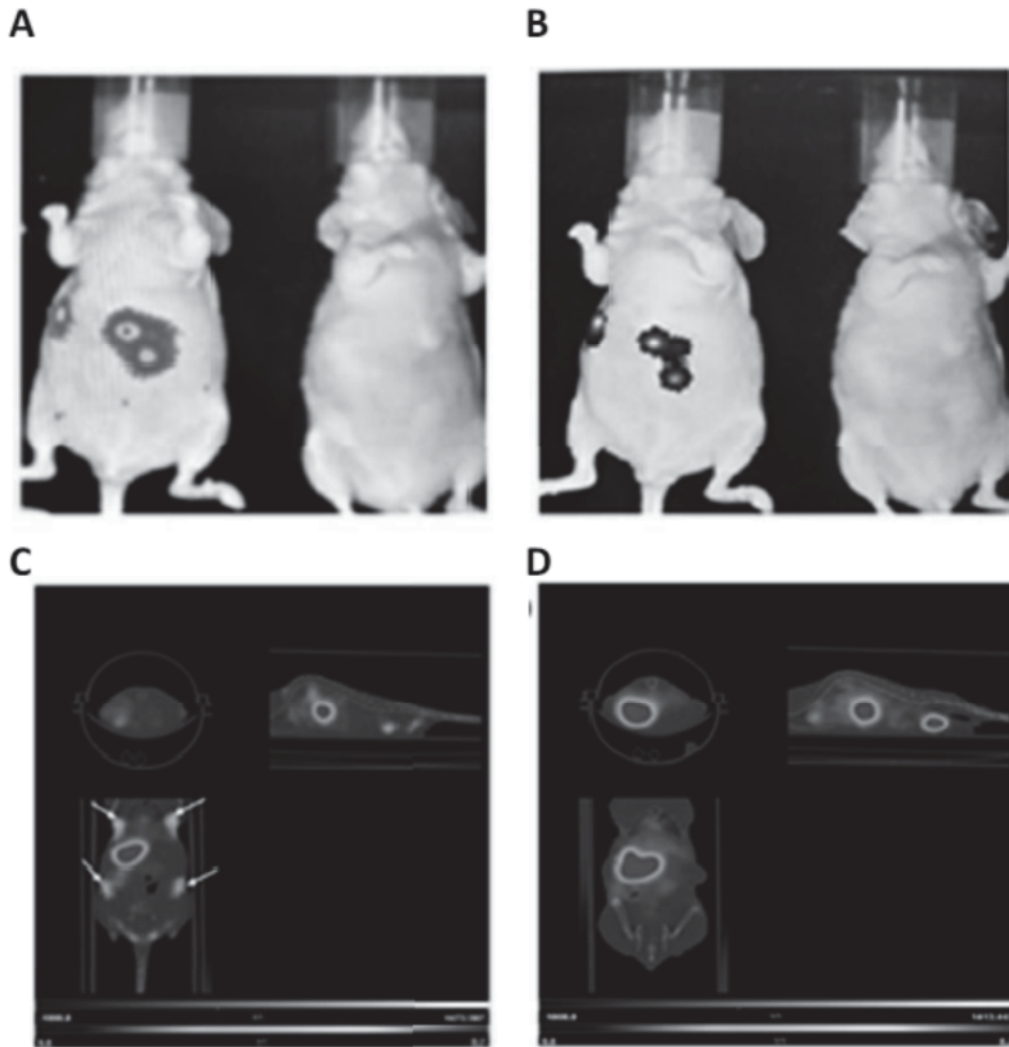


Fig. 7





②① N.º solicitud: 202030272

②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.04.2020

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CRESPO-BARREDA A et al. Use of Placental MSCs and their exosomes as theragnostic agents for cancer treatment and diagnostic. Human Gene Therapy 20191101 Mary Ann Liebert Inc. nld. , 01/11/2019, Vol. 30, Páginas A53, ISSN 1557-7422 (print), doi:10.1089/hum.2019.29095.abstracts. Todo el documento.	1-6, 9-21
A	CRESPO-BARREDA A et al. Placental MSCs as vehicles for the endogenous Na/I symporter (hNIS): a new theragnostic strategy. Human Gene Therapy NOV 2016. , 31/10/2016, Vol. 27, Páginas A91, ISSN 1043-0342(print) ISSN 1557-7422(electronic). Todo el documento	1-21
A	AGRAWAL ASHISH K et al. Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine JUL 2017. , 30/06/2017, Vol. 13, Páginas 1627-1636, ISSN 1549-9634(print) ISSN 1549-9642(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.nano.2017.03.001>. Resumen.	1-21
A	MUNAGALA RADHA et al. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. Cancer Letters 2016. , 30/11/2015, Vol. 371, Páginas 48-61, ISSN 0304-3835(print) ISSN 1872-7980(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.canlet.2015.10.020>. Resumen	1-21
A	DE LA VIEJA ANTONIO et al. Role of iodide metabolism in physiology and cancer. Endocrine-Related Cancer APR 2018. , 31/03/2018, Vol. 25, Páginas R225-R245, ISSN 1351-0088(print) ISSN 1479-6821(electronic), <DOI: doi:10.1530/ERC-17-0515>	1-21
A	TAZEBAY UYGAR H et al. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. Nature Medicine August, 2000. , 31/07/2000, Vol. 6, Páginas 871-878, ISSN 1078-8956.	1-21
A	GARDEAZABAL L et al. Topical use of exosomes from human maternal milk accelerates acute cutaneous wound healing. . Journal of Investigative Dermatology SEP 2019. , 31/08/2019, Vol. 139, Páginas S327, ISSN 0022-202X(print) ISSN 1523-1747(electronic). https://www.morressier.com/article/topical-use-exosomes-human-maternal-milk-accelerates-acute-cutaneous-wound-healing/5d4980d28fb7e44098e7328e	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
05.08.2020

Examinador
E. Albarrán Gómez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K47/46 (2006.01)

A61K35/20 (2006.01)

A61K49/06 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL