

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090814** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.08.07**

(51) Int. Cl. *A61K 9/127* (2006.01)  
*A61K 35/28* (2015.01)  
*A61Q 19/00* (2006.01)  
*C07K 14/78* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2018.09.21**

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА**

(31) **15/712,294**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.09.22**

**Бадиавас Евангелос В. (US)**

(33) **US**

(74) Представитель:

(86) **PCT/US2018/052213**

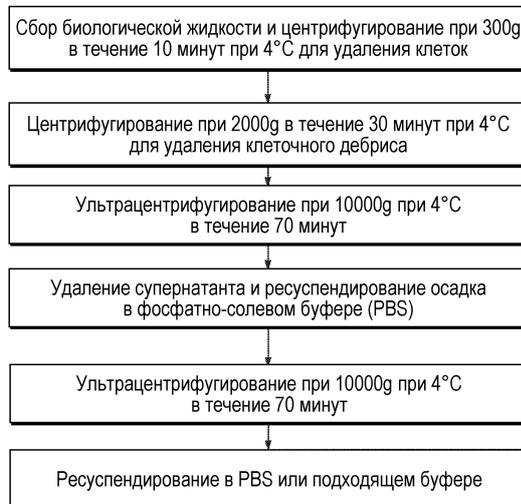
**Медведев В.Н. (RU)**

(87) **WO 2019/060719 2019.03.28**

(71) Заявитель:

**ЮНИВЕРСИТИ ОФ МАЙАМИ (US)**

(57) В настоящем изобретении предложены композиции и способы для лечения буллезного эпидермолиза.



**202090814**

**A1**

**A1**

**202090814**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562217EA/17

### СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по заявке USSN 15/712,294, поданной 22 сентября 2017 года, содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[002] Настоящее изобретение относится к области медицины, цитологии, молекулярной биологии и генетики. В частности, настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения буллезного эпидермолиза.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Буллезный эпидермолиз (БЭ) является группой генодерматозов, которые вызывают образование пузырей на коже и слизистых оболочках, с частотой случаев 20 на миллион новорожденных в США. Это заболевание является результатом нарушения фиксации между эпидермисом и дермой, приводящего к ранимости кожи. Его тяжесть варьирует от умеренной до летальной.

[004] Дистрофический буллезный эпидермолиз (ДБЭ) является наследуемым вариантом, поражающим кожу и другие органы. Детей, рожденных с этим заболеванием, называют "дети-бабочки", поскольку описано, что их кожа такая же тонкая и ранимая, как крылья бабочки. Кожа больных ДБЭ очень чувствительна к тяжелому образованию пузырей. Открытые раны на коже заживают медленно или вообще не заживают, часто с обширным рубцеванием, и особенно восприимчивы к инфекции. Многие пациенты вынуждены принимать ванны в смеси гипохлорита натрия и воды, чтобы бороться с этими инфекциями. Хроническое воспаление приводит к повреждениям ДНК в пораженных клетках кожи, что, в свою очередь, вызывает плоскоклеточную карциному (SCC). Большинство пациентов с ДБЭ умирают до наступления возраста 30 лет от SCC или от осложнений, связанных с ДБЭ.

[005] ДБЭ возникает в результате мутаций в гене COL7A1 человека, кодирующем белок коллаген VII типа (коллаген VII). Мутации, вызывающие ДБЭ, могут быть аутосомно-доминантными (ДДБЭ) или аутосомно-рецессивными (РДБЭ). COL7A1 расположен на коротком плече хромосомы 3 человека, в хромосомной области, обозначенной 3p21.31. Размер гена составляет приблизительно 31000 пар оснований, при этом он отличается сильной фрагментацией своей кодирующей последовательности на 118 экзонов. COL7A1 транскрибируется в мРНК длиной 9287 пар оснований. В коже белок коллаген VII типа синтезируется кератиноцитами и фибробластами кожи.

[006] Коллаген VII представляет собой белок массой 300 кДа, который димеризуется с образованием полукольцевой петлевой структуры: якорных фибрилл. Считается, что якорные фибриллы образуют структурную связь между эпидермальной базальной мембраной и фибриллярными коллагенами в сосочковом слое дермы. Коллаген

VII также ассоциирован с выстилающим эпителием пищевода, и пациенты с ДБЭ могут страдать от хронических рубцов, сращения тканей и обструкции пищевода. Больные часто страдают тяжелым истощением из-за поражения слизистой оболочки полости рта и пищевода и нуждаются в зондах для искусственного питания. Они также страдают железодефицитной анемией неясного генеза, которая приводит к хронической усталости.

[007] Сохраняется потребность в предоставлении способов и композиций для лечения БЭ.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[008] В настоящем изобретении предложены способы выделения микровезикул (MV), например внеклеточных везикул (MV), из биологических жидкостей, не повреждая структурную и/или функциональную целостность микровезикул. В настоящем изобретении также предложены способы выделения эктосом, микрочастиц, микровезикул, нановезикул, отделяемых везикул, апоптотических телец или мембранных частиц из биологических жидкостей, не повреждая их структурную и/или функциональную целостность. В настоящем изобретении также предложены MV (например, EV) и способы применения MV (например, EV) для лечения БЭ (например, РДБЭ и/или ДДБЭ).

[009] В одном аспекте предложен способ лечения буллезного эпидермолиза у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, включающей выделенные микровезикулы, очищенные осаждением из биологической жидкости, и облегчение или уменьшение тяжести одного или более симптомов буллезного эпидермолиза у субъекта.

[010] В некоторых примерах осуществления буллезный эпидермолиз является дистрофическим буллезным эпидермолизом, например, рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом.

[011] В некоторых примерах осуществления выделенные микровезикулы являются внеклеточными везикулами, которые необязательно осаждены из биологической жидкости с помощью осаждающего агента, выбранного из группы, состоящей из ионов кальция, ионов магния, ионов натрия, ионов аммония, ионов железа, сульфата аммония, альгината и полиэтиленгликоля.

[012] В некоторых примерах осуществления биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из периферической крови, сыворотки, плазмы крови, асцитной жидкости, мочи, спинномозговой жидкости (СМЖ), мокроты, слюны, костного мозга, синовиальной жидкости, водянистой влаги, амниотической жидкости, ушной серы, грудного молока, жидкости бронхоальвеолярного лаважа, спермы, секрета предстательной железы, куперовской жидкости, женского эякулята, пота, стула, волос, слезной жидкости, кистозной жидкости, плевральной и перитонеальной жидкости, перикардальной жидкости, лимфы, химуса, хилуса, желчи, тканевой жидкости, менструальных выделений, гноя, кожного сала, рвоты, вагинальных выделений, отделяемого слизистых оболочек, кишечной жидкости, сока поджелудочной железы, жидкости лаважа, жидкости из клетки, жидкости из образца ткани и жидкости из культуры клеток. В некоторых примерах

осуществления биологическая жидкость получена из клеток млекопитающего (например, человека). В некоторых примерах осуществления клетки млекопитающего являются мезенхимальными клетками.

[013] В некоторых примерах осуществления осаждающий агент является полиэтиленгликолем, который необязательно имеет молекулярную массу приблизительно 6000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 10000 Да или приблизительно 20000 Да.

[014] В некоторых примерах осуществления один или более симптомов буллезного эпидермолиза выбраны из группы, состоящей из любой комбинации утолщенных наростов, образования кожных пузырей (например, на руках, ногах, локтях и/или коленях), образования пузырей на слизистой полости рта, утолщенных ногтей на руках и/или ногах, сепсиса, нарушения питания, обезвоживания, нарушения электролитного баланса, обструкций дыхательных путей, нарушения экспрессии коллагена VII, анемии, стриктур пищевода, задержки развития, синдактилии или сращивания пальцев рук и/или ног, порока развития зубов, микростомии и истирания роговицы.

[015] В некоторых примерах осуществления лечение включает повышение экспрессии коллагена VII у субъекта.

[016] В другом аспекте предложен способ лечения буллезного эпидермолиза у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, включающей выделенные внеклеточные везикулы, и облегчение или уменьшение тяжести одного или более симптомов буллезного эпидермолиза у субъекта.

[017] В некоторых примерах осуществления буллезный эпидермолиз является дистрофическим буллезным эпидермолизом, например, рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом.

[018] В некоторых примерах осуществления выделенные микровезикулы являются внеклеточными везикулами, необязательно осажденными из биологической жидкости при использовании осаждающего агента, выбранного из группы, состоящей из ионов кальция, ионов магния, ионов натрия, ионов аммония, ионов железа, сульфата аммония, альгината и полиэтиленгликоля.

[019] В некоторых примерах осуществления биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из периферической крови, сыворотки, плазмы крови, асцитной жидкости, мочи, спинномозговой жидкости (СМЖ), мокроты, слюны, костного мозга, синовиальной жидкости, водянистой влаги, амниотической жидкости, ушной серы, грудного молока, жидкости бронхоальвеолярного лаважа, спермы, секрета предстательной железы, куперовой жидкости, женского эякулята, пота, стула, волос, слезной жидкости, кистозной жидкости, плевральной и перитонеальной жидкости, перикардальной жидкости, лимфы, химуса, хилуса, желчи, тканевой жидкости, менструальных выделений, гноя, кожного сала, рвоты, вагинальных выделений, отделяемого слизистых оболочек, кишечной жидкости, сока поджелудочной железы, жидкости лаважа, жидкости из клетки, жидкости из образца ткани и жидкости из культуры клеток. В некоторых примерах

осуществления биологическая жидкость получена из клеток млекопитающего (например, человек). В некоторых примерах осуществления клетки млекопитающего являются мезенхимальными клетками.

[020] В некоторых примерах осуществления осаждающий агент является полиэтиленгликолем, необязательно имеющим молекулярную массу приблизительно 6000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 10000 Да или приблизительно 20000 Да.

[021] В некоторых примерах осуществления один или более симптомов буллезного эпидермолиза выбраны из группы, состоящей из любой комбинации утолщенных наростов, образования кожных пузырей (например, на руках, ногах, локтях и/или коленях), образования пузырей на слизистой полости рта, утолщенных ногтей на руках и/или ногах, сепсиса, нарушения питания, обезвоживания, нарушения электролитного баланса, обструкций дыхательных путей, нарушения экспрессии коллагена VII, анемии, стриктур пищевода, задержки развития, синдактилии или сращивания пальцев рук и/или ног, порока развития зубов, микростомии и истирания роговицы.

[022] В некоторых примерах осуществления лечение включает повышение экспрессии коллагена VII у субъекта.

[023] В другом аспекте предложен способ повышения уровней коллагена VII в клетке, включающий контакт клетки с выделенной внеклеточной везикулой из жидкости млекопитающего, где клетка экспрессирует генотип буллезного эпидермолиза.

[024] В некоторых примерах осуществления жидкость млекопитающего выбрана из группы, состоящей из периферической крови, сыворотки, плазмы крови, асцитной жидкости, мочи, СМЖ, мокроты, слюны, костного мозга, синовиальной жидкости, водянистой влаги, амниотической жидкости, ушной серы, грудного молока, жидкости бронхоальвеолярного лаважа, спермы, секрета предстательной железы, куперовой жидкости, женского эякулята, пота, стула, волос, слезной жидкости, кистозной жидкости, плевральной и перитонеальной жидкости, перикардальной жидкости, лимфы, химуса, хилуса, желчи, тканевой жидкости, менструальных выделений, гноя, кожного сала, рвоты, вагинальных выделений, отделяемого слизистых оболочек, кишечной жидкости, сока поджелудочной железы, жидкости лаважа, жидкости из клетки, жидкости из образца ткани и жидкости из культуры клеток. В некоторых примерах осуществления жидкость млекопитающего является кондиционированной средой. В некоторых примерах осуществления кондиционированная среда получена из мезенхимальных стволовых клеток.

[025] В некоторых примерах осуществления клетка включает мутацию в гене COL7A1.

[026] В некоторых примерах осуществления генотип буллезного эпидермолиза является рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом.

[027] В определенных примерах осуществления, один или обе из пролиферации клетки стимулирован, и устойчивость клетки к перевариванию трипсина улучшена.

[028] В некоторых примерах осуществления выделенная внеклеточная везикула

доставляет белок коллаген VII и/или мРНК COL7A1 в клетку.

[029] В другом аспекте предложен способ доставки одного или более биоактивных веществ в клетку, включающий контакт клетки с выделенной внеклеточной везикулой из жидкости млекопитающего.

[030] В некоторых примерах осуществления жидкость млекопитающего выбрана из группы, состоящей из периферической крови, сыворотки, плазмы крови, асцитной жидкости, мочи, СМЖ, мокроты, слюны, костного мозга, синовиальной жидкости, водянистой влаги, амниотической жидкости, ушной серы, грудного молока, жидкости бронхоальвеолярного лаважа, спермы, секрета предстательной железы, куперовской жидкости, женского эякулята, пота, стула, волос, слезной жидкости, кистозной жидкости, плевральной и перитонеальной жидкости, перикардальной жидкости, лимфы, химуса, хилуса, желчи, тканевой жидкости, менструальных выделений, гноя, кожного сала, рвоты, вагинальных выделений, отделяемого слизистых оболочек, кишечной жидкости, сока поджелудочной железы, жидкости лаважа, жидкости из клетки, жидкости из образца ткани и жидкости из культуры клеток. В некоторых примерах осуществления жидкость млекопитающего является кондиционированной средой. В некоторых примерах осуществления кондиционированная среда получена из мезенхимальных стволовых клеток.

[031] В некоторых примерах осуществления клетка включает мутацию в гене COL7A1.

[032] В некоторых примерах осуществления одно или более биоактивных веществ выбрано из группы, состоящей из белка коллагена VII, мРНК коллагена VII, активатора сигнализации STAT3 (например, интерферона, эпидермального фактора роста, интерлейкина-5, интерлейкина-6, MAP-киназы и/или нерцепторной тирозинкиназы c-src) и активатора канонического пути Wnt.

[033] В некоторых примерах осуществления STAT3 фосфорилирован.

[034] В некоторых примерах осуществления одно или более биоактивных веществ является одним или более фармацевтическими соединениями.

[035] В некоторых примерах осуществления клетка имеет генотип рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза.

[036] В некоторых примерах осуществления стимулирована пролиферация клетки и/или повышена устойчивость клетки к расщеплению трипсином.

[037] В другом аспекте предложен способ выделения и/или очистки микровезикул из супернатантов культур клеток или биологических жидкостей с применением осаждающего агента, который осаждает микровезикулу из супернатанта культуры клеток или биологической жидкости в результате вытеснения сольватной воды.

[038] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул подвергают последующей очистке. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул подвергают последующей очистке с получением препарата эктосом. В одном варианте

осуществления выделенный препарат микровезикул подвергают последующей очистке с получением препарата микрочастиц. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул подвергают последующей очистке с получением препарата нановезикул. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул подвергают последующей очистке с получением препарата отделяемых везикул. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул подвергают последующей очистке с получением препарата мембранных частиц. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул подвергают последующей очистке с получением препарата апоптотических телец.

[039] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул, который стимулирует или усиливает ангиогенез. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул стимулирует или усиливает ангиогенез у пациента.

[040] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул, который стимулирует или усиливает регенерацию нейронов. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул стимулирует или усиливает регенерацию нейронов у пациента.

[041] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул, который стимулирует или усиливает клеточную пролиферацию. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул стимулирует или усиливает клеточную пролиферацию у пациента.

[042] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул, который стимулирует или усиливает клеточную миграцию. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул стимулирует или усиливает клеточную миграцию у пациента. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который стимулирует или усиливает заживление ран. В одном варианте осуществления рана является ожогом на всю толщу кожи. В одном варианте осуществления рана является ожогом второй степени.

[043] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул, который уменьшает образование рубца у пациента.

[044] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул, который уменьшает образование морщины на коже пациента.

[045] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул, который применяется для диагностики наличия и/или прогрессирования заболевания у пациента. В одном варианте осуществления заболевание является метастатической меланомой. В альтернативном варианте осуществления заболевание является воспалительным/аутоиммунным нарушением, таким как ревматоидный артрит. В одном варианте осуществления заболевание является реакцией "трансплантат против хозяина".

[046] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул, который может вызывать функциональную регенерацию и организацию сложных структур ткани. В одном варианте осуществления предложен выделенный препарат микровезикул,

который может восстанавливать гемопозитическую ткань у пациента с апластической анемией. В одном варианте осуществления предложен выделенный препарат микровезикул, который может восстанавливать по меньшей мере одну ткань у пациента с больной, поврежденной или отсутствующей кожей, выбранную из группы, состоящей из: эпителиальной ткани, стромальной ткани, нервной ткани, сосудистой ткани и придаточных структур. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который может восстанавливать ткань и/или клетки из всех трех зародышевых листков.

[047] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул, который применяется для модуляции иммунной системы пациента.

[048] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул, который улучшает выживание ткани или клеток, которые пересажены пациенту. В одном варианте осуществления пациент проходит лечение выделенным препаратом микровезикул до получения трансплантата ткани или клеток. В дополнительном варианте осуществления пациент проходит лечение выделенным препаратом микровезикул после получения трансплантата ткани или клеток. В дополнительном варианте осуществления ткань или клетки обрабатывают выделенным препаратом микровезикул. В одном варианте осуществления ткань или клетки обрабатывают выделенным препаратом микровезикул перед трансплантацией.

[049] В другом аспекте предложен выделенный препарат микровезикул, содержащий по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из РНК, ДНК и белка из клетки-хозяина. В одном варианте осуществления клетка-хозяин модифицирована для экспрессии по меньшей мере одной молекулы, выбранной из группы, состоящей из РНК, ДНК и белка. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул, содержащий по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из РНК, ДНК и белка из клетки-хозяина, применяется в качестве терапевтического средства.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[050] Сопровождающие чертежи, которые включены в настоящий документ и составляют часть описания, иллюстрируют различные варианты осуществления настоящего изобретения и вместе с описанием также служат для пояснения принципов изобретения и позволяют среднему специалисту в данной области осуществить и применить изобретение. На чертежах одинаковые номера позиций обозначают идентичные или функционально сходные элементы. Более полное понимание изобретения и его многих сопутствующих преимуществ будет легко достигнуто, поскольку оно станет более понятным при обращении к следующему подробному описанию, рассматриваемому в сочетании с сопровождающими чертежами, где:

[051] На *Фиг. 1* показана схематическая схема протокола, используемого для выделения микровезикул с помощью ультрацентрифугирования.

[052] На *Фиг. 2* показан один вариант осуществления способа выделения

микровезикул согласно настоящему изобретению.

[053] На **Фиг. 3** показан дополнительный вариант осуществления способа выделения микровезикул согласно настоящему изобретению.

[054] На **Фиг. 4** показан один вариант осуществления устройства настоящего изобретения, которое облегчает осветление биологической жидкости и сбор осажденных микровезикул с помощью фильтрации.

[055] На **Фиг. 5A - Фиг. 5D** показаны электронные микроснимки микровезикул, полученных из среды, кондиционированной с использованием мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга человека, выделенных с применением способа ультрацентрифугирования, описанного в Примере 1 (**Фиг. 5A** и **Фиг. 5B**), и выделенных согласно способам настоящего изобретения (**Фиг. 5C** и **Фиг. 5D**) при увеличениях, показанных на соответствующих панелях.

[056] На **Фиг. 6A - Фиг. 6D** показаны электронные микроснимки микровезикул, полученных из среды, кондиционированной с использованием свиных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, выделенных с применением способа ультрацентрифугирования, описанного в Примере 1 (**Фиг. 6A** и **Фиг. 6B**), и выделенных согласно способам настоящего изобретения (**Фиг. 6C** и **Фиг. 6D**) при увеличениях, показанных на соответствующих панелях.

[057] На **Фиг. 7A - Фиг. 7D** показаны электронные микроснимки микровезикул, полученных из среды, кондиционированной с использованием мышинных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, выделенных с применением способа ультрацентрифугирования, описанного в Примере 1 (**Фиг. 7A** и **Фиг. 7B**), и выделенных согласно способам настоящего изобретения (**Фиг. 7C** и **Фиг. 7D**) при увеличениях, показанных на соответствующих панелях.

[058] На **Фиг. 8A - Фиг. 8C** показаны электронные микроснимки микровезикул, выделенных из человеческой плазмы согласно способам настоящего изобретения. На **Фиг. 8A - Фиг. 8C** показаны микровезикулы при возрастающем увеличении, как показано масштабной линейкой на соответствующих панелях.

[059] На **Фиг. 9A - Фиг. 9C** показаны электронные микроснимки микровезикул, выделенных из свиной плазмы согласно способам настоящего изобретения. На **Фиг. 9A - Фиг. 9C** показаны микровезикулы при возрастающем увеличении, как показано масштабной линейкой на соответствующих панелях.

[060] На **Фиг. 10A - Фиг. 10C** показаны электронные микроснимки микровезикул, выделенных из человеческой мочи согласно способам настоящего изобретения. На **Фиг. 10A - Фиг. 10C** показаны микровезикулы при возрастающем увеличении, как показано масштабной линейкой на соответствующих панелях.

[061] На **Фиг. 11** показан Вестерн-блот, на котором представлена экспрессия HSP70, CD63, STAT3 и фосфорилированного STAT3 в лизатах мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга человека, микровезикулы, выделенные из среды, кондиционированной с использованием стволовых клеток из костного мозга

человека, полученных с помощью ультрацентрифугирования (MV чМСК, ультрацентрифуга) или способами настоящего изобретения, как описано в Примере 3 (чМСК, осаждение ПЭГ). Также были исследованы микровезикулы из человеческой плазмы и человеческой мочи, полученные способами настоящего изобретения, как описано в Примере 3. (человеческая плазма, осаждение ПЭГ), и (человеческая моча, осаждение ПЭГ) соответственно.

[062] На **Фиг. 12А - Фиг. 12С** показан эффект микровезикул, выделенных из среды, кондиционированной с использованием мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга человека, в отношении пролиферации нормальных фибробластов кожи человека (Фиг. 12А), фибробластов кожи, полученных из язвы при диабетической стопе (Фиг. 12В), и фибробластов кожи, полученных из пролежневой язвы на ноге (Фиг. 12С). Сравнивали эффект микровезикул, выделенных с помощью ультрацентрифугирования (MV U/C), и микровезикул, выделенных способами настоящего изобретения (MV ПЭГ). Фибробласты, обработанные PBS, или среду культивирования, обедненную микровезикулами, включали в качестве контроля. Пролиферацию определяли с помощью МТТ-теста.

[063] На **Фиг. 13А - Фиг. 13Г** показан эффект микровезикул, выделенных из среды, кондиционированной с использованием мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга человека, в отношении миграции фибробластов кожи человека, как определяли по способности фибробластов мигрировать в область, в которой были соскоблены клетки. На панели, обозначенной "предварительная обработка", показана репрезентативная область планшета клеточной культуры, где клетки были удалены перед добавлением тестируемых препаратов. Эффект миграции фибробластов исследовали при использовании микровезикул, выделенных согласно способам настоящего изобретения (осаждение ПЭГ), и микровезикул, выделенных с помощью ультрацентрифугирования (Ультрацентрифуга), в указанных концентрациях. Фибробласты, обработанные PBS или обедненной микровезикулами средой культивирования, были включены в качестве контроля.

[064] На **Фиг. 14А - Фиг. 14Г** показан эффект микровезикул, выделенных из среды, кондиционированной с использованием мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга человека, в отношении миграции фибробластов кожи человека, полученных из язвы при диабетической стопе, как определяли по способности фибробластов мигрировать в область, в которой клетки были соскоблены. На панели, обозначенной "предварительная обработка", показана репрезентативная область планшета клеточной культуры, где клетки были удалены перед добавлением тестируемых препаратов. Эффект миграции фибробластов исследовали при использовании микровезикул, выделенных согласно способам настоящего изобретения (осаждение ПЭГ), и микровезикул, выделенных с помощью ультрацентрифугирования (Ультрацентрифуга), в указанных концентрациях. Фибробласты, обработанные PBS или обедненной микровезикулами средой культивирования, были включены в качестве контроля.

[065] На **Фиг. 15A - Фиг. 15D** показан захват микровезикул настоящего изобретения фибробластами кожи человека. Ядра клеток, визуализированные при использовании красителя Hoechst 33342, показаны на панелях, обозначенных "Hoechst33342". Клетки, визуализированные при использовании красителя Vybrant, показаны на панели, обозначенной "Vybrant-DiO". Микровезикулы, визуализированные при использовании красителя РКН, показаны на панели, обозначенной "РКН-меченные MV". Панель, на которой наложены изображения, полученные со всеми тремя красителями, обозначена "Совмещение".

[066] На **Фиг. 16A - Фиг. 16D** показан захват микровезикул настоящего изобретения фибробластами кожи человека. Ядра клеток, визуализированные при использовании красителя Hoechst 33342, показаны на панелях, обозначенных "Hoechst33342". Клетки, визуализированные при использовании красителя Vybrant, показаны на панели, обозначенной "Vybrant-DiO". Микровезикулы, визуализированные при использовании красителя РКН, показаны на панели, обозначенной "РКН-меченные MV". Панель, на которой наложены изображения, полученные со всеми тремя красителями, обозначена "Совмещение".

[067] На **Фиг. 17** показан Вестерн-блот лизатов фибробластов кожи человека, обработанных: микровезикулами, выделенными согласно способам настоящего изобретения из плазмы, полученной у пациента, страдающего ревматоидным артритом (MV из человеческой плазмы, осажденные ПЭГ); микровезикулами, выделенными согласно способам настоящего изобретения из среды, кондиционированной мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из костного мозга (MV чМСК человека, осажденные ПЭГ); микровезикулы, выделенные с помощью ультрацентрифугирования из среды, кондиционированной мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из костного мозга (MV чМСК человека, ультрацентрифугирование); контролем PBS; и обедненной контрольной средой (чМСК кондиционированная среда, обедненная MV).

[068] На **Фиг. 18** показано присутствие области, содержащей экзон 15 BRAF с мутацией T1799A в: клетках SK-MEL28, из РНК, амплифицированной с использованием праймера 1 (дорожка 3); клетках SK-MEL28, из РНК, амплифицированной с использованием праймера 2 (дорожка 4); микровезикулах, выделенных согласно способам настоящего изобретения из среды, кондиционированной с клетками SK-MEL28, из РНК, амплифицированной с использованием праймера 1 (дорожка 5); микровезикулах, выделенных согласно способам настоящего изобретения из среды, кондиционированной с клетками SK-MEL28, из РНК, амплифицированной с использованием праймера 2 (дорожка 6); клетках SK-MEL28, из ДНК, амплифицированной с использованием праймера 1 (дорожка 7); клетках SK-MEL28, из ДНК, амплифицированной с использованием праймера 2 (дорожка 8); микровезикулах, выделенных согласно способам настоящего изобретения из среды, кондиционированной с клетками SK-MEL28, из ДНК, амплифицированной с использованием праймера 1 (дорожка 9); и микровезикулах,

выделенных согласно способам настоящего изобретения из среды, кондиционированной клетками SK-MEL28, из ДНК, амплифицированной с использованием праймера 2 (дорожка 10).

[069] На **Фиг. 19** показано присутствие BRAF V600E в лизате клеток SK-MEL28 и лизате микровезикул, выделенных согласно способам настоящего изобретения из среды, кондиционированной с клетками SK-MEL28.

[070] На **Фиг. 20A - Фиг. 20D** показан захват микровезикул, выделенных согласно способам настоящего изобретения из среды, кондиционированной с использованием стволовых клеток из костного мозга, полученных у мыши, экспрессирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP), в фибробластах кожи человека. Ядра клеток, визуализированные при использовании красителя Hoechst 33342, показаны на панелях, обозначенных "Hoechst33342". Клетки, визуализированные при использовании красителя Vybrant, показаны на панели, обозначенной "Vybrant-DiO". GFP-меченные микровезикулы показаны на панели, обозначенной "GFP". Панель, на которой наложены изображения, полученные со всеми тремя красителями, обозначена "Совмещение".

[071] На **Фиг. 21A - Фиг. 21D** показан захват микровезикул, выделенных согласно способам настоящего изобретения из среды, кондиционированной с использованием стволовых клеток из костного мозга, полученных у мыши, экспрессирующей GFP, в фибробластах кожи человека. Ядра клеток, визуализированные при использовании красителя Hoechst 33342, показаны на панелях, обозначенных "Hoechst33342". Клетки, визуализированные при использовании красителя Vybrant, показаны на панели, обозначенной "Vybrant-DiO". GFP-меченные микровезикулы показаны на панели, обозначенной "GFP". Панель, на которой наложены изображения, полученные со всеми тремя красителями, обозначена "Совмещение".

[072] На **Фиг. 22A - Фиг. 22D** показаны гистологические срезы глубоких ран на всю толщю кожи из: Фиг. 22A - необработанных животных; Фиг. 22B - микровезикул, выделенных из среды, кондиционированной с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга согласно способам настоящего изобретения; Фиг. 22C - раствора хлорида натрия; и Фиг. 22D - микровезикул, выделенных из аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга с помощью ультрацентрифугирования, через 5 дней после ранения.

[073] На **Фиг. 23A - Фиг. 23D** показаны изображения ожогов второй степени у животных, обработанных: Фиг. 23A - микровезикулами, выделенными из среды, кондиционированной с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, с помощью ультрацентрифугирования; Фиг. 23B - микровезикулами, выделенными из среды, кондиционированной с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, согласно способам настоящего изобретения; и Фиг. 23C - необработанные животные, через 7 дней после ранения. На Фиг. 23D показана глубокая рана на всю толщю кожи у животного, обработанная микровезикулами, выделенными из среды, кондиционированной с использованием

аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, с помощью ультрацентрифугирования, через 7 дней после ранения. Стрелками указано формирование абсцесса в глубокой ране, обработанной микровезикулами, выделенными с помощью ультрацентрифугирования, в День 7 (40×). Этого не наблюдали в глубоких ранах на всю толщу кожи, обработанных микровезикулами, полученными согласно способам настоящего изобретения.

[074] На **Фиг. 24** показан гистологический препарат раны второй степени через 28 дней после ранения у животного, обработанный микровезикулами, выделенными из среды, кондиционированной с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, согласно способам настоящего изобретения.

[075] На **Фиг. 25** показан гистологический препарат раны второй степени через 28 дней после ранения у животного, обработанный раствором хлорида натрия.

[076] На **Фиг. 26** показан гистологический препарат раны на всю толщу кожи через 28 дней после ранения у животного, обработанный микровезикулами, выделенными из среды, кондиционированной с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, согласно способам настоящего изобретения.

[077] На **Фиг. 27А - Фиг. 27С** показан гистологический препарат раны на всю толщу кожи через 28 дней после ранения у животного, обработанный микровезикулами, выделенными из среды, кондиционированной с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, согласно способам настоящего изобретения. На **Фиг. 27А** показан рост новых нервов (стрелки) и ангиогенез (круги). На **Фиг. 27В** показан рост новых нервов (стрелки). На **Фиг. 27С** показан рост новых кровеносных сосудов (стрелки).

[078] На **Фиг. 28** показан гистологический препарат раны на всю толщу кожи через 7 дней после ранения у животного, обработанный микровезикулами, полученными из среды, кондиционированной с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга.

[079] На **Фиг. 29А - Фиг. 29В** показано присутствие или отсутствие химеризма у облученных животных после введения GFP-меченного костного мозга.

[080] На **Фиг. 30А - Фиг. 30С** показаны эффекты лечения МСК в отношении роста волос после гамма-облучения (**Фиг. 30А** и **Фиг. 30В**) и отсутствие химеризма у облученных животных после введения GFP-меченного костного мозга (**Фиг. 30С**).

[081] На **Фиг. 31А - Фиг. 31F** показан эффект микровезикул из костного мозга, полученных с использованием способа настоящего изобретения, в отношении формирования кровеносных сосудов при использовании анализа ангиогенеза *in vitro*. Три верхние панели являются репрезентативными, сделанными с помощью эпифлуоресцентного микроскопа изображениями культур клеток ЭКПВЧ, обработанных микровезикулами из костного мозга, полученными с использованием способа настоящего изобретения ("MV из аспирата костного мозга"). Три нижние панели являются репрезентативными, сделанными с помощью эпифлуоресцентного микроскопа

изображениями культур клеток ЭКПВЧ, обработанных контрольным растворителем ("Контроль растворителем").

[082] На **Фиг. 32А - Фиг. 32С** показан эффект микровезикул из костного мозга, полученных с использованием способа настоящего изобретения, в отношении роста или пролиферации клеток, при использовании анализа роста клеток *in vitro*. На **Фиг. 32А** показаны репрезентативные, полученные с помощью эпифлуоресцентного микроскопа изображения культур нормальных зрелых фибробластов, обработанных микровезикулами из костного мозга, полученными с использованием способа настоящего изобретения ("MV костного мозга") или PBS ("PBS"), через три дня после обработки. На **Фиг. 32В** показано среднее количество клеток в культурах нормальных зрелых фибробластов, обработанных микровезикулами из костного мозга, полученными с использованием способа настоящего изобретения ("MV костного мозга") или PBS ("PBS"), через три дня после обработки. На **Фиг. 32С** графически представлено количество клеток.

[083] На **Фиг. 33А - Фиг. 33В** показаны результаты лечения хронической раны стволовыми клетками костного мозга (включая МСК-КМ). **Фиг. 33А** - До лечения и перед хирургической обработкой раны. Можно наблюдать некротизированное ахиллово сухожилие. **Фиг. 33В** - Заживление после введения (т.е. наружного применения) клеток костного мозга.

[084] На **Фиг. 34А - Фиг. 34С** показано восстановление кожи в ранах, обработанных стволовыми клетками костного мозга. (А) **Фиг. 34А** - биопсия фиброзной, зарубцованной раны до лечения. Показаны биопсии после лечения с образованием многочисленных ретикулярных волокон (**Фиг. 34В**) и упругих волокон (**Фиг. 34С**).

[085] На **Фиг. 35А - Фиг. 35С** показано глубокое ожоговое поражение второй степени. Пациенту делали два введения МСК-КМ с интервалом 11 дней. **Фиг. 35А** - Глубокое ожоговое поражение второй степени в день 0 (до лечения). Обведенная область представляет наиболее глубокую часть ожогового поражения. **Фиг. 35В** - Выделение волосяных фолликулов через 11 дней после первого введения (т.е. наружного применения) МСК-КМ. Выделенные фолликулы отмечены в обведенной области А. **Фиг. 35С** - Рост волос в обведенной области на **Фиг. 35А** через 34 дня после второго введения МСК-КМ.

[086] На **Фиг. 36А - Фиг. 36С** показано заживление у ожогового больного после лечения с двумя наружными применениями МСК с интервалом в десять дней. **Фиг. 36А** - До лечения. **Фиг. 36В** - Через 10 дней после лечения (т.е. наружного применения) первой дозы МСК. **Фиг. 36С** - Через 7 дней после лечения второй дозой МСК-КМ (т.е. через 17 дней после **Фиг. 36А**).

[087] На **Фиг. 37А - Фиг. 37В** показано отсутствие рубцевания у ожогового больного, проходящего обследование через год после лечения МСК-КМ. Верхняя панель: вентральная сторона левого предплечья (на нижней панели показана обведенная желтым область). Кожа пациента демонстрирует нормальную эластичность без признаков рубцевания в ранее обожженных областях.

[088] На **Фиг. 38А - Фиг. 38В** показаны раны на всю толщу кожи (день 5), созданные у свиней породы Йоркшир. Фиг. 38А - Необработанный контроль. Фиг. 38В - Рана, обработанная EV МСК-КМ согласно некоторым вариантам осуществления изобретения. После лечения EV МСК-КМ наблюдали значительно большее закрытие раны. Стрелками указаны области усиленного восстановления кожи согласно некоторым вариантам осуществления изобретения.

[089] На **Фиг. 39А - Фиг. 39С** показаны раны на всю толщу кожи (день 28), созданные у свиней породы Йоркшир, обработанные EV МСК-КМ согласно некоторым примерам осуществления. Фиг. 39А - Стрелками отмечен рост нервов, а звезды показывают рост сосудов. Фиг. 39В - Более сильное увеличение, иллюстрирующее рост сосудов (стрелки). Фиг. 39С - Более сильное увеличение, иллюстрирующее рост нервов (стрелки).

[090] На **Фиг. 40А - Фиг. 40В** показаны ожоговые раны второй степени у свиней через 5 дней после лечения путем инъекции в пораженную ткань свиней EV МСК-КМ согласно некоторым примерам осуществления. Слева: EV, полученные способами ультрацентрифугирования, известными в уровне техники, использовали для лечения ожоговой раны. Рана была выпуклой и сильно воспаленной с образованием стерильной пустулы (указывающей из индуцированный воспалительный ответ, а не инфекцию) и уменьшенным заживлением. Справа: EV, полученные с использованием примерных способов, описанных в настоящем документе, использовали для лечения ожоговой раны. Рана демонстрировала ускоренное заживление с уменьшенным воспалением по сравнению с традиционными EV, полученными с помощью ультрацентрифугирования.

[091] На **Фиг. 41А - Фиг. 41В** графически представлено обогащение мРНК COL7A1 в EV МСК-КМ (средние столбцы на каждой панели). Обработка EV повышала экспрессию COL7A1 в РДБЭ фибробластах. На панели слева показана экспрессия COL7A1, обнаруженная с использованием пары праймеров 1; на панели справа показана экспрессия COL7A1, обнаруженная с использованием пары праймеров 2. Экспрессия гена была нормализована по экспрессии бета-актина, распространенного гена домашнего хозяйства EV.

[092] На **Фиг. 42** графически представлен анализ методом хемоселективного лигирования (с использованием реакции "click iT" химии), который показал продукцию нового коллагена VII из РДБЭ фибробластов после комбинированного лечения EV МСК-КМ (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) и аналогом L-метионина L-гомопропаргилглицином (HPG) (модифицированной аминокислотой), который включался в синтезируемые белки.

[093] На **Фиг. 43А - Фиг. 43В** графически представлено, что EV МСК-КМ значимо стимулируют пролиферацию РДБЭ (Фиг. 43А) и способствуют устойчивости к расщеплению трипсином (Фиг. 43В), оба стандартных теста *in vitro* для оценки приобретения функции в поддержке заживляющего потенциала РДБЭ фибробластов кожи.

[094] На **Фиг. 44А - Фиг. 44С** показана проверка *in vitro* клеточной линии,

полученной от грудного ребенка с диагнозом РДБЭ (типа Аллопо-Сименса). Фибробласты РДБЭ экспрессировали значительно меньше COL7A1 по сравнению с фибробластами, полученными у здоровых субъектов (НЧФ). Фиг. 44А - Пары праймеров 1 и 2, подобранные к области вблизи 3'-конца кДНК, соответствующей 5'-концу мРНК. Фиг. 44В - Экспрессия гена COL7A1 в нормальных фибробластах человека (НФЧ) и в фибробластах РДБЭ. Фиг. 44С - клетки РДБЭ секретируют низкие уровни белка коллагена VII по сравнению с нормальными (контрольными) фибробластами человека.

[095] На **Фиг. 45А - Фиг. 45В** показан обмен везикулами между МСК-КМ и фибробластами РДБЭ. РДБЭФ (окрашенные липидным красителем DiI (красный)) и МСК-КМ (окрашенные липидным красителем DiO (зеленый)) совместно культивировали, и в течение одного дня они начинали захватывать внеклеточные везикулы (желтые). Масштабная линейка, 10 мкм.

[096] На **Фиг. 46А - Фиг. 46D** показано, что белок коллаген VII был выделен совместно с внеклеточными везикулами (ЭВ) МСК-КМ. Фиг. 46А - Электронный микроснимок внеклеточных везикул, выделенных из МСК-КМ бессывороточной кондиционированной среды (КС). Фиг. 46В - Снимок NanoSight EV МСК-КМ в разведении 1:500. Фиг. 46С - Гистограмма зависимости размера от концентрации (разведение 1:500). Вставка показывает, что EV содержат маркер экзосом CD63. Фиг. 46D - Белок коллаген VII в МСК-КМ КС и связанный с очищенными EV МСК-КМ.

[097] На **Фиг. 47А - Фиг. 47В** показано обогащение мРНК COL7A1 в EV МСК-КМ (средние столбцы на каждой панели). Обработка EV повышала экспрессию COL7A1 в фибробластах РДБЭ. На панели слева показана экспрессия COL7A1, детектируемого с использованием пары праймеров 1; на панели справа показана экспрессия COL7A1, детектируемого с использованием пары праймеров 2. Экспрессию гена нормализовали по экспрессии бета-актина, обычного гена домашнего хозяйства EV.

[098] На **Фиг. 48А - Фиг. 48С** показано, что фибробласты РДБЭ, обработанные EV МСК-КМ, содержали больше белка коллагена VII в среде через 3 дня после промывки. Фиг. 48А - Схема обработки. Фиг. 48В - Вестерн-блот коллагена VII в среде РДБЭ. Фиг. 48С - Денситометрический количественный анализ Фиг. 48В (определение коллагена VII выше исходного уровня).

[099] На **Фиг. 49А - Фиг. 49С** показан анализ методом хемоселективного лигирования (с использованием реакции "click iT" химии) (Фиг. 49А и Фиг. 49В), который обнаружил продукцию нового коллагена VII из фибробластов РДБЭ после комбинированной обработки EV МСК-КМ (10 мкг/мл) и аналогом L-метионина L-гомопропаргилглицином (HPG) (модифицированной аминокислотой), который включался в синтезируемые белки (Фиг. 49С).

[0100] На **Фиг. 50А - Фиг. 50В** показано, что EV МСК-КМ увеличивали суррогатные тесты *in vitro*, связанные с заживлением ран (пролиферация и устойчивость к трипсину), фибробластов РДБЭ. Фиг. 50А - Тест на пролиферацию (МТТ). Фиг. 50В - Тест на устойчивость к трипсину.

[0101] На *Фиг. 51A - Фиг. 51E* показаны МСК-КМ, которые доставляли в растворе хлорида натрия ожоговым больным в клиническом исследовании. МСК-КМ секретировали большие количества EV (CD63-положительных) в растворе хлорида натрия в течение нескольких часов (показано, 4 часа). Верхняя левая панель, NanoSight буферного раствора хлорида натрия в качестве фона; верхняя правая панель, NanoSight EV в растворе хлорида натрия (разведение 1:500); нижние панели: гистограмма разведения 1:500 раствора хлорида натрия, доставляемого в ожоговом клиническом исследовании, количественный анализ гистограммы. На Вестерн-блоте во вставке показан CD63 (маркер экзосом), секретируемый МСК-КМ в течение 4 часов.

[0102] На *Фиг. 52* показана модель согласно некоторым примерам осуществления изобретения, в которой секретом МСК-КМ содержит ассоциированные с EV и не ассоциированные с EV белки, которые предоставляют различные ранозаживляющие функции фибробластам РДБЭ, включая белок коллаген VII, мРНК коллагена VII, активаторы сигнализации STAT3 и активаторы канонического пути Wnt.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0103] Для ясности описания, а не в качестве ограничения, подробное описание изобретения разделено на следующие подразделы, которые описывают или иллюстрируют определенные признаки, варианты осуществления или применения настоящего изобретения.

#### **Способы выделения микровезикул настоящего изобретения**

[0104] При использовании в настоящем документе термин "микровезикулы" относится к везикулам, включающим липидные бислои, сформированные из плазматической мембраны клеток, и являются гетерогенными по размеру, в пределах от приблизительно 2 нм до приблизительно 5000 нм. Клетка, из которой сформирована микровезикула, в настоящем документе именуется как "клетка-хозяин". Микровезикулы представляют собой гетерогенную популяцию везикул и включают, без ограничения, внеклеточные везикулы (ЭВ), экзосомы, микрочастицы, микровезикулы, нановезикулы, отделяемые везикулы, мембранные частицы и т.п.

[0105] Микровезикулы экспонируют мембранные белки из своей клетки-хозяина на поверхности своих мембран, при этом микровезикулы также могут внутри содержать молекулы из клетки-хозяина, такие как, например, мРНК, миРНК, тРНК, рРНК, ДНК, липиды, белки или инфекционные частицы. Такие молекулы могут образовываться из или являться рекомбинантными молекулами, введенными в клетку-хозяина. Микровезикулы играют важную роль в межклеточной коммуникации и могут действовать локально и дистально в организме, вызывая изменения в клетках при слиянии с клеткой-мишенью, введении молекул, транспортируемых на поверхности и/или внутри микровезикулы, в клетку-мишень. Например, микровезикулы участвуют в противоопухолевой регрессии, иммунной супрессии рака, опухоли, метастаза, взаимодействий опухоли-стромы, ангиогенеза и в регенерации ткани. Микровезикулы также могут применяться для диагностики заболевания, поскольку они, как было показано, несут биомаркеры

нескольких заболеваний, включая, например, заболевание сердца, ВИЧ и лейкоз.

[0106] В одном варианте осуществления микровезикулы выделены из биологической жидкости, содержащей микровезикулы, в способе, включающем следующие этапы:

- a) получение биологической жидкости, содержащей микровезикулы,
- b) осветление биологической жидкости для удаления клеточного дебриса,
- c) осаждение микровезикул путем добавления осаждающего агента к очищенной биологической жидкости,
- d) сбор осажденных микровезикул и промывка материала для удаления осаждающего агента, и
- e) суспендирование промытых микровезикул в растворе для хранения или последующего применения.

[0107] В одном варианте осуществления биологическую жидкость очищают центрифугированием. В альтернативном варианте осуществления биологическую жидкость очищают фильтрацией.

[0108] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают центрифугированием. В альтернативном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают фильтрацией.

[0109] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, содержащей микровезикулы в способе, включающем следующие этапы:

- a) получение биологической жидкости, содержащей микровезикулы,
- b) осветление биологической жидкости для удаления клеточного дебриса,
- c) осаждение микровезикул путем добавления осаждающего агента к очищенной биологической жидкости,
- d) сбор осажденных микровезикул и промывка материала для удаления осаждающего агента,
- e) суспендирование промытых микровезикул в растворе, и
- f) обработка микровезикул для анализа содержания нуклеиновой кислоты, углевода, липида, малых молекул и/или белка.

[0110] В одном варианте осуществления биологическую жидкость очищают центрифугированием. В альтернативном варианте осуществления биологическую жидкость очищают фильтрацией.

[0111] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают центрифугированием. В альтернативном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают фильтрацией.

[0112] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложены реагенты и наборы для выделения микровезикул из биологических жидкостей согласно способам настоящего изобретения.

[0113] Биологическая жидкость может быть периферической кровью, сывороткой,

плазмой крови, асцитной жидкостью, мочой, спинномозговой жидкостью (СМЖ), мокротой, слюной, костным мозгом, синовиальной жидкостью, водянистой влагой, амниотической жидкостью, ушной серой, грудным молоком, жидкостью бронхоальвеолярного лаважа, спермой (включая секрет предстательной железы), куперовской жидкостью или предэякулятом, женским эякулятом, потом, стулом, волосами, слезной жидкостью, кистозной жидкостью, плевральной и перитонеальной жидкостью, перикардальной жидкостью, лимфой, хилусом, хилусом, желчью, тканевой жидкостью, менструальными выделениями, гноем, кожным салом, рвотой, вагинальными выделениями, отделяемым слизистых оболочек, кишечной жидкостью, соком поджелудочной железы, жидкостями лаважа носовых пазух, бронхолегочными аспиратами или другими смывными жидкостями.

[0114] Биологическая жидкость также может быть получена из полости бластулы, пуповинной крови или материнского кровотока, которая может иметь эмбриональное или материнское происхождение. Биологическая жидкость также может быть получена из образца ткани или биопсии.

[0115] Биологическая жидкость может быть получена из растительных клеток культур растительных клеток. Биологическая жидкость может быть получена из дрожжевых клеток или культур дрожжевых клеток.

[0116] В одном варианте осуществления биологическая жидкость является средой культивирования клеток. В одном варианте осуществления среду культивирования клеток кондиционируют с использованием тканей и/или клеток перед выделением микровезикул согласно способам настоящего изобретения.

[0117] Термин "кондиционированный" или "кондиционированная среда" относится к среде, где выращивают популяцию клеток или ткань, или их комбинацию, и при этом популяция клеток или ткань, или их комбинация выделяют факторы в среду. В одном таком применении популяция клеток или ткань, или их комбинация удаляют из среды, тогда как факторы, которые продуцируют клетки, остаются. В одном варианте осуществления продуцированные факторы являются микровезикулами. Среда может быть кондиционирована с использованием любого подходящего способа, выбранного специалистом в данной области. Например, среду могут культивировать согласно способам, описанным в EP1780267A2.

[0118] В одном варианте осуществления микровезикулы выделены из клеток или ткани, которые были предварительно обработаны перед выделением микровезикул. Предварительная обработка может включать, например, культивирование в специальной среде, среде, которая содержит по меньшей мере одну добавку, фактор роста, среде без сыворотки или их комбинации. Также предварительная обработка может включать контакт клеток или тканей с добавками (например, интерлейкином, VEGF, индукторами факторов транскрипции, факторами транскрипции, гормонами, нейромедиаторами, фармацевтическими соединениями, микроРНК), трансформирующими агентами (например, липосомой, вирусами, трансфицированными агентами и т.д.). В альтернативе

предварительная обработка может включать обработку клеток или ткани в измененных физических условиях (например, в условиях гипоксии, холодового шока, теплового шока и т.п.).

[0119] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из среды, кондиционированной с использованием клеток или ткани, предварительно обработанных перед выделением микровезикул. Предварительная обработка может включать, например, культивирование в специальной среде, среде, содержащей по меньшей мере одну добавку, фактор роста, среде без сыворотки или их комбинации. Также предварительная обработка может включать контакт клеток или тканей с добавками (например, интерлейкином, VEGF, индукторами факторов транскрипции, факторами транскрипции, гормонами, нейромедиаторами, фармацевтическими соединениями, микроРНК), трансформирующими агентами (например, липосомой, вирусами, трансфицированными агентами и т.д.). В альтернативе предварительная обработка может включать обработку клеток или ткани в измененных физических условиях (например, в условиях гипоксии, холодового шока, теплового шока и т.п.).

[0120] В одном варианте осуществления биологическая жидкость является экстрактом из растения. В альтернативном варианте осуществления биологическая жидкость является средой культивирования клеток из культуры растительных клеток. В альтернативном варианте осуществления биологическая жидкость является дрожжевым экстрактом. В альтернативном варианте осуществления биологическая жидкость является средой культивирования клеток из культуры дрожжевых клеток.

[0121] Хотя способы согласно настоящему изобретению могут проводить при любой температуре, специалист в данной области сумеет легко понять, что некоторые биологические жидкости могут разлагаться, причем такое разложение уменьшается, если образец выдерживают при температуре ниже температуры, при которой разлагается биологическая жидкость. В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению проводят при 4°C. В альтернативном варианте осуществления, по меньшей мере одну стадию способа согласно настоящему изобретению проводят при 4°C. В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость может быть разбавлена перед применением в способах согласно настоящему изобретению. Разбавление может требоваться для вязких биологических жидкостей, чтобы уменьшить вязкость образца, если вязкость образца слишком высокая, чтобы получить приемлемый выход микровезикул. Разбавление может быть разбавлением 1:2. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:3. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:4. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:5. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:6. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:7. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:8. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:9. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:10. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:20. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:30. В альтернативе разбавление может быть разбавлением

1:40. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:50. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:60. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:70. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:80. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:90. В альтернативе разбавление может быть разбавлением 1:100.

[0122] Биологическая жидкость может быть разбавлена любым разбавителем, если разбавитель не влияет на функциональную и/или структурную целостность микровезикул. Средний специалист в данной области сможет с легкостью выбрать подходящий разбавитель. Разбавителем может быть, например, фосфатно-солевой буферный раствор, среда культивирования клеток и т.п.

[0123] В одном варианте осуществления биологическую жидкость очищают путем приложения центробежной силы для удаления клеточного дебриса. Центробежная сила, приложенная к биологической жидкости, является достаточной для удаления каких-либо клеток, лизированных клеток, остатков разрушенной ткани из биологической жидкости, однако приложенная центробежная сила недостаточна по величине и/или длительности воздействия для удаления микровезикул. Биологическая жидкость может требовать разбавления для облегчения осветления.

[0124] Длительность и величина центробежной силы, используемой для осветления биологической жидкости, могут изменяться в зависимости от ряда факторов, легко оцениваемых специалистом в данной области, включающих, например, биологическую жидкость, pH биологической жидкости, требуемую чистоту выделенных микровезикул, требуемый размер выделенных микровезикул, требуемую молекулярную массу микровезикул и т.п. В одном варианте осуществления к биологической жидкости прикладывают центробежную силу  $2000 \times g$  в течение 30 минут.

[0125] Очищенную биологическую жидкость подвергают контакту с осаждающим агентом для осаждения микровезикул. В одном варианте осуществления осаждающим агентом может быть любой агент, который окружает микровезикулы и вытесняет воду сольватации. Такие осаждающие агенты могут быть выбраны из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, декстрана и полисахаридов.

[0126] В альтернативном варианте осуществления осаждающий агент может вызывать агрегацию микровезикул.

[0127] В альтернативном варианте осуществления осаждающий агент выбран из группы, состоящей из ионов кальция, ионов магния, ионов натрия, ионов аммония, ионов железа, органических растворителей, таких как сульфат аммония, и флокулянтов, таких как альгинат.

[0128] Очищенную биологическую жидкость подвергают контакту с осаждающим агентом в течение времени, достаточного для осаждения микровезикул. Период времени, достаточный для осаждения микровезикул, может изменяться в зависимости от различных факторов, которые могут быть с легкостью оценены средним специалистом в данной области, включающих, например, биологическую жидкость, pH биологической жидкости,

требуемую чистоту выделенных микровезикул, требуемый размер выделенных микровезикул, требуемую молекулярную массу микровезикул и т.п. В одном варианте осуществления период времени, достаточный для осаждения микровезикул, составляет 6 часов.

[0129] В одном варианте осуществления осветленную биологическую жидкость подвергают контакту с осаждающим агентом в течение времени, достаточного для осаждения микровезикул, при 4°C.

[0130] Концентрация осаждающего агента, используемого для осаждения микровезикул из биологической жидкости, может изменяться в зависимости от различных факторов, которые могут быть с легкостью оценены средним специалистом в данной области, включающих, например, биологическую жидкость, pH биологической жидкости, требуемую чистоту выделенных микровезикул, требуемый размер выделенных микровезикул, требуемую молекулярную массу микровезикул и т.п.

[0131] В одном варианте осуществления осаждающим агентом является полиэтиленгликоль. Молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, может составлять от приблизительно 200 Да до приблизительно 10000 Да. В одном варианте осуществления молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, может составлять больше 10000 Да. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, составляет 10000 Да или 20000 Да. Выбор молекулярной массы может зависеть от различных факторов, включающих, например, вязкость биологической жидкости, требуемую чистоту микровезикул, требуемый размер микровезикул, используемую биологическую жидкость и т.п. В одном варианте осуществления молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, может составлять от приблизительно 200 Да до приблизительно 8000 Да или является примерно любой из 200 Да, 300 Да, 400 Да, 600 Да, 1000 Да, 1450 Да, 1500 Да, 2000 Да, 3000 Да, 3350 Да, 4000 Да, 6000 Да, 8000 Да, 10000 Да, 20000 Да или 35000 Да, или любыми промежуточными диапазонами или молекулярными массами между указанными значениями.

[0132] В одном варианте осуществления молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, составляет приблизительно 6000 Да.

[0133] В одном варианте осуществления средняя молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, составляет приблизительно 8000 Да.

[0134] В одном варианте осуществления средняя молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, составляет приблизительно 10000 Да.

[0135] В одном варианте осуществления средняя молекулярная масса

полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, составляет приблизительно 20000 Да.

[0136] Концентрация полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, может составлять от приблизительно 0,5% в/об до приблизительно 100% в/об. Концентрация полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, может зависеть от различных факторов, включающих, например, вязкость биологической жидкости, требуемую чистоту микровезикул, требуемый размер микровезикул, используемую биологическую жидкость и т.п.

[0137] В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликоль используется в концентрации настоящего изобретения при концентрации приблизительно от 5% до 25% в/об. В некоторых вариантах осуществления концентрация составляет приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% или 15% или находится в пределах между любыми двумя из этих значений.

[0138] В одном варианте осуществления концентрация полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, составляет приблизительно 8,5% в/об.

[0139] В одном варианте осуществления концентрация полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, составляет приблизительно 6% в/об.

[0140] В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу 6000 Да, используется в концентрации 8,5% в/об. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль разбавлен в 0,4М хлориде натрия.

[0141] В одном варианте осуществления концентрация полиэтиленгликоля, используемого в способах согласно настоящему изобретению, обратно пропорциональна средней молекулярной массе полиэтиленгликоля. Например, в одном варианте осуществления, полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу 4000 Да, используется в концентрации 20% в/об. В дополнительном варианте осуществления полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу 8000 Да, используется в концентрации 10% в/об. В дополнительном варианте осуществления полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу 20000 Да, используется в концентрации 4% в/об.

[0142] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают путем приложения центробежной силы. Центробежная сила является достаточной и приложена в течение достаточной длительности, чтобы микровезикулы образовывали осадок, но является недостаточной, чтобы повредить микровезикулы.

[0143] Длительность и величина центробежной силы, используемой для осаждения микровезикул из биологической жидкости, могут изменяться в зависимости от различных факторов, которые могут быть с легкостью оценены средним специалистом в данной области, включающих, например, биологическую жидкость, pH биологической жидкости, требуемую чистоту выделенных микровезикул, требуемый размер выделенных микровезикул, требуемую молекулярную массу микровезикул и т.п. В одном варианте

осуществления осажденные микровезикулы собирают путем приложения центробежной силы  $10000 \times g$  в течение 60 минут.

[0144] Осажденные микровезикулы могут быть промыты любой жидкостью при условии, что жидкость не влияет на функциональную и/или структурную целостность микровезикул. Средний специалист в данной области может с легкостью подобрать подходящую жидкость. Жидкости могут быть, например, фосфатно-солевым буферным раствором, средой культивирования клеток и т.п.

[0145] В одном варианте осуществления этап промывки обеспечивает удаление осаждающего агента. В одном варианте осуществления микровезикулы промывают путем центробежного фильтрования, с помощью фильтрующего устройства с отсечкой молекулярной массы 100 кДа.

[0146] Выделенные микровезикулы могут быть суспендированы с использованием любой жидкости при условии, что жидкость не влияет на функциональную и/или структурную целостность микровезикул. Средний специалист в данной области может с легкостью подобрать подходящую жидкость. Жидкости могут быть, например, фосфатно-солевым буферным раствором, средой культивирования клеток и т.п.

[0147] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы могут быть дополнительно обработаны. Дополнительная обработка может быть выделением микровезикул определенного размера. В альтернативе дополнительная обработка может быть выделением микровезикул конкретного диапазона размеров. В альтернативе дополнительная обработка может быть выделением микровезикул определенной молекулярной массы. В альтернативе дополнительная обработка может быть выделением микровезикул конкретного диапазона молекулярных масс. В альтернативе дополнительная обработка может быть выделением микровезикул, экспонирующих или содержащих определенную молекулу.

[0148] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения дополнительно обрабатывают с целью выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 1000 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения дополнительно обрабатывают с целью выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 500 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения дополнительно обрабатывают с целью выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 400 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения дополнительно обрабатывают с целью выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 300 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения дополнительно обрабатывают с целью выделения препарата

микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 200 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения дополнительно обрабатывают с целью выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 100 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения дополнительно обрабатывают с целью выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 50 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения дополнительно обрабатывают с целью выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 20 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения дополнительно обрабатывают с целью выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 10 нм при определении с помощью электронной микроскопии.

[0149] В одном варианте осуществления последующую очистку выполняют с помощью способа, выбранного из группы, состоящей из иммуноафинной очистки, ВЭЖХ, тангенциальной фильтрации, разделения фаз/фракционирования и микрофлюидики.

[0150] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы дополнительно обрабатывают с целью анализа молекул, экспонируемых на или содержащихся в микровезикулах. Анализируемые молекулы выбраны из группы, состоящей из нуклеиновой кислоты, углевода, липида, малых молекул, ионов, метаболитов, белка и их комбинаций.

[0151] Биологическая жидкость, включающая среду культивирования клеток, кондиционированную с использованием культивируемых клеток: В одном варианте осуществления микровезикулы получают из среды, кондиционированной с использованием культивируемых клеток. В способах согласно настоящему изобретению может использоваться любая культивируемая клетка или популяция клеток. Клетки могут быть стволовыми клетками, первичными клетками, линиями клеток, тканью или эксплантатами органов или их любой комбинацией. Клетки могут быть аллогенными, аутологичными или ксеногенными по происхождению.

[0152] В одном варианте осуществления клетки являются клетками, полученными из аспирата костного мозга. В одном варианте осуществления клетки, полученные из аспирата костного мозга, являются мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из костного мозга. В одном варианте осуществления клетки, полученные из аспирата костного мозга, являются мононуклеарными клетками. В одном варианте осуществления клетки, полученные из аспирата костного мозга, являются смесью мононуклеарных клеток и мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга.

[0153] В одном варианте осуществления мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга выделены из аспирата костного мозга при культивировании аспирата

костного мозга в пластмассовых флаконах для культур тканей в течение времени до приблизительно 4 дней, с последующей промывкой для удаления неприкрепившихся клеток.

[0154] В одном варианте осуществления мононуклеарные клетки выделяют из аспирата костного мозга при центрифугировании низкой плотности с использованием градиента фиколла и сборе мононуклеарных клеток в промежуточном слое.

[0155] В одном варианте осуществления перед выделением микровезикул согласно способам настоящего изобретения, клетки культивируют, выращивают или поддерживают при подходящей температуре и составе газовой смеси (как правило, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> для клеток млекопитающих) в клеточном инкубаторе. Условия культивирования существенно различаются для каждого типа клеток и могут быть с легкостью определены средним специалистом в данной области.

[0156] В одном варианте осуществления изменяют одно или более условий культивирования. В одном варианте осуществления такое изменение приводит к другому фенотипу.

[0157] В одном варианте осуществления, когда клеткам требуется сыворотка в среде их культивирования, для начала процедуры выделения микровезикул в среду для культивирования клеток добавляют сыворотку, не содержащую микровезикул, а затем добавляют среду к клеткам для кондиционирования. Микровезикулы собирают из кондиционированной среды культивирования клеток. Сыворотка может быть обеднена любым подходящим способом, таким как, например, ультрацентрифугирование, фильтрация, осаждение и т.п. Выбор среды, концентрации сыворотки и условий культивирования зависит от ряда факторов, которые могут быть легко оценены специалистами в данной области, включая, например, тип культивируемых клеток, требуемую чистоту микровезикул, требуемый фенотип культивируемой клетки и т.п. В одном варианте осуществления среда культивирования клеток, которую кондиционируют для процедуры выделения микровезикул, является средой для культивирования клеток того же типа, в которой выращивали клетки до процедуры выделения микровезикул.

[0158] В одном варианте осуществления, для начала процедуры выделения микровезикул, среду культивирования клеток удаляют, и к кондиционируемым клеткам добавляют бессывороточную среду. Затем микровезикулы собирают из кондиционированной бессывороточной среды. Выбор среды и условий культивирования зависят от различных факторов, которые могут быть легко оценены специалистом в данной области, включающих, например, тип культивируемых клеток, требуемую чистоту микровезикул, требуемый фенотип культивируемой клетки и т.п. В одном варианте осуществления в бессывороточную среду добавляют по меньшей мере один дополнительный фактор, который способствует или повышает выживаемость клеток в бессывороточной среде. Такой фактор может, например, обеспечивать трофическую поддержку клеток, ингибировать или предотвращать апоптоз клеток.

[0159] Клетки культивируют в культуральной среде в течение достаточного

периода времени, чтобы клетки могли секретировать микровезикулы в среду культивирования. Период времени, достаточный, чтобы клетки могли секретировать микровезикулы в среду культивирования, зависит от различных факторов, которые могут быть легко оценены специалистами в данной области, включающих, например, тип культивируемой клетки, требуемую чистоту микровезикул, требуемый фенотип культивируемой клетки, требуемый выход микровезикул и т.п.

[0160] Затем микровезикулы удаляют из среды культивирования способами согласно настоящему изобретению.

[0161] В одном варианте осуществления перед процедурой выделения микровезикул клетки обрабатывают по меньшей мере одним средством, выбранным из группы, состоящей из противовоспалительного соединения, антиапоптотического соединения, ингибитора фиброза, соединения, которое способно усиливать ангиогенез, иммунодепрессантного соединения, соединения, способствующего выживанию клеток, химиотерапевтического средства, соединения, способного усиливать клеточную миграцию, нейrogenного соединения и фактора роста. В одном варианте осуществления при культивировании клеток в среде, из которой собирают микровезикулы, клетки обрабатывают по меньшей мере одним средством, выбранным из группы, состоящей из противовоспалительного соединения, антиапоптотического соединения, ингибитора фиброза, соединения, способного усиливать ангиогенез, иммунодепрессантного соединения, соединения, способствующего выживанию клеток, и фактора роста.

[0162] В одном варианте осуществления противовоспалительное соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в патенте США 6,509,369.

[0163] В одном варианте осуществления антиапоптотическое соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в патенте США 6,793,945.

[0164] В одном варианте осуществления ингибитор фиброза может быть выбран из соединений, раскрытых в патенте США 6,331,298.

[0165] В одном варианте осуществления соединение, которое способно усиливать ангиогенез, может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2004/0220393 или заявке на патент США 2004/0209901.

[0166] В одном варианте осуществления иммунодепрессантное соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2004/0171623.

[0167] В одном варианте осуществления соединение, способствующее выживанию клеток, может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2010/0104542.

[0168] В одном варианте осуществления фактор роста может быть по меньшей мере одной молекулой, выбранной из группы, состоящей из членов семейства TGF- $\beta$ , включающих TGF- $\beta$ 1, 2 и 3, костные морфогенетические белки (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 и -13), факторы роста фибробластов 1 и 2, тромбоцитарный фактор роста AA, AB и BB, обогащенную тромбоцитами плазму, инсулиноподобный фактор роста (IGF-I, II) фактор роста/дифференцировки (GDF-5, -6, -8, -10, -15), фактор роста клеток эндотелия

сосудов (VEGF), плейотрофин, эндотелин, помимо прочего. Другие фармацевтические соединения могут включать, например, никотинамид, индуцируемый гипоксией фактор 1 альфа, глюкагоноподобный пептид I (GLP-1), GLP-1 и GLP-2-Mimetibody и II, эксндин-4, Nodal, ноггин, NGF, ретиноевую кислоту, паратиреоидный гормон, тенасцин-С, тропоэластин, полученные из тромбина пептиды, кателицидины, дефензины, ламинин, биологические пептиды, содержащие клетка- и гепарин-связывающие домены адгезивных внеклеточных матриксных белков, такие как фибронектин и витронектин, и ингибиторы МАРК, такие как, например, соединения, раскрытые в заявке на патент США 2004/0209901 и заявке на патент США 2004/0132729.

[0169] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, включающей среду культивирования клеток, кондиционированную с использованием культуры мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, что включает следующие этапы:

- a) получение популяции мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга и посев во флаконы при разведении клеток 1:4,
- b) культивирование клеток в среде, пока клетки не достигнут 80-90% конфлюэнтности,
- c) удаление и осветление среды для удаления клеточного дебриса,
- d) осаждение микровезикул путем добавления осаждающего агента к осветленной среде,
- e) сбор осажденных микровезикул и промывка материала для удаления осаждающего агента, и
- f) суспендирование промытых микровезикул в растворе для хранения или последующего применения.

[0170] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, включающей среду культивирования клеток, кондиционированную с использованием культуры моноклеарных клеток из костного мозга, что включает следующие этапы:

- a) получение популяции моноклеарных клеток из костного мозга и посев во флаконы при разведении клеток 1:4,
- b) культивирование клеток в среде, пока клетки не достигнут 80-90% конфлюэнтности,
- c) удаление и осветление среды для удаления клеточного дебриса,
- d) осаждение микровезикул путем добавления осаждающего агента в осветленную среду,
- e) сбор осажденных микровезикул и промывка материала для удаления осаждающего агента, и
- f) суспендирование промытых микровезикул в растворе для хранения или последующего применения.

[0171] В одном варианте осуществления мезенхимальные стволовые клетки из

костного мозга культивируют в среде, включающей  $\alpha$ -MEM с добавкой 20% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина/глутамин при 37°C в воздухе с 95% влажностью и 5% CO<sub>2</sub>.

[0172] В одном варианте осуществления мононуклеарные клетки из костного мозга культивируют в среде, включающей  $\alpha$ -MEM с добавкой 20% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина/глутамин при 37°C в воздухе с 95% влажностью и 5% CO<sub>2</sub>.

[0173] В одном варианте осуществления среду осветляют центрифугированием.

[0174] В одном варианте осуществления осаждающий агент является полиэтиленгликолем, имеющим среднюю молекулярную массу 6000. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль используют в концентрации приблизительно 8,5 в/об %. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль разбавляют в растворе хлорида натрия, имеющем конечную концентрацию 0,4 М.

[0175] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают центрифугированием.

[0176] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы промывают с помощью центробежного фильтрования с использованием мембраны с отсечкой по молекулярной массе 100 кДа при использовании фосфатно-солевого буферного раствора.

[0177] Биологическая жидкость, включающая плазму: В одном варианте осуществления микровезикулы получают из плазмы. Плазма может быть получена у здорового человека или, в альтернативе, у человека с конкретным фенотипом заболевания.

[0178] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, включающей плазму, что включает следующие этапы:

- a) получение плазмы и разбавление плазмы средой культивирования клеток,
- b) осаждение микровезикул путем добавления осаждающего агента в разбавленную плазму,
- c) сбор осажденных микровезикул и промывка материала для удаления осаждающего агента, и
- d) суспендирование промытых микровезикул в растворе для хранения или последующего применения.

[0179] В одном варианте осуществления плазму разбавляют средой 1:10. В одном варианте осуществления средой является  $\alpha$ -MEM.

[0180] В одном варианте осуществления осаждающий агент является полиэтиленгликолем, имеющим среднюю молекулярную массу 6000. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль используют в концентрации приблизительно 8,5 в/об %. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль разбавляют в растворе хлорида натрия, имеющем конечную концентрацию 0,4 М.

[0181] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают центрифугированием.

[0182] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы промывают с помощью центробежного фильтрования с использованием мембраны с отсечкой по молекулярной массе 100 кДа при использовании фосфатно-солевого буферного раствора.

[0183] Биологическая жидкость, включающая аспират костного мозга: В одном варианте осуществления микровезикулы получают из аспирата костного мозга. В одном варианте осуществления микровезикулы получают из клеточной фракции аспирата костного мозга. В одном варианте осуществления микровезикулы получают из бесклеточной фракции аспирата костного мозга.

[0184] В одном варианте осуществления микровезикулы получают из культивируемых клеток из аспирата костного мозга. В одном варианте осуществления культивируемые клетки из аспирата костного мозга используют для кондиционирования среды культивирования клеток, из которой выделяют микровезикулы.

[0185] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, включающей аспират костного мозга, что включает следующие этапы:

- a) получение аспирата костного мозга и разделение аспирата костного мозга на бесклеточную фракцию и клеточную фракцию,
- b) растворение бесклеточной фракции,
- c) осветление разбавленной бесклеточной фракции для удаления клеточного дебриса,
- d) осаждение микровезикул в бесклеточной фракции путем добавления осаждающего агента к разбавленной бесклеточной фракции,
- e) сбор осажденных микровезикул и промывка материала для удаления осаждающего агента, и
- f) суспендирование промытых микровезикул в растворе для хранения или последующего применения.

[0186] В одном варианте осуществления бесклеточную фракцию разбавляют средой 1:10.

[0187] В одном варианте осуществления средой является  $\alpha$ -MEM.

[0188] В одном варианте осуществления разбавленную бесклеточную фракцию осветляют центрифугированием.

[0189] В одном варианте осуществления осаждающий агент является полиэтиленгликолем, имеющим среднюю молекулярную массу 6000. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль используется в концентрации приблизительно 8,5 в/об %. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль разбавляют в растворе хлорида натрия, имеющем конечную концентрацию 0,4 М.

[0190] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают центрифугированием.

[0191] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы промывают с помощью центробежного фильтрования с использованием мембраны с отсечкой по

молекулярной массе 100 кДа при использовании фосфатно-солевого буферного раствора.

[0192] В одном варианте осуществления клеточную фракцию дополнительно обрабатывают с целью выделения и сбора клеток. В одном варианте осуществления клеточную фракцию дополнительно обрабатывают с целью выделения и сбора мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга. В одном варианте осуществления клеточную фракцию дополнительно обрабатывают с целью выделения и сбора моноклеарных клеток из костного мозга. В одном варианте осуществления клеточную фракцию используют для кондиционирования среды, из которой могут быть позже получены микровезикулы.

[0193] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из клеточной фракции. Клеточную фракцию могут инкубировать в течение некоторого периода времени перед выделением микровезикул. В альтернативе микровезикулы могут быть выделены из клеточной фракции сразу после сбора клеточной фракции.

[0194] В одном варианте осуществления клеточную фракцию также обрабатывают по меньшей мере одним средством, выбранным из группы, состоящей из противовоспалительного соединения, антиапоптотического соединения, ингибитора фиброза, соединения, которое способно усиливать ангиогенез, иммунодепрессантного соединения, соединения, способствующего выживанию клеток, химиотерапевтического средства, соединения, способного усиливать клеточную миграцию, нейrogenного соединения и фактора роста.

[0195] В одном варианте осуществления противовоспалительное соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в патенте США 6,509,369.

[0196] В одном варианте осуществления антиапоптотическое соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в патенте США 6,793,945.

[0197] В одном варианте осуществления ингибитор фиброза может быть выбран из соединений, раскрытых в патенте США 6,331,298.

[0198] В одном варианте осуществления соединение, которое способно усиливать ангиогенез, может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2004/0220393 или заявке на патент США 2004/0209901.

[0199] В одном варианте осуществления иммунодепрессантное соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2004/0171623.

[0200] В одном варианте осуществления соединение, способствующее выживанию клеток, может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2010/0104542.

[0201] В одном варианте осуществления фактор роста может быть по меньшей мере одной молекулой, выбранной из группы, состоящей из членов семейства TGF- $\beta$ , включающих TGF- $\beta$ 1, 2 и 3, костные морфогенетические белки (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 и -13), факторы роста фибробластов 1 и 2, тромбоцитарный фактор роста AA, AB и BB, обогащенную тромбоцитами плазму, инсулиноподобный фактор роста (IGF-I, II) фактор роста/дифференцировки (GDF-5, -6, -8, -10, -15), фактор роста клеток эндотелия

сосудов (VEGF), плейотрофин, эндотелин, помимо прочего. Другие фармацевтические соединения могут включать, например, никотинамид, индуцируемый гипоксией фактор 1 альфа, глюкагоноподобный пептид I (GLP-1), GLP-1 и GLP-2-Mimetibody и II, эксндин-4, Nodal, ноггин, NGF, ретиноевую кислоту, паратиреоидный гормон, тенасцин-С, тропоэластин, полученные из тромбина пептиды, кателицидины, дефензины, ламинин, биологические пептиды, содержащие клетка- и гепарин-связывающие домены адгезивных внеклеточных матриксных белков, такие как фибронектин и витронектин, и ингибиторы МАРК, такие как, например, соединения, раскрытые в заявке на патент США 2004/0209901 и заявке на патент США 2004/0132729. В одном варианте осуществления клеточную фракцию культивируют в гипоксических условиях. В одном варианте осуществления клеточную фракцию подвергают тепловому шоку.

[0202] Биологическая жидкость, включающая мочу: В одном варианте осуществления микровезикулы получают из мочи. Моча может быть получена у здорового человека или, в альтернативе, у человека с конкретным фенотипом заболевания.

[0203] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, включающей мочу, что включает следующие этапы:

- а) получение образца мочи,
- б) осветление мочи для удаления клеточного дебриса,
- с) осаждение микровезикул путем добавления осаждающего агента к осветленной моче,
- д) сбор осажденных микровезикул и промывка материала для удаления осаждающего агента, и
- е) суспендирование промытых микровезикул в растворе для хранения или последующего применения.

[0204] В одном варианте осуществления мочу осветляют центрифугированием.

[0205] В одном варианте осуществления осаждающий агент является полиэтиленгликолем, имеющим среднюю молекулярную массу 6000. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль используется в концентрации приблизительно 8,5 в/об %. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль разбавляют в растворе хлорида натрия, имеющем конечную концентрацию 0,4 М.

[0206] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают центрифугированием.

[0207] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы промывают с помощью центробежного фильтрования с использованием мембраны с отсечкой по молекулярной массе 100 кДа при использовании фосфатно-солевого буферного раствора.

[0208] В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения биологические жидкости очищают с помощью фильтрации. В дополнительном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают с помощью фильтрации. В дополнительном варианте осуществления биологические жидкости осветляют и

осажденные микровезикулы собирают с помощью фильтрации. В некоторых вариантах осуществления фильтрация биологической жидкости и/или осажденных микровезикул требует приложения внешней силы. Внешняя сила может быть силой тяжести, обычной силой тяжести или центробежной силой. В альтернативе внешняя сила может быть вакуумом.

[0209] В одном варианте осуществления в варианте осуществления настоящего изобретения предложено устройство для облегчения осветления биологической жидкости с помощью фильтрации. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложено устройство для облегчения сбора осажденных микровезикул с помощью фильтрации. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложено устройство, облегчающее осветление биологической жидкости и сбор осажденных микровезикул с помощью фильтрации. В одном варианте осуществления устройство также обеспечивает промывку микровезикул.

[0210] В одном варианте осуществления устройство является устройством, показанным на Фигуре 4. В этом варианте осуществления биологическую жидкость добавляют во внутреннюю камеру. Внутренняя камера имеет первый фильтр с размером пор, который позволяет микровезикулам проходить, но задерживает частицы с размером больше, чем у микровезикулы, во внутренней камере. В одном варианте осуществления размер пор фильтра внутренней камеры составляет 1 мкм. В этом варианте осуществления, когда биологическая жидкость проходит из внутренней камеры через фильтр, частицы больше 1 мкм задерживаются во внутренней камере, а все остальные частицы собираются в зоне между нижней частью внутренней камеры и вторым фильтром.

[0211] Второй фильтр имеет размер пор, который не позволяет проходить микровезикулам. В одном варианте осуществления размер пор второго фильтра внутренней камеры составляет 0,01 мкм. В этом варианте осуществления, когда биологическая жидкость проходит через второй фильтр, микровезикулы удерживаются в зоне между нижней частью внутренней камеры и вторым фильтром, а все остальные частицы и жидкость собираются в нижней части устройства.

[0212] Средний специалист в данной области с легкостью сумеет оценить, что устройство может иметь больше двух фильтров с разными размерами пор, например, для отбора микровезикул требуемых размеров.

[0213] В одном варианте осуществления осаждающий агент добавляют к биологической жидкости во внутренней камере. В одном варианте осуществления осаждающий агент добавляют к фильтрату после того, как он прошел через первый фильтр. Мембраны фильтра, используемые в устройстве согласно настоящему изобретению, могут быть изготовлены из любого подходящего материала при условии, что мембрана фильтра не будет реагировать с биологической жидкостью или связываться с компонентами в биологической жидкости. Например, мембраны фильтра могут быть изготовлены из материала с низкой связывающей способностью, такого как, например,

полиэфирсульфон, нейлон 6, политетрафторэтилен, полипропилен, зэтамодифицированное микростекловолокно, нитроцеллюлоза, ацетат целлюлозы, поливинилиденфторид, регенерированная целлюлоза.

### **Микровезикулы настоящего изобретения**

[0214] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 5000 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 1000 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 500 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 400 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 300 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 200 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 100 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 50 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 20 нм при определении с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 10 нм при определении с помощью электронной микроскопии.

[0215] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения имеют молекулярную массу по меньшей мере 100 кДа.

[0216] Микровезикулы, выделенные согласно способам настоящего изобретения, могут применяться в терапии. В альтернативе микровезикулы, выделенные согласно способам настоящего изобретения, могут применяться для диагностических тестов. В альтернативе микровезикулы настоящего изобретения могут применяться для изменения или модификации клеток или тканей. В случае, когда микровезикулы настоящего изобретения применяются для изменения или модификации клеток или тканей, микровезикулы могут быть нагружены, помечены РНК, ДНК, липидами, углеводами, белком, лекарственными средствами, малыми молекулами, метаболитами или их комбинациями, которые будут изменять или модифицировать клетку или ткань. В альтернативе микровезикулы могут быть выделены из клеток или тканей, которые

экспрессируют и/или содержат РНК, ДНК, липиды, углеводы, белок, лекарственные средства, малые молекулы, метаболиты или их комбинации.

#### **Применение микровезикул настоящего изобретения в диагностических тестах**

[0217] Микровезикулы настоящего изобретения могут применяться в диагностическом тесте, который позволяет обнаруживать биомаркеры, идентифицирующие конкретные фенотипы, такие как, например, состояние или заболевание, или стадия или прогрессирование заболевания. Биомаркеры или маркеры из микровезикул, специфических для клетки-источника, могут использоваться для определения схем лечения для заболеваний, состояний, стадий заболеваний и стадий состояний, и могут также использоваться для определения эффективности лечения. Маркеры из микровезикул, специфических для клетки-источника, также могут использоваться для идентификации состояний заболеваний неизвестной этиологии.

[0218] При использовании в настоящем документе термин "биомаркер" относится к показателю биологического состояния. Это - характеристика, которую объективно измеряют и оценивают как показатель нормальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство. Один или более биомаркеров микровезикулы могут оценивать для определения фенотипа. Биомаркер может быть метаболитом, нуклеиновой кислотой, пептидом, белком, липидом, антигеном, углеводом или протеогликаном, таким как ДНК или РНК. РНК может быть мРНК, миРНК, мякРНК, мяРНК, рРНК, тРНК, миРНК, гяРНК или шРНК.

[0219] Фенотип у субъекта может быть определен путем получения биологического образца у субъекта и исследования одной или более микровезикул из образца. Например, определение фенотипа у субъекта или пациента может включать обнаружение заболевания или состояния (включая досимптоматическое обнаружение на ранней стадии), определение прогноза, диагностику или тераностику заболевания или состояния, или определение стадии или прогрессирования заболевания или состояния. Определение фенотипа также может включать определение подходящего лечения или эффективности лечения для определенных заболеваний, состояний, стадий заболеваний и стадий состояний, прогнозы и анализ вероятности прогрессирования заболевания, в частности, повторного возникновения заболевания, распространения метастазов или рецидива заболевания. Фенотип также может быть клинически определенным типом или подтипом состояния или заболевания, такого как рак или опухоль. Определение фенотипа также может быть определением физиологического состояния или оценкой нарушения функции органа или отторжения органа, например, после трансплантации. Продукты и способы, описанные в настоящем документе, позволяют проводить оценку субъекта на индивидуальной основе, что может обеспечить преимущества более эффективных и экономичных решений при лечении.

[0220] Фенотип может быть любым фенотипом, перечисленным в Патенте США 7,897,356. Фенотип может быть опухолью, новообразованием или раком. Рак, диагностируемый или оцениваемый с применением продуктов или способов, описанных в

настоящем документе, включает, без ограничения перечисленным, рак молочной железы, рак яичника, рак легкого, рак толстой кишки, гиперпластический полип, аденому, рак толстой и прямой кишки, тяжелую дисплазию, легкую дисплазию, гиперплазию предстательной железы, рак предстательной железы, меланому, рак поджелудочной железы, рак головного мозга (такой как глиобластома), гемобластоз, гепатоцеллюлярную карциному, рак шейки матки, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак пищевода, гастроинтестинальную стромальную опухоль (ГИСО), почечно-клеточную карциному (ПКК) или рак желудка. Рак толстой и прямой кишки может относиться к CRC стадии B или C-D по классификации Дюкса. Гемобластоз может быть B-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом, B-клеточной лимфомой ДВККЛ, B-клеточной лимфомой-ДВККЛ из клеток, подобных клеткам зародышевого центра, B-клеточной лимфомой-ДВККЛ из клеток, подобных активированным B-клеткам, и лимфомой Беркитта. Фенотип также может быть предраковым состоянием, таким как пищевод Баррета.

[0221] Фенотип также может быть воспалительным заболеванием, иммунопатологическим заболеванием или аутоиммунным заболеванием. Например, заболевание может быть воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК), болезнью Крона (БК), язвенным колитом (ЯК), воспалением тазовых органов, васкулитом, псориазом, диабетом, аутоиммунным гепатитом, рассеянным склерозом, миастенией гравис, диабетом I типа, ревматоидным артритом, псориазом, системной красной волчанкой (СКВ), тиреоидитом Хашимото, болезнью Грейвса, анкилозирующим спондилитом, болезнью Шегрена, CREST-синдромом, склеродермией, ревматическим заболеванием, отторжением органа, реакцией трансплантат против хозяина, первичным склерозирующим холангитом или сепсисом. В некоторых примерах осуществления заболеванием является БЭ, например, РДБЭ и/или ДДБЭ, пограничный БЭ, простой БЭ и/или приобретенные формы БЭ.

[0222] Фенотип также может быть сердечно-сосудистым заболеванием, таким как атеросклероз, застойная сердечная недостаточность, нестабильная бляшка, инсульт или ишемия. Сердечно-сосудистое заболевание или состояние может быть повышенным артериальным давлением, стенозом, окклюзией сосуда или тромботическим явлением.

[0223] Фенотип также может быть неврологическим заболеванием, таким как рассеянный склероз (РА), болезнь Паркинсона (БП), болезнь Альцгеймера (БА), шизофрения, биполярное расстройство, депрессия, аутизм, прионная болезнь, болезнь Пика, деменция, болезнь Хантингтона (БХ), синдром Дауна, цереброваскулярная болезнь, энцефалит Расмуссена, вирусный менингит, нейропсихиатрическая системная красная волчанка (НПСКВ), амиотрофический боковой склероз, болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, трансмиссивная губчатая энцефалопатия, ишемическое реперфузионное повреждение (например, инсульт), травма головного мозга, микробная инфекция или синдром хронической усталости. Фенотип также может быть состоянием, таким как фибромиалгия, хроническая нейропатическая боль или периферическая нейропатическая боль.

[0224] Фенотип также может быть инфекционным заболеванием, таким как бактериальная, вирусная инфекция или кандидоз. Например, заболевание или состояние могут быть болезнью Уиппла, прионной болезнью, циррозом, метицилин-резистентным золотистым стафилококком, ВИЧ, гепатитом, сифилисом, менингитом, малярией, туберкулезом или гриппом. Вирусные белки, такие как ВИЧ или ВГС-подобные частицы, могут быть оценены в экзосоме для оценки вирусного состояния.

[0225] Фенотип может также быть перинатальным или связанным с беременностью состоянием (например, преэклампсией или преждевременными родами), нарушением обмена веществ или состоянием, таким как нарушение обмена веществ или состояние, связанное с обменом железа. Нарушение обмена веществ или состояние может быть также диабетом, воспалением или перинатальным состоянием.

[0226] Фенотип может быть обнаружен с помощью любого подходящего метода анализа, такого как, например, Вестерн-блоттинг, ИФА, ПЦР и т.п. Методы анализа могут комбинировать для проведения мультиплексного анализа больше чем одного фенотипа. Примеры методов анализа, которые могут быть применены к микровезикулам настоящего изобретения, раскрыты в заявках РСТ WO2009092386A3 и WO2012108842A1.

[0227] В случае, когда биомаркером является РНК, РНК может быть выделена из микровезикул настоящего изобретения способами, раскрытыми в патенте США 8,021,847.

[0228] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте заболеваний, раскрытых в патенте США 7,897,356.

[0229] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на рак согласно способам, раскрытым в патенте США 8,211,653.

[0230] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на рак согласно способам, раскрытым в патенте США 8,216,784.

[0231] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на рак предстательной железы согласно способам, раскрытым в патенте США 8,278,059. В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на прогноз для выживания рака согласно способам, раскрытым в патенте США 8,343,725.

[0232] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте для прогноза выживаемости при раке согласно способам, раскрытым в патенте США 8,349,568.

[0233] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на острый лимфолейкоз согласно способам, раскрытым в патенте США 8,349,560.

[0234] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на острый лимфолейкоз согласно способам, раскрытым в патенте США 8,349,561.

[0235] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на вирус гепатита С. В одном варианте осуществления РНК вируса гепатита С выделяют из микровезикул настоящего изобретения согласно способам, описанным в патенте США 7,807,438, для проверки на присутствие вируса гепатита С у пациента.

[0236] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на определение ответа пациента на противоопухолевую терапию согласно способам, раскрытым в патенте США 8,349,574.

[0237] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на диагностику злокачественных опухолей согласно способам, раскрытым в заявке на патент США US20120058492A1.

[0238] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на диагностику рака или неблагоприятный исход беременности согласно способам, раскрытым в заявке на патент США US20120238467A1.

[0239] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на ВИЧ в моче согласно способам, раскрытым в заявке на патент США US20120214151A1. В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на сердечно-сосудистые явления согласно способам, раскрытым в заявке на патент США US20120309041A1.

[0240] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на сердечно-сосудистые явления согласно способам, раскрытым в заявке на патент WO2012110099A1.

[0241] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на сердечно-сосудистые явления согласно способам, раскрытым в заявке на патент WO2012126531A1.

[0242] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на сердечно-сосудистые явления согласно способам, раскрытым в заявке на патент WO2013110253A3.

[0243] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на меланому согласно способам, раскрытым в заявке на патент WO2012135844A2.

[0244] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в диагностическом тесте на метастатическую меланому путем исследования микровезикул, выделенных согласно способам настоящего изобретения, на присутствие биомаркера BRAF. Присутствие BRAF может быть определено с помощью Вестерн-блоттинга или, в альтернативе, ПЦР. В одном варианте осуществления тест на метастатическую меланому позволяет обнаруживать BRAF дикого типа и злокачественный BRAF. В одном варианте осуществления тест на метастатическую меланому позволяет обнаруживать сплайс-варианты злокачественного BRAF.

[0245] В одном варианте осуществления микровезикулы, которые применяются в диагностическом тесте на метастатическую меланому, выделены с помощью способа, включающего этапы, схематично представленные на Фигуре 3.

[0246] В одном варианте осуществления микровезикулы получают у пациента, желающего выполнить диагностику на наличие метастатической меланомы. В одном варианте осуществления микровезикулы получают из плазмы крови пациента.

[0247] В одном варианте осуществления наличие метастатической меланомы определяют с помощью ПЦР при использовании одного из двух наборов праймеров, приведенных ниже:

Последовательность 1:

Прямой: AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA (SEQ ID NO: 1)

Обратный: CTGATGGGACCCACTCCATC (SEQ ID NO: 2)

Длина ампликона: 70

Последовательность 2:

Прямой: GAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG (SEQ ID NO: 3)

Обратный: CTGATGGGACCCACTCCATC (SEQ ID NO: 4)

Длина ампликона: 82

[0248] В другом варианте осуществления наличие метастатической меланомы определяют с помощью Вестерн-блоттинга при использовании мышиного антитела против V600E BRAF (NewEast Biosciences, Malvern, PA).

#### **Применение микровезикул настоящего изобретения в терапии**

[0249] Микровезикулы настоящего изобретения могут применяться в качестве терапии для лечения заболевания.

[0250] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в качестве вакцин согласно способам, описанным в заявке на патент США US20030198642A1.

[0251] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются для модуляции или супрессии иммунного ответа у пациента согласно способам, описанным в заявке на патент США US20060116321A1.

[0252] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются для модуляции или супрессии иммунного ответа у пациента согласно способам, описанным в заявке PCT WO06007529A3.

[0253] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются для модуляции или супрессии иммунного ответа у пациента согласно способам, описанным в заявке PCT WO2007103572A3.

[0254] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются для модуляции или супрессии иммунного ответа у пациента согласно способам, описанным в патенте США 8,288,172.

[0255] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в качестве терапии при раке согласно способам, описанным в заявке PCT

WO2011000551A1. В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в качестве терапии при раке или воспалительном заболевании согласно способам, описанным в заявке на патент США US20120315324A1.

[0256] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются в качестве терапии при повреждении сосудов согласно способам, описанным в патенте США 8,343,485.

[0257] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются для доставки молекул в клетки. Доставка молекул может применяться при лечении или предупреждении заболевания. В одном варианте осуществления доставку осуществляют согласно способам, описанным в заявке PCT WO04014954A1. В дополнительном варианте осуществления доставку осуществляют согласно способам, описанным в заявке PCT WO2007126386A1. В дополнительном варианте осуществления доставку осуществляют согласно способам, описанным в заявке PCT WO2009115561A1. В дополнительном варианте осуществления доставку осуществляют согласно способам, описанным в заявке PCT WO2010119256A1.

[0258] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются для стимуляции или улучшения заживления раны. В одном варианте осуществления рана является глубоким ожогом на всю толщю кожи. В одном варианте осуществления рана является ожогом второй степени.

[0259] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются для стимуляции или улучшения ангиогенеза у пациента.

[0260] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются для стимуляции или улучшения регенерации нейронов у пациента.

[0261] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются для уменьшения образования рубца у пациента.

[0262] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются для уменьшения образования морщин на коже пациента.

[0263] В одном варианте осуществления микровезикулы настоящего изобретения применяются для регуляции регенерации сложной ткани у пациента.

[0264] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, которые могут вызывать функциональную регенерацию и организацию структур сложной ткани. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, которые могут восстанавливать гемопоэтическую ткань у пациента с апластической анемией. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, которые могут восстанавливать по меньшей мере одну ткань у пациента с больной, поврежденной или отсутствующей кожей, выбранную из группы, состоящей из: эпителиальной ткани, стромальной ткани, нервной ткани, сосудистой ткани и придаточных структур. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, которые могут восстанавливать ткань

и/или клетки из всех трех зародушевых листков.

[0265] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который применяется для модуляции иммунной системы пациента.

[0266] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который применяется для облегчения одного или более симптомов БЭ (например, РДБЭ и/или ДДБЭ, пограничного БЭ, простого БЭ и/или приобретенных форм БЭ) у пациента.

[0267] В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который применяется для повышения экспрессии коллагена VII у пациента, имеющего БЭ (например, РДБЭ и/или ДДБЭ, пограничный БЭ, простой БЭ и/или приобретенные формы БЭ).

[0268] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который повышает выживание ткани или клеток, которые пресаживают пациенту. В одном варианте осуществления пациента лечат выделенным препаратом микровезикул перед получением трансплантата ткани или клеток. В дополнительном варианте осуществления пациента лечат выделенным препаратом микровезикул после получения трансплантата ткани или клеток. В дополнительном варианте осуществления ткань или клетки обрабатывают выделенным препаратом микровезикул. В одном варианте осуществления ткань или клетки обрабатывают выделенным препаратом микровезикул перед трансплантацией.

[0269] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, содержащих по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из РНК, ДНК, липида, углевода, метаболита, белка и их комбинации из клетки-хозяина. В одном варианте осуществления клетка-хозяин модифицирована для экспрессии по меньшей мере одной молекулы, выбранной из группы, состоящей из РНК, ДНК, липида, углевода, метаболита, белка и их комбинации. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул, содержащих по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из РНК, ДНК, липида, углевода, метаболита, белка и их комбинации из клетки-хозяина, применяется в качестве терапевтического средства.

#### **Применение микровезикул настоящего изобретения в способах лечения**

[0270] Для терапевтического применения MV предпочтительно объединяют с фармацевтически приемлемым носителем. При использовании в настоящем документе "фармацевтически приемлемый носитель" означает буферы, носители и вспомогательные вещества, подходящие для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерного токсического действия, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соизмеримых с разумным отношением выгоды/риска. Носитель(и) должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместимым с другими компонентами композиций и не являться токсичным для реципиента.

Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, растворители, дисперсионные среды, покрытия, изотонические вещества и вещества, задерживающие абсорбцию, и т.п., которые совместимы с фармацевтическим применением. Использование таких сред и веществ для фармацевтически активных субстанций известно в уровне техники.

[0271] Таким образом, композиции EV согласно настоящему изобретению могут включать по меньшей мере одно из любых подходящих вспомогательных веществ, таких как, без ограничения перечисленными, разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант и т.п. Предпочтительными являются фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Неограничивающие примеры и способы приготовления таких стерильных растворов известны в уровне техники, такие как, без ограничения, описанные в Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990. Обычно могут выбрать фармацевтически приемлемые носители, которые подходят для способа введения, растворимости и/или стабильности композиции EV, как известно в уровне техники или как описано в настоящем документе.

[0272] Фармацевтические вспомогательные вещества и добавки, используемые в настоящей композиции, включают, без ограничения перечисленными, белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводы (например, сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; производные сахаров, такие как альдиты, альдоновые кислоты, этерифицированные сахара и т.п., и полисахариды или полимеры сахаров), которые могут присутствовать отдельно или в комбинации, составляющие в отдельности или в комбинации 1-99,99% по массе или объему. Примеры белковых вспомогательных веществ включают сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA), рекомбинантный человеческий альбумин (гНА), желатин, казеин и т.п. Репрезентативные компоненты, которые представляют собой молекулы аминокислот/антител, которые также могут функционировать в буферной емкости, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т.п.

[0273] Углеводные вспомогательные вещества, подходящие для применения в изобретении, включают, например, моносахариды, такие как фруктозу, мальтозу, галактозу, глюкозу, D-маннозу, сорбозу и т.п.; дисахариды, такие как лактозу, сахарозу, трегалозу, целлобиозу и т.п.; полисахариды, такие как рафинозу, мелезитозу, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), миоинозит и т.п. Предпочтительными углеводными наполнителями для применения в настоящем изобретении являются маннит, трегалоза и рафиноза.

[0274] Композиции EV также могут включать буфер или регулятор pH; как правило, буфер является солью, полученной из органической кислоты или основания. Репрезентативные буферы включают соли органических кислот, такие как соли лимонной

кислоты, уксусной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты или фталевой кислоты; Трис, трометамин гидрохлорид или фосфатные буферы.

[0275] Кроме того, композиции EV согласно изобретению могут включать полимерные вспомогательные вещества/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фикоиллы (полимерный сахар), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин), полиэтиленгликоли, ароматизаторы, противомикробные средства, подсластители, антиоксиданты, антистатические вещества, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как "TWEEN 20" и "TWEEN 80"), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатообразующие вещества (например, ЭДТА).

[0276] Эти и дополнительные известные фармацевтические вспомогательные вещества и/или добавки, подходящие для применения в композициях молекулы антитета согласно изобретению, известны в уровне техники, например, как перечислено в "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), и в "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998). Предпочтительные материалы носителей или вспомогательных веществ являются углеводами (например, сахарами и альдитами) и буферными веществами (например, цитратом) или полимерными веществами.

[0277] В настоящем изобретении предложены стабильные композиции, включающие MV в фармацевтически приемлемом составе. Консервированные составы содержат по меньшей мере один известный консервант или консервант, необязательно выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из одного фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, фенилмеркурнитрита, феноксиэтанола, формальдегида, хлорбутанола, хлорида магния (например, гексагидрата), алкилпарабена (метил, этил, пропил, бутил и т.п.), хлорида бензалкония, хлорида бензетония, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смесей в водном разбавителе. Любая подходящая концентрация или смесь могут использоваться, как известно в уровне техники, например, 0,001-5%, или любой диапазон или значение в указанных пределах, такой как, без ограничения, 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или любой диапазон или значение в указанных пределах. Неограничивающие примеры включают отсутствие консерванта, присутствие 0,1-2% мета-крезола (например, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9 или 1,0%), 0,1-3% бензилового спирта (например, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0 или 2,5%), 0,001-0,5% тимеросала (например, 0,005 или 0,01%), 0,001-2,0% фенола (например, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9 или 1,0%), 0,0005-1,0% алкилпарабен(ов) (например, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9 или 1,0%) и т.п.

[0278] Фармацевтические композиции, содержащие MV, как раскрыто в настоящем

документе, могут быть представлены в единичной лекарственной форме и могут быть изготовлены любым подходящим способом. Фармацевтическая композиция должна иметь состав, совместимый с ее предполагаемым путем введения. Примерами путей введения являются внутривенное (в/в), кожное, ингаляционное, трансдермальное, местное, трансмукозальное и ректальное введение. Предпочтительным путем введения MV является наружное применение. Полезные композиции могут быть получены способами, известными в области фармацевтики. Например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), выше. Компоненты композиций, подходящие для парентерального введения, включают стерильный разбавитель, такой как воду для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновую кислоту или бисульфит натрия; хелатообразующие вещества, такие как ЭДТА; буферные вещества, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и вещества для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстрозу.

[0279] Носитель должен быть стабильным в условиях производства и хранения и должен содержать консерванты, предохраняющие от воздействия микроорганизмов. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

[0280] Фармацевтические композиции предпочтительно являются стерильными. Стерилизация может быть достигнута любым подходящим методом, например, фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны. Если композицию лиофилизируют, стерилизация фильтрованием может быть проведена до или после лиофилизации и восстановления.

[0281] Композиции настоящего изобретения могут находиться в различных формах. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии и липосомы. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции находятся в форме растворов для инъекций или инфузий. Предпочтительным способом введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутриглазной, внутрибрюшинный, внутримышечный). В предпочтительном варианте осуществления препарат вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В другом предпочтительном варианте осуществления препарат вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции.

[0282] Фразы "парентеральное введение" и "вводимый парентерально" при использовании в настоящем документе означают способы введения средств кроме энтерального и наружного применения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутриартериальное,

интратекальное, внутрикапсулярное, интраорбитальное, интравитреальное, интракардиальное, внутрικοжное, внутривбрюшинное, транстрахеальное, ингаляционное, подкожное, субкутикулярное, внутрисуставное, субкапсулярное, субарахноидальное, интраспинальное, эпидуральное введение и внутривгрудинную инъекцию и инфузию.

[0283] В настоящем изобретении предложен набор, включающий упаковочный материал и по меньшей мере одну везикулу, включающую раствор MV с предписанными буферами и/или консервантами, необязательно в водном разбавителе. Водный разбавитель необязательно дополнительно включает фармацевтически приемлемый консервант. Консерванты включают вещества, выбранные из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил, этил, пропил, бутил и т.п.), хлорида бензалкония, хлорид бензетония, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смесей. Концентрация консерванта, используемого в композиции, является концентрацией, достаточной, чтобы обеспечить противомикробное действие. Такие концентрации зависят от выбранного консерванта и с легкостью могут быть определены квалифицированным специалистом.

[0284] Другие вспомогательные вещества, например, изотонические вещества, буферы, антиоксиданты, консерванты, улучшители могут быть необязательно и предпочтительно добавлены к разбавителю. Изотоническое вещество, такое как глицерин, обычно используют в известных концентрациях. Физиологически переносимый буфер может быть добавлен для обеспечения улучшенного контроля pH. Композиции могут охватывать широкий диапазон pH, например, от приблизительно pH 4,0 до приблизительно pH 10,0, от приблизительно pH 5,0 до приблизительно pH 9,0 или от приблизительно pH 6,0 до приблизительно pH 8,0.

[0285] Другие добавки, такие как фармацевтически приемлемые солюбилизаторы, такие как TWEEN 20 (полиэтиленоксид (20) сорбитанмонолаурат), TWEEN 40 (полиэтиленоксид (20) сорбитанмонопальмитат), TWEEN 80 (полиэтиленоксид (20) сорбитанмоноолеат), Pluronic F68 (блоксополимеры полиэтиленоксида и полиоксипропилена) и ПЭГ (полиэтиленгликоль) или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 или 80 или полосамер 184 или 188, Pluronic® многоатомные спирты, другие блоксополимеры и хелатообразователи, такие как ЭДТА и ЭГТА, могут быть необязательно добавлены к составам или композициям для уменьшения агрегации. Эти добавки особенно полезны в случае использования насоса или пластмассового контейнера для введения состава. Наличие фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества уменьшает склонность белка к агрегации.

[0286] Различные системы доставки могут использоваться для введения MV субъекту. В некоторых примерах осуществления введение MV является наружным, необязательно с добавлением перевязки, биндажа, медицинской ленты, тампона, марли и т.п. Подходящие перевязки, содействующие при наружной доставке, известны в уровне техники и доступны в продаже. В других вариантах осуществления MV вводят путем пульмональной доставки, например, путем интраназального введения или перорального

ингаляционного введения. Пульмональная доставка может быть выполнена с применением шприца или ингаляционного устройства (например, небулайзера, аэрозольного дозирующего ингалятора, многодозового жидкостного ингалятора, термоиспарительного аэрозольного устройства, ингалятора сухого порошка и т.п.). Подходящие способы пульмональной доставки известны в уровне техники и доступны коммерчески.

[0287] Любая из композиций, описанных выше, может храниться в жидкой или замороженной форме и, необязательно, может быть подвергнута процессу консервации.

[0288] В некоторых примерах осуществления изобретения EV, описанные в настоящем документе, применяются для доставки одного или более биоактивных средств в клетку-мишень. Предполагается, что термин "биоактивное средство" включает, без ограничения перечисленными, белки (например, немембрансвязанные белки), пептиды (например, немембрансвязанные пептиды), факторы транскрипции, нуклеиновые кислоты и т.п., которые экспрессируются в клетке и/или в клеточной жидкости и которые добавляют в ходе очистки и/или получения EV, описанных в настоящем документе, и/или фармацевтические соединения, белки (например, не мембрансвязанные белки), пептиды (например, не мембрансвязанные пептиды), факторы транскрипции, нуклеиновые кислоты и т.п., воздействию которых EV, описанные в настоящем документе, подвергаются в ходе одной или более стадий очистки и/или получения, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биоактивным средством является белок коллаген VII, мРНК коллагена VII, активатор сигнализации STAT3 (например, интерферон, эпидермальный фактор роста, интерлейкин-5, интерлейкин-6, MAP-киназа, нерецепторная тирозинкиназа c-src или другая молекула, которая фосфорилирует и/или иным образом активирует STAT3) и/или активатор канонического пути Wnt (см., например, McBride et al. (2017). Трансгенная экспрессия ингибитора канонического пути Wnt, каллестатина, связана со снижением CD19+ В-лимфоцитов, циркулирующих в периферической крови. См. публикацию *International Journal of Hematology*, 1-10. DOI: 10.1007/s12185-017-2205-5, полностью включенную в настоящий документ посредством отсылки). В других вариантах осуществления биоактивным средством является одно или более фармацевтических соединений, известных в уровне техники.

[0289] Специалистам в данной области будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации способов, описанных в настоящем документе, могут быть сделаны с использованием подходящих эквивалентов без отступления от объема вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе. Далее, после подробного описания некоторых вариантов осуществления, они будут более понятны при обращении к следующим примерам, которые включены исключительно в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения. Все патенты, заявки на патент и источники, описанные в настоящем документе, включены посредством отсылки во всей своей полноте во всех отношениях.

## ПРИМЕРЫ

**Пример 1: Выделение микровезикул из среды культивирования клеток с помощью ультрацентрифугирования**

[0290] В данном примере проиллюстрирован типичный способ, с помощью которого микровезикулы выделяют из среды культивирования клеток или любой биологической жидкости. Схема способа выделения микровезикул из среды культивирования клеток показана на Фигуре 1. В общем, клетки культивируют в среде с добавкой сыворотки, не содержащей микровезикул (сыворотка может быть обеднена микровезикулами с помощью ультрацентрифугирования, фильтрации, осаждения и т.д.). После культивирования клеток в течение некоторого периода времени, среду удаляют и переносят в конические пробирки и центрифугируют при  $400\times g$  в течение 10 минут при  $4^{\circ}C$  для осаждения клеток. Затем супернатант переносят в новые конические пробирки и центрифугируют при  $2000\times g$  в течение 30 минут при  $4^{\circ}C$  для дополнительного удаления клеток и клеточного дебриса. После этого может следовать еще одна стадия центрифугирования (например, при  $10000\times g$  в течение 30 минут для дополнительного удаления клеточного дебриса и/или удаления более крупных микровезикул). Полученный супернатант переносят в ультрацентрифужные пробирки, взвешивают для получения равного веса и проводят ультрацентрифугирование при  $70000+ \times g$  в течение 70 минут при  $4^{\circ}C$  для осаждения микровезикул.

[0291] Этот супернатант затем отбрасывают и ресуспендируют осадок в охлажденном на льду PBS. Раствор подвергают ультрацентрифугированию при  $70000+ \times g$  в течение 70 минут при  $4^{\circ}C$  для осаждения микровезикул. Обогащенный микровезикулами осадок ресуспендируют в малом объеме (приблизительно 50-100 мкл) подходящего буфера (например, PBS).

**Пример 2: Выделение микровезикул из среды культивирования клеток с помощью способов настоящего изобретения**

[0292] В данном примере проиллюстрировано, как микровезикулы выделяют из среды культивирования клеток способами настоящего изобретения. Схема способа выделения микровезикул из среды, которая содержит культивируемые клетки, показана на Фигурах 2 и 3. В общем, клетки культивируют в среде с добавкой сыворотки, не содержащей микровезикулы (сыворотка может быть обеднена микровезикулами с помощью ультрацентрифугирования, фильтрации, осаждения и т.д.). После культивирования клеток в течение некоторого периода времени, среду удаляют, переносят в коническую пробирку и центрифугируют при  $400\times g$  в течение 10 минут при  $4^{\circ}C$  для осаждения клеток. Затем супернатант переносят в новые конические пробирки и центрифугируют при  $2000\times g$  в течение 30 минут при  $4^{\circ}C$  для дополнительного удаления клеток и клеточного дебриса. Затем может следовать другой этап центрифугирования (например, при  $10000\times g$  в течение 30 минут для дополнительного удаления клеточного дебриса и удаления более крупных частиц).

[0293] Затем микровезикулы осаждают при  $4^{\circ}C$  с использованием 8,5% в/об ПЭГ 6000 и 0,4 М NaCl. Эту смесь центрифугируют при  $10000\times g$  и  $4^{\circ}C$  в течение 30 минут.

Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в подходящем буфере (например, PBS). Его могут использовать для реакций, проводимых непосредственно после, или подвергать дополнительной очистке. Дополнительные процедуры очистки могут включать применение центрифужных фильтров (например, с отсечкой по мол. массе 100 кДа), иммуноафинной очистки, ВЭЖХ, фильтрации в тангенциальном потоке, разделение фаз/фракционирование, микрофлюидику и т.д.

**Пример 3: Выделение микровезикул из среды, кондиционированной с использованием стволовых клеток из костного мозга, согласно способам настоящего изобретения**

[0294] Человеческий костный мозг здорового донора был получен от AllCells LLC (Emeryville, CA, <http://www.allcells.com>). МСК выделяли с помощью стандартного метода адгезии на пластике. Мононуклеарные клетки костного мозга выделяли при центрифугировании в градиенте низкой плотности с использованием Ficoll-Paque Premium (плотность: 1,077 г/мл) согласно методике производителя (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Мононуклеарные клетки собирали в пограничном слое, три раза промывали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) с добавкой 2% FBS (Atlanta Biologics, Atlanta, GA) и ресуспендировали в среде для МСК, состоящей из альфа-модифицированной минимальной среды (α-MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) и 20% FBS, 1% пенициллина/стрептомицина (Lonza, Allendale, NJ) и 1% глутамин (Lonza).

[0295] Первичные культуры МСК или мононуклеарных клеток сеяли при плотности  $2-3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> в специально обработанные чашки для культур тканей (BD Biosciences, San Jose, CA) и помещали в клеточный инкубатор при 37°C в атмосферу с 95% влажностью и 5% CO<sub>2</sub>. Через 48-72 часов неприкрепившиеся клетки удаляли, культуральные флаконы однократно промывали PBS и во флакон добавляли новую среду. Клетки выращивали до 80% конфлюэнтности и затем пассировали в Трипсин-ЭДТА (Life technologies, Carlsbad, CA). Клетки разделяли в отношении 1:4 в 5-уровневых флаконах (BD Biosciences). В альтернативе криоконсервированные МСК размораживали при 37°C и сразу культивировали в α-MEM с добавкой 20% не содержащей микровезикулы эмбриональной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина/глутамин при 37°C в атмосфере с 95% влажностью и 5% CO<sub>2</sub>. Их размножали аналогично указанному выше.

[0296] Клетки выращивали в многоуровневых флаконах до 80-90% конфлюэнтности. Колбы два раза промывали PBS и добавляли α-MEM с добавкой 1% пенициллина/стрептомицина/глутамин. Через 24 часа кондиционированную среду переносили в конические центрифужные пробирки объемом 50 мл (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL) и сразу центрифугировали при 400×g в течение 10 минут при 4°C для осаждения неприкрепившихся клеток. Супернатант переносили в новые конические центрифужные пробирки на 50 мл и центрифугировали при 2000×g в течение 30 минут при 4°C для дополнительного удаления клеток и клеточного дебриса. Супернатанты собирали и помещали в стерильные полипропиленовые одноразовые контейнеры объемом 250 мл (Corning, Corning, NY). К супернатанту добавляли не

содержащий РНКаз и протеаз полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой 6000 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) в количестве 8,5 в/об % и хлорид натрия (конечная концентрация 0,4 М). Раствор помещали в холодную комнату при 4°C на ночь с качанием. Раствор переносили в конические центрифужные пробирки на 50 мл и центрифугировали при 10000×g и 4°C в течение 30 минут. Супернатант удаляли и обогащенный микровезикулами осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Обогащенный микровезикулами раствор переносили в центрифужные фильтры Amicon ultra-15 (с номинальной отсечкой по молекулярной массе 100 кДа) (Millipore, Billerica, MA) и центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Центрифужные фильтры промывали фосфатно-солевым буферным раствором и снова центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Концентрированный образец (приблизительно 200 мкл) собирали из нижней части фильтрующего устройства. Концентрацию белка определяли при использовании набора для анализа белка micro BCA Protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) и хранили обогащенный раствор микровезикул при -70 градусов или обрабатывали для последующего применения (например, выделения белка, РНК и ДНК).

**Пример 4: Выделение микровезикул из плазмы способами настоящего изобретения**

[0297] Приблизительно 6-8 мл крови (человеческой и свиной) собирали путем венепункции и помещали в пластиковые ЭДТА пробирки Vacutainer BD с лавандовыми крышками (BD Biosciences, San Jose, CA). Пробирки с пробами после венепункции центрифугировали при 400×g в течение 30 минут при комнатной температуре. Плазму удаляли (приблизительно 3-4 мл) и помещали в новые конические центрифужные пробирки на 50 мл (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL). Стерильную альфа-модифицированную минимальную среду ( $\alpha$ -MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) добавляли в отношении 1:10 (плазмы к среде).

[0298] К раствору добавляли не содержащий РНКаз и протеаз полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой 6000 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) в количестве 8,5 в/об % и хлорид натрия (конечная концентрация 0,4 М). Раствор помещали в холодную комнату при 4°C в течение ночи с качанием. Раствор центрифугировали при 10000×g и 4°C в течение 30 минут. Супернатант фильтровали и обогащенный микровезикулами осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Обогащенный микровезикулами раствор переносили в центрифужные фильтрующие элементы Amicon ultra-15 (с номинальной отсечкой по молекулярной массе 100 кДа) (Millipore, Billerica, MA) и центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Фильтрующие элементы промывали фосфатно-солевым буферным раствором и снова центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Концентрированный образец (приблизительно 200-400 мкл) собирали из нижней части фильтрующего устройства. Концентрацию белка определяли с помощью набора для анализа белка micro BCA Protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) и обогащенный раствор микровезикул хранили при -70 градусах или обрабатывали для последующего применения (например, выделения белка, РНК и ДНК).

**Пример 5: Выделение микровезикул из аспирата костного мозга способами настоящего изобретения**

[0299] Костный мозг свиньи выделяли из подвздошного гребня. Участок кожи тщательно обрабатывали 7,5% повидон-йодом и 70% изопропанолом. Троакар диаметром 3 мм (11 G) (Ranafac, Avon, MA) вводили в подвздошный гребень. Аспирационный шприц содержал 5000-1000 единиц гепарина для предотвращения свертывания образца костного мозга. Аспирировали приблизительно 20-25 мл костного мозга и переносили раствор в конические центрифужные пробирки объемом 50 мл. В альтернативе человеческий костный мозг здорового донора (приблизительно 50 мл) приобретали в AllCells LLC (Emeryville, CA, URL: allcells.com).

[0300] Конические пробирки объемом 50 мл центрифугировали при 400×g в течение 30 минут при комнатной температуре. Супернатант (бесклеточную фракцию) собирали (приблизительно 10-12 мл на 50 мл) и помещали в новые конические центрифужные пробирки объемом 50 мл (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL). Стерильную альфа-модифицированную минимальную среду ( $\alpha$ -MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) добавляли в соотношении 1:10 (супернатанта костного мозга к среде). Раствор переносили в новые конические пробирки объемом 50 мл и центрифугировали при 2000×g в течение 30 минут при 4°C. Супернатант переносили в новые конические пробирки объемом 50 мл и к этому раствору добавляли не содержащий РНКаз и протеаз полиэтиленгликоль средней молекулярной массой 6000 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) в количестве 8,5 в/об % и хлорид натрия (конечная концентрация 0,4 M).

[0301] Раствор помещали в холодную комнату при 4°C на ночь с качанием. Раствор центрифугировали при 10000×g и 4°C в течение 30 минут. Супернатант фильтровали и обогащенный микровезикулами осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Обогащенный микровезикулами раствор переносили в центрифужные фильтрующие элементы Amicon ultra-15 (с номинальной отсечкой по молекулярной массе 100 кДа) (Millipore, Billerica, MA) и центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Фильтрующие элементы промывали фосфатно-солевым буферным раствором и снова центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Концентрированный образец (приблизительно 200-400 мкл) собирали из нижней части фильтрующего устройства. Концентрацию белка определяли с помощью набора для анализа белка micro BCA Protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) и обогащенный раствор микровезикул хранили при -70 градусах или обрабатывали для последующего применения (например, выделения белка, РНК и ДНК).

[0302] Клеточную фракцию собирали и обрабатывали для выделения мезенхимальных стволовых клеток или полного выделения костного мозга.

**Пример 6: Выделение микровезикул из мочи способами настоящего изобретения**

[0303] Приблизительно 500 мл чисто собранной человеческой мочи выделяли и помещали в конические пробирки объемом 50 мл (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston,

FL).

[0304] Конические пробирки объемом 50 мл центрифугировали при 400×g в течение 30 минут при 4°C. Супернатант удаляли и помещали в новые конические центрифужные пробирки объемом 50 мл (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL). Раствор переносили в новые коническим пробирки объемом 50 мл и центрифугировали при 2000×g в течение 30 минут при 4°C. Супернатант переносили в новые конические пробирки объемом 50 мл и к этому раствору добавляли не содержащий РНКаз и протеаз полиэтиленгликоль средней молекулярной массы 6000 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) в количестве 8,5 в/об % и хлорид натрия (конечная концентрация 0,4 М).

[0305] Раствор помещали в холодную комнату при 4°C на ночь с качанием. Раствор центрифугировали при 10000×g и 4°C в течение 30 минут. Супернатант фильтровали и обогащенный микровезикулами осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Обогащенный микровезикулами раствор переносили в центрифужные фильтрующие элементы Amicon ultra-15 (с номинальной отсечкой по молекулярной массе 100 кДа) (Millipore, Billerica, MA) и центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Фильтрующие элементы промывали фосфатно-солевым буферным раствором и снова центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Концентрированный образец (приблизительно 200-400 мкл) собирали из нижней части фильтрующего устройства. Концентрацию белка определяли с помощью набора для анализа белка micro BCA Protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) и обогащенный раствор микровезикул хранили при -70 градусах или обрабатывали для последующего применения (например, выделения белка, РНК и ДНК).

**Пример 7: Выделение микровезикул из среды долговременной культуры клеток костного мозга способами настоящего изобретения**

[0306] Костный мозг получали из аспирата (см. Пример 1) и вызывали лизис эритроцитов с использованием 0,8% раствора хлорида аммония, содержащего 0,1 мМ EDTA (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC). Ядросодержащие клетки осаждали под слоем эмбриональной бычьей сыворотки (Atlanta Biologics, Atlanta, GA) при 400×g в течение 5 минут. Ядросодержащие клетки промывали в среде Маккоя 5а (Mediatech Inc., Manassas, VA) при осаждении при 400×g в течение 5 минут. Клетки ресуспендировали в культуральной среде при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл и сеяли во флаконы 25, 75 или 225 см<sup>2</sup> (Corning, Corning, NY).

[0307] Культуральные среды состояли из среды Маккоя 5а, 1% бикарбоната натрия (Life technologies, Carlsbad, CA), 0-4% MEM заменимых аминокислот (Life technologies), 0-8% MEM незаменимых аминокислот (Life technologies), 1% L-глутамина (Lonza, Allendale, NJ), 0,1 мкМ гидрокортизона (Life technologies), 1% пенициллина/стрептомицина (Lonza), 12-5% фетальной телячьей сыворотки (Atlanta Biologics) и 12-5% лошадиной сыворотки (Stem Cell Technology). Культуры инкубировали при 33°C и 5% CO<sub>2</sub>. Подпитку производили еженедельно путем добавления половины исходного объема среды без удаления среды в течение первых девяти недель культивирования. Если культуры

выращивали больше девяти недель, каждую неделю объем культуральной среды уменьшали до исходного объема и добавляли половину исходного объема новой среды.

[0308] Приблизительно через девять недель культивирования исходную среду удаляли и сохраняли. Клетки два раза промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и инкубировали в течение 24 часов в среде, состоящей из среды Маккоя 5а, 1% бикарбоната натрия, 0-4% MEM заменимых аминокислот, 0-8% MEM незаменимых аминокислот (Life technologies), 1% L-глутамин (Lonza, Allendale, NJ) и 1% пенициллина/стрептомицина (Lonza).

[0309] Через 24 часа супернатант переносили в конические центрифужные пробирки объемом 50 мл (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL) и сразу центрифугировали при  $400\times g$  в течение 10 минут при  $4^{\circ}C$  для осаждения неприкрепившихся клеток. Сохраненную исходную среду добавляли обратно к клеткам. Супернатант переносили в новые конические центрифужные пробирки объемом 50 мл и центрифугировали при  $2000\times g$  в течение 30 минут при  $4^{\circ}C$  для дополнительного удаления клеток и клеточного дебриса.

[0310] Супернатант собирали и помещали в стерильные полипропиленовые одноразовые контейнеры объемом 250 мл (Corning, Corning, NY). К супернатанту добавляли не содержащий РНКаз и протеаз полиэтиленгликоль средней молекулярной массой 6000 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) в количестве 8,5 в/об % и хлорид натрия (конечная концентрация 0,4 М). Раствор помещали в холодную комнату при  $4^{\circ}C$  на ночь с качанием. Раствор переносили в конические центрифужные пробирки объемом 50 мл и центрифугировали при  $10000\times g$  при  $4^{\circ}C$  в течение 30 минут. Супернатант фильтровали и обогащенный микровезикулами осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Обогащенный микровезикулами раствор переносили в центрифужные фильтрующие элементы Amicon ultra-15 (с номинальной отсечкой по молекулярной массе 100 кДа) (Millipore, Billerica, MA) и центрифугировали при  $5000\times g$  в течение 30 минут. Фильтрующие элементы промывали фосфатно-солевым буферным раствором и снова центрифугировали при  $5000\times g$  в течение 30 минут. Концентрированный образец (приблизительно 200 мкл) собирали из нижней части фильтрующего устройства. Концентрацию белка определяли с помощью набора для анализа белка micro BCA Protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) и обогащенный раствор микровезикул хранили при  $-70$  градусах или обрабатывали для последующего применения (например, выделения белка, РНК и ДНК).

#### **Пример 8: Анализ микровезикул настоящего изобретения**

[0311] Образцы микровезикул исследовали с помощью электронной микроскопии. Для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) каждый образец микровезикул наносили на покрытые формваром медные сетки с ячейками 150 меш (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) в течение 20 минут. Сетки осушали и помещали на капли 2% глутаральдегида на 5 минут, затем промывали бидистиллированной водой (DDOH), после чего окрашивали на каплях 4% водным р-ром ацетата уранила и многократно

промывали DDOH. Сетки исследовали при 80 кВ в электронном микроскопе Philips CM10.

[0312] На Фигуре 5 показаны электронные микроснимки микровезикул, полученных из мезенхимальных стволовых клеток человеческого костного мозга, выделенные способом ультрацентрифугирования, описанным в Примере 1 (панели А и В), и согласно способам настоящего изобретения, как описано в Примере 3 (панели С и D). На Фигуре 6 показаны электронные микроснимки микровезикул, полученных из свиных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, выделенных способом ультрацентрифугирования, описанным в Примерах 1 (панели А и В), и согласно способам настоящего изобретения, как описано в Примере 3 (панели С и D). На Фигуре 7 показаны электронные микроснимки микровезикул, полученных из мышинных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, выделенных способом ультрацентрифугирования, описанным в Примерах 1 (панели А и В), и согласно способам настоящего изобретения, как описано в Примере 3 (панели С и D).

[0313] На Фигурах 5-7 представлены различия между микровезикулами, выделенными способами настоящего изобретения, по сравнению с выделением с помощью ультрацентрифугирования. Микровезикулы, выделенные согласно способам настоящего изобретения, имеют более гладкие границы, не сморщены и представляются более "интактными".

[0314] На Фигуре 8 показаны электронные микроснимки микровезикул, выделенных из человеческой плазмы согласно способам настоящего изобретения. Гетерогенность форм и размеров, достигнутая при выделении с ПЭГ, указывает, что были выделены все типы микровезикул. Подобную гетерогенность наблюдали в микровезикулах из свиной плазмы (Фигура 9) и человеческой мочи (Фигура 10), которые были выделены согласно способам настоящего изобретения.

[0315] Для анализа экспрессии белка в образцах микровезикул клетки и микровезикулы лизировали в буфере RIPA (Cell signaling technology, Danvers, MA) и оценивали концентрацию белка при использовании набора для анализа micro BCA (Pierce, Rockford, IL). Приблизительно 20 микрограммов лизата наносили на каждую дорожку и в течение ночи метили мембраны (1:1000) одним из антитела кролика против CD63 (SBI Biosciences, Mountain View, CA), мАт кролика против hsp70 (SBI Biosciences), мАт кролика к STAT3 (Cell signaling technology) и/или мАт кролика к фосфо-STAT3 (Cell signaling technology).

[0316] Присутствие экзосомных маркеров (HSP 70 и CD63) подтвердило, что способы настоящего изобретения позволяли выделять экзосомы. Кроме того, экзосомы также содержали фактор транскрипции STAT3 и активированную фосфорилированную форму фосфо-STAT3. См. Фигуру 11.

#### **Пример 9: Влияние микровезикул настоящего изобретения на пролиферацию и миграцию фибробластов**

[0317] Для изучения способности микровезикул настоящего изобретения стимулировать или улучшать заживление ран, исследовали способность микровезикул

стимулировать пролиферацию фибробластов кожи. Фибробласты кожи здорового взрослого человека были получены в Life technology (Carlsbad, CA). Фибробласты пациента с хронической раной (пролежневая язва на ноге и язва при диабетической стопе) собирали согласно одобренному IRB протоколу (IND# BB IND 13201) из ран, существующих в течение 2 лет, без подтверждений заживления, несмотря на применение стандартных и усовершенствованных методов лечения ран. Фибробласты здорового донора и пациентов с хронической раной сеяли при плотности  $5 \times 10^3$  клеток в лунке в 24-луночные планшеты для культур тканей (BD Biosciences, San Jose, CA). МТТ-тесты пролиферации клеток проводили в день 0 и день 3. Микровезикулы добавляли в день 0. Микровезикулы, выделенные с ПЭГ и выделенные с помощью ультрацентрифугирования, обладали приблизительно эквивалентной эффективностью в отношении увеличения роста и нормальных фибробластов и фибробластов пациентов с хронической раной через 3 дня. Фосфатно-солевой буфер (PBS) и кондиционированная МСК среда, обедненная микровезикулами, показали слабый рост. См. Фигуру 12.

[0318] В экспериментах с совместным культивированием фибробласты здорового взрослого и фибробласты пациентов с язвой при диабетической стопе сеяли в двадцатичетырехлуночные планшеты. Каждую лунку засеивали с достижением 100% конфлюентности (приблизительно  $1 \times 10^5$  клеток в лунке). Чтобы предотвратить влияние пролиферации клеток, за 2 часа до создания царапин среду заменяли свежей бессывороточной культуральной средой, содержащей митомицин в концентрации 10 мкг/мл. Затем конфлюентный монослой царапали стерильным наконечником пипетки на 1 мл, оставляя царапину шириной 0,4-0,5 мм. Затем культуральную среду немедленно удаляли (вместе с отделившимися клетками). Удаленную среду заменяли свежей культуральной средой (10% FBS), содержащей микровезикулы (полученные с ПЭГ или с помощью ультрацентрифугирования), PBS или кондиционированную МСК среду, обедненную микровезикулами. Поцарапанную область контролировали путем сбора цифровых изображений сразу после создания царапины и через 3 дня после обработки. Цифровые изображения получали с помощью инвертированного микроскопа IX81 Olympus (Olympus America, Center Valley, PA, URL: olympusamerica.com) и цифровой камеры ORCA-AG Hamamatsu (Hamamatsu Photonics KK, Hamamatsu City, Pref. Shizuoka, Japan, URL: hamamatsu.com). Через три дня после обработки, микровезикулы, выделенные в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, показали наибольшую миграцию (по существу закрытие раны), после чего следовали микровезикулы, полученные из ультрацентрифуги. Контроли (PBS) и кондиционированная МСК среда, обедненная микровезикулами (Обедненная), показали небольшую миграцию. См. Фигуру 13.

[0319] На Фигуре 14 показано влияние микровезикул на клеточную миграцию фибробластов, полученных из язвы при диабетической стопе. Аналогично результатам на Фигуре 13, микровезикулы, выделенные согласно способам настоящего изобретения, вызвали наибольшую миграцию, затем следовали микровезикулы, выделенные с

помощью способа ультрацентрифугирования, описанного в Примере 1. Контроли (PBS) и кондиционированная МСК среда, обедненная микровезикулами (Обедненная), показали небольшую миграцию.

**Пример 10: Захват микровезикул настоящего изобретения клетками**

[0320] Микровезикулы МСК человека, выделенные из кондиционированной среды согласно способам настоящего изобретения, метили красителем РКН-26 (красный), связывающим фосфолипиды клеточных мембран, согласно инструкциям производителя (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Нормальные фибробласты кожи метили Vybrant-DiO (Life technology) согласно инструкциям производителя. Нормальные фибробласты кожи сеяли в покрытые фибронектином (Sigma-Aldrich) 4-луночные слайд-камеры Nunc\* Lab-Tek\* II (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL) (5×10 клеток в лунке). Клетки окрашивали красителем для окрашивания ядер Hoechst 33342 (Life technology) согласно инструкциям производителя. Меченные DiO фибробласты обрабатывали РКН-26-мечеными микровезикулами в течение 24 часов. Изображения регистрировали с помощью инвертированного микроскопа 1X81 Olympus и цифровой камеры ORCA-AG Hamamatsu. Нормальные фибробласты кожи (окрашенные зеленым красителем мембранных липидов DiO) демонстрировали захват РКН-26-меченных MV МСК человека, выделенных путем осаждения ПЭГ, в перинуклеарной области. См. Фигуры 15 и 16. На Фигуре 16 микровезикулы можно наблюдать в перинуклеарной области.

**Пример 11: Применение микровезикул настоящего изобретения в качестве средства диагностики ревматоидного артрита**

[0321] Нормальные фибробласты кожи сеяли при плотности  $1 \times 10^5$  клеток/лунка в 6-луночный планшет для культур тканей (BD Biosciences). Фибробласты выдерживали в бессывороточной среде в течение ночи и обрабатывали PBS (контроль), 10 микрограммами микровезикул, выделенных в соответствии со способами согласно настоящему изобретению из плазмы, полученной у пациента, страдающего ревматоидным артритом (ПЭГ-осаждение MV из плазмы человека); микровезикулами, выделенными в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, из среды, кондиционированной мезенхимальными стволовыми клетками из костного мозга (ПЭГ-осаждение MV чМСК человека); микровезикулами, выделенными с помощью ультрацентрифугирования из среды, кондиционированной мезенхимальными стволовыми клетками из костного мозга (ультрацентрифугирование MV чМСК человека); контролем PBS; и контролем с обедненной средой (кондиционированная чМСК среда, обедненная MV). Уровень фосфорилирования STAT3, наблюдаемый в фибробластах, был более высоким в микровезикулах, выделенных в соответствии со способами согласно настоящему изобретению. См. Фигуру 17.

**Пример 12: Применение микровезикул настоящего изобретения в качестве средства диагностики метастатической меланомы**

[0322] BRAF - человеческий ген, который дает белок, называемый B-Raf. Было идентифицировано более 30 мутаций гена BRAF, ассоциированных с онкологическими

заболеваниями человека. Были разработаны ПЦР-праймеры для амплификации мутантной формы BRAF, которая ассоциирована с метастатической меланомой. Мутация представляет собой мутацию T1799A в экзоне 15 в BRAF. Она приводит к замене валина (V) глутаматом (E) в кодоне 600 (в данном случае обозначается V600E). Присутствие этой мутации требуется для лечения ингибитором BRAF вемурафенибом. Известно, что линия клеток SK-Mel28, полученная из ATCC (Washington DC, Maryland), как известно, имеет мутацию T1799A в экзоне 15 в BRAF. Микровезикулы, выделенные в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, были получены из среды, кондиционированной путем 3-дневного инкубирования в EMEM (ATCC) + 10% сыворотки (Atlanta Biologics, Atlanta, Georgia).

[0323] Выделенные микровезикулы обрабатывали для выделения ДНК и РНК с использованием набора AUPrep DNA/RNA производства Qiagen (Hilden, Germany). Приблизительно 50 нг РНК из клеток SK-MEL28 и микровезикул подвергали обратной транскрипции с использованием iScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix (BioRad, Hercules, CA). Аликвоту 2 мл использовали для ПЦР с использованием смеси для ПЦР Platinum<sup>®</sup> PCR SuperMix (Life technology) согласно инструкциям производителя. Кроме того, 80 нг ДНК из клеток SK-MEL28 и микровезикул использовали для ПЦР с использованием смеси для ПЦР Platinum<sup>®</sup> PCR SuperMix согласно инструкциям производителя. Продукты ПЦР разделяли в 3% агарозном геле и визуализировали с помощью системы документирования гелей Bio-Rad. Результаты показаны на Фигуре 18.

Использовали следующие праймеры:

Последовательность 1:

Прямой: AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA (SEQ ID NO: 1)

Обратный: CTGATGGGACCCACTCCATC (SEQ ID NO: 2)

Длина ампликона: 70

Последовательность 2:

Прямой: GAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG (SEQ ID NO: 3)

Обратный: CTGATGGGACCCACTCCATC (SEQ ID NO: 4)

Длина ампликона: 82

[0324] Кроме того, образцы микровезикул лизировали в буфере RIPA и оценивали концентрацию белка при использовании набора для анализа microBCA. Приблизительно 50 микрограммов наносили на каждую дорожку и метили мембраны в течение ночи (1:1000) мышинным антителом против BRAF V600E (NewEast Biosciences, Malvern, PA). Вторичное антитело козы против иммуноглобулинов мыши (Pierce) применяли в разведении 1:10000 в течение 1 часа. Вестерн-блот показал обнаружение BRAF V600E в лизате SKMEL28 клеток и MV.

**Пример 13: Выделение микровезикул из среды, кондиционированной с использованием культуры GFP-меченных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, способами настоящего изобретения**

[0325] Гомозиготные трансгенные мыши, экспрессирующие улучшенный зеленый

флуоресцентный белок (GFP) под контролем промотора убиквитина С человека (C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J), были получены из Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). У этих мышей, как известно, GFP экспрессируется во всех тканях.

[0326] GFP-мышей (возрастом примерно 3-4 недели) усыпляли путем асфиксии в CO<sub>2</sub>. Конечности надрезали выше бедра и ниже голеностопного сустава. Задние конечности изымали и удаляли кожу, мышцы и всю соединительную ткань. Затем кости помещали в чашку с охлажденным на льду стерильным IX PBS и несколько раз промывали в PBS. Концы каждой кости срезали ножницами. Нагретую среду ( $\alpha$ -MEM с добавкой 20% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина/глутамин) из шприца на 10 см<sup>3</sup> пропускали через тело кости для извлечения всего костного мозга в 150 мм чашку. Это повторяли несколько раз, чтобы гарантировать удаление всего костного мозга. Смесь клеток пипетировали несколько раз для разделения клеток и суспензию клетки пропускали через клеточный фильтр (размером 70 мкм) (BD Biosciences, San Jose, CA) для удаления крупных скоплений клеток или частиц кости.

[0327] Первичные культуры сеяли при плотности в пределах  $2-3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> в специально обработанных для культур тканей чашках (BD Biosciences, San Jose, CA) и помещали в клеточный инкубатор при 37°C в атмосфере с 95% влажностью и 5% CO<sub>2</sub>. Через 72-96 часов неприкрепившиеся клетки удаляли, культуральные флаконы однократно промывали PBS и во флакон добавляли новую среду. Клетки выращивали до 80% конfluence и затем пассировали в трипсин-ЭДТА (Life technologies, Carlsbad, CA). Клетки делили в отношении 1:4.

[0328] В альтернативе криоконсервированные МСК GFP-мышей размораживали при 37°C и сразу культивировали в  $\alpha$ -MEM с добавкой 20% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина/глутамин при 37°C в атмосфере с 95% влажностью и 5% CO<sub>2</sub>. Их размножали аналогично указанному выше.

[0329] Клетки выращивали во флаконах до 100% конfluence (приблизительно 1 неделю). Супернатант переносили в конические центрифужные пробирки объемом 50 мл (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL) и сразу центрифугировали при  $400 \times g$  в течение 10 минут при 4°C для осаждения неприкрепившихся клеток. Супернатант переносили в новые конические центрифужные пробирки объемом 50 мл и центрифугировали при  $2000 \times g$  в течение 30 минут при 4°C для дополнительного удаления клеток и клеточного дебриса. Супернатанты собирали и помещали в стерильные полипропиленовые одноразовые контейнеры объемом 250 мл (Corning, Corning, NY). К супернатанту добавляли не содержащий РНКаз и протеаз полиэтиленгликоль средней молекулярной массы 6000 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) в количестве 8,5 в/об % и хлорид натрия (конечная концентрация 0,4 М). Раствор помещали в холодную комнату при 4°C на ночь с качанием. Раствор переносили в конические центрифужные пробирки объемом 50 мл и центрифугировали при  $10000 \times g$  и 4°C в течение 30 минут. Супернатант фильтровали и обогащенный микровезикулами осадок ресуспендировали в фосфатно-

солевом буферном растворе (PBS). Обогащенный микровезикулами раствор переносили в центрифужные фильтрующие элементы Amicon ultra-15 (с номинальной отсечкой по молекулярной массе 100 кДа) (Millipore, Billerica, MA) и центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Фильтрующие элементы промывали фосфатно-солевым буферным раствором и снова центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Концентрированный образец (приблизительно 200-400 мкл) собирали из нижней части фильтрующего устройства. Концентрацию белка определяли с помощью набора для анализа белка micro BCA Protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) и обогащенный раствор микровезикул хранили при -70 градусах или обрабатывали для последующего применения (например, выделения белка, РНК и ДНК).

[0330] Для определения клеточного захвата микровезикул нормальные человеческие фибробласты кожи метили Vybrant-DiO (Life technology) согласно инструкциям производителя. Нормальные фибробласты кожи сеяли в покрытые фибронектином (Sigma-Aldrich) 4-луночные слайд-камеры Nunc\* Lab-Tek\* II (Thermo Fisher Scientific Inc.) (5×10 клеток в лунке). Клетки окрашивали красителем для окрашивания ядер Hoechst 33342 (Life technology) согласно инструкциям производителя. Меченные DiI фибробласты обрабатывали микровезикулами, выделенными из МСК GFP-экспрессирующих мышей, в течение 24 часов. Изображения регистрировали с помощью инвертированного микроскопа IX81 Olympus и цифровой камеры Hamamatsu ORCA-AG. См. Фигуры 20 и 21. Важно, что на этих изображениях показано, что микровезикулы, содержащие GFP, захватывались клетками.

**Пример 14: Применение микровезикул настоящего изобретения в качестве терапии для стимуляции или улучшения заживления ран**

[0331] Глубокие раны на всю толщю кожи создавали на спинах свиней с помощью инструмента для панч-биопсии диаметром 10 мм. Микровезикулы выделяли из среды, кондиционированной с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, либо согласно способам, описанным в Примере 1 ("обычный метод ультрацентрифугирования"), или способам, описанными в Примере 3. В раны вводили по 30 микрограммов микровезикул путем местной инъекции в момент ранения и в Дни 1 и 2. Контроли обрабатывали раствором хлорида натрия или оставляли для открытого заживления на воздухе. Через 5 дней животных усыпляли и обследовали раны.

[0332] На Фигуре 22 показано гистологическое исследование ран через 5 дней после ранения. На 5 день раны, обработанные микровезикулами, выделенными согласно способам настоящего изобретения (т.е. согласно способам, описанным в Примере 3), казались меньше, чем контроли с обработкой раствором хлорида натрия, контроли с открытым заживлением на воздухе и раны, обработанные микровезикулами, полученными с помощью ультрацентрифугирования. Раны, обработанные микровезикулами, полученными с помощью ультрацентрифугирования, показали улучшенный воспалительный ответ по сравнению с ранами, обработанными микровезикулами, полученными согласно способам настоящего изобретения, и обоими контролями.

[0333] В другом исследовании ожоговые раны второй степени создавали на спинах свиней с помощью латунного прутка, нагретого до 100°C. Микровезикулы выделяли из среды, кондиционированной с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, либо согласно способам, описанным в Примере 1 ("обычный метод ультрацентрифугирования"), или способам, описанным в Примере 3. В раны вводили по 30 микрограммов микровезикул путем местной инъекции в момент ранения и в дни 1 и 2. Контроли обрабатывали раствором хлорида натрия или оставляли открытыми для заживления на воздухе.

[0334] В течение всего эксперимента (до 28 дней после ожогового ранения) раны, обработанные микровезикулами, полученными с помощью ультрацентрифугирования, были значительно более воспаленными, чем раны, обработанные микровезикулами, полученными согласно способам настоящего изобретения (т.е. согласно способам, описанным в Примере 3). См. Фигуру 23. Аналогичным образом, раны, обработанные микровезикулами, полученными с помощью ультрацентрифугирования, были значительно более воспаленными, чем контроли, обработанные хлоридом натрия, и контроли, открытые доступу воздуха. Ожоговые раны, обработанные микровезикулами, полученными согласно способам настоящего изобретения, не казались значительно более воспаленным, чем контроли.

[0335] На Фигуре 23 показано различие в воспалении в День, 7 после ранения при сравнении ран, обработанных микровезикулами, полученными с помощью ультрацентрифугирования, микровезикулами, полученными согласно способам настоящего изобретения, и контроля, открытого доступу воздуха. При исследовании под микроскопом формирование абсцесса наблюдали как в глубоких ранах, так и в ожоговых ранах, обработанных микровезикулами, полученными с помощью ультрацентрифугирования. Без ограничения научной теорией, воспаление, отмеченное с микровезикулами, полученными с помощью ультрацентрифугирования, как предполагали, было вызвано поврежденными микровезикулами, которые могут легко стимулировать воспалительный каскад. Микровезикулы настоящего изобретения также могут обеспечивать дополнительную пользу при включении дополнительных частиц.

[0336] На Фигуре 24 показана ожоговая рана второй степени у свиньи, обработанная микровезикулами, выделенными способами настоящего изобретения, через 28 дней после ожогового поражения. Наблюдается значимое ремоделирование коллагена с появлением основного вещества. Эти результаты исследования указывают на ремоделирование кожи с образованием коллагена III типа. Также наблюдали дермо-эпидермальную индукцию, приводящую к утолщению эпидермиса, который выглядел хорошо фиксированным с дермой. Эти результаты не наблюдаются при формировании рубца и лучше согласовываются с регенерацией кожи. Эпидермис, формирующийся над рубцом, легко подвергается повторному повреждению из-за неспособности хорошо фиксироваться с рубцующейся кожей.

[0337] На Фигуре 25 показана ожоговая рана второй степени у свиньи,

обработанная раствором хлорида натрия, через 28 дней после ожогового поражения. Наблюдала минимальную регенерацию кожи с уплощенным эпидермисом. Отсутствие значимого формирования эпидермальных гребней с высокой вероятностью указывало на плохо фиксированный эпидермис. Эти результаты с намного более высокой вероятностью указывают на формирование рубца с риском продолжительного повреждения.

[0338] На Фигуре 26 показана рана на всю толщу кожи у свиньи, обработанная микровезикулами, выделенными согласно способам настоящего изобретения, через 28 дней после ранения. Наблюдала вращение нерва (проиллюстрировано стрелками) в ремоделируемую дерму, вероятно стимулированное применением микровезикул. Рост нерва сопровождается ангиогенным ответом (обведенные области). Нерв представляется развитой структурой и не обусловлен простым прорастанием аксона. Это - уникальный результат, о котором никогда не сообщалось, и также этого не наблюдали в контрольных ранах или ранах, обработанных микровезикулами, полученными с помощью ультрацентрифугирования. Такие наблюдения с высокой вероятностью указывают на регенерацию сложной ткани со способностью к образованию зрелых элементов из всех зародышевых листков, включая эпидермис, строму, сосудистую сеть и нервную ткань. Поэтому представляется, что такие способы смогут широко применяться для лечения различных состояний, включая травматические, воспалительные, неопластические и дегенеративные нарушения тканей эктодермального, энтодермального и мезодермального происхождения.

[0339] На Фигуре 27 показана рана на всю толщу кожи у свиньи, обработанная микровезикулами, выделенными способами настоящего изобретения, через 28 дней после ранения. Эта Фигура иллюстрирует наблюдения, описанные на Фигуре 26, при более сильном увеличении. На А) рост нерва, по-видимому, следует по пути, связанному с ангиогенным ответом. Этот результат интересен, поскольку рост нерва, как известно, сопровождает ангиогенез при эмбриологическом развитии. Опять же, эти результаты указывают на регенерацию ткани. На В) показан нерв в поле более сильного увеличения. На С) лучше показан ангиогенез в области роста нерва.

[0340] Остеогенез наблюдали во всех обработанных группах (контроль и обработка микровезикулами) в модели раны на всю толщу кожи у свиней. См. Фигуру 28. Животные получали в общей сложности 1,44 мг микровезикул (половину полученных согласно способам настоящего изобретения и половину полученных ультрацентрифугированием). Затем должно было проявляться системное воздействие, стимулирующее образование костной ткани во всех ранах. Остеогенез, как правило, чаще наблюдали в более воспаленных ранах, что указывает на синергический эффект локальных медиаторов воспаления и системного действия микровезикул.

**Пример 15: Применение микровезикул настоящего изобретения в качестве терапии для репопуляции костного мозга и регенерации сложных структур**

[0341] Мышей C57/CJ6 (GFP) облучали смертельной дозой с двумя циклами облучения гамма-излучением по 400 сГр с абляцией их собственных клеток-

предшественников костного мозга. После обработки лазером на коже прикрепляли пластиковую камеру, и в нее добавляли клетки из костного мозга, полученные у сингенной GFP<sup>+</sup> трансгенной мыши. Клетки GFP<sup>+</sup> костного мозга включали только что собранные суммарные клетки костного мозга, негативно отобранные по линии дифференцировки клетки костного мозга, мезенхимальные стволовые клетки и полные культивируемые клетки костного мозга (как описано в настоящей заявке). Только у нескольких животных был достигнут химеризм, обнаруживаемый по присутствию циркулирующих GFP<sup>+</sup> клеток через 4-6 недель после введения клеток. (См. Фигуру 29). Неожиданно многие животные выжили без признаков приживления донорского костного мозга. В целом (во всех группах, получавших клетки) выжило 30% животных, которым вводили клетки. В различных группах показатели выживаемости были самыми высокими у животных, получавших клетки, негативно отобранные по линии дифференцировки (45%), и свежeweделенные клетки костного мозга (30%). Контрольные облученные животные, не получавшие клеток, показали 100% летальность. Цитокины не смогли аналогичным образом спасти животных, подобным образом облученных летальными дозами, и у этих выживших животных не было продемонстрировано функционального приживления донорского костного мозга. Микровезикулы, секретируемые доставленными клетками, вероятно, ответственны за восстановление собственного костного мозга, что приводило к выживанию этих животных. Было продемонстрировано, что свежeweделенный костный мозг (который включает в себя клетки, негативные по линии дифференцировки) и мезенхимальные стволовые клетки продуцируют достаточное количество микровезикул, которые могут обеспечивать этот эффект. В другом исследовании мышей C57/CJ6 (GFP<sup>-</sup>) облучали смертельной дозой с двумя циклами облучения гамма-излучением по 400 сГр с подавлением роста их волос и частичной абляции костного мозга. После облучения у мышей брили спины, а затем мышей на площади примерно 2 см облучали абляционным фракционным эрбиевым:ИАГ лазером. После обработки лазером на кожу прикрепляли пластиковую камеру, и в камеру добавляли клетки из костного мозга, полученные у сингенной GFP<sup>+</sup> трансгенной мыши. Клетки GFP<sup>+</sup> костного мозга включали свежeweделенные клетки костного мозга, негативно отобранные по линии дифференцировки клетки костного мозга, мезенхимальные стволовые клетки и полные культивируемые клетки костного мозга (как описано в настоящей заявке). Ни у одного животного не был достигнут химеризм, обнаруживаемый по присутствию циркулирующих GFP<sup>+</sup> клеток через 4-6 недель после введения клеток. См. Фигуру 30. У животных, получавших только лазерную терапию, наблюдали полное отсутствие роста волос или минимальный рост коротких волос. См. Фигуру 30(A). У животных, получавших клетки костного мозга, наблюдали значительный, продолжительный рост волос. См. Фигуру 30 (A и B). Эти результаты были наиболее выраженными у мышей, получавших негативно отобранные по линии дифференцировки GFP<sup>+</sup> клетки и суммарные свежeweделенные GFP<sup>+</sup> клетки костного мозга. Рост волос мог быть обнаружен через 2 недели и продолжался в течение нескольких месяцев. Биопсию

кожи забирали в области роста новых волос, но GFP+ клетки не были обнаружены. Функциональное приживание клеток костного мозга также не удалось обнаружить ни у одного животного с помощью FACS-анализа. См. Фигуру 30(C). Как и в примере на Фигуре 29, цитокины не продемонстрировали такого эффекта в отношении восстановления роста волос. Микровезикулы, секретируемые доставленными клетками, вероятно, ответственны за стимуляцию роста волос.

**Пример 16: Применение микровезикул настоящего изобретения для индукции или стимуляции ангиогенеза и индукции или стимуляции пролиферации фибробластов**

[0342] Выделение микровезикул из аспирата костного мозга: Приблизительно 25 мл нового целого костного мозга были получены от AllCells, Inc. (Alameda, CA). Костный мозг осторожно помещали в новые конические центрифужные пробирки объемом 50 мл и центрифугировали при 400×g в течение 30 минут при комнатной температуре. Супернатант осторожно удаляли (приблизительно 15 мл) и помещали в новые конические центрифужные пробирки объемом 50 мл (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL) и центрифугировали при 2000×g в течение 30 минут при 4°C. Супернатант снова осторожно удаляли и помещали в новые конические центрифужные пробирки объемом 50 мл, в которые добавляли стерильную альфа-модифицированную минимальную среду Игла (α-MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) в соотношении 1:10 (супернатанта костного мозга к среде). К раствору добавляли не содержащий РНКаз и протеаз полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) в количестве 8,5 в/об % и хлорид натрия (конечная концентрация 0,4 М). Раствор помещали в холодную комнату при 4°C на ночь с качанием. Раствор центрифугировали при 10000×g и 4°C в течение 30 минут. Супернатант удаляли, а обогащенный микровезикулами осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS). Обогащенный микровезикулами раствор переносили в центрифужные фильтрующие элементы Amicon ultra-15 (с номинальной отсечкой по молекулярной массе 100 кДа) (Millipore, Billerica, MA) и центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Фильтрующие элементы промывали фосфатно-солевым буфером и снова центрифугировали при 5000×g в течение 30 минут. Концентрированный образец (приблизительно 200-400 мкл) собирали из нижней части фильтрующего устройства.

[0343] Исследование ангиогенеза: Ангиогенез измеряли с помощью анализа образования эндотелиальных трубок (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). Криоконсервированные первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека (ЭКПВЧ) (Invitrogen Life Technologies) выращивали во 75 см флаконе для культур тканей в течение 6 дней в среде 200PRF с 2% ростовой добавки с низким содержанием сыворотки (Invitrogen Life Technologies). Затем клетки сеяли при плотности  $3 \times 10^4$  в 24-луночные планшеты для культур тканей, содержащие среду без добавок. Затем клетки ЭКПВЧ обрабатывали микровезикулами костного мозга (приблизительно 100 мкг). В качестве контроля растворителем использовали PBS. Обработанные клетки инкубировали в

течение 6 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Флуоресцентный краситель кальцеин АМ в концентрации 2 мкг/мл использовали для визуализации образования трубок. Флуоресцентные изображения получали с помощью инвертированного микроскопа IX81 Olympus (Olympus America, Center Valley, PA). Выделенные из костного мозга MV показали значимую способность к образованию трубок по сравнению с контролем растворителем (PBS) (см. Фигуру 31).

[0344] Анализ роста: Фибробласты здорового взрослого донора сеяли в 24-луночные планшеты (10000 клеток/лунка) в среду для выращивания (5% FBS, 1% глутамина, 1% пенициллина/стрептомицина) для анализа. После ночного инкубирования случано отбирали три лунки и окрашивали клетки реагентом NucBlue Live ReadyProbes (Life technologies Invitrogen) (День 0). Флуоресцентные изображения регистрировали с помощью системы визуализации клеток EVOS FL Auto Cell Imaging System (Life technologies Invitrogen). Фибробласты подпитывали новой средой, содержащей микровезикулы, полученные из костного мозга (приблизительно 100 мкг), или PBS (контроль растворителем) и через три дня (День 3) клетки окрашивали и визуализировали. Количество фибробластов, обработанных микровезикулами, полученными из костного мозга, увеличилось приблизительно в три раза (по сравнению с Днем 0) и при значительном большей частоте, чем контроль растворителем (Фигура 32, панель А и Фигура 32, панель В).

#### **Пример 17: EV-опосредованная доставка биоактивных материалов в клетки-мишени**

[0345] Согласно некоторым примерам осуществления изобретения, EV, описанные в настоящем документе, могут применяться для доставки одного или более биоактивных средств (например, белков или пептидов коллагена VII, мРНК коллагена VII, активаторов сигнализации STAT3, активаторов канонического пути Wnt и т.п.) в клетку-мишень. Этот пример демонстрирует доставку EV в клетки фибробластов РДБЭ с дефицитной экспрессией COL7A1 по сравнению с клетками фибробластов дикого типа. EV стимулировали экспрессию коллагена VII в фибробластах РДБЭ. EV также стимулировали экспрессию маркеров, связанных с заживлением раны, в фибробластах РДБЭ.

[0346] На Фигуре 44 показана проверка *in vitro* линии клеток, полученной у грудного ребенка с диагнозом РДБЭ (типа Аллопо-Сименса). Наблюдали обмен везикул между МСК-КМ и фибробластами РДБЭ (Фигура 45). Коллаген VII выделяли совместно с EV МСК-КМ (Фигура 46), и мРНК COL7A1 обогащали в EV МСК-КМ (Фигура 47).

[0347] Фибробласты РДБЭ были обработаны EV МСК-КМ в день 1, промыты в день три и демонстрировали увеличение экспрессии коллагена VII в день шесть (Фигура 48). Анализ хемоселективного лигирования (с использованием реакции "click iT" химии) показал продукцию нового коллагена VII из фибробластов РДБЭ после комбинированной обработки EV МСК-КМ (Фигура 49). Как было показано, EV МСК-КМ увеличивали *in vitro* суррогатные маркеры, связанные с заживлением раны (например, пролиферацию и устойчивость к трипсину) фибробластов РДБЭ (Фигура 50).

[0348] МСК-КМ, которые доставляли в растворе хлорида натрия ожоговым больным в клиническом исследовании, как было показано, секретировали большие количества EV (CD63-положительных) в растворе хлорида натрия в течение нескольких часов (показано, 4 часа) (Фигура 51).

[0349] Модель МСК-КМ-опосредованного заживления раны представлена на Фигуре 52.

**Пример 18: Внеклеточные везикулы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, при лечении рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза**

[0350] Местные и внутривенные инъекции аллогенных мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга (МСК-КМ), как было показано, способствовали заживлению раны при рецессивном дистрофическом буллезном эпидермолизе (РДБЭ). Авторами настоящего изобретения было описано, что внеклеточные везикулы (EV), полученные из МСК-КМ (EV МСК-КМ), по большей части ответственны за эффекты заживления, связываемые с МСК-КМ. Также обнаружили, что EV могут переносить коллаген VII (Col VII) в клетки РДБЭ. Предложили первое клиническое исследование, в котором EV МСК-КМ от здоровых аллогенных доноров будут вводить местно в раны пациентов с РДБЭ, с максимальной безопасностью и комфортом для пациента и с улучшением заживления раны. Лечение EV обладает многими преимуществами по сравнению с клеточной терапией, включающими намного более низкие риски генетической нестабильности и злокачественного перерождения. При получении одобрения нового исследуемого лекарственного средства (IND) от FDA будут изготовлены EV МСК-КМ клинического стандарта для открытого исследования Фазы I с повышением дозы наружного применения аллогенных EV из МСК-КМ у 30 пациентов с РДБЭ.

***Определенные цели***

Цель 1 - Получение одобрения IND FDA для исследования с повышением дозы Фазы I наружного применения EV МСК-КМ у пациентов с РДБЭ и изготовление оптимальных МСК-КМ-EV клинического стандарта

[0351] Будут применяться специализированные критерии для скрининга, отбора и функционального исследования донорских EV МСК-КМ для применения в настоящем клиническом исследовании I фазы. Это включает в себя определение деталей производства EV и характеристик продукта для IND, поскольку они конкретно относятся к РДБЭ. Будут применяться анализы, которые были признаны важными в клинических исследованиях на основе стволовых клеток, и проведена оценка доноров EV МСК-КМ на основе функциональных характеристик на клетках РДБЭ реципиента. Будут отобраны оптимальные доноры МСК-КМ и изготовлены EV МСК-КМ, которые будут применяться для лечения пациентов с РДБЭ в настоящем исследовании.

Цель 2 - Поведение открытого клинического исследования с повышением дозы местных, аллогенных EV, полученных из МСК-КМ, при лечении ран у 30 пациентов с РДБЭ

[0352] Введение доз будет основано на успешном клиническом исследовании ГИ местного применения МСК-КМ у ожоговых больных. Будет создано 3 группы введения доз, с последовательным повышением дозы, по 10 пациентов в каждой группе. Схема введения доз будет следующей: первая доза в день лечения 0 с тремя дополнительными дозами, вводимыми ежемесячно (в общей сложности четыре введения за три месяца). Основными оцениваемыми показателями будут безопасность и переносимость местного применения EV МСК-КМ; вторичными оцениваемыми показателями будут заживление раны, боль, зуд и косметические показатели (включая пигментацию, оценку рубца и подтверждение регенерации ткани). Контрактная исследовательская организация Integrium будет оказывать содействие при проведении клинического исследования.

### *Стратегия исследования*

Цель 1 - Получение одобрение IND от FDA для наружного применения полученных из МСК-КМ внеклеточных везикул (EV) в клиническом исследовании Фазы I для лечения ран у пациентов с РДБЭ.

[0353] Прямое применение полученных из костного мозга стволовых клеток и клеток-предшественников для лечения ожогов и хронических длительно незаживающих ран приводит к закрытию раны и восстановлению кожи. Пациенты с хроническими ранами (продолжительностью больше одного года) проходили лечение стволовыми клетками костного мозга и клетками-предшественниками. МСК составляли приблизительно 30% клеток, вводимых пациентам. Подтверждение заживления наблюдали у всех пациентов, получавших лечение, причем у многих из них было достигнуто полное закрытие их ран. У некоторых субъектов ремиссия сохранялась больше 7 лет (в конечном счете, выбыли из наблюдения). Из клинических результатов было отмечено восстановление кожи и отсутствие рубцевания при заживлении ран, отмеченное как клинически, так и гистологически. Клинически присутствовало повышение раневого ложа со слабой атрофией/депрессией или их отсутствием при закрытии заживающих ран (Фигура 33). Результаты гистологического исследования подтверждают восстановление кожи в обработанных ранах.

[0354] Результаты микроскопического исследования включали увеличение образования коллагена и наложение основного вещества. Одни из наиболее удивительных наблюдений было восстановление структур, таких как ретикулин и эластичные волокна (Фигура 34). Эти волокна, как правило, исчезают при заживлении даже неосложненных острых и хронических ран. В целом, эти данные подтверждают способность вызывать заживление незаживающей раны, восстанавливать дефицит объема ткани, стимулировать регенерацию ткани и значительно уменьшать образование рубцов при местном применении стволовых клеток, полученных из костного мозга, без нежелательных явлений.

[0355] Аллогенные МСК-КМ, применяемые местно на ожоговых ранах, демонстрировали быструю эпителизацию, уменьшение рубцевания, восстановление пигмента и регенерацию волосяных фолликулов. Не наблюдали никаких связанных

тяжелых нежелательных явлений или отторжения. Фолликулярная регенерация (Фигура 35), согласующаяся с регенерацией ткани, была отмечена после местного применения МСК-КМ на ожоговых ранах. Регенерация волосных фолликулов, тем не менее, не наблюдалась на необработанных областях ожогового поражения. Также наблюдалась выраженная репигментация (Фигура 36), указывающая на регенерацию ткани.

[0356] Быстрая репигментация, отмечаемая у пациентов, не известна ни для каких других способов лечения, поскольку эти раны обычно проходят длительный (часто постоянный) период послеожоговой лейкопатии. Восстановление эластичности обожженной кожи также было необычным результатом (Фигура 37). Что особенно примечательно в этих результатах, так это то, что они появились после кратковременного местного применения МСК-КМ. Именно в таких временных рамках маловероятно, что клетки будут способны долго выживать и/или приживляться при таком способе введения. Это убедительно свидетельствует о том, что доставленные клетки способны быстро обмениваться сложными сообщениями, что приводит к сильному регенеративному и заживляющему эффекту. Цитокины, нуклеиновые кислоты и факторы транскрипции не могут долго сохраняться в среде ожоговой раны вне клеток, и при этом невозможно, чтобы отдельные факторы могли вызывать такой сложный ответ.

[0357] Без ограничения научной теорией, сделали предположение, что такой клинический ответ могут генерировать мембраносвязанные EV. При проверке просто солевого носителя, в котором клетки доставляют пациентам (после удаления клеток), были обнаружены более  $1,6 \times 10^{11}$  частиц EV/мл, подтверждая доставку значительного количества EV пациентам. EV в образцах, вводимых пациентам, оставались интактными и обладали характерными маркерами EV. Недавно авторы настоящего изобретения сообщили в своей публикации, что EV стимулируют пролиферацию и миграцию нормальных фибробластов и фибробластов в хронических ранах, а также улучшают ангиогенез при активации STAT3-опосредованных генов-мишеней (Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, Salgado M, Van Badiavas E. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. *Stem Cells Dev* 2015; 24:1635-47). Настоящие доклинические исследования также подтверждают стимуляцию EV МСК-КМ заживления ран и регенерации ткани (Фигуры 38 и 39). Подтверждение регенерации ткани в доклинических исследованиях, таких как рост нервов, не были достигнуты другими средствами. В частности, в доклинических исследованиях авторами настоящего изобретения было продемонстрировано, что другие способы выделения EV повреждают везикулы, что ведет к развитию нежелательной воспалительной реакции. Настоящий новый способ не вызывает повреждений EV и, как было показано, вызвал быстрое заживление без развития воспалительной реакции (Фигура 40). Предварительные данные показали, что эти везикулы кроме доставки факторов, способствующих заживлению, могут транспортировать белок Col VII и функциональную мРНК COL7A1 в фибробласты РДБЭ (Фигуры 41 и 42).

[0358] В анализе захвата белка Col VII в комбинации с реакцией хемоселективного лигирования (Click iT®, ThermoFisher) было обнаружено, что фибробласты РДБЭ фактически были индуцированы EV МСК-КМ (в дозе 10 мкг/мл) с образованием нового белка Col VII (Фигура 42). EV МСК-КМ значительно стимулируют как пролиферацию РДБЭ, так и способствуют устойчивости к расщеплению трипсином (Фигура 43). Это стандартные анализы, используемые для оценки приобретения функции и потенциального заживления раны кожных фибробластов РДБЭ. Эти данные свидетельствуют о том, что EV МСК-КМ обладают преимуществами для лечения РДБЭ в дополнение к своему потенциалу для улучшения заживления ран. Для получения одобрения IND на проведение клинического исследования будет организовано производство на контрактных производственных объектах стандарта GMP, с которыми ГИ успешно работал в предыдущих исследованиях. Помимо выполнения общих производственных требований, будут решаться вопросы, касающиеся конкретно лечения РДБЭ. Будут установлены критерии для скрининга и отбора доноров для оптимизации потенциальной прорегенеративной активности EV. Будут определены характеристики продукта EV МСК-КМ. Эти параметры включают концентрацию белка, распределение по размеру EV (например, с применением NanoSight NS300), исследование поверхностных маркеров, удаление реагентов, используемых в процессе производства, и тестирование стабильности продукта. С помощью масс-спектрометрии и РНК-секвенирования будет определено содержание белка и РНК нагрузки у нескольких доноров EV МСК-КМ путем соотнесения нагрузки с результатами функционального анализа. Функциональная активность EV МСК-КМ будет определяться в отношении реципиентных клеток РДБЭ, включая исследования *in vitro* для определения эффективности заживления ран и реверсии фенотипа, включая анализы пролиферации фибробластов РДБЭ и устойчивости к трипсину. Кроме того, анализы эндотелиального ангиогенеза будут проведены *in vitro*.

Цель 2 - Проведение открытого клинического исследования, с повышением дозы, наружного применения аллогенных EV МСК-КМ при лечении ран у 30 пациентов с РДБЭ

Метод:

[0359] Клиническое исследование будет представлять собой открытое пилотное исследование с тремя группами лечения с введением повышаемой дозы (10 пациентов на каждый уровень дозы). Исследователи будут определять для лечения целевые поражения площадью 5-50 см<sup>2</sup>. EV в растворе хлорида натрия будут наносить под тонкой силиконовой повязкой в качестве основного слоя с наложением вторичных повязок стандарта лечения. Контрольные раны будут обрабатывать раствором хлорида натрия под силиконовой повязкой. Обработку будут выполнять в начале исследования, через 4 недели, 8 недель и 12 недель. Уровни дозы будут установлены на основе уровней, применяемых ГИ при исследовании ожогов. Будут сделаны цифровые снимки подвергаемых лечению и контрольных ран. Подвергаемые лечению и контрольные раны будут измерять с помощью устройства Silhouette®.

[0360] Результаты лечения будут оценивать ежемесячно в течение 12 недель. С

учетом предыдущего опыта, ожидают увидеть больше чем 50% стимуляцию заживления. Клинически и с точки зрения лабораторной вариации установили обобщенное стандартное отклонение, равное 20. В данном случае статистическая мощность (не путать с вероятностью) 0,8 рекомендуется для клинических исследований, изучающих различия в этом диапазоне (Breau RH, Carnat TA, Gaboury I. Inadequate statistical power of negative clinical trials in urological literature. The Journal of urology 2006; 176:263-6; Ichihara K, Boyd JC. An appraisal of statistical procedures used in derivation of reference intervals. Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM/FESCC 2010; 48:1537-51). Фактически, для оценки различий более 50% может потребоваться статистическая мощность меньше 0,8. Вероятность того, что разность шансов будет названа значимой, обозначается  $\alpha$  (ошибка I типа) и обычно должна иметь пороговое значение 0,05, ниже которого р-значение считается значимым. Вероятность упустить реальную разность (ошибка II типа) обозначается  $\beta$ . С этими значениями, которые считаются реалистичными, был вычислен следующий размер выборки (Таблица 1), который потребуется. Значение  $\alpha$  означает вероятность того, что разность шансов будет названа значимой. Как обычно, пороговое значение составляет 0,05 (95% уровень значимости), ниже которого р-значение считается значимым. Значения в Таблице 1 приведены для двусторонних критериев. Размер выборки, выбранный из 10 пациентов в группе, будет более чем адекватным, даже при увеличении статистической мощности намного выше рекомендуемой, от 0,8 до 0,95. Хотя это является более строгим, чем может понадобиться, это будет гарантировать, что будет получена надлежащая статистическая мощность в зависимости от предполагаемого количества субъектов.

Таблица 1

| Мощность | $\beta$ | Количество пациентов |               |               |               |
|----------|---------|----------------------|---------------|---------------|---------------|
|          |         | $\alpha=0,10$        | $\alpha=0,05$ | $\alpha=0,02$ | $\alpha=0,01$ |
| 0,80     | 0,2     | 3                    | 4             | 5             | 6             |
| 0,90     | 0,1     | 4                    | 5             | 6             | 7             |
| 0,95     | 0,05    | 5                    | 6             | 7             | 8             |

Критерии включения в исследование:

[0361] Основные критерии включения включают: пациентов мужского или женского пола в возрасте 12 лет или старше на момент скрининга и с предоставленным согласием опекуна, если пациент не достиг возраста 18 лет; наличие подтвержденного диагноза РДБЭ, определенного по клинической картине и подтверждением в гистологическом исследовании; наличие по меньшей мере 1 активной раны площадью от 5 до 50 см<sup>2</sup> на руках и/или ногах; женщины с детородным потенциалом при скрининге должны иметь отрицательный результат в тесте мочи или сыворотки на беременность, при этом они должны использовать приемлемую форму контрацепции (оральные/имплантируемые/инъекционные/ трансдермальные контрацептивы, внутриматочные контрацептивы или другие формы контрацепции). Ключевые критерии исключения будут включать: клинические признаки инфекции; параллельное применение

иммунодепрессантной терапии любого типа по любой причине.

Первичные критерии эффективности:

[0362] Будут оценивать следующие первичные критерии эффективности.

1) Скрининг и документирование всех нежелательных явлений, особенно тех, которые, как подозревают, были связаны с лечением.

2) Исследование и анализ всех связанных нежелательных явлений, о которых сообщают.

3) Оценка участников, которые прекратили участие в исследовании по собственному решению или из-за непереносимости лечения.

[0363] Следует отметить, что в настоящей заявке предложено применение EV, полученных из аллогенных МСК-КМ, в многократных дозах для улучшения заживления ран и, возможно, введения Col VII в раны РДБЭ. Клинические реестры ЕС и США насчитывают более 1000 клинических исследований по всему миру с применением МСК-КМ и, следовательно, производимых ими паракринных материалов (включая EV), причем примерно в половине всех исследований используются аллогенные источники. На сегодняшний день о серьезных побочных эффектах не сообщали. В настоящем исследовании с использованием аллогенных МСК-КМ у пациентов с ожогами не обнаружили никаких признаков связанного нежелательного явления или иммунного ответа на доставленный материал, который, как известно, содержит количества образцов EV МСК-КМ. Анализ иммунного ответа в данном исследовании включает чувствительный анализ ИФА, проверенный FDA, который позволит обнаружить незначительные субклинические признаки иммунного ответа в реакциях смешанных культур лимфоцитов. Несмотря на то, что в настоящем исследовании давали многократные дозы, в этих анализах не обнаружили никакого иммунного ответа. Это, однако, не является неожиданным, поскольку известно, что МСК-КМ обладают иммуномодулирующими свойствами (Bartholomew A, Polchert D, Szilagyi E, Douglas GW, Kenyon N. Mesenchymal stem cells in the induction of transplantation tolerance. *Transplantation* 2009; 87:S55-7; Siegel G, Schafer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2009; 87:S45-9; Sundin M, Barrett AJ, Ringden O, et al. HSCT recipients have specific tolerance to MSC but not to the MSC donor. *J Immunother* 2009; 32:755-64), которые, как было показано, опосредованы EV, которые они дают (Bruno S, Deregibus MC, Camussi G. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunology letters* 2015; 168:154-8; Chen W, Huang Y, Han J, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. *Immunologic research* 2016; 64:831-40; Li X, Liu L, Yang J, et al. Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation. *EBioMedicine* 2016; 8:72-82). Предполагается, что осторожное продвижение с терапией на основе EV для лечения РДБЭ оправдано, учитывая, что в многочисленных исследованиях, в том числе и авторов настоящего изобретения, доставляли EV на основе аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в течение многих лет без признаков

иммунного ответа или отторжения. Конечно, будет производиться тщательный мониторинг пациентов на наличие признаков иммунного ответа или отторжения с использованием мер, хорошо зарекомендовавших себя в данных исследованиях. Поскольку недавно было обнаружено, что EV МСК-КМ могут стимулировать Col VII и индуцировать в клетках РДБЭ продукцию Col VII, был поднят вопрос о вероятности выработки антител к Col VII у пациентов. Это вызывало беспокойство во многих клинических исследованиях, проводимых с участием пациентов с РДБЭ, но ни в одном из них не было продемонстрировано нежелательного ответа, даже в исследованиях, в которых были обнаружены антитела к Col VII (Petrof, ниже). В доклинических исследованиях прямого введения белка Col VII, даже когда при обнаружении циркулирующих антител к Col VII, не было отмечено ухудшения течения заболевания, увеличения образования пузырей и связывания этих антител с кожей (Riazifar, ниже; Palazzi X, Marchal T, Chabanne L, Spadafora A, Magnol JP, Meneguzzi G. Inherited dystrophic epidermolysis bullosa in inbred dogs: A spontaneous animal model for somatic gene therapy. *J Invest Dermatol* 2000; 115:135-7; South AP, Uitto J. Type VII Collagen Replacement Therapy in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa-How Much, How Often? *J Invest Dermatol* 2016; 136:1079-81; Woodley DT, Cogan J, Wang X, et al. De novo anti-type VII collagen antibodies in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 2014; 134:1138-40). Исследования МСК-КМ у пациентов с РДБЭ также не смогли продемонстрировать ухудшение течения заболевания, усиление образования пузырей или подтверждение индукции аутоиммунитета, даже когда можно было определить присутствие Col VII и/или обнаружить антитела против коллагена (El-Darouti M, Fawzy M, Amin I, et al. Treatment of dystrophic epidermolysis bullosa with bone marrow non-hematopoietic stem cells: a randomized controlled trial. *Dermatol Ther* 2016; 29:96-100; Riazifar M, Pone EJ, Lotvall J, Zhao W. Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended Messages of Regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017; 57:125-54; Petrof G, Lwin SM, Martinez-Queipo M, et al. Potential of Systemic Allogeneic Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Children with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* 2015; 135:2319-21). Индуцированная как химически (Woodley, ниже), так и трансплантацией стволовых клеток костного мозга (Wagner JE, Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, et al. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The New England journal of medicine* 2010; 363:629-39) экспрессия Col VII у пациентов с РДБЭ не могла вызывать какую-либо обеспокоенность по поводу индуцированных антител против Col VII у подвергнутых лечению пациентов. Это неудивительно, так как больше чем у половины пациентов с РДБЭ обычно экспрессируются преобладающие антигенные фрагменты Col VII, ответственные за выработку антител (Woodley DT, Cogan J, Hou Y, et al. Gentamicin induces functional type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J Clin Invest* 2017; Jones DA, Hunt SW, 3rd, Prisanh PS, Briggaman RA, Gammon WR. Immunodominant autoepitopes of type VII collagen are short, paired peptide sequences within the fibronectin type III homology region of the noncollagenous (NC1) domain. *J Invest Dermatol*

1995; 104:231-5; Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, et al. Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest* 1993; 92:1831-9; Pfendner E, Uitto J, Fine JD. Epidermolysis bullosa carrier frequencies in the US population. *J Invest Dermatol* 2001; 116:483-4).

[0364] Наблюдение, что многие пациенты РДБЭ испытывают фокальный обратный мозаицизм (с областями прочной кожи, содержащей интактный Col VII), также представляет убедительное подтверждение, что введение Col VII пациентам с РДБЭ с низкой вероятностью приведет к патогенному ответу. Несмотря на это, если бы продукция антител к Col VII производила клинически значимый эффект, это больше напоминало бы приобретенную форму буллезного эпидермолиза; намного легче поддающуюся лечению болезнь, чем РДБЭ. Также необходимо указать, что предлагается применение EV, а не стволовых клеток. Стволовые клетки обладают способностью приживаться, при этом их нельзя удалить. EV не жизнеспособны, не могут сохраняться и не воспроизводятся. Таким образом, если обнаруживается какое-либо подтверждение или подозрение развития неблагоприятного результата (включая повышение титра антител против Col VII), лечение может быть остановлено и является обратимым.

Вторичные критерии эффективности:

[0365] Будут оценивать следующие вторичные критерии эффективности:

1) Уменьшение образования пузырей/эрозии на основе изменения индекса площади поверхности тела (BSAI).

2) Уменьшение размера или закрытие целевой раны. Уменьшение размера раны является показателем для определения возможной эффективности лечения с применением EV. Целевые раны будут измерять с использованием Silhouette® (Aranz Medical), одобренной FDA медицинского устройства для визуализации ран, трехмерного измерения и документирования с использованием неинвазивной лазерной технологии, обеспечивающей проведение безошибочной, точной и воспроизводимой оценки ран.

3) Оценка врачом индивидуальных признаков - эта шкала позволяет оценивать образование пузырей и эрозии, выделения/покрытие коркой/мокнутие, зуд, эритему на непораженной пузырями окружающей коже и боль. Области тела будут включать голову/шею, верхние конечности, торс и нижние конечности.

4) Индекс активности буллезного эпидермолиза и рубцевания (EBDASI).

5) Оценка боли по опроснику VAS и применение обезболивающих средств.

6) Оценка по шкале ItchyQuant (утвержденная шкала оценки зуда) (Haydek CG, Love E, Mollanazar NK, et al. Validation and Banding of the ItchyQuant: A Self-Report Itch Severity Scale. *J. Invest. Dermatol.* 2017; 137:57-61).

7) Индекс качества жизни при дерматологических заболеваниях у детей (CDLQI). Начальным центром исследования является Университет Майами (со всемирно известным детским дерматологом доктором Лоуренсом Шахнером). Будут определены вторичные центры.

[0366] Хотя различные аспекты изобретения были проиллюстрированы выше со ссылкой на примеры и предпочтительные варианты осуществления, следует понимать, что объем изобретения определяется не предшествующим описанием, а следующей формулой изобретения, правильно рассматриваемой в соответствии с принципами патентного права.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения буллезного эпидермолиза у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

введение субъекту фармацевтической композиции, включающей выделенные микровезикулы, очищенные путем осаждения из биологической жидкости; и

облегчение или снижение тяжести одного или более симптомов буллезного эпидермолиза у субъекта.

2. Способ по п.1, где выделенные микровезикулы являются внеклеточными везикулами.

3. Способ по п.2, где внеклеточные везикулы осаждены из биологической жидкости при использовании осаждающего агента, выбранного из группы, состоящей из ионов кальция, ионов магния, ионов натрия, ионов аммония, ионов железа, сульфата аммония, альгината и полиэтиленгликоля.

4. Способ по п.1, где биологическая жидкость получена из клеток млекопитающих.

5. Способ по п.4, где клетки млекопитающих являются клетками человека.

6. Способ по п.3, где осаждающий агент является полиэтиленгликолем.

7. Способ по п.6, где средняя молекулярная масса полиэтиленгликоля составляет приблизительно 6000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 10000 Да или приблизительно 20000 Да.

8. Способ по п.1, где один или более симптомов буллезного эпидермолиза выбраны из группы, состоящей из любой комбинации утолщенных наростов, образования кожных пузырей, образования пузырей на слизистой полости рта, утолщенных ногтей на руках и/или ногах, сепсиса, нарушения питания, обезвоживания, нарушения электролитного баланса, обструкций дыхательных путей, нарушения экспрессии коллагена VII, анемии, стриктур пищевода, задержки развития, синдактилии или сращивания пальцев рук и/или ног, порока развития зубов, микростомии и истирания роговицы.

9. Способ по п.8, где образования кожных пузырей затрагивает руки, ноги, локти и/или колени.

10. Способ по п.1, где лечение включает повышение экспрессии коллагена VII у субъекта.

11. Способ лечения буллезного эпидермолиза у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

введение субъекту фармацевтической композиции, включающей выделенные внеклеточные везикулы; и

облегчение или уменьшение тяжести одного или более симптомов буллезного эпидермолиза у субъекта.

12. Способ по п.11, где выделенные внеклеточные везикулы осаждены из биологической жидкости при использовании осаждающего агента, выбранного из группы, состоящей из ионов кальция, ионов магния, ионов натрия, ионов аммония, ионов железа, сульфата аммония, альгината и полиэтиленгликоля.

13. Способ по п.12, где биологическая жидкость получена из клеток млекопитающих.

14. Способ по п.13, где клетки млекопитающих являются клетками человека.

15. Способ по п.12, где осаждающий агент является полиэтиленгликолем.

16. Способ по п.15, где средняя молекулярная масса полиэтиленгликоля составляет приблизительно 6000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 10000 Да или приблизительно 20000 Да.

17. Способ по п.11, где один или более симптомов буллезного эпидермолиза выбраны из группы, состоящей из любой комбинации утолщенных наростов, образования кожных пузырей, образования пузырей на слизистой полости рта, утолщенных ногтей на руках и/или ногах, сепсиса, нарушения питания, обезвоживания, нарушения электролитного баланса, обструкций дыхательных путей, нарушения экспрессии коллагена VII, анемии, стриктур пищевода, задержки развития, синдактилии или сращивания пальцев рук и/или ног, порока развития зубов, микростомии и истирания роговицы.

18. Способ по п.17, где образование кожных пузырей затрагивает руки, ноги, локти и/или колени.

19. Способ по п.11, где лечение включает повышение экспрессии коллагена VII у субъекта.

20. Способ повышения уровней коллагена VII в клетке, включающий контакт клетки с выделенной внеклеточной везикулой из жидкости млекопитающего, где клетка экспрессирует генотип буллезного эпидермолиза.

21. Способ по п.20, где клетка включает мутацию в гене COL7A1.

22. Способ по п.20, где выделенная внеклеточная везикула доставляет белок коллаген VII и/или мРНК COL7A1 в клетку.

23. Способ доставки одного или более биоактивных средств в клетку, включающий контакт клетки с выделенной внеклеточной везикулой из жидкости млекопитающего.

24. Способ по п.23, где клетка включает мутацию в гене COL7A1.

25. Способ по п.23, где одно или более биоактивных средств выбраны из группы, состоящей из белка коллагена VII, мРНК коллагена VII, активатора сигнализации STAT3 и активатора канонического пути Wnt.

26. Способ по п.25, где активатор сигнализации STAT3 выбран из группы, состоящей из интерферона, эпидермального фактора роста, интерлейкина 5, интерлейкина 6, MAP-киназы и нерецепторной тирозинкиназы c-src.

27. Способ по п.25, где STAT3 фосфорилирован.

28. Способ по п.23, где одно или более биоактивных средств являются одним или более фармацевтическими соединениями.

29. Способ по п.1, где биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из периферической крови, сыворотки, плазмы крови, асцитной жидкости, мочи, спинномозговой жидкости (СМЖ), мокроты, слюны, костного мозга, синовиальной

жидкости, водянистой влаги, амниотической жидкости, ушной серы, грудного молока, жидкости бронхоальвеолярного лаважа, спермы, секрета предстательной железы, куперовой жидкости, женского эякулята, пота, стула, волос, слезной жидкости, кистозной жидкости, плевральной и перитонеальной жидкости, перикардиальной жидкости, лимфы, химуса, хилуса, желчи, тканевой жидкости, менструальных выделений, гноя, кожного сала, рвоты, вагинальных выделений, отделяемого слизистых оболочек, кишечной жидкости, сока поджелудочной железы, жидкости лаважа, жидкости из клетки, жидкости из образца ткани и жидкости из культуры клеток.

30. Способ по п.4, где клетки млекопитающих являются мезенхимальными клетками.

31. Способ по п.12, где биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из периферической крови, сыворотки, плазмы крови, асцитной жидкости, мочи, СМЖ, мокроты, слюны, костного мозга, синовиальной жидкости, водянистой влаги, амниотической жидкости, ушной серы, грудного молока, жидкости бронхоальвеолярного лаважа, спермы, секрета предстательной железы, куперовой жидкости, женского эякулята, пота, стула, волос, слезной жидкости, кистозной жидкости, плевральной и перитонеальной жидкости, перикардиальной жидкости, лимфы, химуса, хилуса, желчи, тканевой жидкости, менструальных выделений, гноя, кожного сала, рвоты, вагинальных выделений, отделяемого слизистых оболочек, кишечной жидкости, сока поджелудочной железы, жидкости лаважа, жидкости из клетки, жидкости из образца ткани и жидкости из культуры клеток.

32. Способ по п.13, где клетки млекопитающих являются мезенхимальными клетками.

33. Способ по п.20, где жидкость млекопитающего выбрана из группы, состоящей из периферической крови, сыворотки, плазмы крови, асцитной жидкости, мочи, СМЖ, мокроты, слюны, костного мозга, синовиальной жидкости, водянистой влаги, амниотической жидкости, ушной серы, грудного молока, жидкости бронхоальвеолярного лаважа, спермы, секрета предстательной железы, куперовой жидкости, женского эякулята, пота, стула, волос, слезной жидкости, кистозной жидкости, плевральной и перитонеальной жидкости, перикардиальной жидкости, лимфы, химуса, хилуса, желчи, тканевой жидкости, менструальных выделений, гноя, кожного сала, рвоты, вагинальных выделений, отделяемого слизистых оболочек, кишечной жидкости, сока поджелудочной железы, жидкости лаважа, жидкости из клетки, жидкости из образца ткани и жидкости из культуры клеток.

34. Способ по п.33, где жидкость млекопитающего является кондиционированной средой.

35. Способ по п.34, где кондиционированная среда получена из мезенхимальных стволовых клеток.

36. Способ по п.23, где жидкость млекопитающего выбрана из группы, состоящей из периферической крови, сыворотки, плазмы крови, асцитной жидкости, мочи, СМЖ,

мокроты, слюны, костного мозга, синовиальной жидкости, водянистой влаги, амниотической жидкости, ушной серы, грудного молока, жидкости бронхоальвеолярного лаважа, спермы, секрета предстательной железы, куперовской жидкости, женского эякулята, пота, стула, волос, слезной жидкости, кистозной жидкости, плевральной и перитонеальной жидкости, перикардальной жидкости, лимфы, химуса, хилуса, желчи, тканевой жидкости, менструальных выделений, гноя, кожного сала, рвоты, вагинальных выделений, отделяемого слизистых оболочек, кишечной жидкости, сока поджелудочной железы, жидкости лаважа, жидкости из клетки, жидкости из образца ткани и жидкости из культуры клеток.

37. Способ по п.36, где жидкость млекопитающего является кондиционированной средой.

38. Способ по п.37, где кондиционированная среда получена из мезенхимальных стволовых клеток.

39. Способ по п.1, где буллезный эпидермолиз является дистрофическим буллезным эпидермолизом.

40. Способ по п.39, где дистрофический буллезный эпидермолиз является рецессивным.

41. Способ по п.11, где буллезный эпидермолиз является дистрофическим буллезным эпидермолизом.

42. Способ по п.41, где дистрофический буллезный эпидермолиз является рецессивным.

43. Способ по п.20, где генотип буллезного эпидермолиза является рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом.

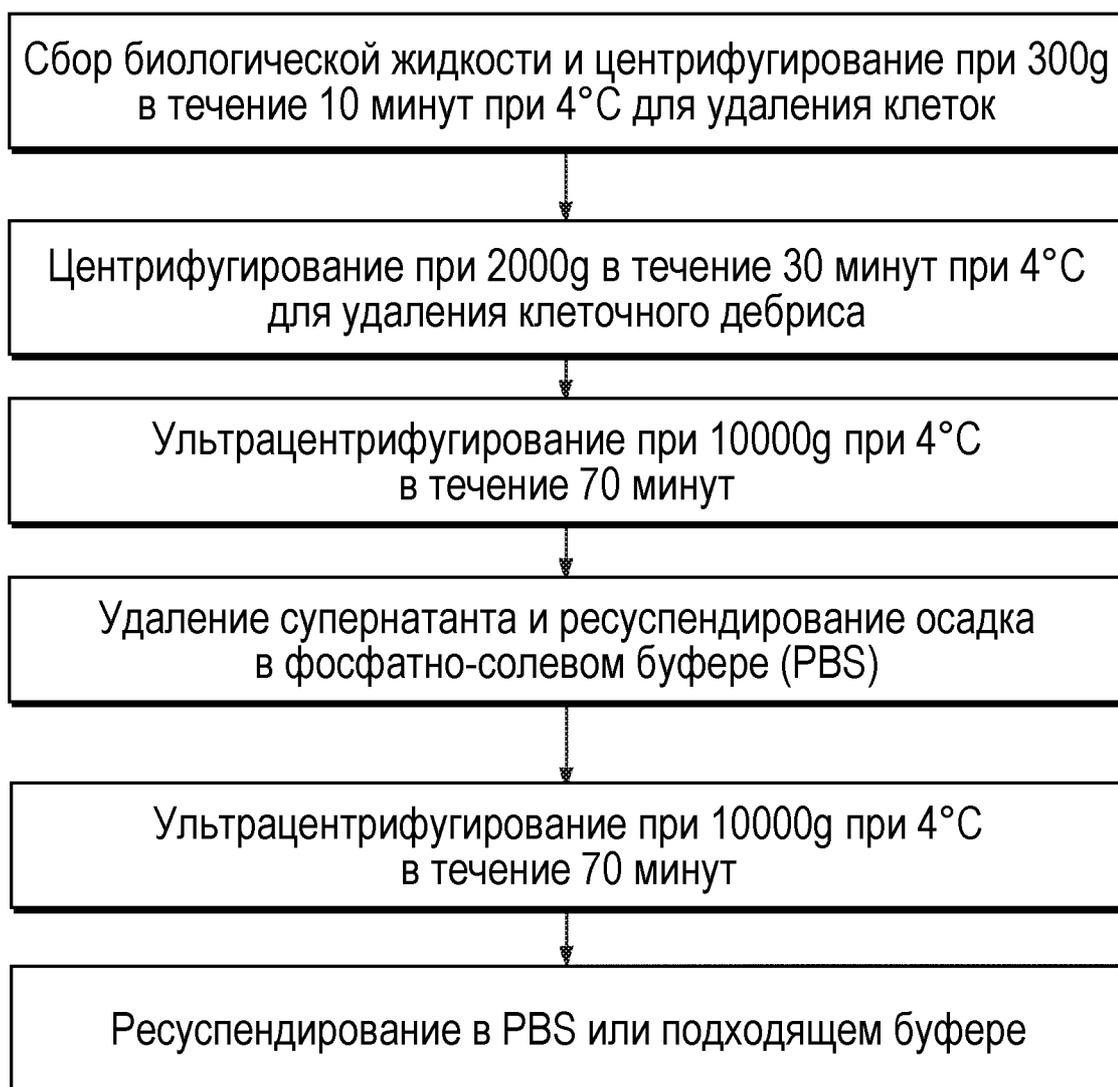
44. Способ по п.20, где стимулирована пролиферация клетки и/или улучшена устойчивость клетки к расщеплению трипсином.

45. Способ по п.23, где клетка имеет генотип рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза.

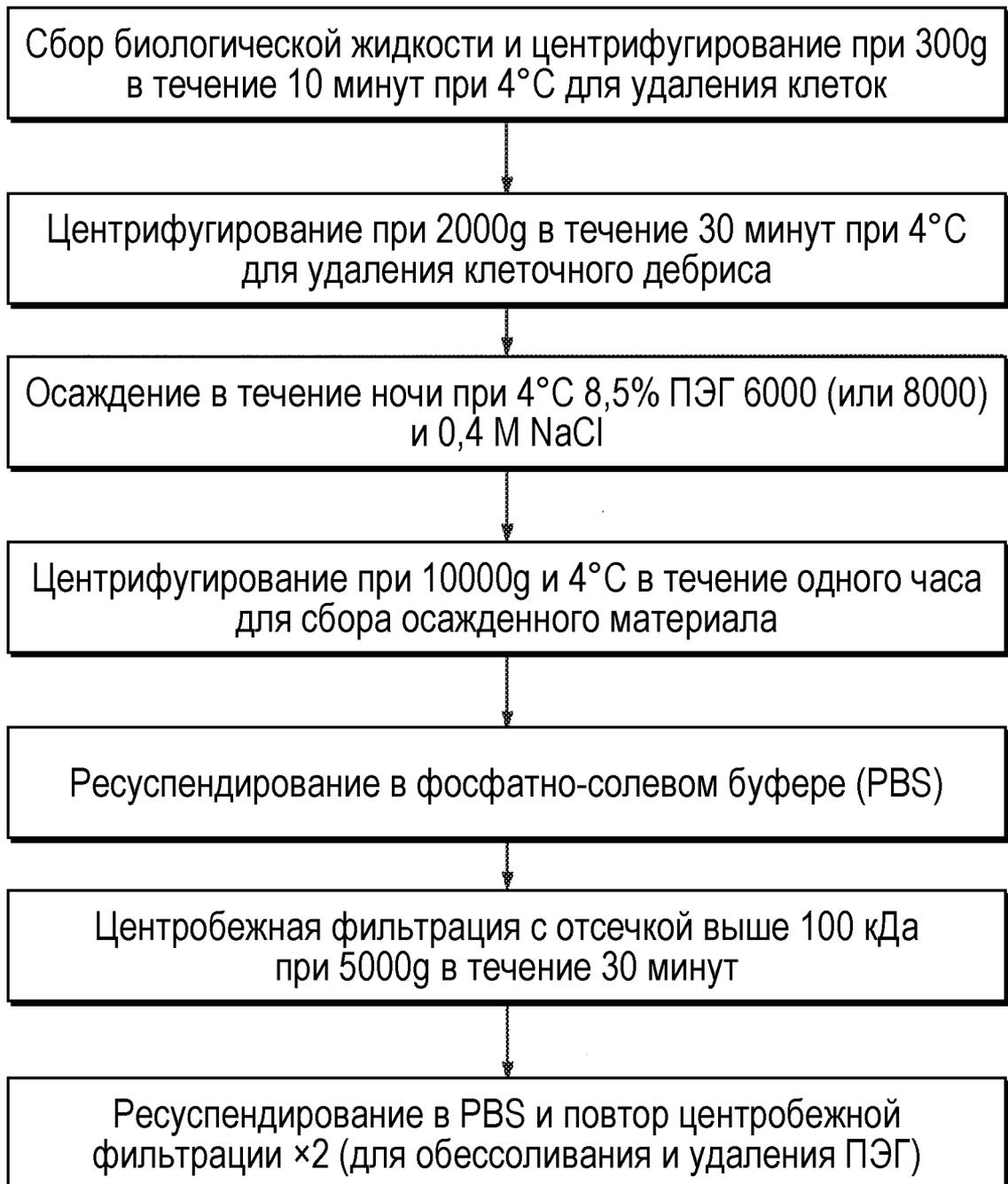
46. Способ по п.23, где стимулирована пролиферация клетки и/или улучшена устойчивость клетки к расщеплению трипсином.

По доверенности

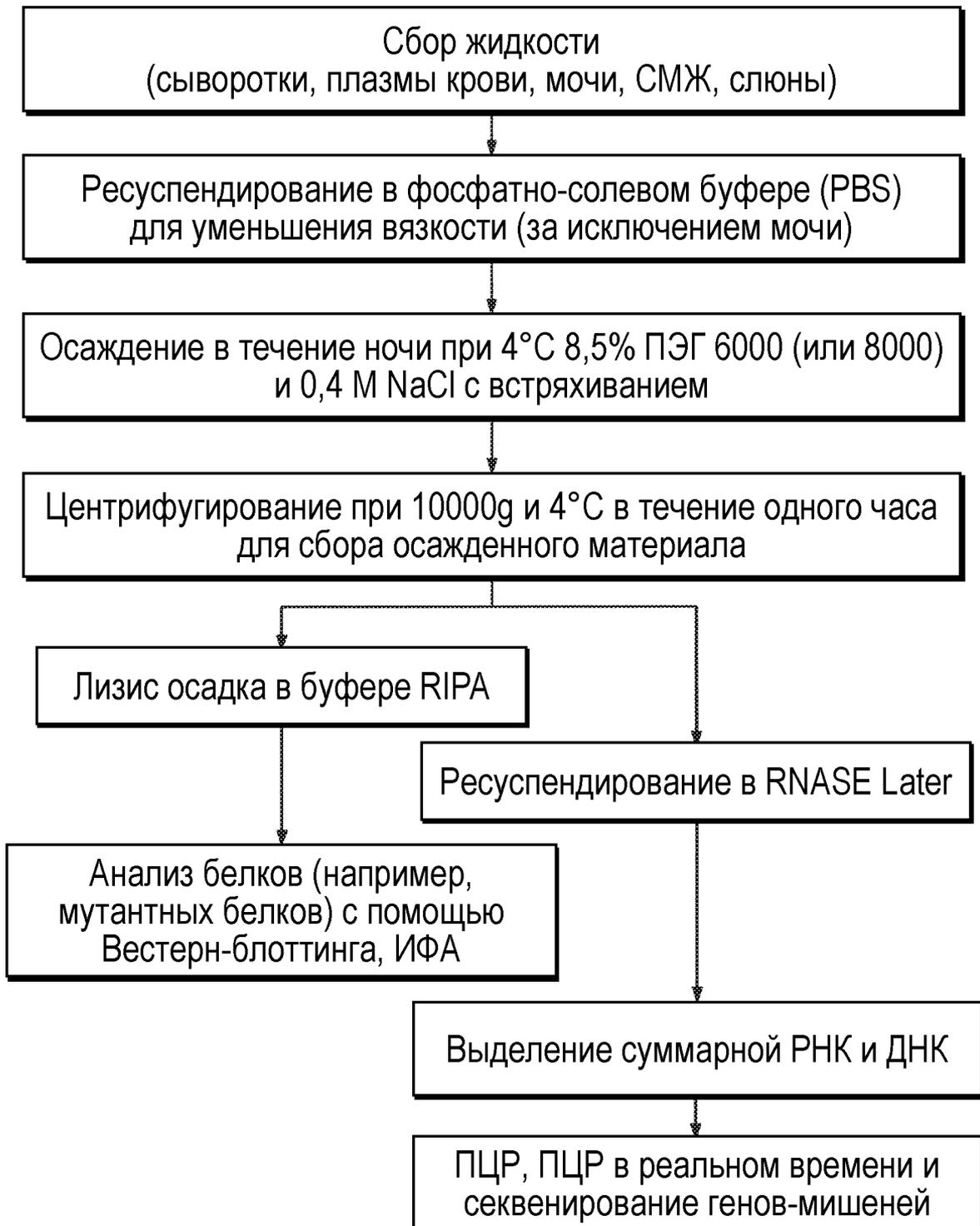
## ФИГ.1



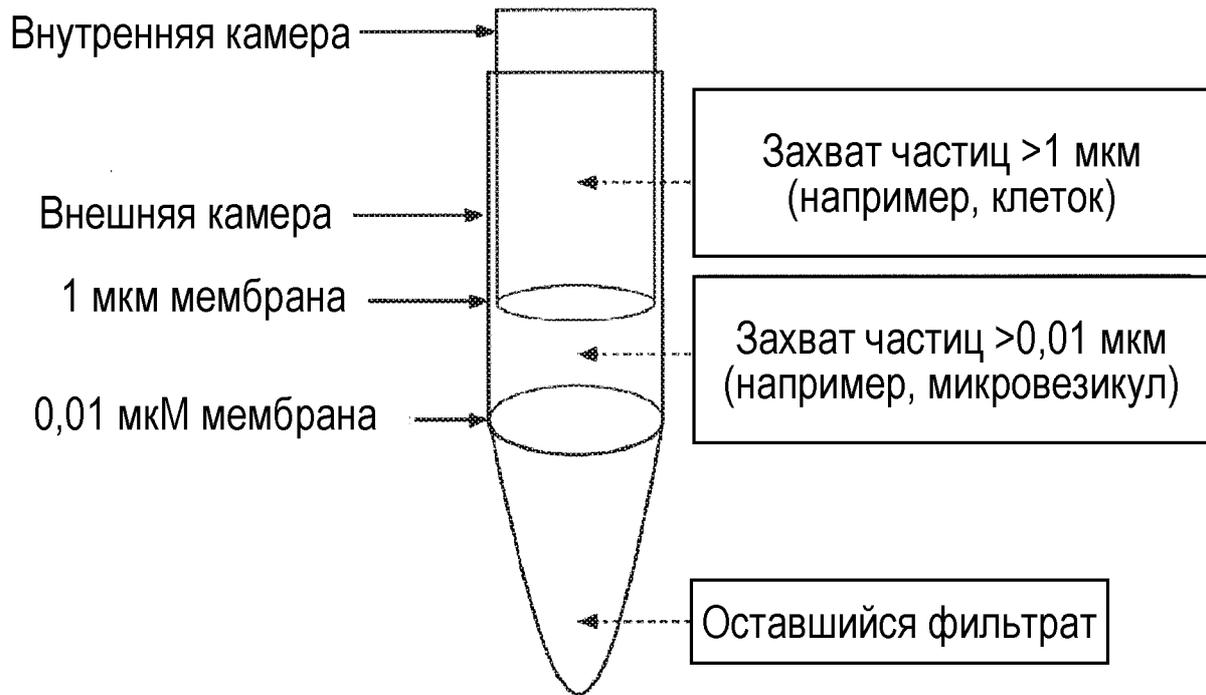
## ФИГ.2



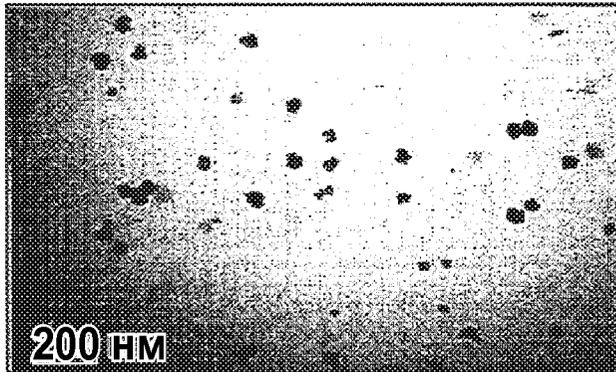
## ФИГ.3



ФИГ.4

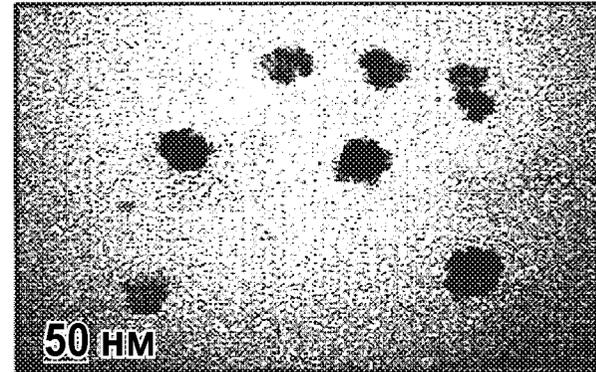


**ФИГ.5А**



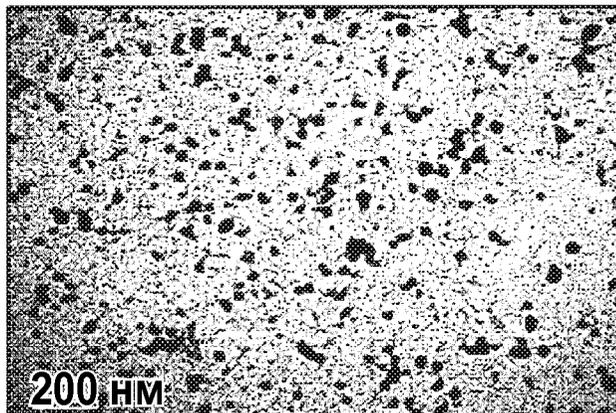
64000x

**ФИГ.5В**



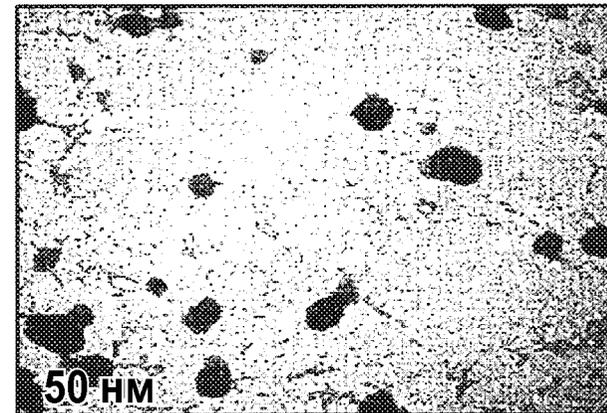
180000x

**ФИГ.5С**



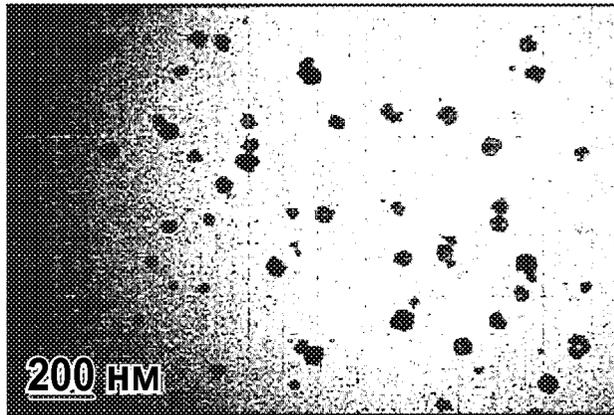
64000x

**ФИГ.5D**

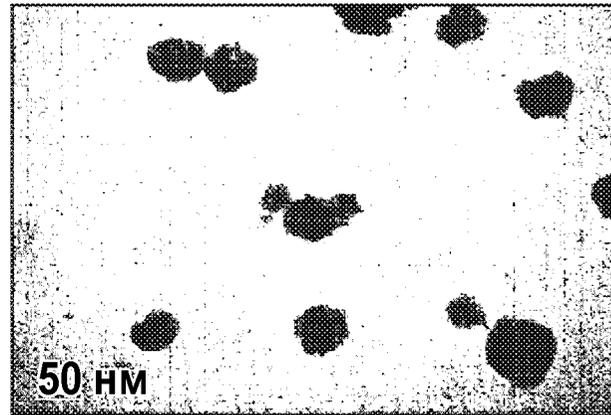


180000x

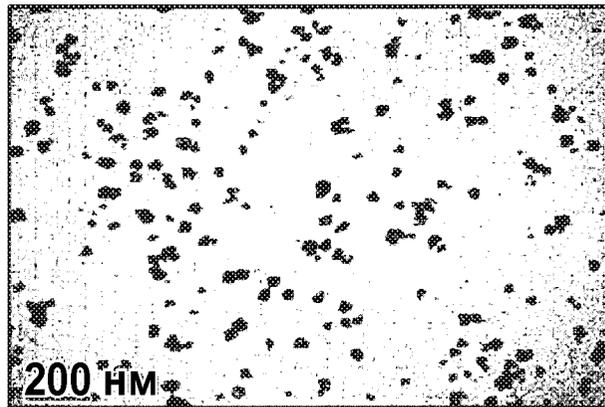
ФИГ.6А



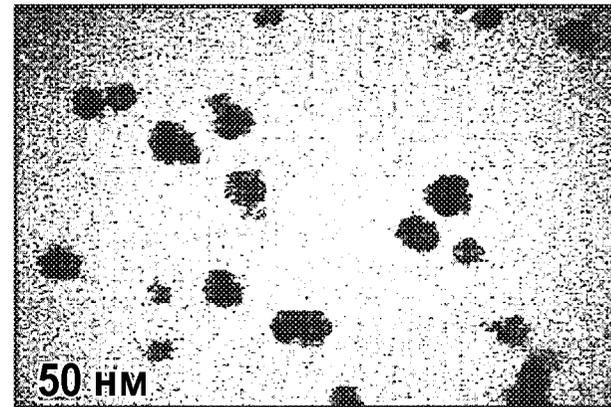
ФИГ.6В



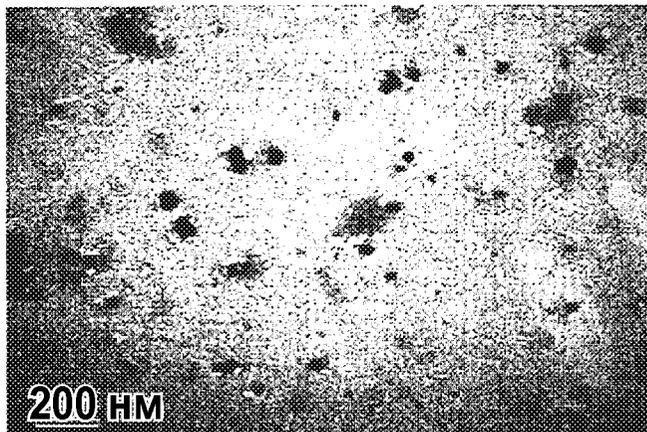
ФИГ.6С



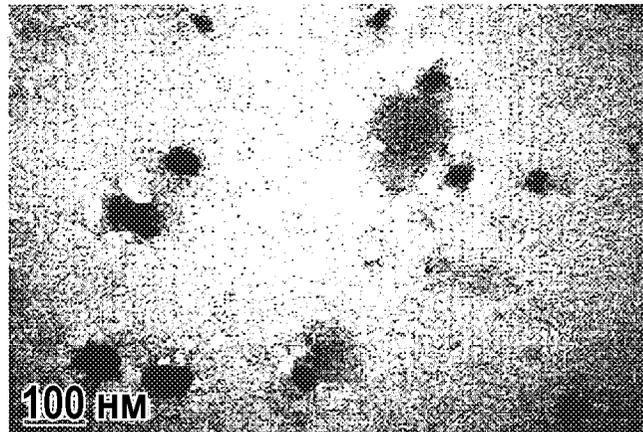
ФИГ.6D



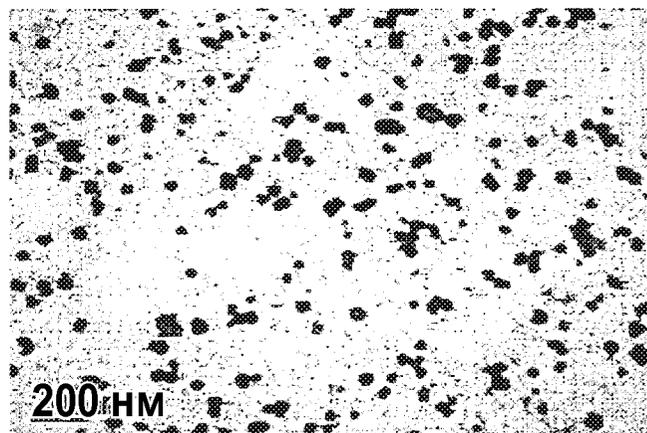
ФИГ.7А



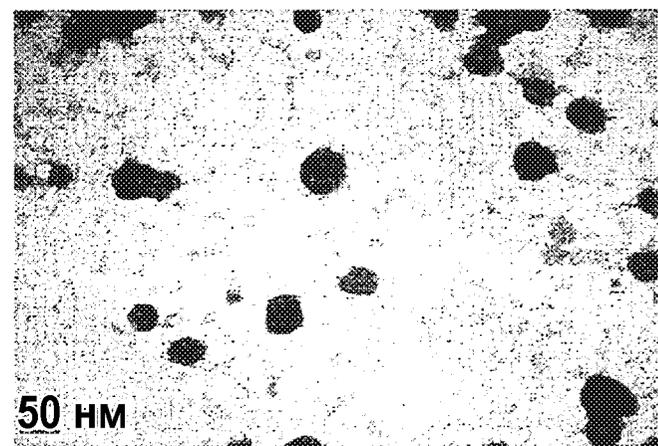
ФИГ.7В



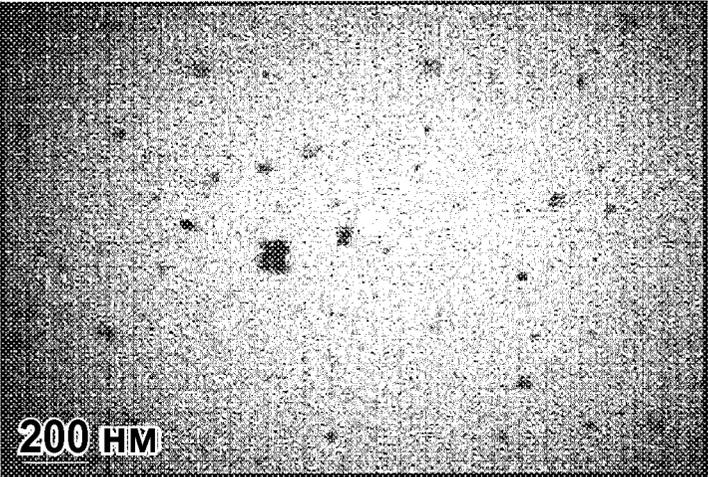
ФИГ.7С



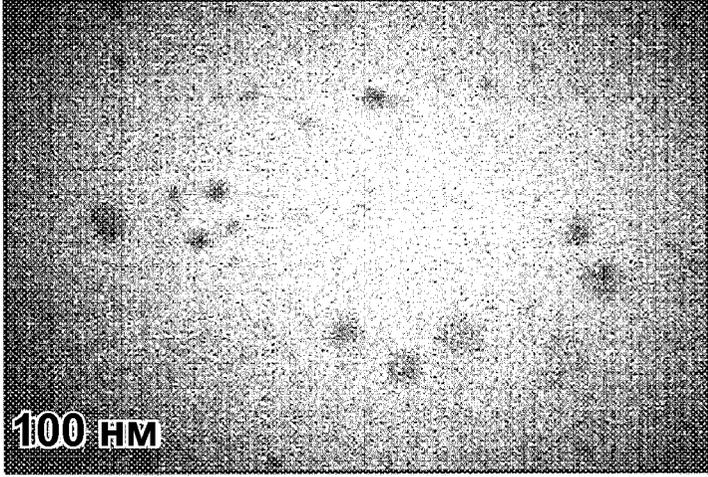
ФИГ.7D



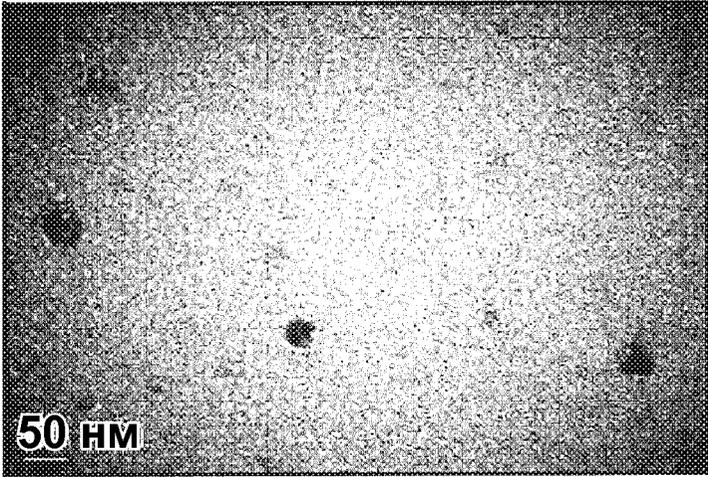
**ФИГ.8А**



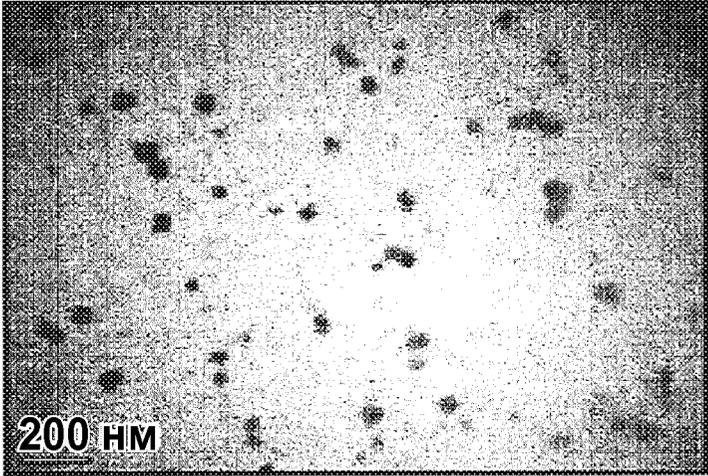
**ФИГ.8В**



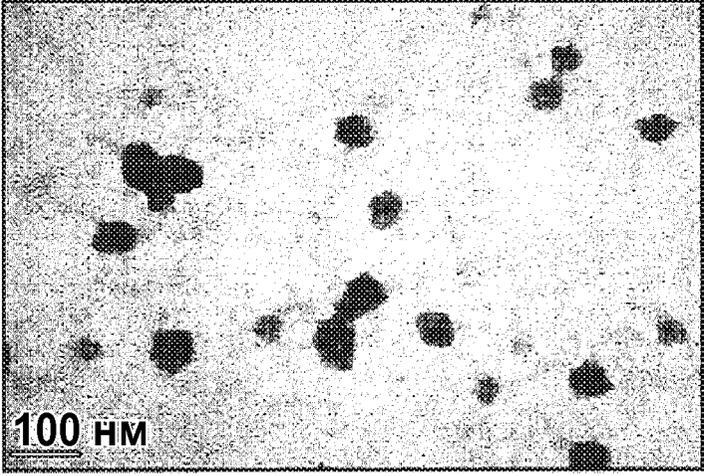
**ФИГ.8С**



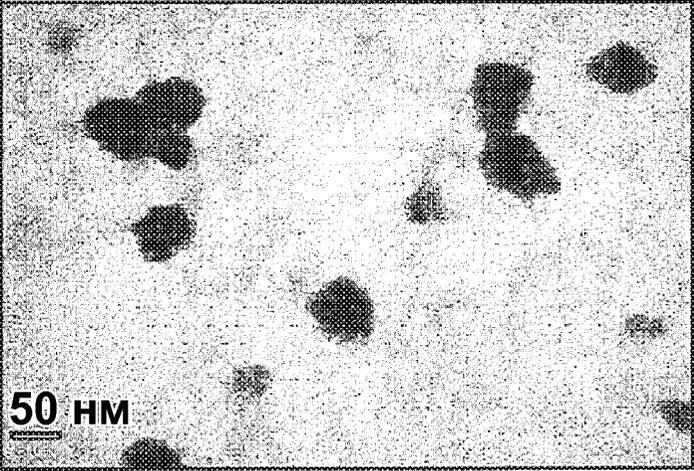
**ФИГ.9А**



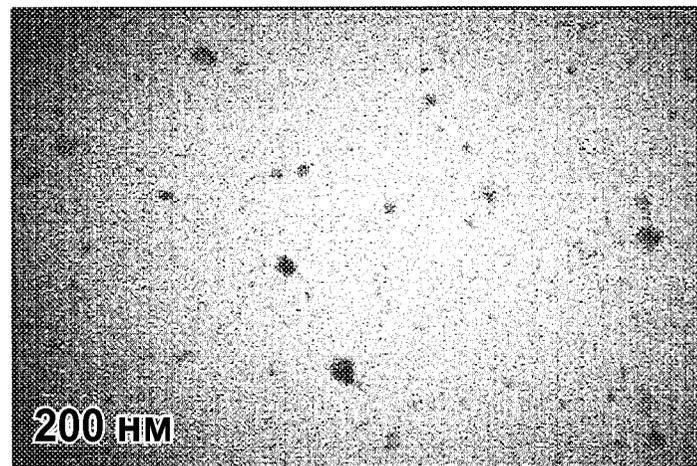
**ФИГ.9В**



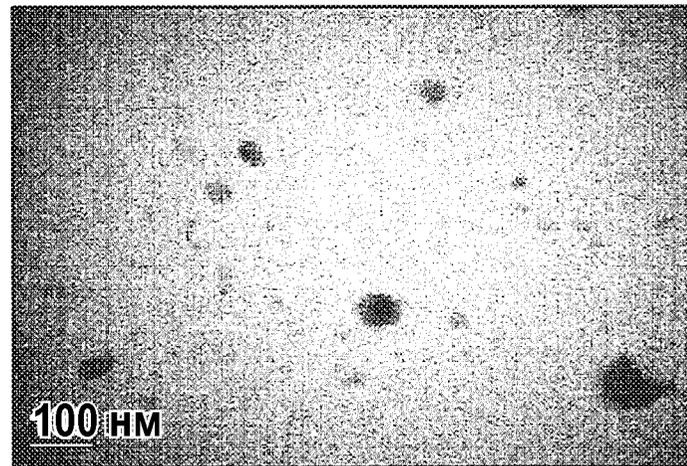
**ФИГ.9С**



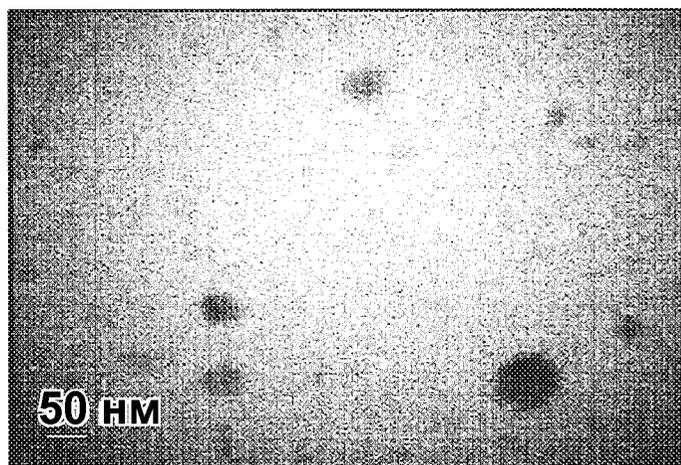
ФИГ.10А



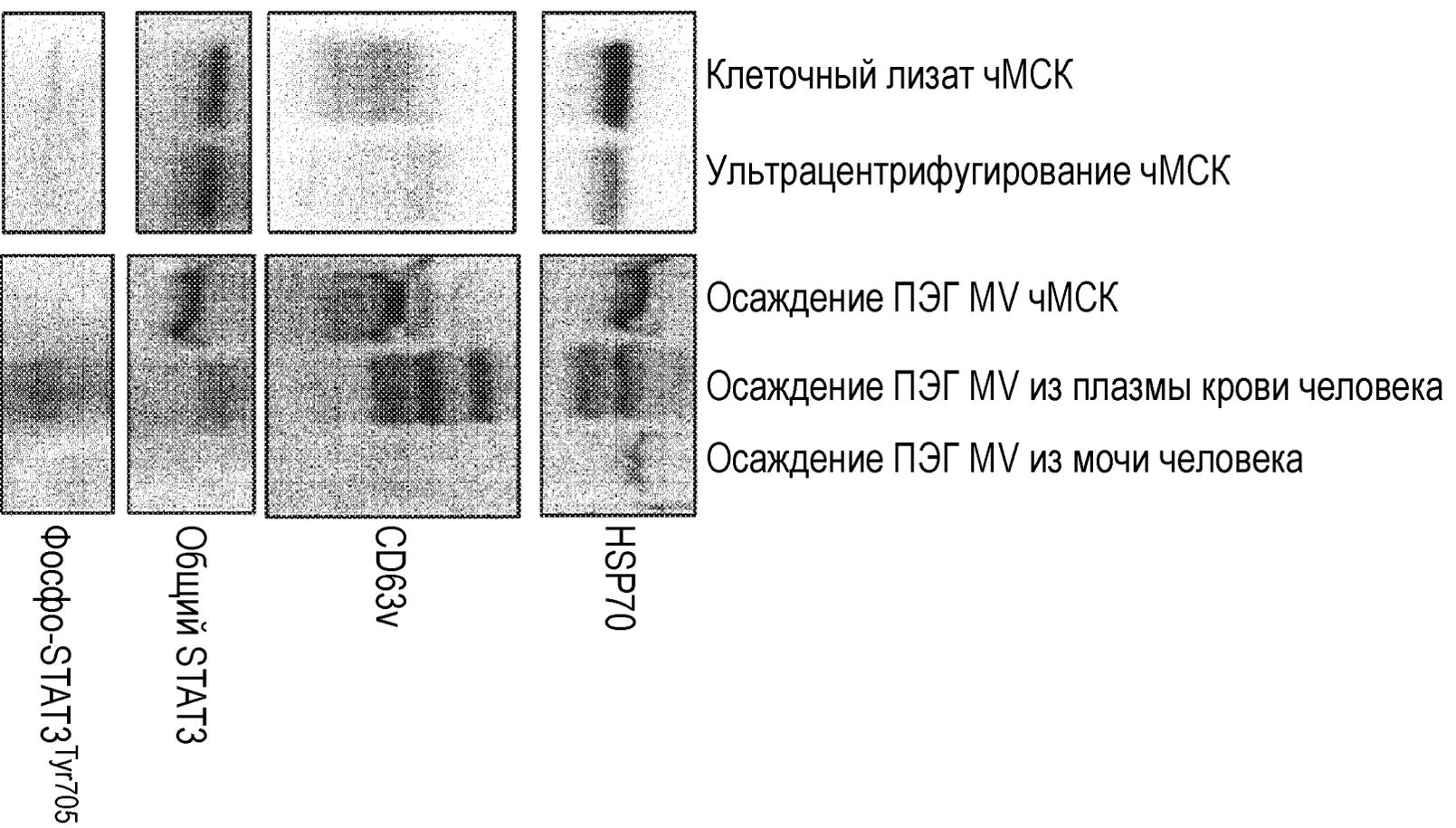
ФИГ.10В



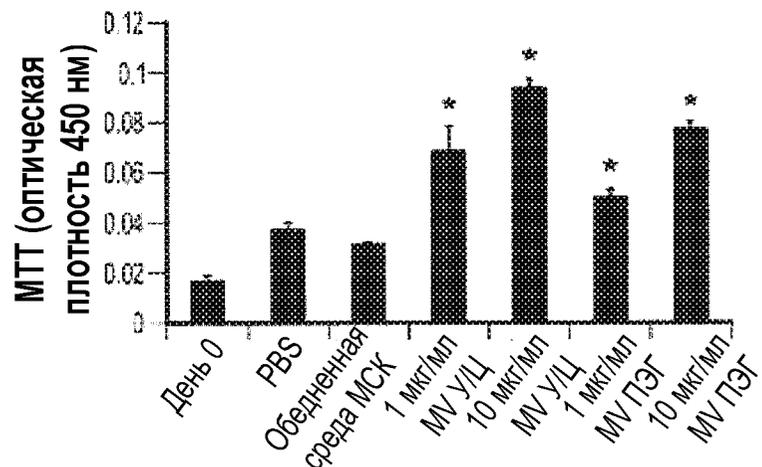
ФИГ.10С



**ФИГ. 11**

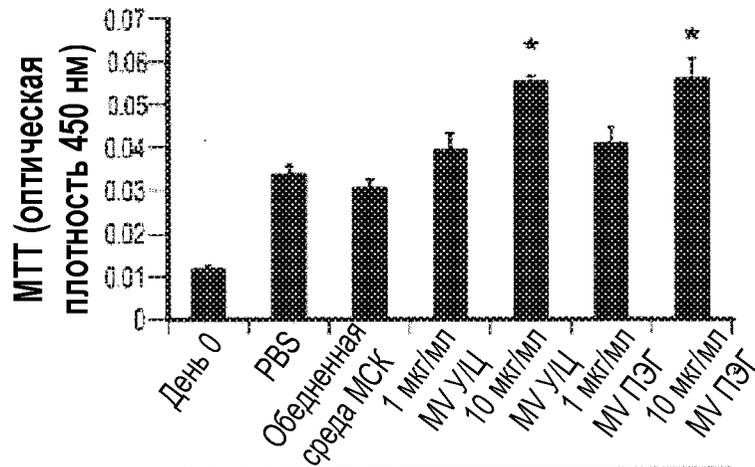


ФИГ.12А



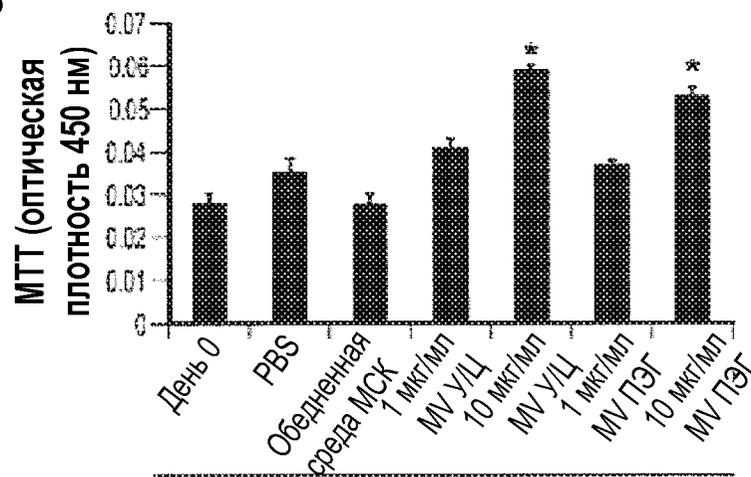
День 3

ФИГ.12В



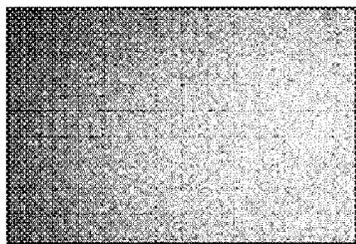
День 3

ФИГ.12С



День 3

**ФИГ.13А**



До обработки

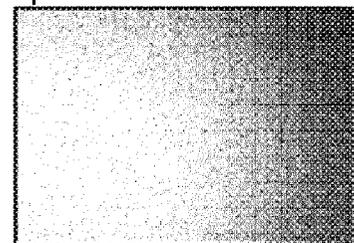
**ФИГ.13В**

Через 3 дня после обработки



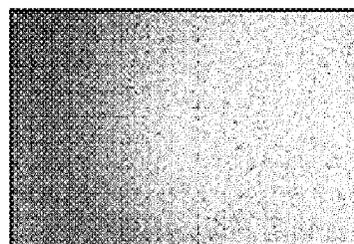
Осаждение ПЭГ MV 1 мкг/мл

**ФИГ.13Е**



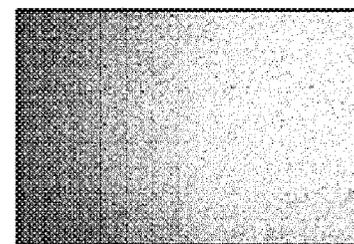
Осаждение ПЭГ MV 10 мкг/мл

**ФИГ.13С**



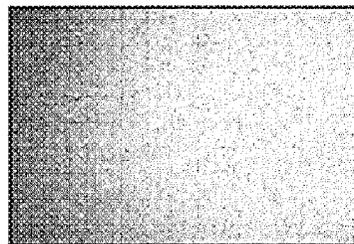
Ультрацентрифугирование  
MV 1 мкг/мл

**ФИГ.13F**



Ультрацентрифугирование  
MV 10 мкг/мл

**ФИГ.13D**



PBS

**ФИГ.13G**



Обедненная

**ФИГ.14А**



До обработки

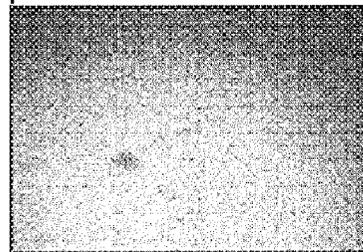
**ФИГ.14В**

Через 3 дня после обработки



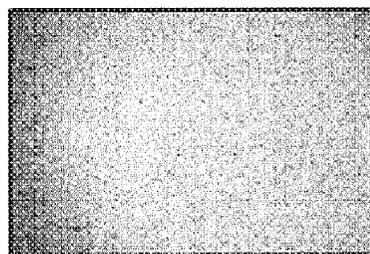
Осаждение ПЭГ MV 1 мкг/мл

**ФИГ.14Е**



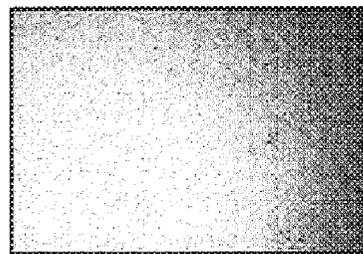
Осаждение ПЭГ MV 10 мкг/мл

**ФИГ.14С**



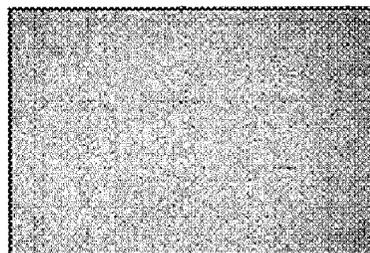
Ультрацентрифугирование  
MV 1 мкг/мл

**ФИГ.14F**



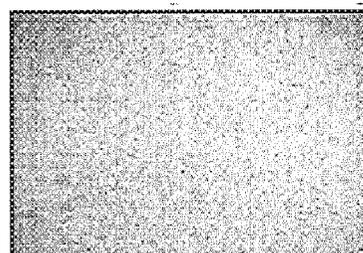
Ультрацентрифугирование  
MV 10 мкг/мл

**ФИГ.14D**



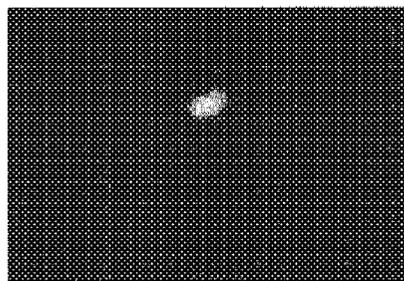
PBS

**ФИГ.14G**



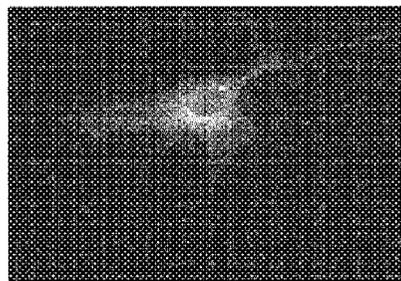
Обедненная

**ФИГ.15А**



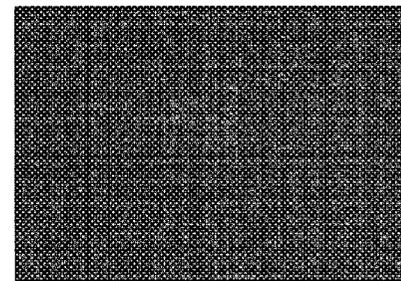
Ноеchst33342

**ФИГ.15В**



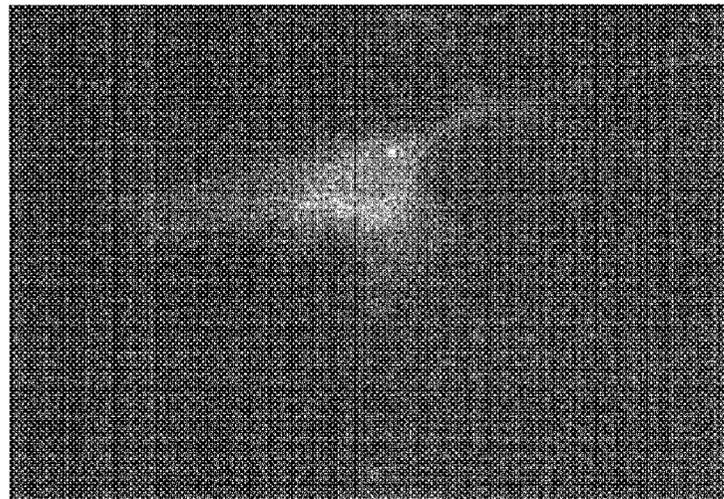
Vybrant-Dio

**ФИГ.15С**



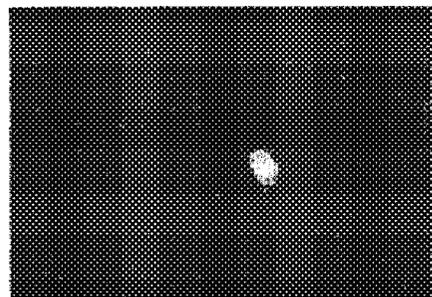
РКН-меченные MV

**ФИГ.15D**



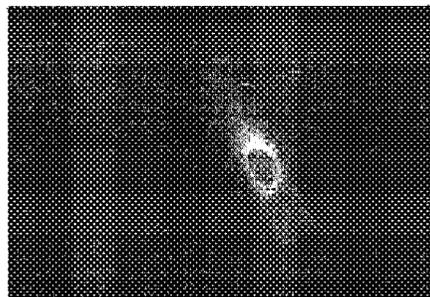
Совмещение

**ФИГ.16А**



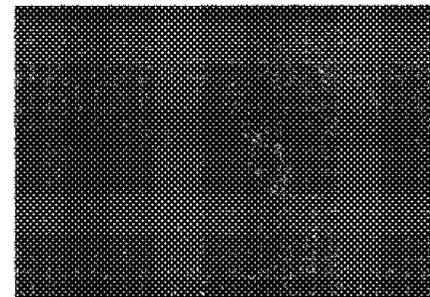
Нoechst33342

**ФИГ.16В**



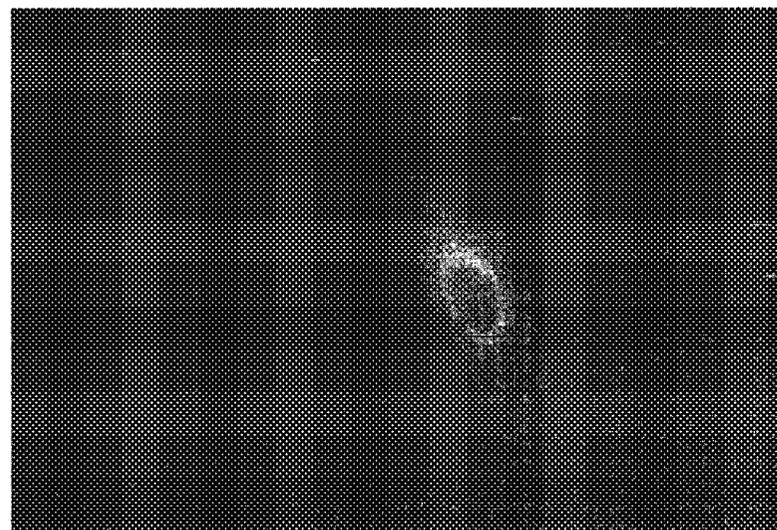
Vybrant-Dio

**ФИГ.16С**



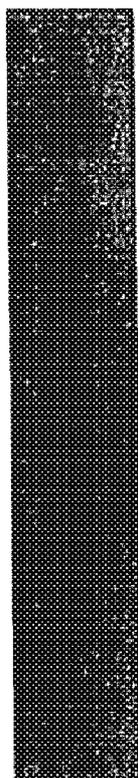
PKH-меченные MV

**ФИГ.16D**



Совмещение

# ФИГ.17



PBS

Кондиционированная чМСК среда, обедненная MV

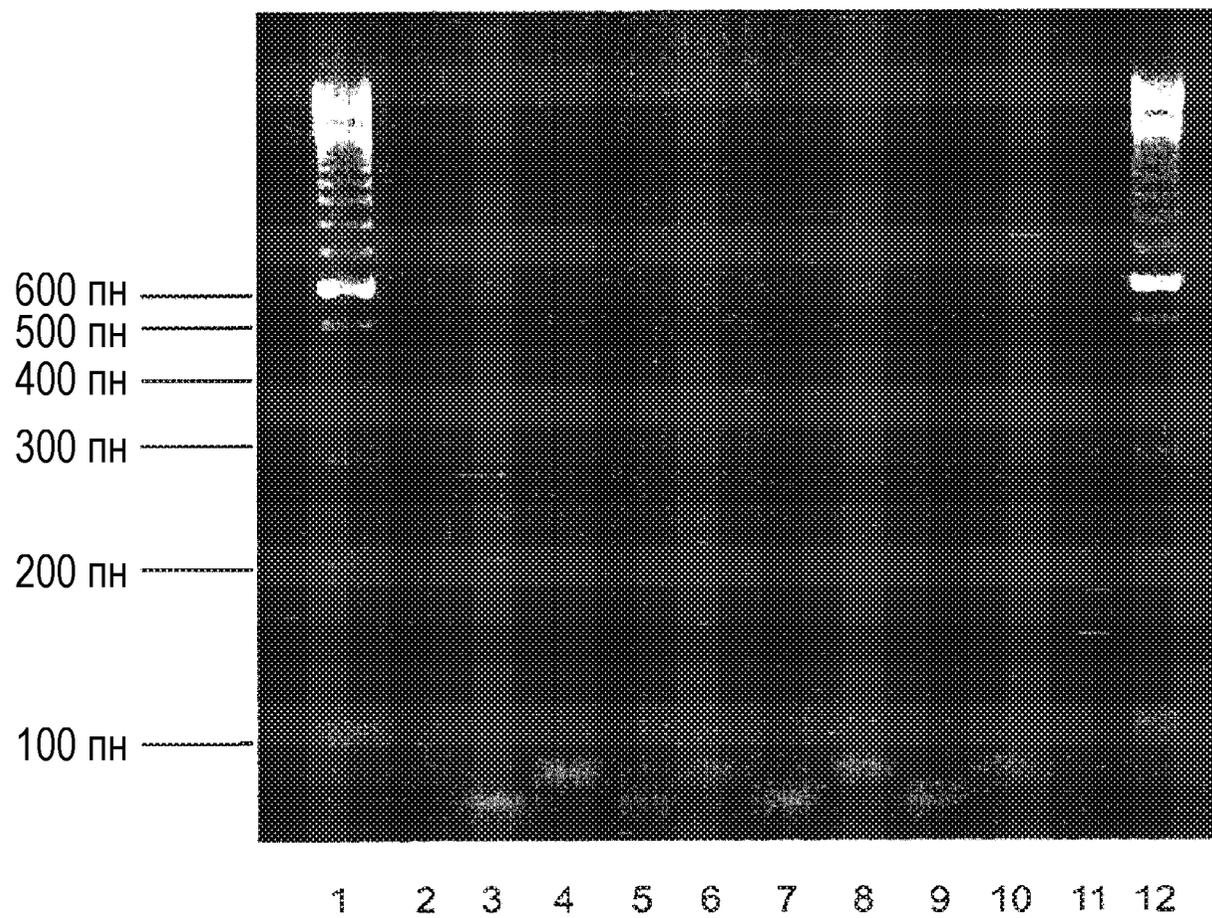
Ультрацентрифугирование MV чМСК

Осаждение ПЭГ MV чМСК

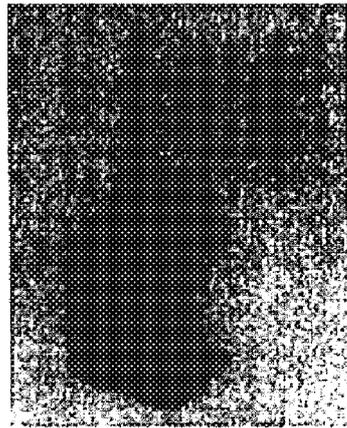
Осаждение ПЭГ MV из плазмы крови человека

Фосфо-СТАТ3 Tyr705

ФИГ.18



ФИГ.19

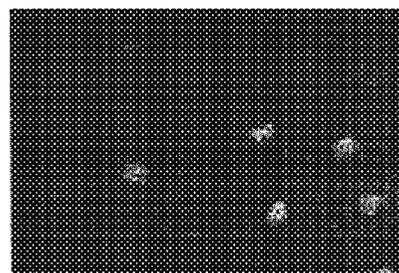


Лизат клеток SK-MEL28

Лизат MV SK-MEL28

BRAF V600E

**ФИГ.20А**



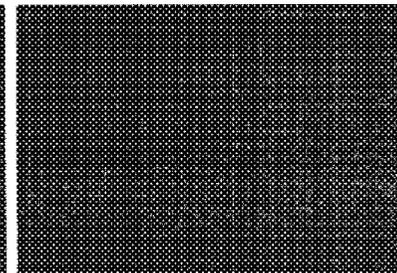
Hoechst33342

**ФИГ.20В**



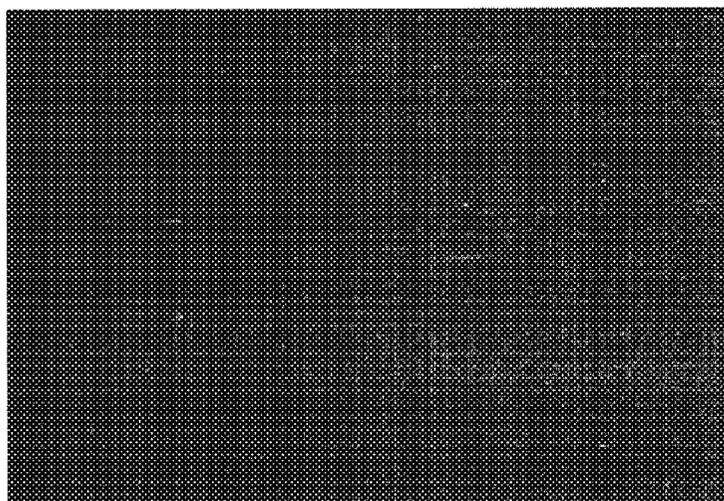
Vybrant-Dio

**ФИГ.20С**



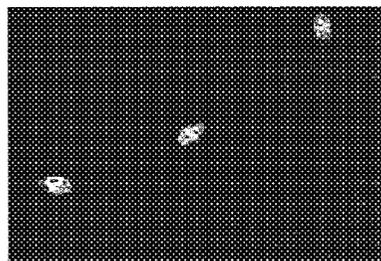
GFP

**ФИГ.20D**



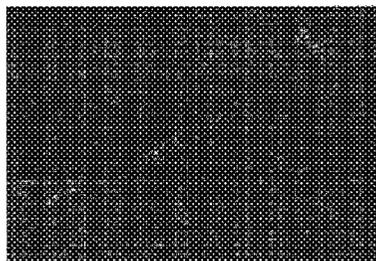
Совмещение

**ФИГ.21А**



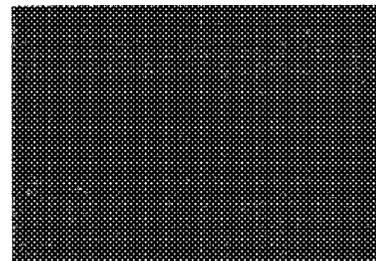
Ноеchst33342

**ФИГ.21В**



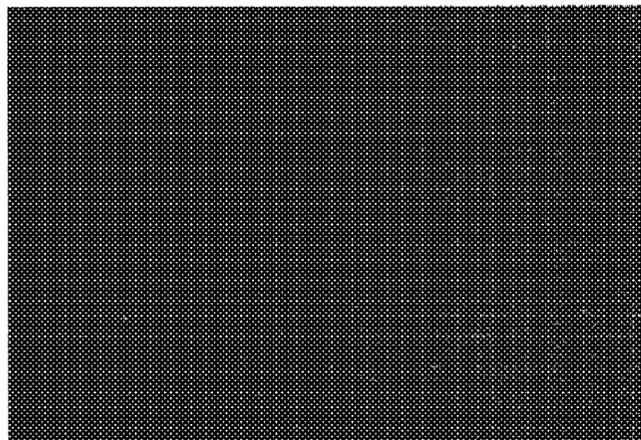
Vybrant-Dio

**ФИГ.21С**



MV, полученные из GFP-экспрессирующих МСК

**ФИГ.21D**

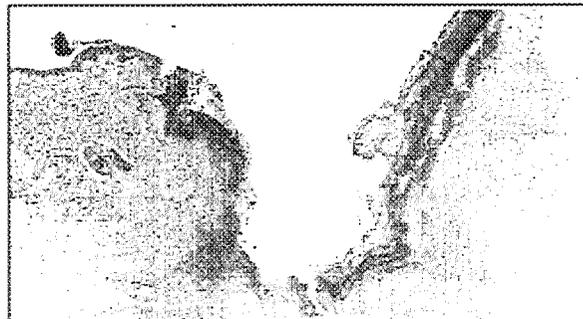


Совмещение

**ФИГ.22А**



**ФИГ.22В**



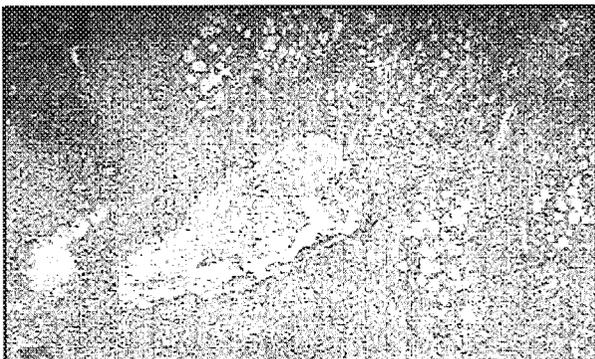
**ФИГ.22С**



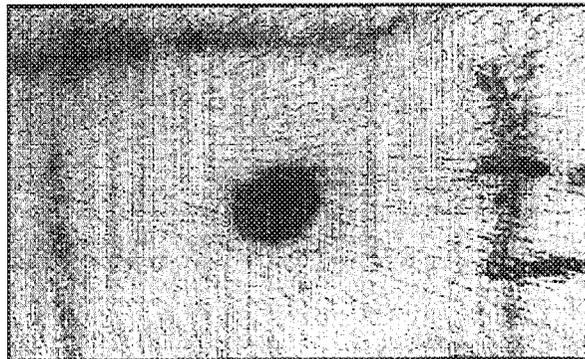
**ФИГ.22D**



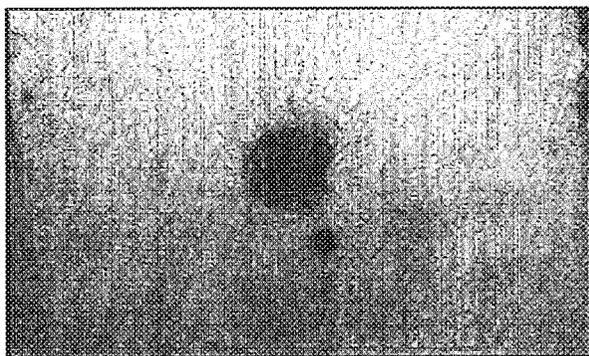
**ФИГ.23А**



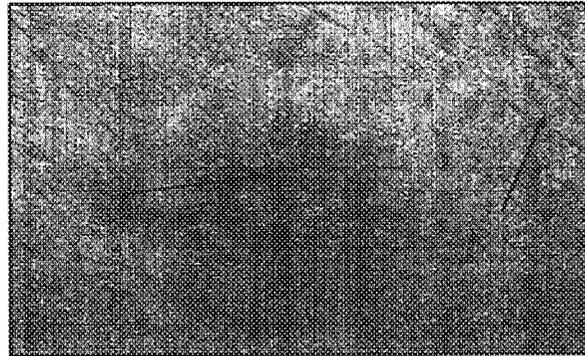
**ФИГ.23В**



**ФИГ.23С**



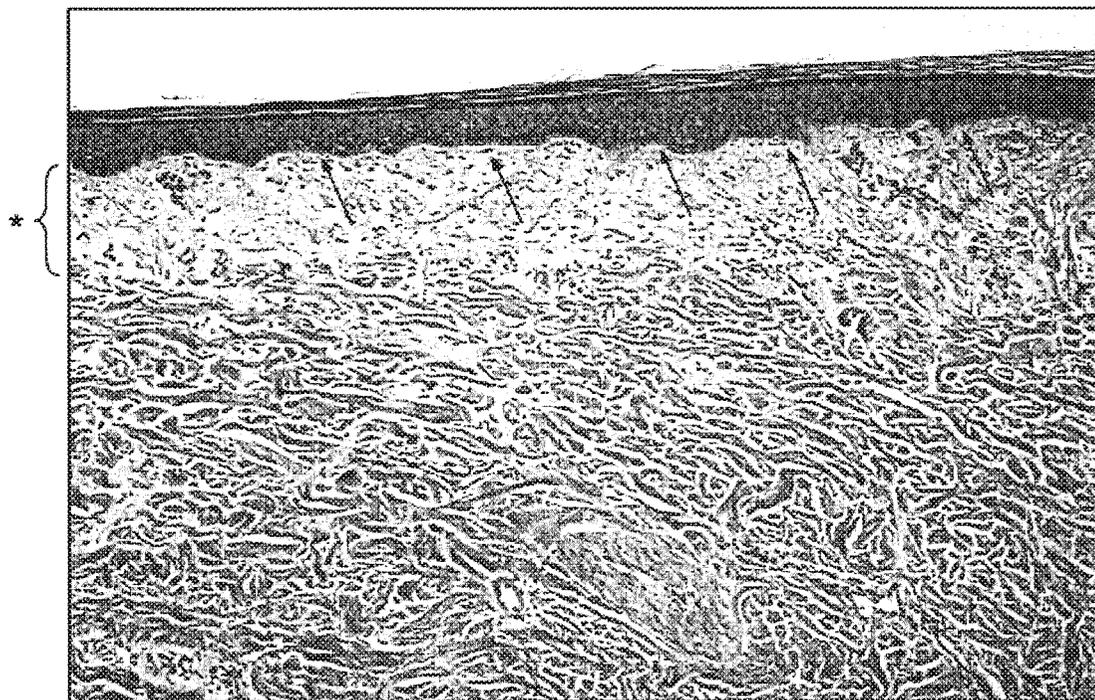
**ФИГ.23D**



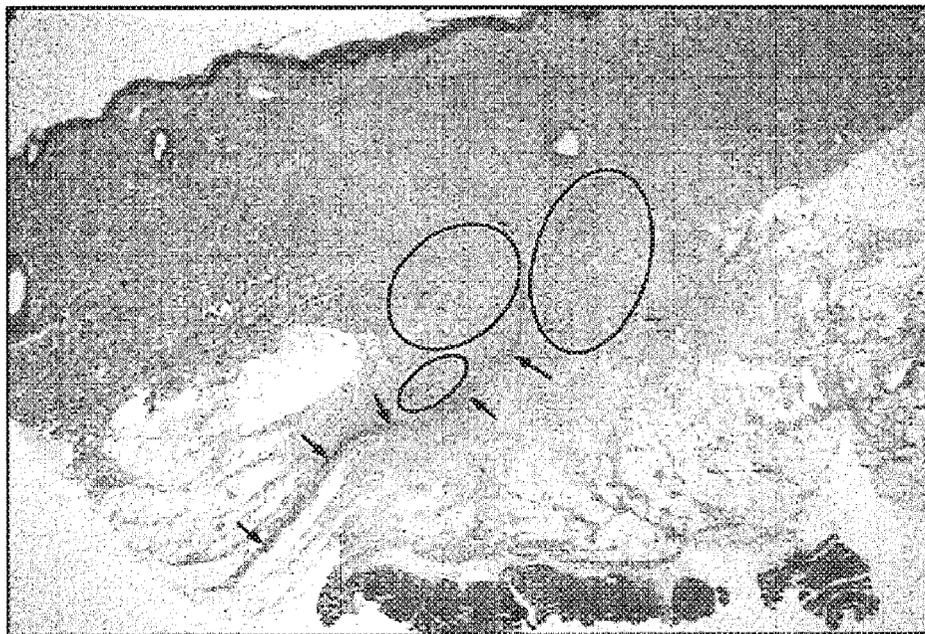
ФИГ.24



ФИГ.25



## ФИГ.26



Фигура 5: Рана на всю толщю кожи, обработанная MV, полученными с помощью наших способов в день 28 (12,5х)

Стрелками указан рост новых нервов в ремоделируемой ране.

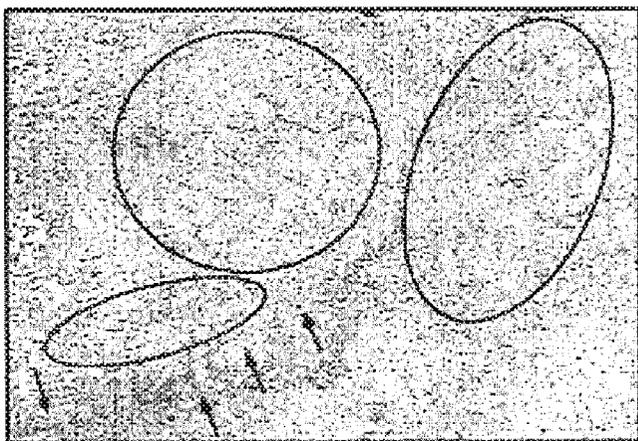
Рост нервов связан с ангиогенезом - показан в обведенных областях

Эти выводы в значительной степени свидетельствуют о регенерации тканей

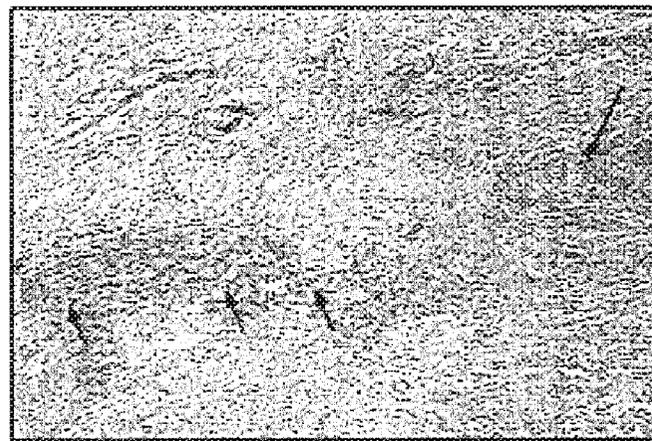
Этого никогда не наблюдали

Не наблюдали в ранах, обработанных контролем или ультрацентрифугированными М

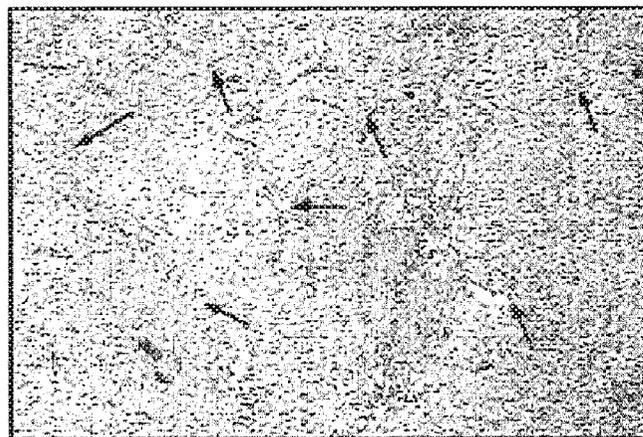
**ФИГ.27А**



**ФИГ.27В**



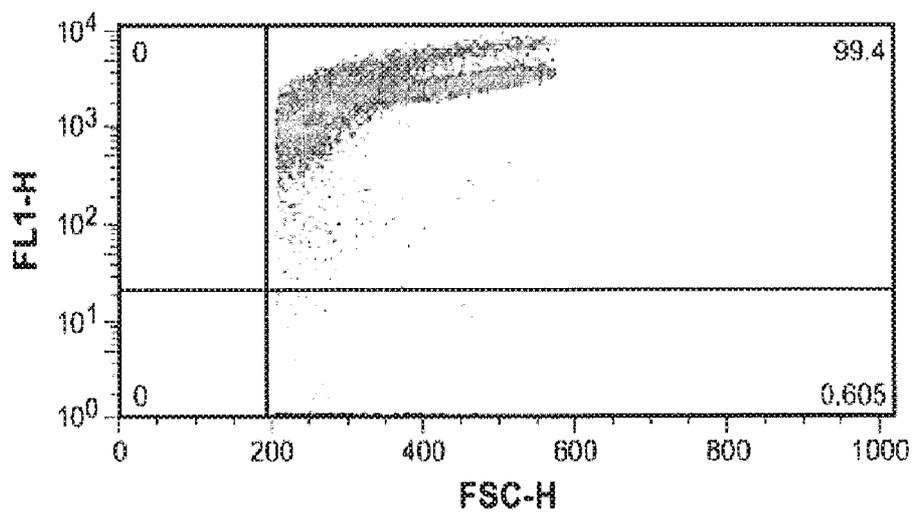
**ФИГ.27С**



ФИГ.28

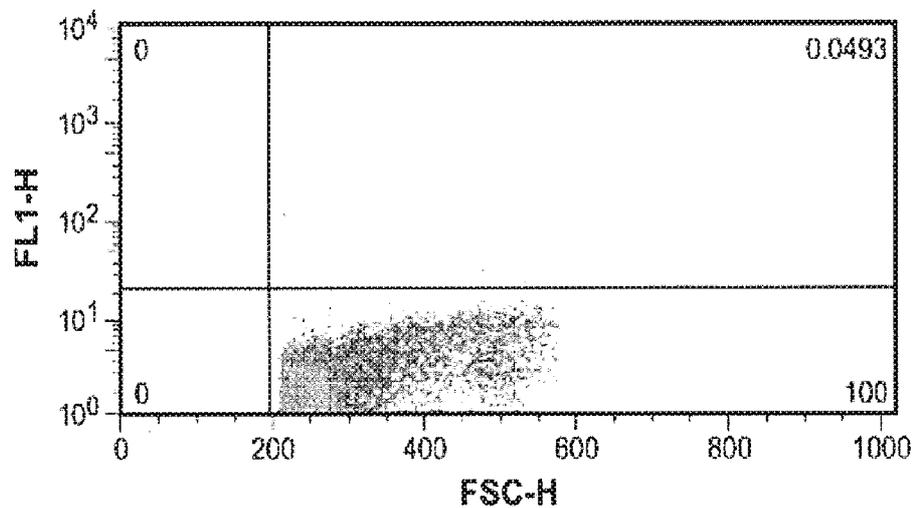


ФИГ.29А



Положительный контроль: GFP

ФИГ.29В



Эксперимент 1

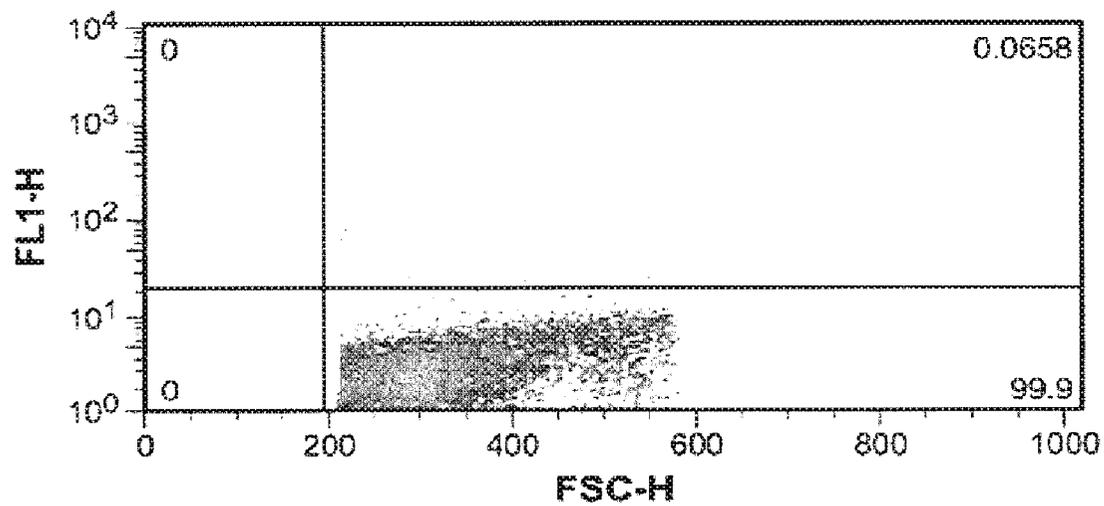
ФИГ.30А



ФИГ.30В

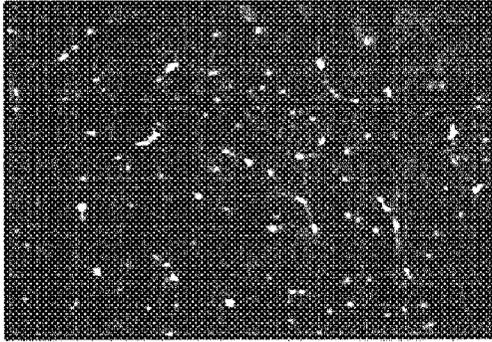


ФИГ.30С

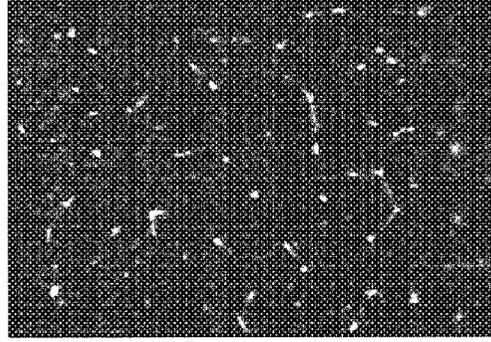


Примеры изображений

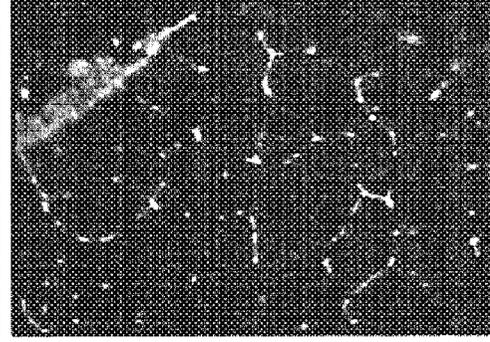
ММ из аспирата  
КОСТНОГО МОЗГА



ФИГ.31А

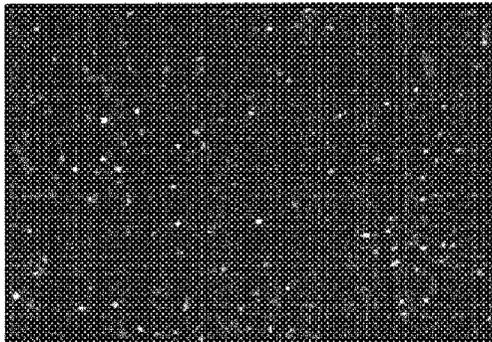


ФИГ.31В

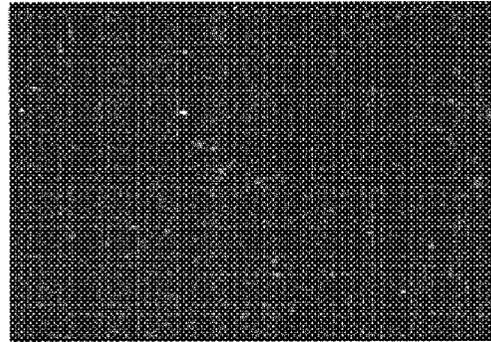


ФИГ.31С

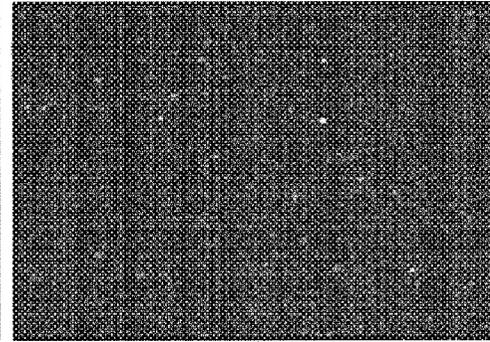
Контроль  
растворителем



ФИГ.31D



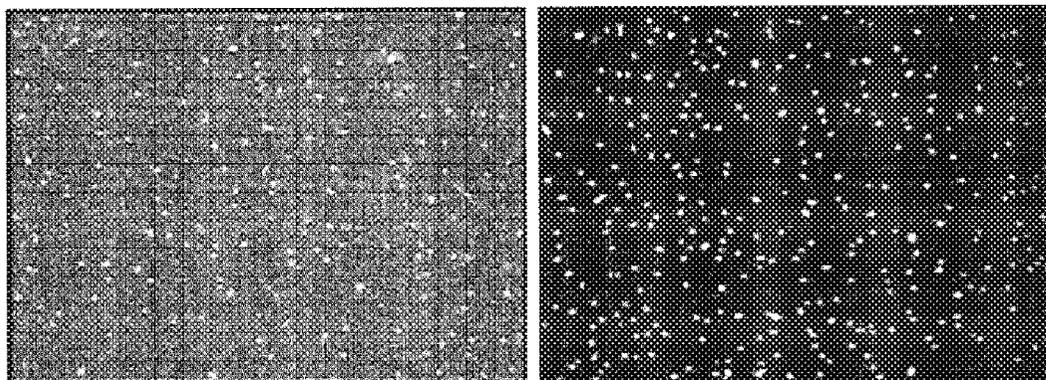
ФИГ.31Е



ФИГ.31F

ФИГ.32А

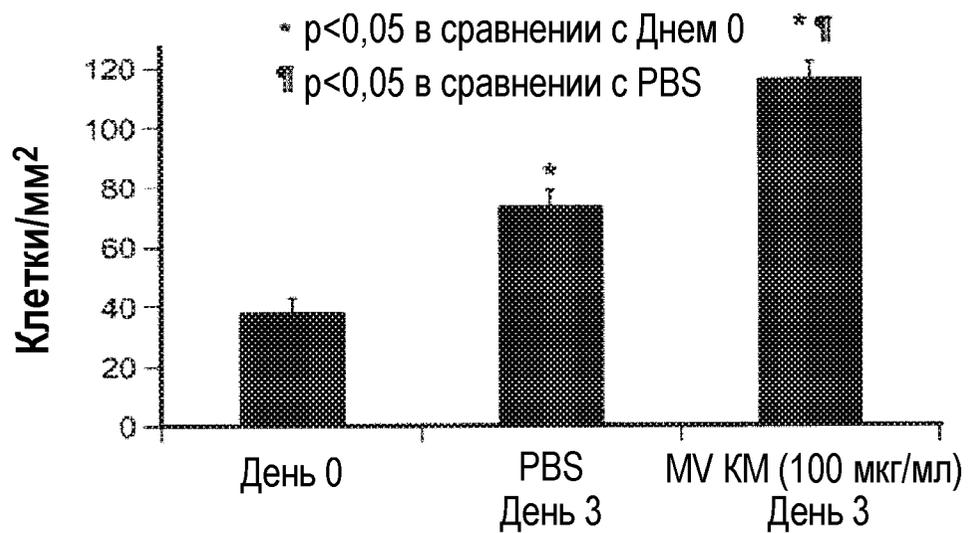
ФИГ.32В

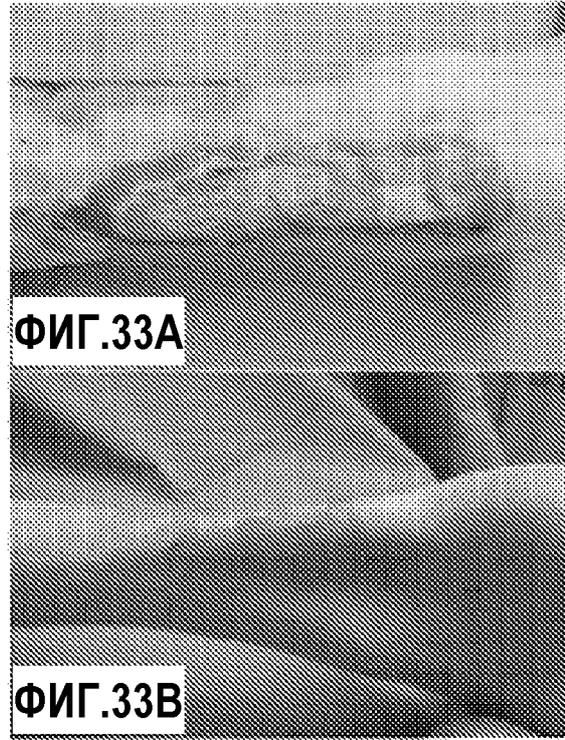


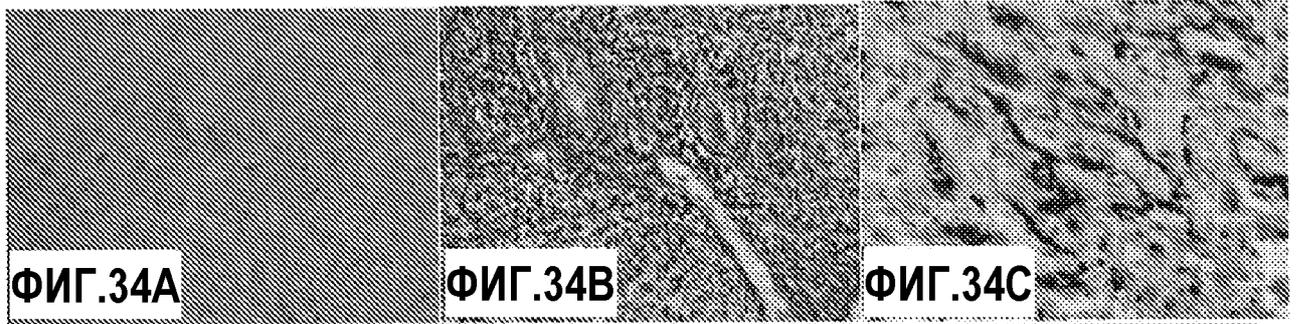
PBS

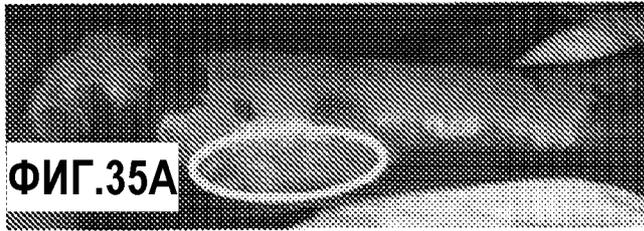
MV из костного мозга

ФИГ.32С

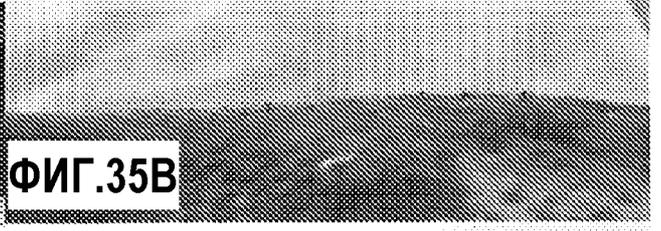




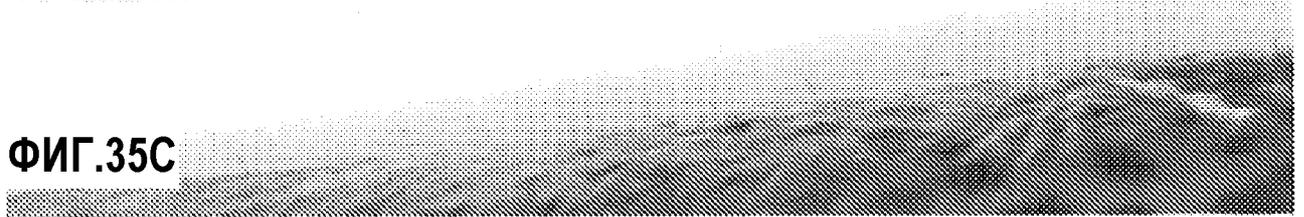




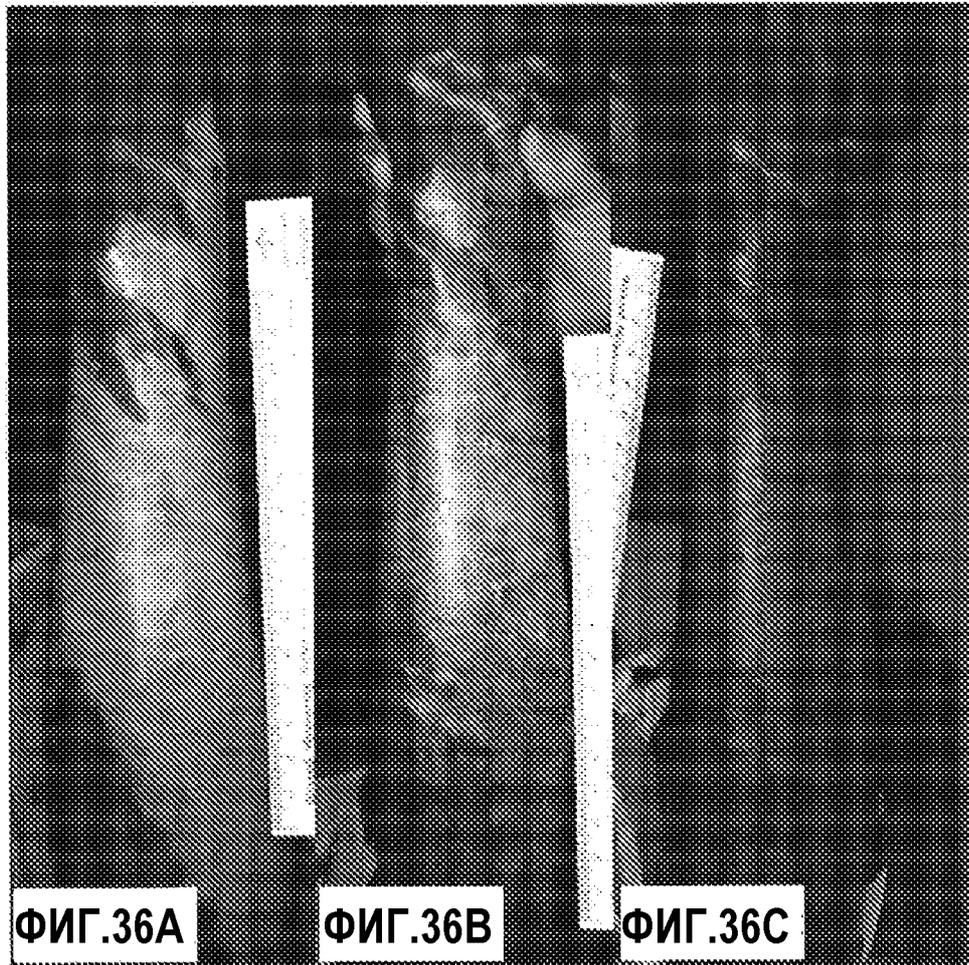
**ФИГ.35А**



**ФИГ.35В**



**ФИГ.35С**



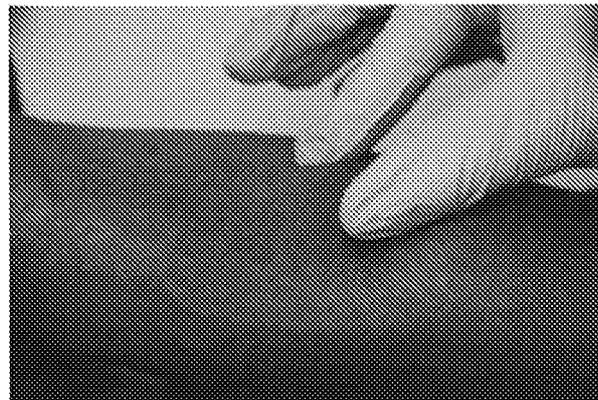
**ФИГ.36А**

**ФИГ.36В**

**ФИГ.36С**



**ФИГ.37А**

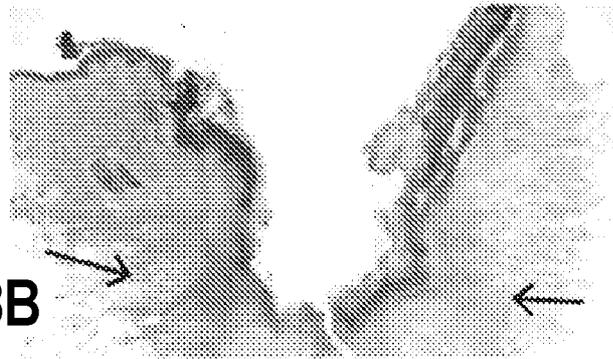


**ФИГ.37В**

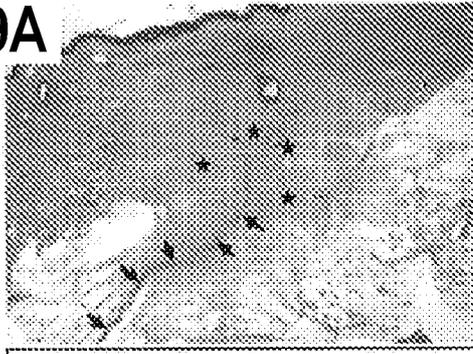
**ФИГ.38А**



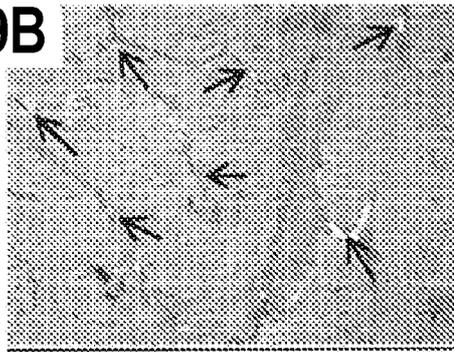
**ФИГ.38В**



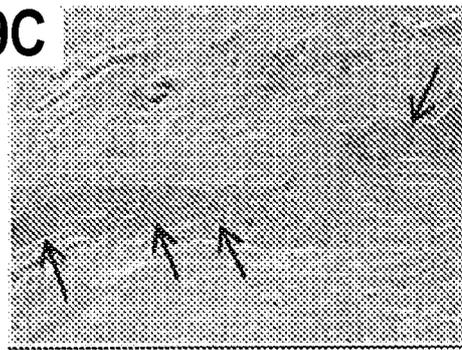
**ФИГ.39А**



**ФИГ.39В**

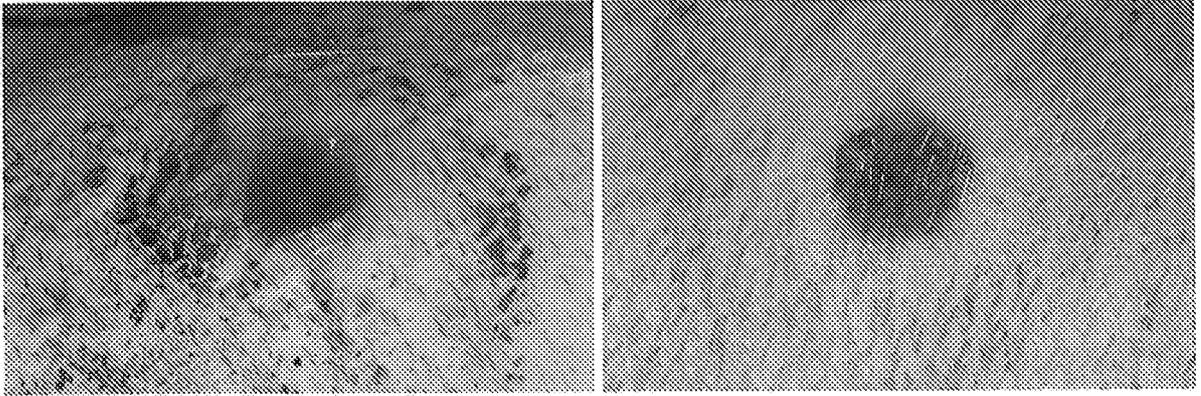


**ФИГ.39С**

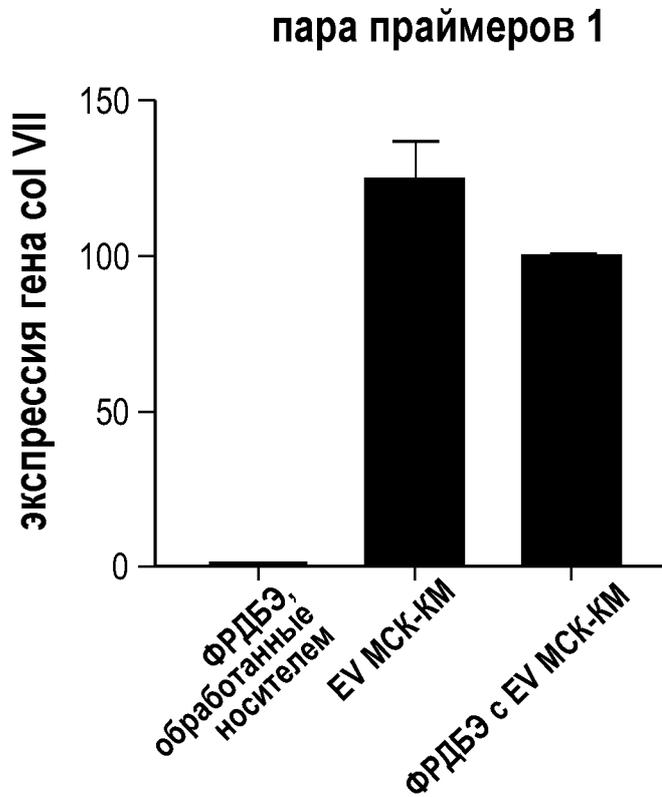


**ФИГ.40А**

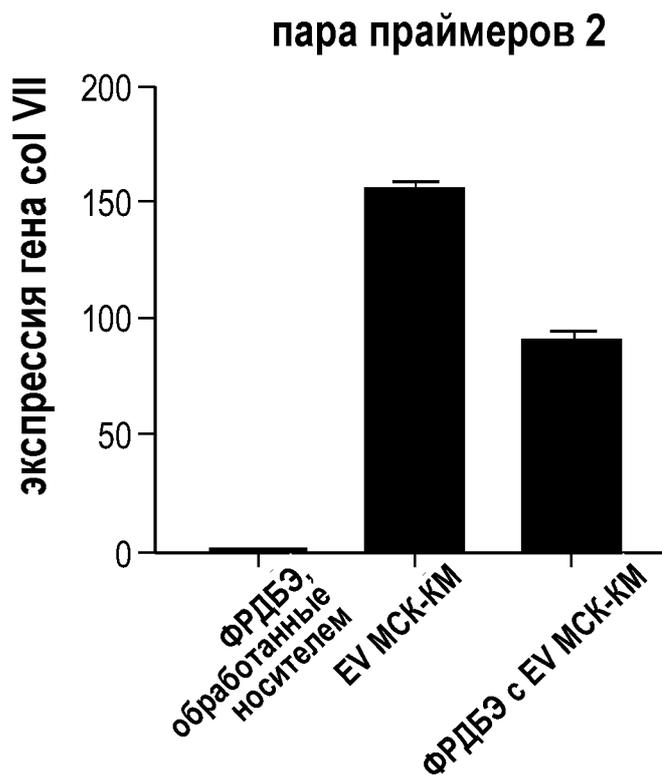
**ФИГ.40В**



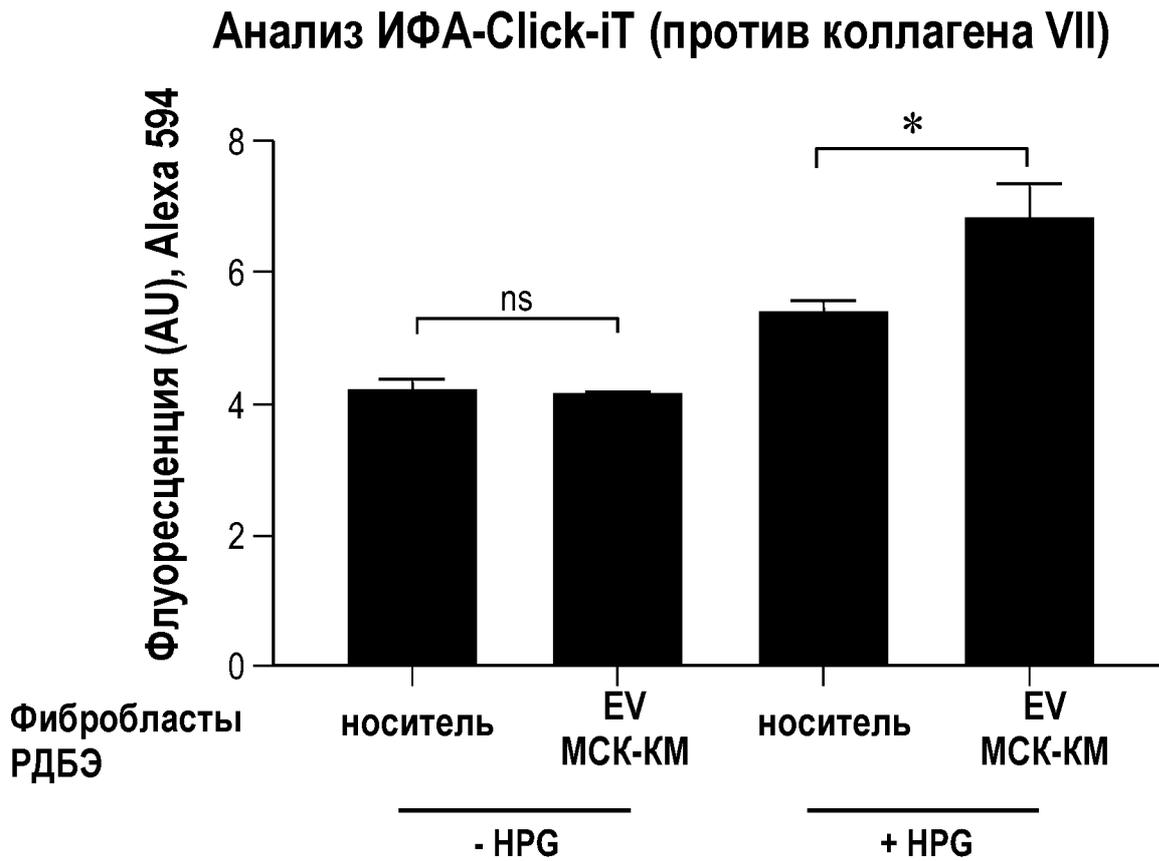
ФИГ.41А



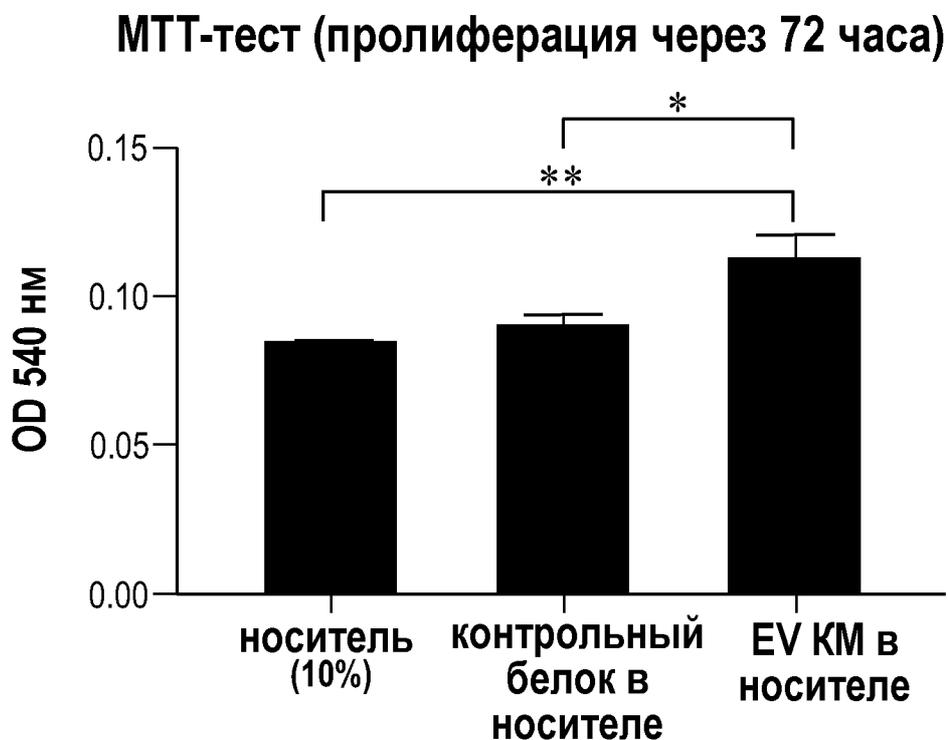
ФИГ.41В



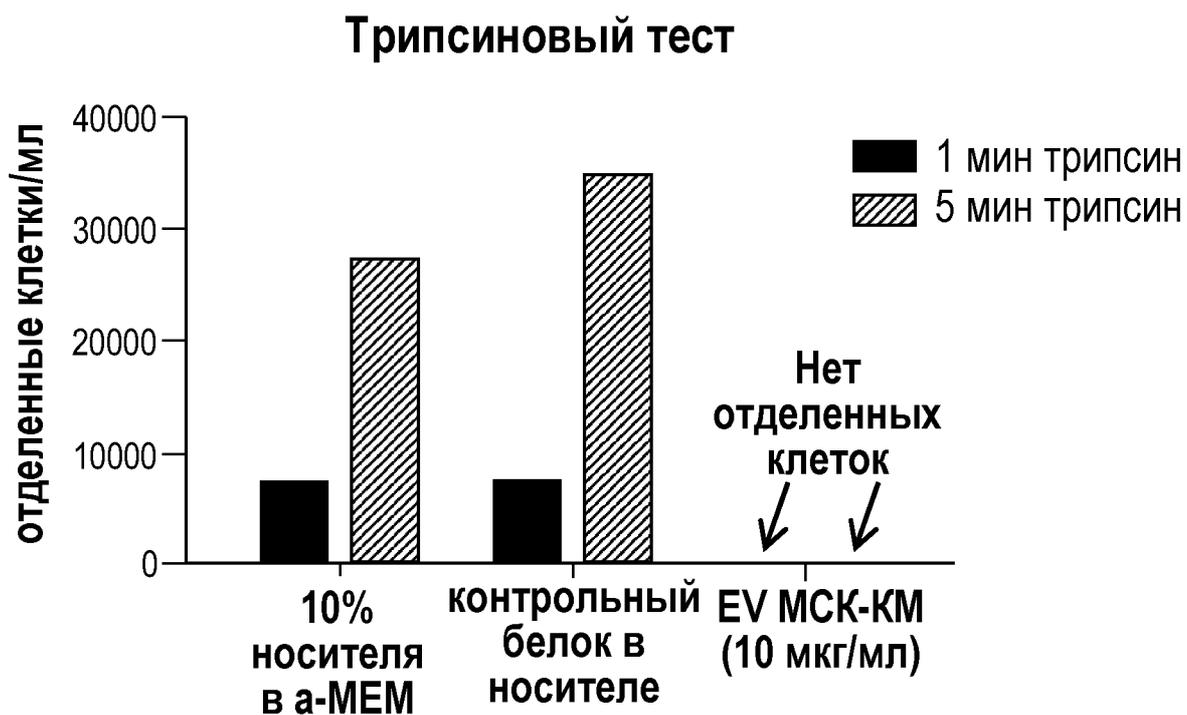
## ФИГ.42



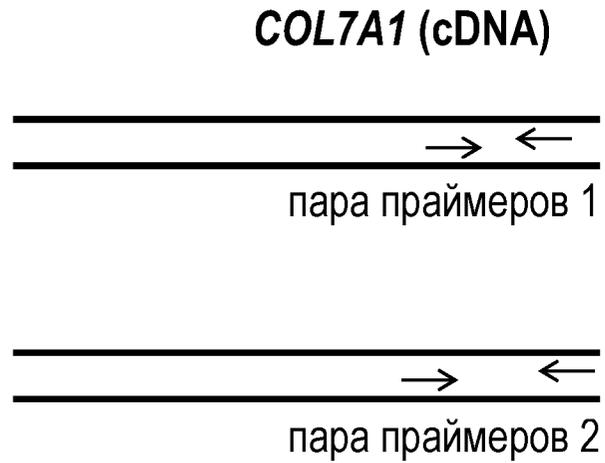
ФИГ.43А



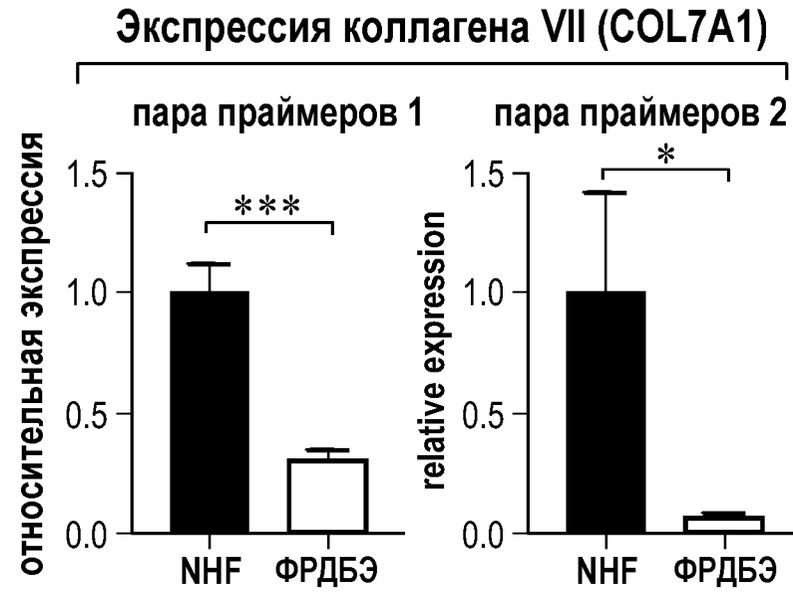
ФИГ.43В



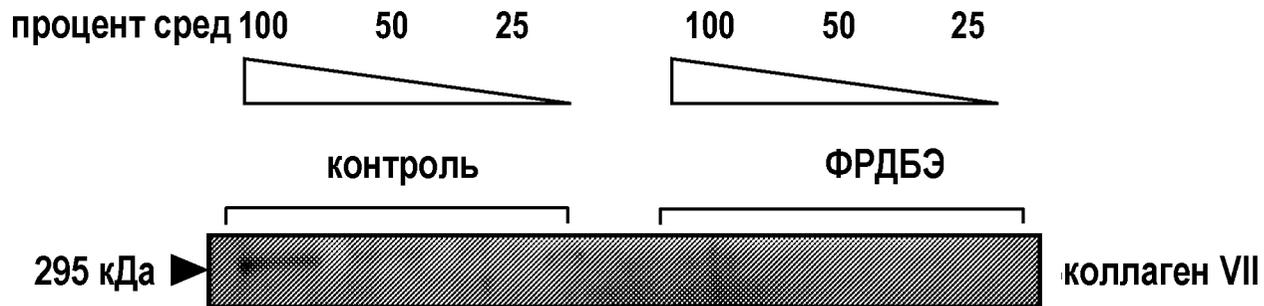
ФИГ.44А



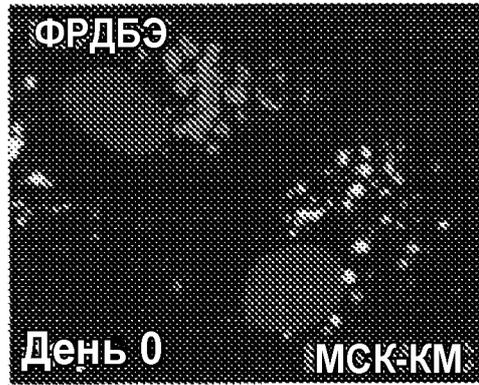
ФИГ.44В



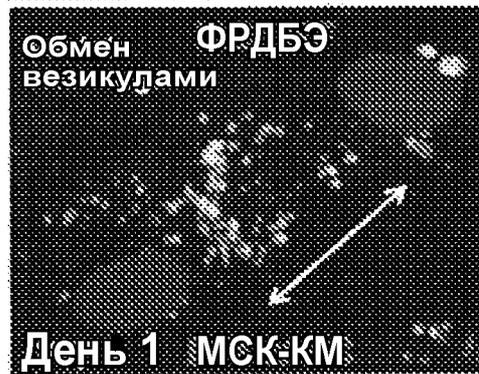
ФИГ.44С



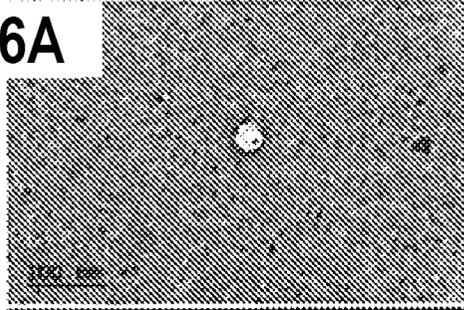
ФИГ.45А



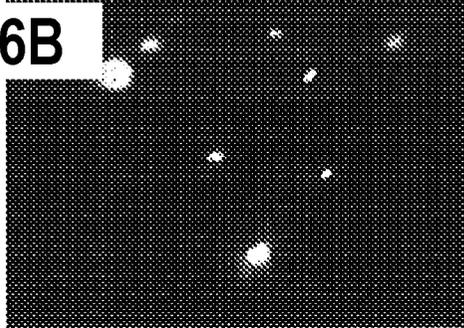
ФИГ.45В



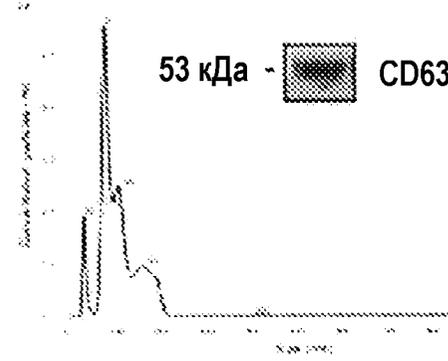
ФИГ.46А



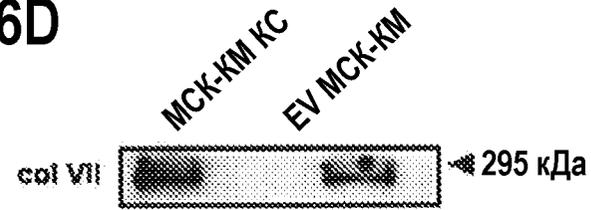
ФИГ.46В



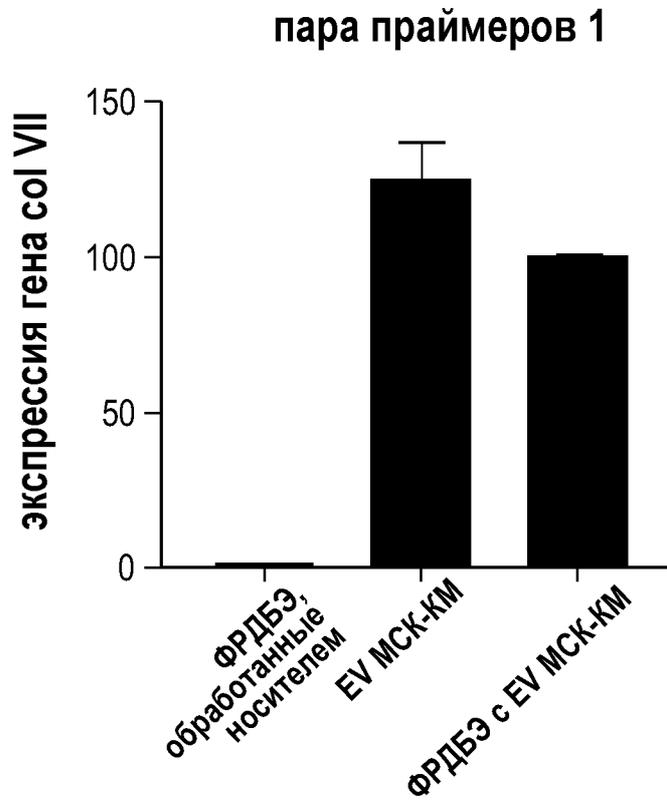
ФИГ.46С



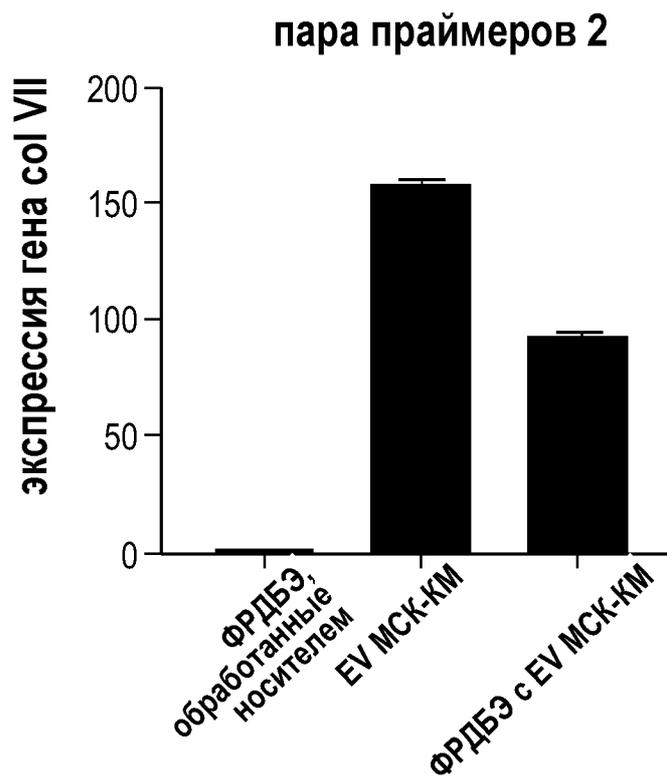
ФИГ.46D



ФИГ.47А



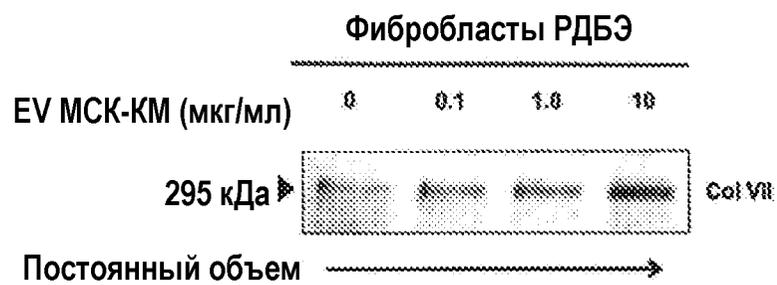
ФИГ.47В



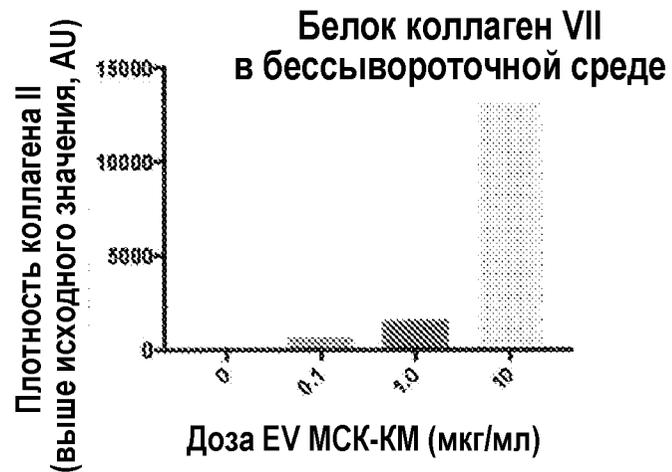
**ФИГ.48А**



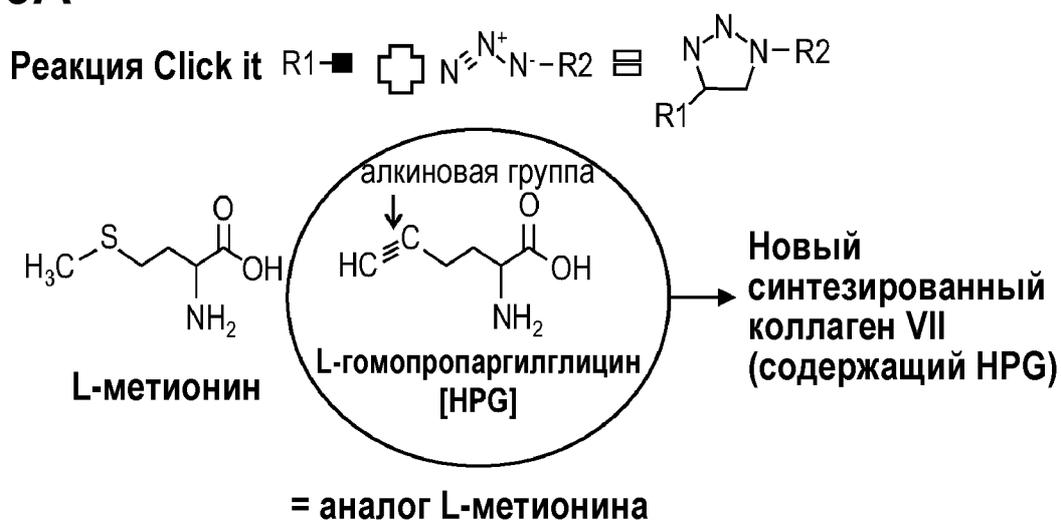
**ФИГ.48В**



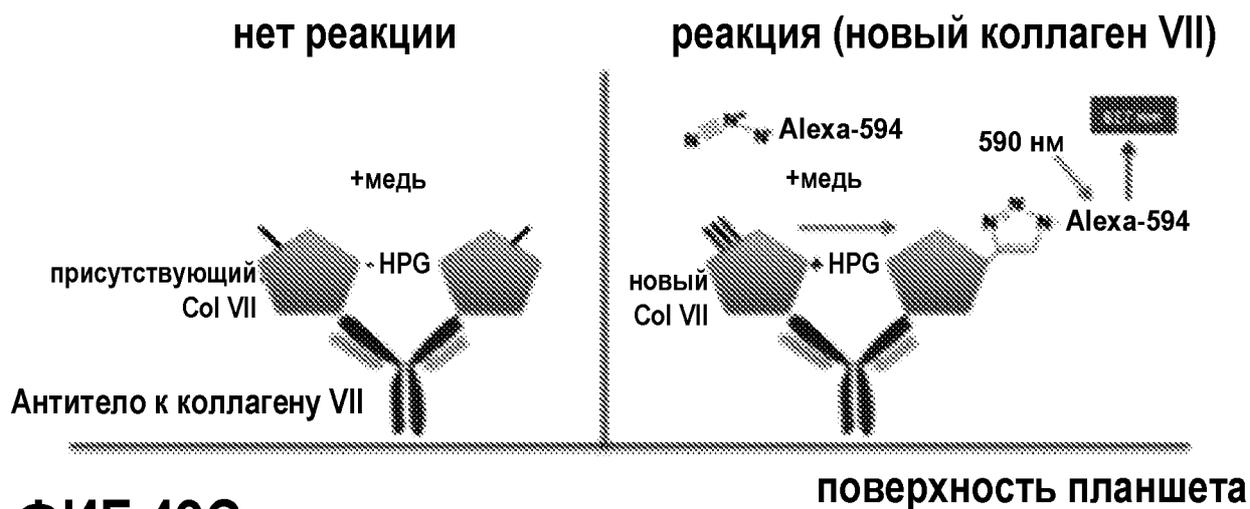
**ФИГ.48С**



## ФИГ.49А

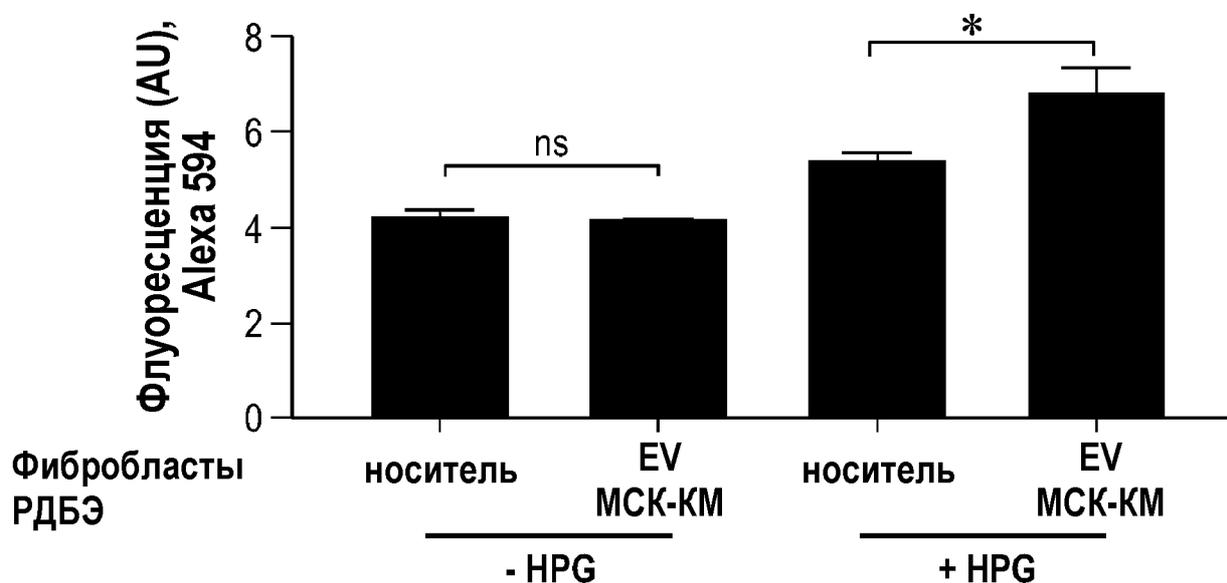


## ФИГ.49В



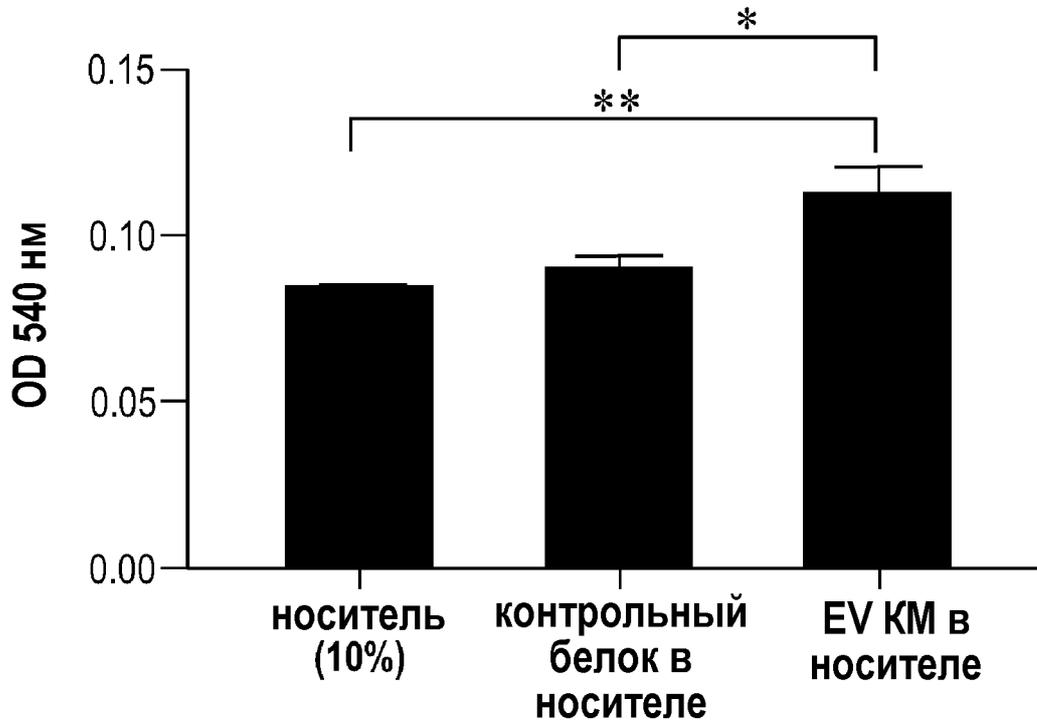
## ФИГ.49С

## Анализ ИФА-Click-IT (против коллагена VII)



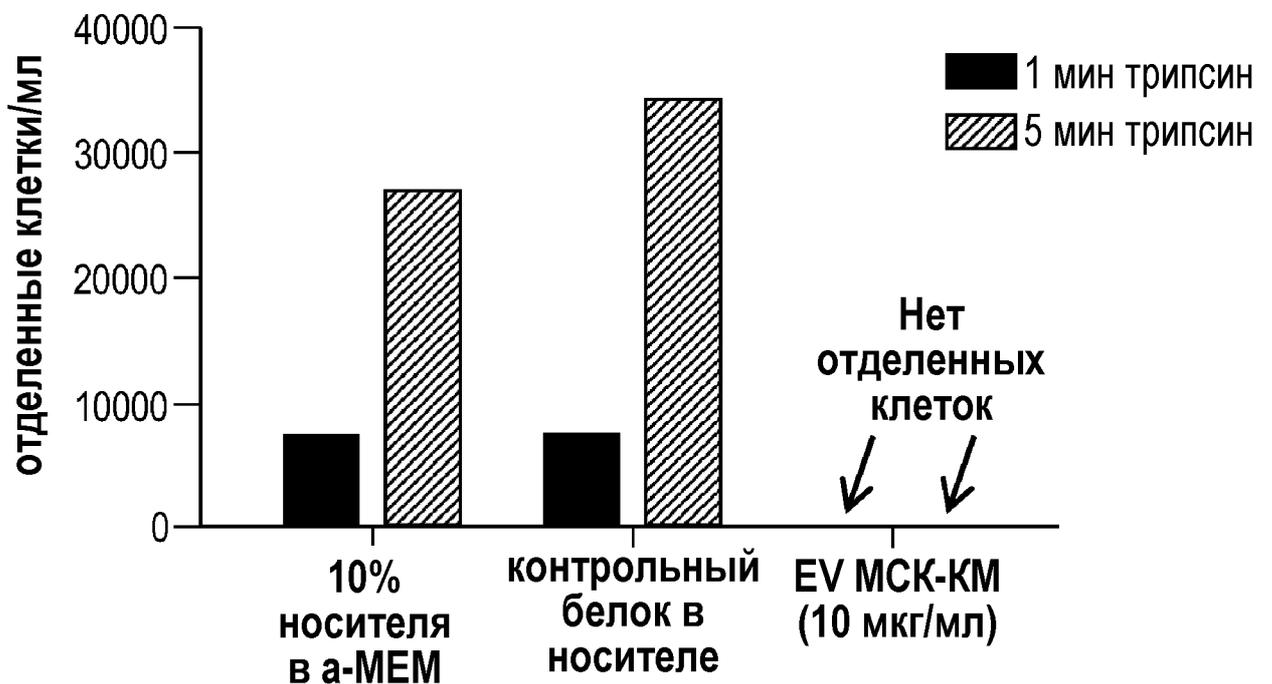
ФИГ.50А

МТТ-тест (пролиферация через 72 часа)



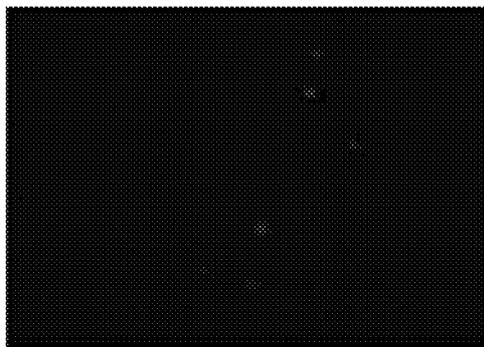
ФИГ.50В

Трипсиновый тест

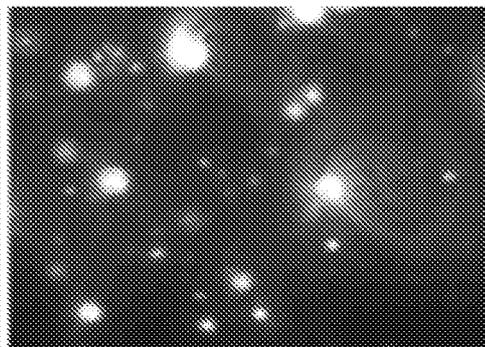


ФИГ.51А

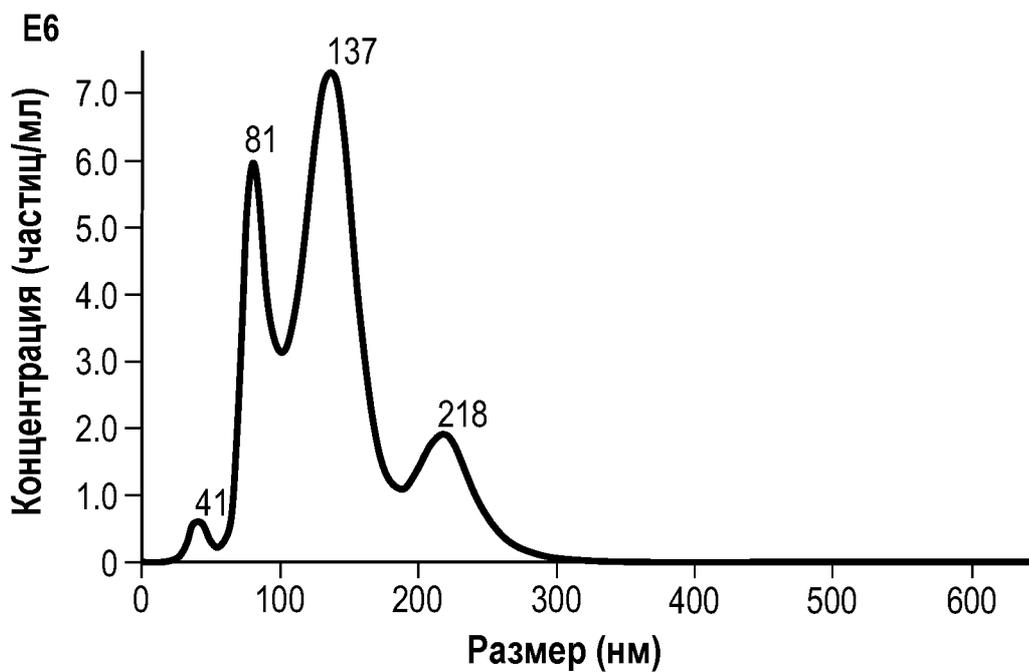
солевой раствор



ФИГ.51В

МСК-КМ солевой раствор  
(клинич. исследование)

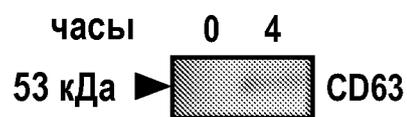
ФИГ.51С



ФИГ.51D



ФИГ.51Е



ФИГ.52

### Стимуляция заживления ран МСК-КМ

