

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091219 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.18

(22) Дата подачи заявки
2018.11.16

(51) Int. Cl. C12N 5/073 (2010.01)
C12M 3/00 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/09 (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)

(54) КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПЛАЦЕНТЫ С ЦЕЛЬЮ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ

(31) 62/587,335

(32) 2017.11.16

(33) US

(86) PCT/US2018/061697

(87) WO 2019/099955 2019.05.23

(71) Заявитель:
СЕЛУЛЭРИТИ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Е Цянь (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложено несколько подходов к получению, выделению и характеристике экзосом, извлеченных из культивированной плаценты или ее части. Альтернативные варианты, описанные в настоящем документе, облегчают получение, выделение и характеристику экзосом, которые могут быть применены в качестве биотехнологических инструментов и терапевтических средств. В настоящем документе также предложены популяции экзосом, полученные из плацентарной органной культуры или культуры частей плаценты. Также предложены композиции, содержащие популяции экзосом, и способы их применения для лечения субъектов.

A1

202091219

202091219

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563111EA/055

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПЛАЦЕНТЫ С ЦЕЛЬЮ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ

[0001] Данная заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США № 62/587 335, поданной 16 ноября 2018 г., полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Предложены способы получения, выделения и характеристики экзосом из культивированной плаценты или ее части. Альтернативные варианты, описанные в настоящем документе, облегчают получение, выделение и характеристику экзосом, которые могут быть применены в качестве биотехнологических инструментов и терапевтических средств.

2. ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Экзосомы - это наноразмерные билипидные мембранные везикулы, выделяемые живыми клетками, которые выполняют важные функции межклеточной коммуникации. Во время беременности человека плацента играет главную роль в регуляции физиологического гомеостаза и обеспечении развития плода. Известно, что внеклеточные везикулы и экзосомы, выделяемые плацентой, способствуют коммуникации между плацентой и материнскими тканями с целью обеспечения толерантности матери к плоду. Экзосомы содержат активные биотехнологические препараты, включая липиды, цитокины, микроРНК, мРНК и ДНК, а также белки, которые могут присутствовать на поверхности экзосом. Считается, что экзосомы используются для многих терапевтических подходов, включая иммунную модуляцию, стимулирование ангиогенеза, а также для доставки лекарственных препаратов. Обнаруживается потребность в большем количестве подходов, которые позволят выделить большие количества экзосом.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Аспекты настоящего изобретения относятся к способам получения, выделения и характеристики экзосом из культивированной плаценты или ее части. Подходы, описанные в настоящем документе, облегчают получение, выделение и характеристику экзосом, которые могут быть использованы в качестве биотехнологических инструментов и терапевтических средств. Предпочтительные альтернативные варианты включают в себя:

[0005] 1. Способ выделения экзосом из плаценты или ее части, включающий в себя:

а) приведение в контакт плаценты или ее части, предпочтительно культивированной плаценты или ее части, с первой средой; и

б) получение первой фракции, содержащей популяцию экзосом, из указанной плаценты или ее части;

с) необязательно, приведение в контакт указанной плаценты или ее части со второй средой и получение второй фракции, содержащей популяцию экзосом, из указанной плаценты или ее части;

d) необязательно, приведение в контакт указанной плаценты или ее части с третьей средой и получение третьей фракции, содержащей популяцию экзосом, из указанной плаценты или ее части; и

е) необязательно, выделение популяции экзосом из указанных первой, второй и/или третьей фракций, предпочтительно путем последовательного центрифугирования и/или аффинной хроматографии, используя антитела или их связывающую часть, специфические для маркера или пептида, присутствующего на желаемой популяции экзосом, причем указанные антитела или их связывающая часть иммобилизованы на субстрате, таком как мембрана, смола, гранула или сосуд.

[0006] 2. Способ по альтернативному варианту 1, в котором плацента или ее часть дополнительно содержит амниотическую мембрану.

[0007] 3. Способ по альтернативному варианту 2, в котором плацента или ее часть представляет собой плаценту человека или ее часть.

[0008] 4. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором первая, вторая и/или третья среды находятся в контакте с плацентой или ее частью в течение по меньшей мере 45 минут, например, 45 минут, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов, или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней, или в течение любого периода времени, который находится в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеупомянутых временных точек.

[0009] 5. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором первая, вторая и/или третья среды находятся в контакте с плацентой или ее частью в течение по меньшей мере 7, 14, 28, 35 или 42 дней или в течение любого периода времени, который находится в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеупомянутых временных точек.

[0010] 6. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором плацента или ее часть является измельченной, гомогенизированной или обработанной ферментами.

[0011] 7. Способ по любому из альтернативных вариантов 1-5, в котором указанная плацента или ее часть является по существу плоской или листообразной и была подвергнута децеллюляризации и по существу высушена, и причем способ дополнительно включает в себя приведение в контакт жидкости, содержащей экзогенные клетки, с децеллюляризованной плацентой или ее частью так, чтобы засеять децеллюляризованную плаценту или ее часть указанными экзогенными клетками, и причем приведение в контакт клеток с децеллюляризованной плацентой или ее частью выполнялось перед приведением в контакт децеллюляризованной плаценты или ее части с первой средой.

[0012] 8. Способ по альтернативному варианту 7, в котором указанные экзогенные клетки получают у субъекта, отличного от донора указанной плаценты или ее части.

[0013] 9. Способ по альтернативному варианту 7 или 8, в котором жидкость представляет собой асцитную жидкость, кровь или плазму.

[0014] 10. Способ по альтернативному варианту 7 или 8, в котором клетки происходят из органа.

[0015] 11. Способ по альтернативному варианту 10, в котором клетки происходят из печени, почки, легкого или поджелудочной железы.

[0016] 12. Способ по альтернативному варианту 7 или 8, в котором клетки представляют собой иммунные клетки.

[0017] 13. Способ по альтернативному варианту 12, в котором клетки представляют собой Т-клетки или В-клетки.

[0018] 14. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором первая среда содержит фосфатно-солевой буфер (ФСБ).

[0019] 15. Способ по альтернативному варианту 9, в котором первая, вторая или третья фракция содержит экзосомы из асцитной жидкости, крови или плазмы.

[0020] 16. Способ по альтернативному варианту 10, в котором первая, вторая или третья фракция содержит экзосомы из клетки органа.

[0021] 17. Способ по альтернативному варианту 11, в котором клетка происходит из печени, почки, легкого или поджелудочной железы.

[0022] 18. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором вторая среда содержит факторы роста.

[0023] 19. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором третья среда содержит хелатор.

[0024] 20. Способ по альтернативному варианту 19, в котором хелатор представляет собой фосфонат, тетранатриевую соль ВАРТА, ВАРТА/АМ, тетранатриевую соль реагента Di-Notrophen ТМ, EGТА/АМ, пиридоксаль изоникотиноилгидразин, N, N,N',N'-тетракис-(2 пиридилметил)этилендиамин, 6-бром-N'-(2-гидроксibenзилиден)-2-метилхиолин-4-карбогидразид, тетракис(ацетоксиметилловый эфир) 1,2-бис(2-аминофеноксi)этан-N, N,N',N'-тетрауксусной кислоты, (этилендиамин)тетрауксусную кислоту (EDТА), эдатамил, этилендиаминтетрауксусную кислоту, этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N, N,N',N'-тетрауксусную кислоту или тетранатриевую соль этиленгликоль-бис(β-аминоэтилэфир)-N, N,N',N'-тетрауксусной кислоты (EGТА) или любую их комбинацию.

[0025] 21. Способ по любому из альтернативных вариантов 19 или 20, в котором хелатор представляет собой EDТА или EGТА или их комбинацию.

[0026] 22. Способ по любому из альтернативных вариантов 19-21, в котором хелатор представлен в третьей среде в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации.

[0027] 23. Способ по любому из альтернативных вариантов 19-22, в котором EDТА в третьей среде представлена в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100

мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации.

[0028] 24. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором третья среда содержит протеазу.

[0029] 25. Способ по альтернативному варианту 24, в котором протеаза представляет собой трипсин, коллагеназу, химотрипсин или карбоксипептидазу или любую их комбинацию.

[0030] 26. Способ по альтернативному варианту 25 или 25, в котором протеаза представляет собой трипсин.

[0031] 27. Способ по альтернативному варианту 24, в котором протеаза представлена в третьей среде в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации.

[0032] 28. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором способ дополнительно включает в себя приведение в контакт плаценты или ее части с дополнительным множеством сред, причем приведение в контакт приводит к получению множества фракций, содержащих экзосомы.

[0033] 29. Способ по альтернативному варианту 28, в котором первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат глюкозу.

[0034] 30. Способ по альтернативному варианту 28 или 29, в котором первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат GM-CSF.

[0035] 31. Способ по любому из альтернативных вариантов 28-30, в котором первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат сыворотку.

[0036] 32. Способ по любому из альтернативных вариантов 28-31, в котором первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат DMEM.

[0037] 33. Способ по любому из альтернативных вариантов 28-32, в котором первая, вторая, третья или дополнительная среда содержит антагонист AHR.

[0038] 34. Способ по альтернативному варианту 33, в котором антагонист AHR представляет собой SR1.

[0039] 35. Способ по альтернативному варианту 34, в котором SR1 присутствует в концентрации 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 200 нМ, 300 нМ, 400 нМ, 500 нМ, 600 нМ, 700 нМ, 800 нМ, 900 нМ или 1 мМ или в любой другой концентрации в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями.

[0040] 36. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором первая среда находится в контакте с плацентой или ее частью, поддерживая температуру на уровне 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C или 40 °C или температуры, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями температуры.

[0041] 37. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в

котором вторая среда находится в контакте с плацентой или ее частью, поддерживая температуру на уровне 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C или 40 °C или температуры, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями температуры.

[0042] 38. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором третья среда находится в контакте с плацентой или ее частью, поддерживая температуру на уровне 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C или 40 °C или температуры, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями температуры.

[0043] 39. Способ по любому из альтернативных вариантов 28-38, в котором дополнительное множество сред находится в контакте с плацентой или ее частью, поддерживая температуру на уровне 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C или 40 °C или температуры, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями.

[0044] 40. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором первая, вторая, третья перфузия или дополнительное множество сред содержат антибиотики.

[0045] 41. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором экзосомы выделяют из указанных первой, второй и/или третьей фракций или множества фракций способом, включающим в себя:

(а) прохождение первой, второй и/или третьей фракций или множества фракций через тканевый фильтр;

(b) выполнение первого центрифугирования фильтрата, собранного на этапе (а), с получением клеточного осадка и первого супернатанта;

(с) выполнение второго центрифугирования первого супернатанта с получением второго супернатанта; и

(d) выполнение третьего центрифугирования второго супернатанта с получением осадка экзосом; и необязательно

(е) ресуспендирование экзосом в растворе.

[0046] 42. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором экзосомы содержат CD63, CD63-A, перфорин, Fas, TRAIL или гранзим В или любую их комбинацию.

[0047] 43. Способ по альтернативному варианту 42, в котором экзосомы содержат CD63A.

[0048] 44. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором экзосомы содержат сигнальную молекулу.

[0049] 45. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, в котором экзосомы содержат цитокины, мРНК или микроРНК.

[0050] 46. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, дополнительно включающий в себя выделение экзосом путем аффинной хроматографии,

причем аффинная хроматография является селективной в отношении удаления экзосом, содержащих вирусные антигены, вирусные белки, бактериальные антигены, бактериальные белки, антигены грибов или белки грибов.

[0051] 47. Способ по любому из вышеупомянутых альтернативных вариантов, дополнительно включающий в себя выделение экзосом с помощью одного или более дополнительных этапов аффинной хроматографии, причем один или более дополнительных этапов хроматографии являются селективными в отношении удаления экзосом, содержащих воспалительных маркер и/или опухолевый маркер.

[0052] Также предложена композиция, содержащая экзосомы, полученные из плаценты человека, причем указанные экзосомы являются положительными на CD1c, CD20, CD24, CD25, CD29, CD2, CD3, CD8, CD9, CD11c, CD14, CD19, CD31, CD40, CD41b, CD42a, CD44, CD45, CD49e, CD4, CD56, CD62P, CD63, CD69, CD81, CD86, CD105, CD133-1, CD142, CD146, CD209, CD326, HLA-ABC, HLA-DRDPDQ, MCSP, ROR1, SSEA-4 или их комбинации.

[0053] Экзосомы, описанные в настоящем документе, содержат определенные маркеры. Такие маркеры, например, могут использоваться для идентификации экзосом и для проведения различия между ними и другими экзосомами, *например*, экзосомами, полученными не из плаценты. В определенных вариантах осуществления такие экзосомы являются положительными на один или более маркеров, *например*, как можно определить с помощью проточной цитометрии, например, с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Кроме того, экзосомы, предложенные в настоящем документе, можно идентифицировать на основании отсутствия определенных маркеров. Определение присутствия или отсутствия таких маркеров можно выполнить с помощью способов, известных в данной области техники, *например*, с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

[0054] В некоторых вариантах осуществления экзосомы являются положительными на CD1c, CD20, CD24, CD25, CD29, CD2, CD3, CD8, CD9, CD11c, CD14, CD19, CD31, CD40, CD41b, CD42a, CD44, CD45, CD49e, CD4, CD56, CD62P, CD63, CD69, CD81, CD86, CD105, CD133-1, CD142, CD146, CD209, CD326, HLA-ABC, HLA-DRDPDQ, MCSP, ROR1 и SSEA-4. В некоторых вариантах осуществления экзосомы являются положительными на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD1c, CD20, CD24, CD25, CD29, CD2, CD3, CD8, CD9, CD11c, CD14, CD19, CD31, CD40, CD41b, CD42a, CD44, CD45, CD49e, CD4, CD56, CD62P, CD63, CD69, CD81, CD86, CD105, CD133-1, CD142, CD146, CD209, CD326, HLA-ABC, HLA-DRDPDQ, MCSP, ROR1 и SSEA-4.

[0055] В некоторых вариантах осуществления экзосомы представляют собой CD3-, CD11b-, CD14-, CD19-, CD33-, CD192-, HLA-A-, HLA-B-, HLA-C-, HLA-DR-, CD11c- или CD34-. В некоторых вариантах осуществления экзосомы представляют собой CD3-, CD11b-, CD14-, CD19-, CD33-, CD192-, HLA-A-, HLA-B-, HLA-C-, HLA-DR-, CD11c- и CD34-.

[0056] В некоторых вариантах осуществления экзосомы содержат молекулы некодирующей РНК.

В некоторых вариантах осуществления молекулы РНК представляют собой микроРНК. В некоторых вариантах осуществления микроРНК выбраны из группы, состоящей из микроРНК из таблицы 7 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления микроРНК выбраны из группы, состоящей из hsa-mir-26b, hsa-miR-26b-5p, hsa-mir-26a-2, hsa-mir-26a-1, hsa-miR-26a-5p, hsa-mir-30d, hsa-miR-30d-5p, hsa-mir-100, hsa-miR-100-5p, hsa-mir-21, hsa-miR-21-5p, hsa-mir-22, hsa-miR-22-3p, hsa-mir-99b, hsa-miR-99b-5p, hsa-mir-181a-2, hsa-mir-181a-1, hsa-miR-181a-5p и их комбинаций.

[0057] В некоторых вариантах осуществления экзосомы содержат цитокин, выбранный из группы, состоящей из цитокинов из таблицы 3 и их комбинаций.

[0058] В некоторых вариантах осуществления экзосомы содержат рецептор цитокинов, выбранный из группы, состоящей из рецепторов цитокинов из таблицы 4 и их комбинаций.

[0059] В некоторых вариантах осуществления экзосомы содержат белок, выбранный из группы, состоящей из белков из таблицы 6 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления экзосомы содержат белок, выбранный из группы, состоящей из цитоплазматической аконитатгидратазы, гликопротеина клеточной поверхности MUC18, белка аргинин N-метилтрансферазы 1, гуаниннуклеотид-связывающего белка G субъединицы альфа, куллина-5, кальций-связывающего белка 39, глюкозидазы 2 субъединицы бета, белка внутриклеточного хлоридного канала 5, семафорина-3В, 60S рибосомального белка L22, сплайсингосомной РНК-геликазы DDX39В, транскрипционного активаторного белка Puf-alpha, белка запрограммированной гибели клетки 10, белка BROX, содержащего домен BRO1, кинуренин-оксоглутарат трансминазы 3, ламинин субъединицы альфа-5, представителя 1 подсемейства Е АТФ-связывающей кассеты, синтаксин-связывающего белка 3, протеасомы субъединицы бета типа-7 и их комбинаций.

[0060] В некоторых вариантах осуществления экзосомы содержат по меньшей мере одну маркерную молекулу на уровне по меньшей мере в два раза выше, чем экзосомы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток, пуповинной крови или плацентарного перфузата. В некоторых вариантах осуществления экзосомы содержат по меньшей мере одну маркерную молекулу на уровне по меньшей мере в два раза выше, чем экзосомы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток, пуповинной крови и плацентарного перфузата.

[0061] В некоторых вариантах осуществления экзосомы выделяют из сред культуры цельной плаценты. В некоторых вариантах осуществления экзосомы выделяют из сред цельной культуры, содержащей доли плаценты или части плаценты.

[0062] В некоторых вариантах осуществления экзосомы получают с помощью способов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления композиция предоставляется в форме, пригодной для внутривенного введения. В

некоторых вариантах осуществления композиция предоставляется в форме, пригодной для локальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композиция предоставляется в форме, пригодной для местного введения. В некоторых вариантах осуществления композиция предоставляется в форме, пригодной для ультразвуковой доставки.

[0063] Также предложены способы повышения пролиферации иммунной клетки, включающие в себя приведение клетки в контакт с композицией по любому из пп. 48-65.

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой NK-клетку.

В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой CD34⁺ клетку.

[0064] Также предложены способы ингибирования пролиферации раковой клетки, включающие в себя приведение клетки в контакт с композицией по настоящему изобретению.

[0065] Также предложены способы ангиогенеза или васкуляризации у указанного субъекта, включающие в себя введение субъекту композиции по настоящему изобретению.

[0066] Также предложены способы модуляции иммунной системы указанного субъекта, включающие в себя введение субъекту композиции по настоящему изобретению.

[0067] Также предложены способы восстановления пораженной или поврежденной ткани у субъекта, включающие в себя введение субъекту композиции по настоящему изобретению.

[0068] Также предложены способы лечения рака у субъекта, включающие в себя введение субъекту композиции по настоящему изобретению.

[0069] В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных способов субъектом является человек.

[0070] Также в настоящем документе предложены композиции, содержащие экзосомы. Такие композиции, как правило, не содержат плацентарные клетки, из которых были получены экзосомы. Более того, такие композиции, как правило, не содержат супернатанты культуры клеток, из которых были получены экзосомы.

[0071] В определенных вариантах осуществления очищенные экзосомы составлены в виде фармацевтических композиций, пригодных для введения субъекту, нуждающемуся в этом. В определенных вариантах осуществления указанный субъект является человеком. Фармацевтические композиции, содержащие полученные из плаценты экзосомы и представленные в настоящем документе, могут быть составлены для введения локально, системно подкожно, парентерально, внутривенно, внутримышечно, местно, перорально, внутрикожно, трансдермально или интраназально субъекту, нуждающемуся в этом. В

определенном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие полученные из плаценты экзосомы и представленные в настоящем документе, составлены для локального введения. В определенном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие полученные из плаценты экзосомы и представленные в настоящем документе, составлены для системного подкожного введения. В определенном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие полученные из плаценты экзосомы и представленные в настоящем документе, составлены для парентерального введения. В определенном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие полученные из плаценты экзосомы и представленные в настоящем документе, составлены для внутримышечного введения. В определенном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие полученные из плаценты экзосомы и представленные в настоящем документе, составлены для местного введения. В определенном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие полученные из плаценты экзосомы и представленные в настоящем документе, составлены для перорального введения. В определенном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие полученные из плаценты экзосомы и представленные в настоящем документе, составлены для внутрикожного введения. В определенном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие полученные из плаценты экзосомы и представленные в настоящем документе, составлены для трансдермального введения. В определенном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие полученные из плаценты экзосомы и представленные в настоящем документе, составлены для интраназального введения. В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие полученные из плаценты экзосомы и представленные в настоящем документе, составлены для внутривенного введения.

[0072] В другом аспекте в настоящем документе предложены применения экзосом и/или фармацевтических композиций, содержащих экзосомы, описанные в настоящем документе.

[0073] В конкретном варианте осуществления экзосомы и/или фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, используются для лечения и/или профилактики заболеваний и/или состояний у субъекта, нуждающегося в этом. В конкретном варианте осуществления экзосомы и/или фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, используются для стимулирования ангиогенеза и/или васкуляризации у субъекта, нуждающегося в этом. В другом конкретном варианте осуществления экзосомы и/или фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, используются для модуляции иммунной активности (*например*, повышение иммунного ответа или снижение иммунного ответа) у субъекта, нуждающегося в этом. В другом конкретном варианте осуществления экзосомы и/или фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, используются для восстановления повреждения ткани,

например, повреждения ткани, вызванного острой или хронической травмой, у субъекта, нуждающегося в этом.

[0074] В другом конкретном варианте осуществления полученные экзосомы и/или фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, используются в способе лечения и/или профилактики заболеваний и/или состояний у субъекта, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, используются в способе лечения заболеваний и/или состояний у субъекта, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, используются в способе профилактики заболеваний и/или состояний у субъекта, нуждающегося в этом. В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, используются в способе стимулирования ангиогенеза и/или васкуляризации у субъекта, нуждающегося в этом. В другом конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, используются в способе модуляции иммунной активности (*например*, повышение иммунного ответа или снижение иммунного ответа) у субъекта, нуждающегося в этом. В другом конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, используются в способе восстановления повреждения ткани, *например*, повреждения ткани, вызванного острой или хронической травмой, у субъекта, нуждающегося в этом.

[0075] В другом конкретном варианте осуществления экзосомы и/или фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, используются в качестве цитопротекторов. В другом аспекте экзосомы и/или фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, описанные в настоящем документе, представлены в форме набора, пригодного для фармацевтического применения.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0076] На ФИГ. 1 показана схема культивирования клеток для выделения экзосом.

[0077] На ФИГ. 2А - ФИГ. 2С показаны три изолята рЕх, которые были проанализированы на их распределение по размеру с помощью NanoSight. Эта работа была выполнена и зарегистрирована компанией SBI Inc. (System Bioscience Inc.) посредством подрядной услуги (www.systembio.com/services/exosome-services/).

[0078] На ФИГ. 3А - ФИГ. 3С показаны белковые маркеры, присутствующие на рЕх (N=12) (ФИГ. 3А), по сравнению с экзосомами плацентарного перфузата (ФИГ. 3В) и экзосомами, полученными из сыворотки пуповинной крови (ФИГ. 3С), используя набор MACSPlex.

[0079] На ФИГ. 4 показаны функциональные пути белков, идентифицированных в популяциях плацентарных экзосом.

[0080] **На ФИГ. 5** показан общий и уникальный белок, идентифицированный в трех образцах плацентарных экзосом.

[0081] **На ФИГ. 6** показано, что рЕхо способствуют миграции фибробластов кожи человека в системе transwell.

[0082] **На ФИГ. 7** показано, что рЕхо способствуют миграции эндотелиальных клеток вены пуповины человека.

[0083] **На ФИГ. 8** показано, что рЕхо стимулируют пролиферацию HUVEC.

[0084] **На ФИГ. 9** показано, что рЕхо стимулируют пролиферацию CD34+ клеток человека.

[0085] **На ФИГ. 10** показано, что рЕхо стимулируют образование колоний CD34+ клеток человека.

[0086] **На ФИГ. 11** показано, что рЕхо ингибируют пролиферацию раковых клеток SKOV3.

[0087] **На ФИГ. 12** показано, что рЕхо ингибируют пролиферацию раковых клеток A549.

[0088] **На ФИГ. 13** показано, что рЕхо ингибируют пролиферацию раковых клеток MDA321.

[0089] **На ФИГ. 14** показано, что рЕхо не влияют на пролиферацию CD3+ Т-клеток в культуре.

[0090] **На ФИГ. 15** показано, что рЕхо повышают экспрессию активационного маркера CD69 в CD3+ Т-клетках UBC.

[0091] **На ФИГ. 16** показано, что рЕхо повышают экспрессию активационного маркера CD69 во взрослых CD3+ Т-клетках МКПК.

[0092] **На ФИГ. 17** показано, что рЕхо увеличивают количество CD56+ NK-клеток в МКПК.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5.1. Полученные из плаценты экзосомы

[0093] Полученные из плаценты экзосомы, описанные в настоящем документе, могут быть выбраны и идентифицированы по их морфологии и/или молекулярным маркерам, как описано ниже. Полученные из плаценты экзосомы, описанные в настоящем документе, отличаются от экзосом, известных в данной области техники, *например*, экзосом, полученных из мезенхимальных стволовых клеток из ворсин хориона, *например*, описанных у Salomon et al., 2013, PLOS ONE, 8:7, e68451. Соответственно, термин «полученные из плаценты экзосомы», как используется в настоящем документе, не предназначен для включения экзосом, полученных из мезенхимальных стволовых клеток из ворсин хориона.

[0094] В некоторых вариантах осуществления популяции полученных из плаценты экзосом, описанных в настоящем документе, не содержат клетки, *например*, ядросодержащие клетки, например, плацентарные клетки.

5.1.1. Маркеры полученных из плаценты экзосом

[0095] Полученные из плаценты экзосомы, описанные в настоящем документе, содержат маркеры, которые могут быть использованы для идентификации и/или выделения указанных экзосом. Эти маркеры могут, например, представлять собой белки, нуклеиновые кислоты, молекулы сахаридов, гликозилированные белки, молекулы липидов и могут существовать в мономерной, олигомерной и/или мультимерной формах. В определенных вариантах осуществления маркеры вырабатывает клетка, из которой получают экзосомы. В определенных вариантах осуществления маркер обеспечивается клеткой, из которой получают экзосомы, однако маркер не экспрессируется указанной клеткой на более высоком уровне. В конкретном варианте осуществления маркеры экзосом, описанных в настоящем документе, выше по уровню в экзосомах по сравнению с клеткой-предшественницей, если сравнивать с контрольной маркерной молекулой. В другом конкретном варианте осуществления маркеры экзосом, описанных в настоящем документе, являются обогащенными в указанных экзосомах по сравнению с экзосомами, полученными из клеток другого типа (*например*, мезенхимальных стволовых клеток из ворсин хориона, описанных у Salomon et al., 2013, PLOS ONE, 8:7, e68451, и преадипоцитных мезенхимальных стволовых клеток), причем экзосомы выделяют идентичными способами.

[0096] Трехмерная структура экзосом позволяет удерживать маркеры на поверхности экзосомы и/или внутри экзосомы. Аналогичным образом, маркерные молекулы могут существовать частично внутри экзосомы, частично на внешней поверхности экзосомы и/или вдоль фосфолипидного бислоя экзосомы. В конкретном варианте осуществления маркеры, связанные с экзосомами, описанными в настоящем документе, являются белками. В определенных вариантах осуществления маркеры являются трансмембранными белками, которые прикреплены внутри фосфолипидного бислоя экзосомы или прикреплены вдоль фосфолипидного бислоя так, что одни части молекулы белка находятся внутри экзосомы, а другие части этой же молекулы контактируют с внешней поверхностью экзосомы. В определенных вариантах осуществления маркеры полностью находятся внутри экзосомы. В другом конкретном варианте осуществления маркеры, связанные с экзосомами, описанными в настоящем документе, являются нуклеиновыми кислотами. В определенных вариантах осуществления указанные нуклеиновые кислоты представляют собой молекулы некодирующей РНК, *например*, микро-РНК (микроРНК).

5.1.1.1. Маркеры поверхности

[0097] Экзосомы, описанные в настоящем документе, содержат маркеры поверхности, которые позволяют их идентифицировать и которые могут использоваться для выделения/получения по существу чистых популяций клеточных экзосом, не содержащих клетки-предшественницы и другой клеточный и неклеточный материал. Способы определения композиции маркеров поверхности экзосом известны в данной области техники. Например, маркеры поверхности экзосом могут быть обнаружены с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или вестерн-

блоттинга.

[0098] В определенных вариантах осуществления экзосомы, описанные в настоящем документе, содержат маркер поверхности в большем количестве, чем экзосомы, известные в данной области техники, как можно определить с помощью, например, FACS.

5.1.1.2. Выход

[0099] Экзосомы, описанные в настоящем документе, могут быть выделены в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, и их выход можно количественно определить. В конкретном варианте осуществления экзосомы, описанные в настоящем документе, выделяют в концентрации около 0,5-5,0 мг на литр культуральной среды (*например*, культуральной среды с сывороткой или без нее). В другом конкретном варианте осуществления экзосомы, описанные в настоящем документе, выделяют в концентрации около 2-3 мг на литр культуральной среды (*например*, культуральной среды, содержащей сыворотку). В другом конкретном варианте осуществления экзосомы, описанные в настоящем документе, выделяют в концентрации около 0,5-1,5 мг на литр культуральной среды (*например*, культуральной среды без сыворотки).

5.1.2. Хранение и консервация

[00100] Экзосомы, описанные в настоящем документе, могут быть законсервированы, то есть помещены в такие условия, которые обеспечивают долговременное хранение, или условия, которые препятствуют деградации экзосом.

[00101] В определенных вариантах осуществления экзосомы, описанные в настоящем документе, могут храниться после сбора в соответствии со способами, описанными выше, в композиции, содержащей буферный агент, при соответствующей температуре. В определенных вариантах осуществления экзосомы, описанные в настоящем документе, хранятся замороженными, *например*, при около -20°C или около -80°C.

[00102] В определенных вариантах осуществления экзосомы, описанные в настоящем документе, могут быть криоконсервированными, *например*, в небольших контейнерах, *например*, ампулах (например, флаконах объемом 2 мл). В определенных вариантах осуществления экзосомы, описанные в настоящем документе, являются криоконсервированными в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 10 мг/мл.

[00103] В определенных вариантах осуществления экзосомы, описанные в настоящем документе, являются криоконсервированными при температуре от около -80°C до около -180°C. Криоконсервированные экзосомы можно переносить в жидкий азот перед размораживанием для использования. В некоторых вариантах осуществления, например, как только температура ампул дойдет до около -90°C, их переносят в хранилище в жидком азоте. Криоконсервирование также можно выполнять с помощью программируемого криозамораживателя. Криоконсервированные экзосомы перед использованием можно размораживать при температуре от около 25°C до около 40°C.

[00104] В определенных вариантах осуществления экзосомы, описанные в

настоящем документе, хранятся при температуре от около 4°C до около 20°C в течение коротких периодов времени (*например*, не более двух недель).

5.2. Композиции

[00105] В настоящем документе дополнительно предложены композиции, *например*, фармацевтические композиции, содержащие экзосомы, предложенные в настоящем документе. Композиции, описанные в настоящем документе, используются для лечения определенных заболеваний и расстройств у субъектов (*например*, людей), когда лечение экзосомами является полезным.

[00106] В определенных вариантах осуществления помимо того, что композиции содержат экзосомы, представленные в настоящем документе, композиции (*например*, фармацевтические композиции), описанные в настоящем документе, содержат фармацевтически приемлемый носитель. Как используется в настоящем документе, термин «фармацевтически приемлемый» обозначает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства или правительством штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения для животных, а более конкретно для человека. Термин «носитель», как используется в настоящем документе в контексте фармацевтически приемлемого носителя, относится к разбавителю, адъюванту, наполнителю или несущей среде, с которыми вводят фармацевтическую композицию. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций. Подходящие наполнители включают в себя крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т. п. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в публикации “Remington's Pharmaceutical Sciences” by JP Remington and AR Gennaro, 1990, 18th Edition.

[00107] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат один или более буферов, *например*, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер (ФСБ), фосфатно-солевой буфер Дульбекко (DPBS) и/или сахарозо-фосфат-глутаматный буфер. В других вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, не содержат буфер. В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат плазмалит.

[00108] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат одну или более солей, *например*, хлорид натрия, хлорид кальция, фосфат натрия, глутамат натрия и соли алюминия (*например*, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, алюм (калийалюминийсульфат) или смесь таких солей алюминия). В других вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, не содержат соли.

[00109] Композиции, описанные в настоящем документе, могут быть включены в

контейнер, упаковку или диспенсер вместе с инструкцией по применению.

[00110] Композиции, описанные в настоящем документе, можно хранить перед применением, *например*, композиции можно хранить замороженными (*например*, при около -20°C или при около -80°C); можно хранить в охлажденном состоянии (*например*, при около 4°C) или можно хранить при комнатной температуре.

5.2.1. Составы и пути введения

[00111] Количество экзосом или композиции, описанных в настоящем документе, которое будет эффективным для терапевтического применения с целью лечения и/или профилактики заболевания или состояния, будет зависеть от природы заболевания и может быть определено стандартными клиническими методами. Точная дозировка экзосом или их композиций для введения субъекту будет также зависеть от способа введения и серьезности заболевания или состояния, подлежащего лечению, и должна быть определена в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого субъекта. Например, эффективные дозировки могут варьироваться в зависимости от способа введения, места назначения, физиологического состояния пациента (включая возраст, массу тела и состояние здоровья), является ли пациент человеком или животным, вводятся ли другие лекарственные препараты, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Лечебные дозировки оптимальным образом титруются для оптимизации безопасности и эффективности.

[00112] Введение экзосом, описанных в настоящем документе, или их композиций может осуществляться различными путями, известными в данной области техники. В определенных вариантах осуществления экзосомы, описанные в настоящем документе, или их композиции вводят локальным, системным, подкожным, парентеральным, внутривенным, внутримышечным, местным, пероральным, внутрикожным, трансдермальным или интраназальным путем. В конкретном варианте осуществления указанное введение осуществляется посредством внутривенной инъекции. В конкретном варианте осуществления указанное введение осуществляется посредством подкожной инъекции. В конкретном варианте осуществления указанное введение является местным. В другом конкретном варианте осуществления экзосомы или их композиции вводят в составе, содержащем внеклеточный матрикс. В другом конкретном варианте осуществления экзосомы или их композиции вводят в комбинации с одним или более дополнительными устройствами для доставки, *например*, со стентом. В другом конкретном варианте осуществления экзосомы или их композиции вводят локально, *например*, в подлежащую лечению указанными экзосомами или композициями область или около нее, например, гипоксическую ткань (*например*, при лечении ишемических заболеваний) или дренирующие лимфатические узлы.

5.3. Способы применения

5.3.1. Лечение заболеваний, при которых будет полезен ангиогенез

[00113] Экзосомы, описанные в настоящем документе, и их композиции стимулируют ангиогенез, поэтому они могут использоваться для лечения заболеваний и

расстройств, при которых будет полезен ангиогенез. Соответственно, в настоящем документе предложены способы применения экзосом, описанных в настоящем документе, или их композиций для стимулирования ангиогенеза у субъектов, нуждающихся в этом. Как используется в настоящем документе, термин «лечение» охватывает излечение, снижение выраженности, улучшение, уменьшение тяжести или сокращение продолжительности заболевания, расстройства или состояния, или любого их параметра или симптома, у субъекта. В конкретном варианте осуществления субъектом, получающим лечение в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, является млекопитающее, *например*, человек.

[00114] В одном варианте осуществления в настоящем документе предлагаются способы индуцирования васкуляризации или ангиогенеза у субъектов, причем указанные способы включают в себя введение субъекту экзосом, предложенных в настоящем документе, или их композиций. Соответственно, способы, предложенные в настоящем документе, можно применять для лечения у субъекта заболеваний и расстройств, при которых будет полезен повышенный ангиогенез/васкуляризация. Примеры таких заболеваний/состояний, при которых будет полезен повышенный ангиогенез и которые, таким образом, могут поддаваться лечению экзосомами и композициями, описанными в настоящем документе, включают в себя без ограничения инфаркт миокарда, застойную сердечную недостаточность, заболевание периферических артерий, критическую ишемию конечностей, болезнь периферических сосудов, гипоплазию левой половины сердца, язву при диабетической стопе, венозную язву или артериальную язву.

[00115] В одном варианте осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения субъекта с нарушением кровотока, *например*, в периферической сосудистой системе, причем указанные способы включают в себя введение субъекту экзосом, предложенных в настоящем документе, или их композиций. В конкретном варианте осуществления способы, предложенные в настоящем документе, включают в себя лечение субъекта с ишемией экзосомами, предложенными в настоящем документе, или их композицией. В определенных вариантах осуществления ишемия представляет собой заболевание периферических артерий (ЗПА), *например*, критическую ишемию конечностей (КИК). В некоторых других вариантах осуществления ишемия представляет собой болезнь периферических сосудов (БПС), заболевание периферических артерий, ишемическую болезнь сосудов, ишемическую болезнь сердца или ишемическую болезнь почек.

5.3.2. Популяции пациентов

[00116] В определенных вариантах осуществления экзосомы, описанные в настоящем документе, вводят субъекту, нуждающемуся в лечении любого из заболеваний или состояний, описанных в настоящем документе. В другом варианте осуществления композицию, описанную в настоящем документе, вводят субъекту, нуждающемуся в лечении любого из заболеваний или состояний, описанных в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления указанный субъект является человеком.

[00117] В конкретном варианте осуществления экзосомы или композиции, описанные в настоящем документе, вводят субъекту (*например*, человеку), нуждающемуся в лечении, для повышения ангиогенеза и/или васкуляризации.

5.4. Наборы

[00118] В настоящем документе предложен фармацевтический комплект или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, *т. е.* композиций, содержащих экзосомы, описанные в настоящем документе. При необходимости может предоставляться связанное с таким контейнером(ами) уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, которое отражает одобрение для введения человеку данным агентством по производству, применению или продаже.

[00119] Наборы, описанные в настоящем документе, можно использовать в приведенных выше способах. Композиции, описанные в настоящем документе, можно получить в форме, которую легко вводить индивидууму. Например, композиция может содержаться внутри контейнера, который подходит для медицинского применения. Таким контейнером, например, может быть стерильный пластиковый пакет, колба, банка или другой контейнер, из которого легко подавать композиции. Например, контейнером может быть пакет для крови или другой пластиковый пакет, приемлемый с медицинской точки зрения, который подходит для внутривенного введения жидкости реципиенту.

Иллюстративная плацентарная культура

[00120] Плацента является источником клеток, включая стволовые клетки, такие как гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и негемопоэтические стволовые клетки. В настоящем документе описаны способы выделения экзосом из плаценты или ее части, которая культивируется в биореакторе. Экзосомы выделяются клетками во время культивирования, и экзосомы выделяются в среду, которая способствует дальнейшей обработке и выделению экзосом. Экзосомы также можно выделять из плаценты или ее части на разных стадиях культивирования (например, в разные моменты времени, и на каждой стадии извлечения могут использоваться разные перфузионные жидкости). После попадания в среду экзосомы можно дополнительно выделять с помощью, например, центрифугирования, коммерчески доступного набора для выделения экзосом, лектиновой аффинности и/или аффинной хроматографии (например, используя иммобилизованные связывающие агенты, такие как связывающие агенты, присоединенные к субстрату, которые являются специфическими в отношении малых ГТФаз семейства Rab, аннексина, флотиллина, Аликс, Tsg101, комплекса ESCRT, CD9, CD37, CD53, CD63, CD63A, CD81, CD82), Hsp70, Hsp90, молекул адгезии эпителиальных клеток (EpCam), перфорина, TRAIL, гранзима B, Fas, одного или более раковых маркеров, таких как: лиганд Fas, CD24, EpCAM, EDIL3, фибронектин, сурвивин, PCA3, TMPRSS2:ERG, глипикан-1, TGF- β 1, MAGE 3/6, EGFR, EGFRvIII, CD9, CD147, CA-125, EpCam и/или CD24, или одного или

более воспалительных маркеров или патогенных маркеров, таких как: вирусный, белок грибка или бактерии или пептид, включая без ограничения α -синуклеин, белки ВИЧ или HCV, тау, бета-амилоид, TGF-бета, TNF-альфа, фетуин-А и/или CD133). Выделенные экзосомы можно использовать в терапевтических средствах, с целью диагностики и в качестве биотехнологических инструментов.

[00121] «Экзосомы», как описано в настоящем документе, представляют собой везикулы, которые присутствуют во многих и, вероятно, во всех жидкостях эукариот, включая асцитную жидкость, кровь, мочу, сыворотку и грудное молоко. Они также могут называться внеклеточными везикулами. Экзосомы - это билипидные мембранные везикулы, выделяемые живыми клетками, которые выполняют важные функции межклеточной коммуникации. Экзосомы вырабатываются клетками, такими как стволовые клетки, эпителиальные клетки, и сообщалось, что подтип экзосом, определенный как матричные нановезикулы (Matrix-bound nanovesicles - MBV), присутствует в клеточных биокаркасах (нечетких) внеклеточного матрикса (extracellular matrix - ECM). Зарегистрированный диаметр экзосом составляет от 30 до 100 нм, что больше, чем у липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), но намного меньше, чем, например, у эритроцитов. Экзосомы можно высвобождать из клетки, когда мультивезикулярные тельца сливаются с плазматической мембраной, или высвобождать непосредственно из плазматической мембраны.

[00122] Было продемонстрировано, что экзосомы имеют специальные функции и играют ключевую роль в таких процессах, как коагуляция, межклеточная передача сигналов и удаление продуктов жизнедеятельности. Известно, что внеклеточные везикулы и экзосомы, выделяемые плацентой, способствуют коммуникации между плацентой и материнскими тканями с целью обеспечения толерантности матери к плоду. Было продемонстрировано, что экзосомы, выделенные из плацентарных эксплантов человека, обладают иммуномодулирующей активностью. Также было продемонстрировано, что экзосомы, полученные из стволовых клеток, уменьшают нейровоспаление путем подавления активации астроцитов и микроглии, а также стимулируют нейрогенез, вероятно, путем нацеливания на нейрогенную нишу, что в обоих случаях способствует восстановлению нервной ткани и восстановлению функций после травматического повреждения мозга. (Review Yang et al. 2017, *Frontiers in Cellular Neuroscience*). Экзосомы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток эмбриона человека, также стимулируют регенерацию костно-хрящевой ткани (Zhang et al. 2016, *Osteoarthritis and Cartilage*). Было продемонстрировано, что экзосомы, выделяемые плацентой человека, которые несут функциональные молекулы лиганда Fas и Trail, вызывают апоптоз в активированных иммунных клетках, что свидетельствует об опосредованных экзосомами иммунных привилегиях плода. (Ann-Christin Stenqvist et al., *Journal of Immunology*, 2013, 191: doi:10.4049).

[00123] Экзосомы содержат активные биотехнологические препараты, включая липиды, цитокины, микроРНК, мРНК и ДНК. Они также могут выступать в качестве

медиаторов межклеточной коммуникации посредством генетического материала и/или белкового переноса. Экзосомы могут также содержать специфическую для клеточного типа информацию, которая может отображать функциональное или физиологическое состояние клетки. Следовательно, существует растущий интерес к разработке клинических и биологических применений для экзосом.

[00124] Соответственно, экзосомы, выделенные из плаценты человека или ее части с помощью описанных в настоящем документе подходов, необязательно включающих в себя характеристику указанных экзосом (например, путем идентификации присутствия или отсутствия одного или более белков или маркеров на экзосомах), можно использовать для усиления иммуномодуляции, противофиброзного действия и/или прорегенеративного эффекта. Соответственно, экзосомы, выделенные из плаценты человека или ее части с помощью подходов, описанных в настоящем документе, можно отбирать (например, в соответствии с маркерами, присутствующими или отсутствующими на экзосомах), очищать, замораживать, лиофилизировать, упаковывать и/или распространять в качестве терапевтического продукта и/или биотехнологического инструмента.

[00125] В некоторых альтернативных вариантах может быть полезно идентифицировать экзосомы, имеющие опухолевые маркеры или пептиды, патогенные маркеры или пептиды, такие как вирусные, грибковые или бактериальные маркеры или пептиды, и/или воспалительные маркеры, такие как воспалительные пептиды, таким образом, такие экзосомы могут быть удалены из популяции экзосом (например, удаление путем аффинной хроматографии со связывающими молекулами, такими как антитела или их связывающие части, которые являются специфическими в отношении таких опухолевых маркеров или пептидов, патогенных маркеров или пептидов и/или воспалительных маркеров или пептидов). Соответственно, в некоторых альтернативных вариантах, например, первую популяцию экзосом выделяют из плаценты человека или ее части с помощью способов, описанных в настоящем документе, и как только первая популяция экзосом будет выделена, эту популяцию экзосом дополнительно обрабатывают с целью удаления одной или более субпопуляций экзосом, используя субстрат, содержащий иммобилизованное антитело или его связывающую часть (например, мембрану, смолу, гранулу или сосуд, содержащие указанное иммобилизованное антитело или его связывающую часть), причем иммобилизованное антитело или его связывающая часть являются специфическими в отношении маркера или пептида, присутствующего на субпопуляции экзосом, которые отбирают для дальнейшего выделения, например, в отношении одного или более опухолевых маркеров или пептидов, патогенных маркеров или пептидов, например, вирусных, грибковых или бактериальных маркеров или пептидов, и/или воспалительных маркеров или воспалительных пептидов. В некоторых альтернативных вариантах первую популяцию экзосом, выделенную из плаценты человека или ее части с помощью способов, описанных в настоящем документе, приводят в контакт с субстратом, содержащим иммобилизованное антитело или его связывающую часть (например, мембраной, смолой, гранулой или сосудом, содержащими указанное

иммобилизованное антитело или его связывающую часть), причем иммобилизованное антитело или его связывающая часть являются специфическими в отношении одного или более раковых маркеров, таких как: лиганд Fas, CD24, EpCAM, EDIL3, фибронектин, сурвивин, PCA3, TMPRSS2:ERG, глипикан-1, TGF- β 1, MAGE 3/6, EGFR, EGFRvIII, CD9, CD147, CA-125, EpCam и/или CD24, чтобы выделить вторую популяцию экзосом из первой популяции экзосом на основании аффинности с иммобилизованным антителом или его связывающей частью. В некоторых альтернативных вариантах первую популяцию экзосом, выделенную из плаценты человека или ее части с помощью способов, описанных в настоящем документе, приводят в контакт с субстратом, содержащим иммобилизованное антитело или его связывающую часть (например, мембраной, смолой, гранулой или сосудом, содержащими указанное иммобилизованное антитело или его связывающую часть), причем иммобилизованное антитело или его связывающая часть являются специфическими в отношении одного или более воспалительных или патогенных маркеров, таких как: вирусный, грибковый или бактериальный белок или пептид, включая без ограничения α -синуклеин, белки ВИЧ или HCV, тау, бета-амилоид, TGF-бета, TNF-альфа, фетuin-A и/или CD133 или их части, чтобы выделить вторую популяцию экзосом из первой популяции экзосом на основании аффинности с иммобилизованным антителом или его связывающей частью.

[00126] В некоторых альтернативных вариантах популяция экзосом, выделенных и/или отобранных с помощью подходов, описанных в настоящем документе, содержит маркеры или пептиды, которые можно использовать в терапевтических средствах, такие как перфорин и/или гранзим В, которые, как было показано, опосредуют противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo* (J Cancer 2016; 7(9):1081-1087), или Fas, который был обнаружен в экзосомах, которые демонстрируют цитотоксическую активность против раковых клеток-мишеней. (Theranostics 2017; 7(10):2732-2745). Соответственно, в некоторых альтернативных вариантах первую популяцию экзосом, выделенную из плаценты человека или ее части с помощью способов, описанных в настоящем документе, приводят в контакт с субстратом, содержащим иммобилизованное антитело или его связывающую часть (например, мембраной, смолой, гранулой или сосудом, содержащими указанное иммобилизованное антитело или его связывающую часть), причем иммобилизованное антитело или его связывающая часть являются специфическими в отношении перфорины, TRAIL, и/или гранзима В, и/или Fas, и вторую популяцию экзосом выделяют из первой популяции экзосом на основании аффинности с иммобилизованным антителом или его связывающей частью с перфорином, TRAIL, и/или гранзимом В, и/или Fas. В некоторых альтернативных вариантах выделяют популяцию экзосом, которая содержит РНК CD63 и/или желаемую микроРНК. В некоторых альтернативных вариантах популяцию экзосом выделяют и/или характеризуют после выделения с помощью аффинной хроматографии или иммунологических методов, причем указанная популяция экзосом содержит маркеры или пептиды, такие как малые ГТФазы семейства Rab, аннексины, флотиллин, Аликс, Tsg101, комплекс ESCRT, CD9, CD37,

CD53, CD63, CD63A, CD81, CD82, Hsp70, Hsp90 и/или молекулы адгезии эпителиальных клеток (Epcam). Как подробно описано выше, в некоторых альтернативных вариантах первую популяцию экзосом, выделенную из плаценты человека или ее части с помощью способов, описанных в настоящем документе, приводят в контакт с субстратом, содержащим иммобилизованное антитело или его связывающую часть (например, мембраной, смолой, гранулой или сосудом, содержащими указанное иммобилизованное антитело или его связывающую часть), причем иммобилизованное антитело или его связывающая часть являются специфическими в отношении малых ГТФаз семейства Rab, аннексинов, флотиллина, Аликс, Tsg101, комплекса ESCRT, CD9, CD37, CD53, CD63, CD63A, CD81, CD82, Hsp70, Hsp90 и/или молекул адгезии эпителиальных клеток (Epcam), и вторую популяцию экзосом выделяют из первой популяции экзосом на основании аффинности с иммобилизованным антителом или его связывающей частью с малыми ГТФазами семейства Rab, аннексинами, флотиллином, Аликс, Tsg101, комплексом ESCRT, CD9, CD37, CD53, CD63, CD63A, CD81, CD82, Hsp70, Hsp90 и/или молекулами адгезии эпителиальных клеток (Epcam). В других альтернативных вариантах популяцию экзосом, выделенную из плаценты человека или ее части с помощью способов, описанных в настоящем документе, приводят в контакт с антителом или его связывающей частью, специфическими в отношении одного или более из малых ГТФаз семейства Rab, аннексинов, флотиллина, Аликс, Tsg101, комплекса ESCRT, CD9, CD37, CD53, CD63, CD63A, CD81, CD82, Hsp70, Hsp90 и/или молекул адгезии эпителиальных клеток (Epcam), и связывание с антителом или его связывающей частью определяют с помощью вторичного связывающего агента, содержащего выявляемый реагент, который связывается с указанным антителом или его связывающей частью (например, используя ИФА или блоттинг), чтобы подтвердить присутствие малых ГТФаз семейства Rab, аннексинов, флотиллина, Аликс, Tsg101, комплекса ESCRT, CD9, CD37, CD53, CD63, CD63A, CD81, CD82, Hsp70, Hsp90 и/или молекул адгезии эпителиальных клеток (Epcam) в выделенной популяции экзосом.

[00127] «Выделение», как описано в настоящем документе, - это способ отделения экзосом от других материалов. Выделение экзосом можно осуществлять с помощью больших центробежных сил в центрифуге, путем использования коммерчески доступных наборов (например, набор SeraMir Exosome RNA Purification (SBI system biosciences), Intact Exosome Purification and RNA Isolation (CombinationKit) Norgen BioTek Corp.), а также с помощью лектиновой аффинности или аффинной хроматографии со связывающими агентами (например, антителом или его связывающей частью), специфическими в отношении маркеров или пептидов на экзосомах, таких как маркеры или пептиды, упомянутые выше (например, связывающие агенты, специфические в отношении малых ГТФаз семейства Rab, аннексинов, флотиллина, Аликс, Tsg101, комплекса ESCRT, CD9, CD37, CD53, CD63, CD63A, CD81, CD82, Hsp70, Hsp90, молекул адгезии эпителиальных клеток (Epcam), перфорины, TRAIL, гранзима В, Fas, одного или более раковых маркеров, таких как: лиганд Fas, CD24, Epcam, EDIL3, фибронектин,

сурвивин, PCA3, TMPRSS2:ERG, глипикан-1, TGF- β 1, MAGE 3/6, EGFR, EGFRvIII, CD9, CD147, CA-125, EpCam и/или CD24, или одного или более воспалительных или патогенных маркеров, таких как: вирусный, грибковый или бактериальный белок или пептид, включая без ограничения α -синуклеин, белки ВИЧ или HCV, тау, бета-амилоид, TGF-бета, TNF-альфа, фетуин-А и/или CD133).

[00128] «Плацента», как описано в настоящем документе, - это орган в матке беременных плацентарных млекопитающих, обеспечивающий питание и поддерживающий плод через пуповину. Как описано в настоящем документе, плацента может использоваться в качестве биореактора для получения экзосом. В некоторых альтернативных вариантах децеллюляризованная плацента может использоваться как каркас и биореактор, который несет популяцию экзогенных клеток (например, популяцию клеток, которую выселили на децеллюляризованную плаценту и культивировали на ней), чтобы получить из указанных клеток популяцию экзосом, которые являются специфическими для клеток. Соответственно, в некоторых альтернативных вариантах децеллюляризованную плаценту засевают популяцией регенеративных клеток (например, популяцией клеток, содержащей стволовые клетки, и/или эндотелиальные клетки, и/или клетки-предшественники), и указанную популяцию регенеративных клеток культивируют на указанной децеллюляризованной плаценте в биореакторе, а специфические для клеток экзосомы выделяют из указанных культивированных клеток с использованием центрифугирования, коммерчески доступных наборов для выделения экзосом, лектиновой аффинности и/или аффинной хроматографии со связывающими агентами (например, антителом или его связывающей частью), специфическими в отношении маркеров или пептидов на экзосомах, таких как маркеры или пептиды, упомянутые выше (например, связывающие агенты, специфические в отношении малых ГТФаз семейства Rab, аннексинов, флотиллина, Аликс, Tsg101, комплекса ESCRT, CD9, CD37, CD53, CD63, CD63A, CD81, CD82, Hsp70, Hsp90, молекул адгезии эпителиальных клеток (EpCam), перфорины, TRAIL, гранзима В, Fas, одного или более раковых маркеров, таких как: лиганд Fas, CD24, EpCAM, EDIL3, фибронектин, сурвивин, PCA3, TMPRSS2:ERG, глипикан-1, TGF- β 1, MAGE 3/6, EGFR, EGFRvIII, CD9, CD147, CA-125, EpCam и/или CD24, или одного или более воспалительных или патогенных маркеров, таких как: вирусный, грибковый или бактериальный белок или пептид, включая без ограничения α -синуклеин, белки ВИЧ или HCV, тау, бета-амилоид, TGF-бета, TNF-альфа, фетуин-А и/или CD133).

[00129] «Асцитная жидкость», как описано в настоящем документе, представляет собой избыточную жидкость в пространстве между мембранами, выстилающими брюшную полость и органы брюшной полости (перитонеальной полости). Асцитная жидкость может быть источником экзосом.

[00130] «Плазма», как описано в настоящем документе, представляет собой жидкую часть крови и лимфатической жидкости, которая составляет около половины объема крови. Плазма лишена клеток и в отличие от сыворотки не сворачивается. Плазма

крови содержит антитела и другие белки. Плазма может быть источником экзосом.

[00131] В настоящем документе предложено несколько способов культивирования клеток с целью получения большого количества экзосом. Культуральные среды, которые используются для извлечения или выделения экзосом, могут содержать одно или более питательных веществ, ферментов или хелаторов. Хелаторы могут использоваться для облегчения высвобождения экзосом из культивированных клеток. Без ограничения хелаторы, используемые в некоторых способах, могут включать в себя фосфонат, тетранатриевую соль ВАРТА, ВАРТА/АМ, тетранатриевую соль реагента Di-Notrophen ТМ, EGTA/АМ, пиридоксаль изоникотиноилгидразин, N, N,N',N'-тетракис-(2 пиридилметил)этилендиамин, 6-бром-N'-(2-гидроксibenзилиден)-2-метилхинолин-4-карбогидразид, тетракис(ацетоксиметилловый эфир) 1,2-бис(2-аминофеноксид)этан-N, N,N',N'-тетрауксусной кислоты, (этилендиамин)тетрауксусную кислоту (EDTA), эдатамил, этилендиаминтетрауксусную кислоту, этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N, N,N',N'-тетрауксусную кислоту или этиленгликоль-бис(β-аминоэтилэфир)-N, N,N',N'-тетрауксусную кислоту (EGTA) или любую их комбинацию. Хелатор может быть предоставлен в средах, используемых для культивирования или выделения экзосом, в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации. Как показано в настоящем документе, присутствие одного или более хелаторов в средах неожиданно увеличило извлечение экзосом из плаценты, культивированной в биореакторе. Среда, используемая для культивирования и/или извлечения экзосом, также может содержать протеазу, которая может дополнительно увеличивать высвобождение экзосом. В некоторых альтернативных вариантах протеаза, содержащаяся в средах, представляет собой трипсин, коллагеназу, химотрипсин или карбоксипептидазу. В некоторых альтернативных вариантах протеаза представлена в средах в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации. В среды, используемые для культивирования и/или извлечения экзосом, также могут добавлять один или более сахаров. В некоторых альтернативных вариантах сахар, добавляемый в среды, представляет собой глюкозу. Предполагается, что присутствие глюкозы в средах повышает высвобождение экзосом. В некоторых альтернативных вариантах глюкоза представлена в средах в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации. Среда также может содержать факторы роста, цитокины или одно или более лекарственных средств, например, GM-CSF, сыворотку и/или антагонист AHR.

Способы получения экзосом из плаценты или ее части

[00132] Типичный способ извлечения экзосом из плаценты или ее части показан на **Фиг. 1**. Источники выделения экзосом могут быть следующими: плазма пуповинной крови (PRP), плацентарный перфузат (PS), плацентарная тканевая культура (PTS), плацентарная органная культура (PO) или экзогенные клетки, которые могут быть помещены в плаценту или ее часть, когда плаценту используют в качестве биореактора для получения экзосом. В одном подходе собирают плаценту или ее часть (№200010323, собрано 25.09.2017 г.). Плаценту приводят в контакт со средами или перфузируют с помощью обычных способов сбора PSC-100, собрано как PS-1 (26.09.2017 г.). Плаценту или ее часть инкубируют в боксе в течение по меньшей мере 4 часов. Плаценту или ее часть приводят в контакт со средами (среда RPMI) или перфузируют 500 мл основной среды RPMI (1% антибиотиков), собрано как PS-2. Плаценту или ее часть затем инкубируют в боксе в течение ночи и покрывают. Плаценту или ее часть приводят в контакт с 750 мл солевого раствора или перфузируют им и собирают как PS-3. Образцы затем отправляли в лабораторию для проведения анализа (Warren). PS1, PS2 и PS3 были проанализированы с помощью FACS в тот же день после лизиса эритроцитов.

[00133] Для анализа ткань плаценты разрезали на кусочки размером 1×1×1 см, помещали в 100 мл раствора (все с 1% P&S) в колбах T75 (каждая содержит около 1/8 плаценты). Были проанализированы четыре раствора: A: среда DMEM; B: ФСБ; C: ФСБ+5 mM EDTA; D: ФСБ+0,025% трипсин-EDTA. Затем их оставляли для инкубации в инкубаторе при 37°C в течение ночи.

[00134] Супернатант затем собирали, пропускали через тканевый фильтр и центрифугировали при 400g, чтобы собрать клетки (осадок). После первого центрифугирования супернатант затем центрифугировали для выделения экзосом (вращение 3000g >10 000 вращение: 100 000g осадок)

[00135] Собранные клетки также использовали для анализа FACS. Образцы клеток находились в нескольких буферах (A=PTS1; B=PTS2; C=PTS-3, D=PTS4). Экзосомы извлекали, а затем анализировали с целью идентификации присутствия экзосомного маркера, подтверждающего, что экзосомы были получены и выделены с помощью данной процедуры.

Идентификация популяции экзосом, выделенных из плацентарного биореактора, с помощью ИФА и белковых анализов

[00136] Фракции супернатанта из плацентарного биореактора собирали с помощью способов, описанных выше, и фракции фильтровали. Супернатант затем центрифугировали при 400g x 10 мин. для сбора клеток. После первого центрифугирования выполняли второе центрифугирование при 3000g x 30 мин для осаждения клеточного дебриса. Третье центрифугирование выполняли при 10 000g x 1 ч. для осаждения микровезикул. Четвертое центрифугирование затем выполняли при 100 000g x 1,5 ч. для осаждения экзосом. Центрифужную пробирку, содержащую осажденные экзосомы, затем помещали в перевернутом положении на бумагу, чтобы остаточная

жидкость стекла. Экзосомный осадок затем растворяли в соответствующем объеме стерильного ФСБ (например, 2,0 мл) для растворения осадка, и аликвоту раствора, содержащего экзосомы, затем помещали в стерильную пробирку Эппендорфа и замораживали в морозильной камере при $-20^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$. Экзосомы затем анализировали на присутствие экзосом-специфического маркера CD63A, используя ELISA-63A и набор Protein Quantification Kit для количественного определения белка.

Как показано, PRP, плацентарный перфузат и ткань плаценты содержат популяцию экзосом, которые являются CD63+ и могут быть эффективно выделены ультрацентрифугированием. Чтобы выделить экзосомы, культуральный супернатант сначала фильтровали через тканевый фильтр и выполняли несколько центрифугирований, как было описано выше, для получения экзосом, которые затем замораживали. Для обнаружения экзосом с помощью ИФА использовали антитело к CD63. В ходе анализа образец разбавляли буфером для связывания экзосом в соотношении 1:1 (60 мкл+60 мкл). CD63+ экзосомы эффективно выделяли с помощью этой процедуры.

Характеристика экзосом

[00137] Экзосомы могут содержать белок, пептиды, РНК, ДНК и цитокины. Могут быть использованы способы, такие как секвенирование мРНК, анализ поверхностного белка (набор MACSplex Exosome Kit, Miltenyi), протеомный анализ, функциональные исследования (ферментные анализы *in vitro* анализы заживления ран (анализ методом застывания царапины), индуцированная экзосомами пролиферация клеток (кератиноциты или фибробласты человека) (сравнение с 5 известными стимуляторами), индуцированная экзосомами выработка коллагена (кератиноциты или фибробласты человека): сравнение с TGFb, включает в себя сывороточный и несывороточный контроль, ИФА для проколлагенового пептида 1 C, индуцированное экзосомами ингибирование воспалительных цитокинов: типы реагирующих клеток включают в себя кератиноциты человека или фибробласты человека, а также сравнения с лиофилизированными убитыми нагреванием бактериями или LPS).

[00138] В некоторых альтернативных вариантах выделенные экзосомы концентрировали с помощью фильтров Vivaspın 100 кДа (Sartorius), промывали один раз ФСБ и извлекали приблизительно 40 мкл. Концентрированную популяцию экзосом смешивали с 10 мкл буфера для лизиса 5XRIPA, содержащего 1xсмесь ингибиторов протеаз (Roche), и перемешивали вихревым способом с последующей обработкой ультразвуком при 20°C в течение 5 мин. с помощью ультразвукового диспергатора в водной среде (Ultrasonic Cleaner, JSP). После обработки ультразвуком пробирку инкубировали на льду в течение 20 мин. с периодическим перемешиванием. Затем смесь центрифугировали при 10 000g в течение 10 мин. при 4°C . Выделенный прозрачный лизат переносили в чистую пробирку. Количество белка измеряли с помощью набора BCA, 10 мкг белка загружали на каждую полосу для вестерн-блоттинга и использовали антитело для определения представляющего интерес белка.

[00139] В другом альтернативном варианте исследовали мечение экзосом и их

поглощение клетками (например, НЕК293Т). Аликвоту замороженных элюированных экзосом ресуспендировали в 1 мл ФСБ и метили с помощью наборов для мечения PKH26 Fluorescent cell linker Kits (Sigma-Aldrich). 2х раствор красителя PKH26 (4 мкл красителя в 1 мл разбавителя С) получали и смешивали с 1 мл экзосомного раствора с получением конечной концентрации красителя 2×10^6 М. Образцы немедленно перемешивали в течение 5 мин. и окрашивание останавливали добавлением 1% БСА для захвата избыточного красителя PKH26. Меченные экзосомы переносили в фильтр Vivaspin 100 кДа и центрифугировали при 4000g, затем дважды промывали ФСБ и приблизительно 50 мкл образца извлекали для анализа на концентрацию экзосом, используя NTA, перед хранением при -80С. ФСБ использовали в качестве отрицательного контроля в реакции мечения. Для проведения исследований поглощения клетки НЕК293Т высевали на 8-луночную слайд-камеру (1×10^4 /лунку), используя обычную среду. Через 24 часа слайд-камеру дважды промывали ФСБ и инкубировали с ФБС (10%) без DMEM и экзосом в течение 24 часов. После этого в каждую лунку добавляли свежую среду DMEM с образцом экзосом, каждый из которых меченный 10% ФБС без экзосом (200 мкл), соответствующий 2×10^9 экзосом, и инкубировали в течение 1,5 часов в инкубаторе для клеточных культур. После инкубации слайд-камеру дважды промывали ФСБ (500 мкл) и фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 20 мин. при комнатной температуре. Слайд-камеры дважды промывали ФСБ (500 мкл), сушили и устанавливали с использованием реагента ProLong Gold Antifade Reagent с DAPI. Клетки визуализировали с помощью микроскопа Axioskop (Zeiss)

Выделение экзосом с высоким выходом из культивированной послеродовой плаценты человека

[00140] Послеродовые плаценты человека, полученные с полного согласия доноров, перфузировали. Остатки крови смывали с плаценты большим количеством стерильного солевого раствора, а затем культивировали в 5 л биореакторе с бессывороточной культуральной средой, дополненной антибиотиками, и культивировали в инкубаторе при 37°C (5% CO₂), и чередовали с вращением в охлажденном состоянии в течение продолжительного периода времени до 4 дней. Супернатант культуральной среды обрабатывали последовательным центрифугированием при 3000g и 10 000g для осаждения ткани, клеток и микровезикул. Экзосомы осаждали ультрацентрифугированием при 100 000g из супернатанта после центрифугирования при 10 000g и растворяли в стерильном ФСБ. Выход экзосом количественно определяли с помощью анализа белка BCA.

[00141] Супернатанты плацентарной органной культуры обрабатывали, как описано в способах, для выделения экзосом. Анализ ИФА с использованием антител к CD63A, показал, что выделенные экзосомы содержат белок CD63A - специфический белковый маркер для экзосом. Подсчитано, что одна плацента, культивированная в одном литре среды, давала приблизительно 40 мг экзосом или приблизительно 1×10^{13} CD63A-положительных экзосомных частиц в течение 24 часов. Проводили дальнейшую

характеристику таких полученных из плаценты экзосом, включая экспрессию CD9, CD81, размер и функциональную активность.

[00142] В другой серии экспериментов послеродовые плаценты человека, полученные с полного согласия доноров, перфузировали с целью выделения экзосом средами с различной концентрацией EDTA. Бессывороточную культуральную среду, дополненную антибиотиками и различными концентрациями EDTA (например, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мМ или в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации), перфузировали в плаценту через пуповинную вену с помощью перистальтического насоса с постоянной скоростью и культивировали в течение дополнительных 24-48 часов в контролируемых условиях. После такого культивирования перфузировали 750 мл физиологической среды, содержащей используемое количество EDTA, с контролируемой скоростью. Затем экзосомы выделяли последовательным центрифугированием и ультрацентрифугированием, подтверждали с помощью анализа ИФА с CD63A и количественно определяли с помощью анализа белка BCA, как было описано выше. Будет обнаружено, что концентрация EDTA в средах, используемых для извлечения экзосом, влияет на количество экзосом, извлеченных из плаценты, культивированной в биореакторе.

Дополнительные альтернативные варианты

[00143] В некоторых альтернативных вариантах предложен способ выделения экзосом из плаценты или ее части. Способ включает в себя а) приведение в контакт плаценты или ее части с первой средой; б) получение первой фракции, содержащей экзосомы, из указанной плаценты или ее части; в) приведение в контакт указанной плаценты или ее части со второй средой; г) получение второй фракции, содержащей экзосомы, из указанной плаценты или ее части; д) приведение в контакт указанной плаценты или ее части с третьей средой; е) получение третьей фракции, содержащей экзосомы, из указанной плаценты или ее части и необязательно выделение экзосом из указанных первой, второй и/или третьей фракций. В некоторых альтернативных вариантах способ дополнительно включает в себя множество стадий приведения в контакт плаценты или ее части с дополнительной средой и получения дополнительной фракции, содержащей экзосомы, из указанной плаценты или ее части. Эти две стадии можно повторять множество раз. Предпочтительно плаценту или ее часть культивируют и/или поддерживают в биореакторе. В некоторых альтернативных вариантах плацента или ее часть содержит амниотическую мембрану. В некоторых альтернативных вариантах плацента или ее часть представляет собой плаценту человека или ее часть. В некоторых альтернативных вариантах первая, вторая и/или третья среды находятся в контакте с плацентой или ее частью в течение по меньшей мере 45 минут, например, 45 минут, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов, или в течение любого периода времени, который находится в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеупомянутых временных точек. В некоторых альтернативных вариантах первая, вторая и/или третья среды

находятся в контакте с плацентой или ее частью в течение по меньшей мере 7, 14, 28, 35 или 42 дней или в течение любого периода времени, который находится в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеупомянутых временных точек. В некоторых альтернативных вариантах плацента или ее часть является измельченной, гомогенизированной или обработанной ферментом, таким как коллагеназа и/или протеаза.

[00144] В некоторых альтернативных вариантах плацента или ее часть представлена в виде по существу плоского или листообразного каркасного материала, который был подвергнут децеллюляризации и необязательно по существу высушен. Децеллюляризованная плацента или ее часть используется в качестве каркаса, чтобы нести экзогенные клетки, такие как гомогенные популяции клеток, полученные из культуры клеток или путем процедур первичного выделения (например, регенеративные клетки, включая стволовые клетки, эндотелиальные клетки и/или клетки-предшественники). Способ дополнительно включает в себя пассивирование жидкости или жидкости, содержащей клетки, которые необходимо высеять в децеллюляризованную плаценту или ее часть. После установления клеток экзосомы, полученные из клеток, извлекают и выделяют с помощью процедур, описанных выше. В некоторых альтернативных вариантах жидкость, содержащая клетки, которые необходимо высеять на децеллюляризованную плаценту или ее часть, представляет собой асцитную жидкость, кровь или плазму. В некоторых альтернативных вариантах клетки происходят из органа. В некоторых альтернативных вариантах клетки происходят из печени, почки, легкого или поджелудочной железы. В некоторых альтернативных вариантах клетки представляют собой иммунные клетки. В некоторых альтернативных вариантах клетки представляют собой Т-клетки или В-клетки.

[00145] В некоторых альтернативных вариантах первая среда содержит фосфатно-солевой буфер (ФСБ). В некоторых альтернативных вариантах вторая среда содержит факторы роста. В некоторых альтернативных вариантах третья среда содержит хелатор. В некоторых альтернативных вариантах хелатор представляет собой EDTA, EGTA, фосфонат, тетранатриевую соль ВАРТА, ВАРТА/АМ, тетранатриевую соль реагента Di-Notrophen ТМ, EGTA/АМ, пиридоксаль изоникотиноилгидразин, N, N,N',N'-тетракис-(2-пиридилметил)этилендиамин, 6-бром-N'-(2-гидроксibenзилиден)-2-метилхинолин-4-карбогидразид, тетракис(ацетоксиметилловый эфир) 1,2-бис(2-аминофеноксид)этан-N, N,N',N'-тетрауксусной кислоты, (этилендиамин)тетрауксусную кислоту, EDTA, эдатамил, этилендиаминтетрауксусную кислоту, этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N, N,N',N'-тетрауксусную кислоту или тетранатриевую соль этиленгликоль-бис(β-аминоэтилэфир)-N, N,N',N'-тетрауксусной кислоты или любую их комбинацию. В некоторых альтернативных вариантах хелатор представляет собой EDTA, или EGTA, или их комбинацию. В некоторых альтернативных вариантах хелатор представлен в третьей среде в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя

вышеупомянутыми значениями концентрации. В некоторых альтернативных вариантах EDTA в третьей среде представлена в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации.

[00146] В некоторых альтернативных вариантах третья среда содержит протеазу. В некоторых альтернативных вариантах протеаза представляет собой трипсин, коллагеназу, химотрипсин или карбоксипептидазу или их смесь. В некоторых альтернативных вариантах протеаза представляет собой трипсин. В некоторых альтернативных вариантах протеаза представлена в третьей среде в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации.

[00147] В некоторых альтернативных вариантах способ дополнительно включает в себя приведение в контакт плаценты или ее части с дополнительным множеством сред, причем приведение в контакт приводит к получению нескольких фракций, содержащих экзосомы. В некоторых альтернативных вариантах первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат глюкозу. В некоторых альтернативных вариантах первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат GM-CSF. В некоторых альтернативных вариантах первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат сыворотку. В некоторых альтернативных вариантах первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат DMEM. В некоторых альтернативных вариантах первая, вторая, третья или дополнительная среда содержит антагонист AHR. В некоторых альтернативных вариантах антагонист AHR представляет собой SR1. В некоторых альтернативных вариантах SR1 присутствует в концентрации 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 200 нМ, 300 нМ, 400 нМ, 500 нМ, 600 нМ, 700 нМ, 800 нМ, 900 нМ или 1 мМ или в любой другой концентрации в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями.

[00148] В некоторых альтернативных вариантах первая среда находится в контакте с плацентой или ее частью, поддерживая температуру на уровне 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C или 40 °C или температуру, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями температуры. В некоторых альтернативных вариантах вторая среда находится в контакте с плацентой или ее частью, поддерживая температуру на уровне 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C или 40 °C или температуру, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями температуры. В некоторых альтернативных вариантах третья среда находится в контакте с плацентой или ее частью, поддерживая температуру на уровне 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C или 40 °C или температуру, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями температуры. В некоторых альтернативных

вариантах дополнительное множество сред находится в контакте с плацентой или ее частью, поддерживая температуру на уровне 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C или 40 °C или температуру, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями.

[00149] В некоторых альтернативных вариантах первая, вторая, третья среда или дополнительное множество сред содержат антибиотики.

[00150] В некоторых альтернативных вариантах экзосомы выделяют из указанных первой, второй и/или третьей фракций или множества фракций способом, включающим в себя:

(a) прохождение первой, второй и/или третьей фракций или множества фракций через тканевый фильтр;

(b) выполнение первого центрифугирования фильтрата, собранного на этапе (a), с получением клеточного осадка и первого супернатанта;

(c) выполнение второго центрифугирования первого супернатанта с получением второго супернатанта; и

(d) выполнение третьего центрифугирования второго супернатанта с получением осадка экзосом; и необязательно

(e) ресуспендирование экзосом в растворе.

[00151] В некоторых альтернативных вариантах популяция выделенных экзосом содержит экзосомы, содержащие CD63, CD63-A, перфорин, Fas, TRAIL или гранзим В или их комбинацию. В некоторых альтернативных вариантах популяция выделенных экзосом содержит экзосомы, которые содержат сигнальную молекулу. В некоторых альтернативных вариантах популяция выделенных экзосом содержит экзосомы, которые содержат цитокины, мРНК или микроРНК.

[00152] В некоторых альтернативных вариантах способ дополнительно включает в себя выделение экзосом с помощью аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является селективной в отношении удаления экзосом, содержащих вирусные антигены, вирусные белки, бактериальные антигены, бактериальные белки, антигены грибка или белки грибка.

[00153] В некоторых альтернативных вариантах способ дополнительно включает в себя выделение экзосом с помощью альтернативной или дополнительной стадии аффинной хроматографии, причем альтернативная или дополнительная стадия аффинной хроматографии является селективной в отношении удаления экзосом, содержащих воспалительные белки. В некоторых альтернативных вариантах способ дополнительно включает в себя обогащение популяции экзосом, содержащих противовоспалительные биомолекулы.

[00154] В некоторых альтернативных вариантах предложены экзосомы, полученные с помощью любого из вариантов осуществления в настоящем документе. В некоторых альтернативных вариантах экзосомы происходят из асцитной жидкости, крови или плазмы. В некоторых альтернативных вариантах экзосомы происходят из клеток

органа. В некоторых альтернативных вариантах экзосомы происходят из иммунных клеток. В некоторых альтернативных вариантах экзосомы происходят из Т-клеток или В-клеток.

[00155] Специалистам в данной области техники будет понятно, что в целом термины, используемые в настоящем документе, и особенно в прилагаемой формуле изобретения (например, пунктах прилагаемой формулы изобретения), как правило, предназначены для обозначения «открытых» терминов (например, термин «включая» следует понимать как «включая без ограничения», термин «имеет» - как «имеет по меньшей мере», термин «включает в себя» - как «включает в себя, но не ограничивается ими» и т. д.). Также специалистам в данной области техники будет понятно, что если подразумевается конкретное число перечислений в указанных пунктах формулы изобретения, подобное намерение будет явно указано в этом пункте, а в случае отсутствия такого перечисления - подобное намерение отсутствует. Например, для облегчения понимания, в приведенных ниже пунктах прилагаемой формулы изобретения могут использоваться вступительные фразы «по меньшей мере один» и «один или более» с целью ввести перечисление. Однако использование таких фраз не следует воспринимать как означающее, что указание перечислений в пункте с помощью неопределенных форм единственного числа ограничивает какой-либо конкретный пункт, содержащий подобное перечисление, вариантами осуществления, содержащими только одно подобное перечисление, даже когда этот же пункт содержит вступительные фразы «один или более» или «по меньшей мере один» и неопределенные формы единственного числа (например, неопределенные формы единственного числа следует понимать как такие, которые означают «по меньшей мере один» или «один или более»); то же самое является верным в отношении применения определенных форм единственного числа, используемых для указания перечислений в пунктах. Кроме того, даже если явно указано конкретное число перечислений в указанных пунктах формулы изобретения, специалистам в данной области техники будет понятно, что подобное перечисление следует понимать как такое, которое означает по меньшей мере перечисленное количество (например, простое упоминает «двух перечислений» без других определений означает по меньшей мере два перечисления или два или более перечислений). Более того, в тех случаях, когда используется формулировка, аналогичная «по меньшей мере один из А, В и С и т. д.», как правило, такая конструкция предполагает, что специалисту в данной области техники будет понятна эта формулировка (например, «система, имеющая по меньшей мере один из А, В и С» будет включать в себя без ограничения систему, которая имеет отдельно А, отдельно В, отдельно С, А и В вместе, А и С вместе, В и С вместе и/или А, В и С вместе и т. д.). В тех случаях, когда используется формулировка, аналогичная «по меньшей мере один из А, В или С и т. д.», как правило, такая конструкция предполагает, что специалисту в данной области техники будет понятна эта формулировка (например, «система, имеющая по меньшей мере один из А, В или С» будет включать в себя без ограничения систему, которая имеет отдельно А, отдельно В, отдельно С, А и В вместе, А и С вместе, В

и С вместе и/или А, В и С вместе и т. д.). Специалистам в данной области техники также будет понятно, что практически любое разделительное слово и/или фразу, представляющие два или более альтернативных термина, будь то в описании, пунктах формулы изобретения или рисунках, следует понимать как такие, которые предусматривают возможности включения одного из терминов, одного из двух терминов или оба термина. Например, фразу «А или В» следует понимать как такую, которая включает в себя следующие возможности: «А», или «В», или «А и В».

6. Примеры

6.1. Пример 1. Культивирование плаценты человека.

[00156] Плаценту человека получают и промывают стерильным ФСБ или солевым раствором для удаления крови. Плаценту затем культивируют в сосудах как цельный орган в большом контейнере с объемом 500 мл или 1000 мл культуральной среды DMEM, дополненной антибиотиками и 2 mM EDTA. В другом альтернативном варианте плаценту могут разрезать на части разного размера и поместить в контейнер с культурой. Культивирование происходит при 37°C в инкубаторе для клеточных культур с 5% CO₂. Время культивирования составляет от 4 часов до 8 часов, и супернатант культуры используют для выделения экзосом. Новые среды добавляют в каждый момент времени сбора (например, каждые 8 часов или каждые 12 часов) и плацентарный орган и ткань культивируют в течение периода по меньшей мере до 5 дней.

6.2. Пример 2. Выделение и очистка плацентарных экзосом

[00157] Супернатант культуры центрифугируют при 3 000g в течение 30 минут для осаждения клеточного и тканевого дебриса. Супернатант затем центрифугируют при 10 000 g в течение 1 часа, а осадок (небольшой клеточный дебрис и органеллы) удаляют. Супернатант затем центрифугируют при 100 000 g в течение 2 часов. Полученный осадок является экзосомами. Экзосомный осадок можно дополнительно очищать с помощью приведенного ниже способа: ресуспендировать с различными объемами ФСБ и центрифугировать снова при 100 000 в течение 2 часов, а конечный осадок затем ресуспендировать стерильным ФСБ. Ресуспендированные экзосомы фильтруют через шприцевый фильтр (0,2 мкм) аликвотами при -80°C в различных объемах от 300 мкл до 1 мл.

[00158] Плацентарные экзосомы характеризуются по размеру. Распределение по размеру анализируют с помощью анализа отслеживания наночастиц. Измеряли размер трех репрезентативных образцов рЕхо, используя NanoSight. Средний размер каждого изолята составляет 117, 101 и 96, соответственно, что соответствует зарегистрированному размеру экзосом. Результаты показаны на ФИГ. 2А - ФИГ. 2С.

6.3. Пример 3. Маркеры рЕхо с помощью анализа FACS

[00159] Белковые маркеры рЕхо были проанализированы с помощью набора MACSPlex Exosome Kit (Miltenyi Biotec, № по кат. 130-108-813) согласно протоколу, предоставленному в наборе. Вкратце, 120 мкл изолятов рЕхо инкубировали с 15 мкл захватывающих экзосомы гранул в течение ночи при комнатной температуре. После

однократного промывания 1 мл раствора для промывания экзосомы инкубировали со смесью реагентов для обнаружения экзосом CD9, CD63 и CD81 и инкубировали в течение дополнительного 1 часа. После двух промываний образцы анализировали с помощью FACS (BD Canto 10). В этом наборе всего имеется 37 белковых маркеров (таблица 1), за исключением контроля mIgG1 и REA.

Таблица 1. Перечень белковых маркеров, используемых для обнаружения рЕхо в наборе MACSPlex Exosome Kit

№.	Антитело	Изотип	№.	Антитело	Изотип
22	CD3	mIgG2a	65	CD81	REA
23	CD4	mIgG2a	66	MSCP	mIgG1
24	CD19	mIgG1	67	CD146	mIgG1
32	CD8	mIgG2a	68	CD41b	REA
33	HLA-DRDPDQ	REA	74	CD42a	REA
34	CD56	REA	75	CD24	mIgG1
35	CD105	mIgG1	76	CD86	mIgG1
42	CD2	mIgG2b	77	CD44	mIgG1
43	CD1c	mIgG2a	78	CD326	mIgG1
44	CD25	mIgG1	79	CD133/1	mIgG1к
45	CD49e	mIgG2b	85	CD29	mIgG1к
46	ROR1	mIgG1к	86	CD69	mIgG1к
52	CD209	mIgG1	87	CD142	mIgG1к
53	CD9	mIgG1	88	CD45	mIgG2a
54	SSEA-4	REA	89	CD31	mIgG1
55	HLA-ABC	REA	96	REA контроль	REA
56	CD63	mIgG1к	97	CD20	mIgG1
57	CD40	mIgG1к	98	CD14	mIgG2a
63	CD62P	REA	99	mIgG1 контроль	mIgG1
64	CD11c	mIgG2b			

[00160] Было обнаружено, что образцы рЕхо являются высоко положительными на следующие белковые маркеры, включая CD1c, CD9, CD20, CD24, CD25, CD29, CD2, CD3, CD8, CD9, CD11c, CD14, CD19, CD31, CD10, CD41b, CD42a, CD44, CD45, CD19c, CD4, CD15, CD19c, CD4, CD56, CD62P, CD83, CD69, CD81, CD86, CD105, CD133-1, CD142, CD148, HLA-ABC, HLA-DRDPDQ, MSCP, ROR1, SSEA-4. рЕхо имеет очень низкий уровень (2,6%) для CD209. Перфузат плаценты человека, получаемый путем перфузии сосудистой сети плаценты солевым раствором без культивирования со средой и в инкубаторе для клеточных культур, также использовали для выделения экзосом и анализировали с помощью аналогичных способов для экспрессии белковых маркеров.

Полученные из перфузата экзосомы также экспрессируют высокие уровни большинства маркеров, обнаруживаемых в рЕхо, однако имеют значительно более низкие уровни CD11c (2,0%), MSCP (3,4%) и SSEA-4 (3,5%) по сравнению с рЕхо. рЕхо также имеет значительно более высокие уровни CD142 и CD81 по сравнению с экзосомами плацентарного перфузата. Сыворотку пуповинной крови также использовали для выделения экзосом и анализировали с помощью аналогичных методов для экспрессии белковых маркеров. Экзосомы, полученные из сыворотки пуповинной крови, также являются положительными на большинство белковых маркеров, однако, как правило, демонстрируют более низкие уровни экспрессии каждого из этих белковых маркеров. В частности, если сравнивать с рЕхо, экзосомы сыворотки пуповинной крови имеют более низкие уровни CD56 (1,4%), CD3 (0,3%) и CD25 (3,9%). Экспрессия белков SSEA-4 и MSCP в сыворотке пуповинной крови значительно более низкая, чем у рЕхо, однако выше, чем у экзосом плацентарного перфузата. Экзосомы сыворотки пуповинной крови также имеют более высокие уровни белка MSCP по сравнению с рЕхо. Эти данные указывают на то, что из ткани культивированной плаценты можно получить уникальную популяцию экзосом по сравнению с некультивированной плацентой и сывороткой пуповинной крови. Результаты для образцов рЕхо в сравнении с экзосомами сыворотки пуповинной крови и экзосомами плацентарного перфузата показаны на ФИГ. 3А - ФИГ. 3С и в таблице 2.

Таблица 2

Средняя экспрессия (%) белковых маркеров в экзосомах из трех разных источников

Маркеры	Культивированная плацента (N=12)	Плацентарный перфузат (N=4)	Сыворотка пуповинной крови (N=4)
CD1c	9,80%	25,30%	15,60%
CD20	12,80%	10,80%	11,40%
CD24	61,90%	84,20%	12,50%
CD25	29,20%	26,50%	3,90%
CD29	69,80%	82,20%	11,20%
CD2	49,80%	67,20%	10,90%
CD3	12,00%	14,60%	0,40%
CD8	64,90%	86,90%	14,40%
CD9	66,20%	80,40%	10,40%
CD11c	37,90%	2,00%	11,50%
CD14	67,20%	29,50%	15,60%
CD19	29,30%	80,90%	8,90%

CD31	61,50%	81,50%	13,40%
CD40	67,30%	81,10%	15,60%
CD41b	64,70%	82,40%	12,50%
CD42a	66,10%	84,60%	13,00%
CD44	66,20%	86,30%	15,60%
CD45	24,70%	23,50%	6,20%
CD49e	60,60%	82,00%	15,30%
CD4	58,60%	77,40%	15,10%
CD56	24,20%	14,40%	1,40%
CD62P	64,10%	87,20%	15,60%
CD63	64,90%	81,10%	10,20%
CD69	58,20%	65,80%	11,90%
CD81	56,40%	84,40%	15,60%
CD86	39,50%	17,30%	10,90%
CD105	53,60%	30,40%	10,00%
CD133-1	64,60%	44,20%	12,00%
CD142	67,80%	11,60%	13,30%
CD146	70,00%	79,40%	11,50%
CD209	2,60%	0%	9,70%
CD326	66,70%	75,50%	6,80%
HLA-ABC	64,60%	82,30%	13,70%
HLA-	60,80%	83,30%	12,80%
DRDPDQ			
MCSP	44,60%	3,40%	8,10%
ROR1	64,20%	86,20%	14,40%
SSEA-4	58,80%	3,50%	10,80%

6.4. Пример 4. Цитокины и факторы роста в образцах рЕхо

[00161] Образцы рЕхо были проанализированы на содержание в них цитокинов с помощью набора MiltiPlex Lumiplex, который содержит 41 различных цитокин. В таблицах ниже представлены данные по цитокинам, обнаруженным в 15 различных составах рЕхо. Данные показывают, что рЕхо содержит значительный уровень цитокинов (среднее значение > 50 пг/мл), включая FGF2, G-CSF, фракталкин, GDGF-AA/BB, GRO, IL-1RA, IL-8, VEGF и RANTES. рЕхо также содержит обнаруживаемые уровни цитокинов (от 5 пг/мл до 49 пг/мл), включая EGF, Flt-3L, IFNa3, MCP-3, PDGF-AA, IL-15, sCD40L, IL6, IP-10, MCP-1, MIP-альфа, MIP-1бета и TNF-альфа.

Таблица 3. Цитокины, обнаруженные в составах рЕхо

ID образца (Табл. 11)	EGF	FGF-2	Eomir	GF-a	G-CSF	Flt3L	GM-CSF	Fractalkine	Fhs2	Fhs	GRO	L-10	MCP-3	L-12P40
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
3074-E1	2.79	17.11	3.77	<-0.55	249.95	1.57	0.49	40.25	7.1	0.61	40.44	0.59	5.87	<-0.74
3315-E1	4.41	290.32	8.47	<-0.55	54.69	6.83	1.12	83.56	11.3	1.2	108.91	<-0.57	4.32	<-0.74
941-E1	1.59	17.11	<-3.20	<-0.55	95.52	<-0.62	<-0.42	17.65	2.22	0.87	6.6	0.7	0.85	<-0.74
941-E2	1.59	12.35	<-3.20	<-0.55	141.85	<-0.62	0.45	22.66	5.19	1.01	6.6	0.62	1.59	<-0.74
955-E1	4.83	95.94	3.25	0.68	441.69	3.74	1.9	83.95	7.83	1.54	35.15	1.21	5.57	<-0.74
995-E2	12.76	120.55	11.42	2.03	257.84	5.42	2.2	227.72	13.81	1.93	102.16	1.63	4.32	266
995-E3	5	30.09	7.45	<-0.55	247.34	8.21	1.81	110.13	28.61	4.22	17.13	1.11	<-0.35	273
366-E2	6.18	359.37	6.56	1.27	343.71	12.73	1.71	197.68	7.35	1.46	103	2.33	9.97	196
405-E2	9.78	315.85	8.72	1.64	145.99	13.34	1.74	335.31	9.06	0.61	114.73	1.98	9.46	128
405-E3	7.91	225.62	6.29	0.84	179.5	4.95	1.53	225.33	7.47	0.48	95.85	1.21	6.75	173
352-E1	6.18	506.7	7.1	0.92	45.57	22.98	1.78	335.31	14.81	1.91	139.65	1.86	11.19	413
352-E2	5.16	483.27	6.29	0.78	72.77	15.12	1.38	251.85	10.68	1.31	109.75	1.14	5.57	221
789-E1	13.48	20.05	7.45	2.29	115.35	<-0.62	0.98	123.45	5.19	<-0.45	35.51	1.35	3	15
789-E2	5.72	24.95	5.83	<-0.55	159.05	1.1	1.56	61.1	4.16	0.94	24.95	0.88	5.87	<-0.74
313-E3	3.72	27.55	4.97	<-0.55	57.57	<-0.62	0.7	77.5	20.54	1.82	7.44	0.85	<-0.35	<-0.74
	EGF	FGF-2	Eomir	GF-a	G-CSF	Flt3L	GM-CSF	Fractalkine	Fhs2	Fhs	GRO	L-10	MCP-3	L-12P40
Mean	6.07	167.39	6.74	1.31	175.86	8.73	1.38	149.74	10.33	1.42	63.53	1.23	5.72	228
SD	3.6	121.0	2.1	0.6	114.3	6.7	0.5	115.0	6.9	0.9	47.8	0.5	3.1	0.9

ID образца (Табл. 12)	MDC	L-12P70	PDGF-AA	L-13	PDGF-ABBB	L-15	sCD40L	L-17A	IL-1RA	L-1a	L-9	L-1b	L-2	L-3
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
3074-E1	8.33	<-0.71	3.95	1.3	205.83	2.19	0.81	0.41	10.57	0.77	0.87	0.48	<-0.42	<-0.31
3315-E1	<-7.64	1.12	14.16	202	314.97	8.37	0.74	0.39	124.57	0.53	1.29	0.65	<-0.42	<-0.31
941-E1	<-7.64	<-0.71	1.41	101	35.31	0.95	1.5	<-0.35	9.47	0.39	0.35	1.23	<-0.42	<-0.31
941-E2	<-7.64	<-0.71	3.59	0.97	98.37	1.2	0.81	0.45	3.48	0.69	0.62	7	<-0.42	<-0.31
955-E1	<-7.64	0.94	8.45	1.59	127	3.76	3.94	0.64	51.53	2.02	0.65	0.79	<-0.42	<-0.31
995-E2	857	3.07	215	4.25	505.7	4.66	25.66	0.95	92.19	2.7	1.84	8.2	<-0.42	<-0.31
995-E3	1162	1.65	125	3.9	317.14	3.72	2.05	0.95	15.85	2.09	2.92	3.37	0.53	0.51
366-E2	1946	1.65	23.19	149	439.81	8.44	22.25	0.9	110.52	2.55	0.99	1.39	<-0.42	0.37
405-E2	4551	3.2	26.94	149	510.45	12.35	23.9	0.5	116.59	1.6	1.08	1.29	<-0.42	<-0.31
405-E3	24.28	1.16	18.87	128	335.8	10.21	10.81	<-0.35	90.59	1.12	0.84	1.68	<-0.42	<-0.31
352-E1	27.1	3.2	33.76	204	492.97	33.13	18.13	1.01	159.21	2.48	1.49	1.5	0.45	<-0.31
352-E2	1483	2.14	28.14	121	442.07	23.78	11.72	0.95	107.51	1.87	1.18	1.38	<-0.42	<-0.31
789-E1	<-7.64	1.86	7.02	161	192.21	2.19	10.47	0.77	91.16	1.71	0.78	0.39	<-0.42	<-0.31
789-E2	975	1.97	9.3	103	210.25	1.8	0.94	0.64	15.85	1.25	0.91	0.64	<-0.42	<-0.31
313-E3	<-7.64	0.94	5.01	289	167.09	0.95	<-0.35	0.85	<-1.20	1.05	2.93	0.35	<-0.42	0.42
	MDC	L-12P70	PDGF-AA	L-13	PDGF-ABBB	L-15	sCD40L	L-17A	IL-1RA	L-1a	L-9	L-1b	L-2	L-3
Mean	1824	1.91	14.13	187	292.69	7.84	9.11	0.73	72.69	1.12	1.26	2.02	0.49	0.43
SD	12.2	0.8	10.2	1.0	159.1	9.3	9.5	0.2	52.9	0.8	0.8	2.4	0.1	0.1

ID образца (Табл. 13)	L-4	L-5	L-6	L-7	L-8	L-10	MCP-1	MIP-1a	MIP-1b	RANTES	TNFa	TNFB	VEGF
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
3074-E1	<3.20	<0.21	2.92	2.9	72.88	7.5	17.08	2.24	1.51	143.77	5.64	0.41	21.6
3315-E1	<3.20	<0.21	6.3	6.2	215.72	27.63	85.9	11.98	6.27	252.91	2.1	0.44	58.06
941-E1	<3.20	0.27	1.15	1.45	6.06	<1.30	1.67	<1.31	40.55	45.16	2.67	0.49	39.7
941-E2	<3.20	<0.21	1.48	5.54	6.6	<1.30	1.53	1.48	0.89	30.32	16.56	0.58	43.8
955-E1	<3.20	0.27	9.07	5.6	55.25	47.16	20.48	2.95	2.99	396.33	25.6	0.59	59.12
995-E2	<3.20	0.22	20.55	10.12	192.31	14.05	63.62	13.25	3.74	448.2	23.97	0.41	51.96
995-E3	<3.20	1.59	10.05	6.49	60.01	8.73	11.42	6.76	1.51	253.63	16.15	0.58	106.17
366-E2	5.54	0.47	15.93	4.55	103.91	101.77	71.51	21.83	11.8	241.3	5.41	1.73	64.19
405-E2	4.01	0.38	17.02	5	135.03	92.1	99.23	26.81	16.62	248.3	6.55	0.97	54.71
405-E3	<3.20	0.32	13.3	5.6	159.16	53.34	59.98	27.54	17.63	163.5	5.82	0.73	44.31
352-E1	6.05	0.45	24.21	7.24	167.95	155.43	138.25	9.99	6.19	300.0	5.29	1.12	67.45
352-E2	<3.20	0.38	16.92	5.4	198.93	89.91	103.45	12.06	6.69	241.5	2.96	0.76	62.53
789-E1	<3.20	0.36	2.62	5.01	17.55	5.64	8.44	1.82	0.65	639.52	7.26	0.55	24.19
789-E2	<3.20	0.27	5.89	2.65	64.19	4.65	8.74	3.7	1.04	417.14	5.5	0.52	22.25
313-E3	<3.20	0.61	1.11	10.52	6.32	3.87	4.2	3.33	0.63	169.04	5.83	0.52	60.41
	L-4	L-5	L-6	L-7	L-8	L-10	MCP-1	MIP-1a	MIP-1b	RANTES	TNFa	TNFB	VEGF
Mean	5.21	0.45	10.02	5.22	97.12	45.97	46.37	19.55	5.86	1255.74	8.89	0.68	51.95
SD	1.1	0.3	7.8	2.5	74.1	49.1	45.2	9.4	5.9	1390.0	7.8	0.4	21.4

[00162] pExo (11 образцов) были также проанализированы на присутствие растворимых рецепторов цитокинов с помощью анализа Multiplex Luminex. Данные представлены в следующей таблице. Данные показывают, что pExo содержит высокие

уровни (> 100 пг/мл) sEGFR, sgp-130, sIL-1R1, sTNFR1, sTNFR2, sVEGFR1, sVEGFR3 и sCD30, sIL-2Ra, sIL-6R, sRAGE также обнаруживают в некоторых образцах (> 10 нг/мл). Данные, отмеченные «<», не были обнаружены и считаются отрицательными.

Таблица 4

Растворимые рецепторы цитокинов в плацентарных экзосомах															
Положение	рЕхо образца	sCD30	sEGFR	sgp-130	sIL-1R1	sIL-1RI	sIL-2Ra	sIL-4R	sIL-6R	sRAGE	sTNFR1	sTNFR2	sVEGFR1	sVEGFR2	sVEGFR3
		pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
E3	98E1	11.76	966	336.15	<12.67	<35.04	85	<39.19	10.34	29.49	90.11	14.82	656	75.84	452.01
F3	38E1	<6.77	355	209.91	<12.67	<35.04	<5.97	<39.19	9.78	8.23	29.88	<12.55	299	<70.39	477
IC4	94E2	11.41	56.01	132.85	<12.67	<35.04	657	<39.19	2.85	11.2	34.07	19.66	4929	<70.39	119.96
F4	94E1	8.03	>100047	83.03	<12.67	<35.04	<5.97	<39.19	3.65	7.57	25.57	<12.55	80.42	<70.39	56.61
IS	40E1	12.84	583	231.6	<12.67	205.01	11.6	<39.19	197.38	17.05	253.83	365.51	15.09	436.1	64.11
IS	38E1	9.34	1444	28.6	<12.67	25.03	21.23	<39.19	232.91	26.43	32.4	531.01	1383	419.7	101.75
IS	38E2	19.12	1057	4461	<12.67	337.31	17.39	<39.19	172.5	19.44	249.47	308.79	1904	1378	86.38
IS	33E1	14.68	7884	4108	<12.67	474.46	16.39	<39.19	183.25	13.31	297.87	473.55	1638	908.98	64.11
IS	78E1	<6.77	2337	174.96	<12.67	<35.04	<5.97	<39.19	7.18	11.93	3.66	15.44	3144	<70.39	273.08
F6	78E2	<6.77	249	20.92	<12.67	<35.04	<5.97	<39.19	6.55	9.86	19.33	<12.55	80.66	<70.39	56.2
IC7	78E3	<6.77	2149	197.21	<12.67	<35.04	<5.97	<39.19	4.05	6.12	15.19	<12.55	9180	<70.39	53.33
	Mean	12.45	13552.50	1365.64	NA	314.45	13.68	NA	75.53	14.60	124.21	249.83	8331.95	643.63	125.95
	SD	3.66	16858.13	1725.87	NA	117.87	5.70	NA	97.06	7.72	127.23	231.22	6238.32	506.33	128.64
IS	QC1	465.86	208	412.75	418.39	1948	420.7	310.54	138.73	252.82	301.08	210.06	4989	1884	1921
IC3	QC2	4219	18134	4012	4030	1720.0	4021	2290	1985	265	2013	2005	18121	15711	1802

6.5. Пример 5. Протеомный анализ плацентарных экзосом

[00163] Три образца рЕхо подвергались протеомному анализу. Представленные образцы лизировали, используя ультразвуковой зонд (QSonica) со следующими настройками: амплитуда 40%, импульс 10х 1 секунда вкл., 1 секунда выкл. Концентрацию белка определяли с помощью флуориметра Qubit. 10 мкг каждого образца обрабатывали ДСН/ПААГ и очищенные белки подвергали расщеплению трипсином. В таблице 5 показан общий белок, идентифицированный в каждом образце. В этих образцах всего было идентифицировано 1814 белков. В таблице 6 показана идентификация и идентификатор генов для наиболее часто идентифицируемых белков в образцах рЕхо. Дополнительные данные показаны на ФИГ. 4 и ФИГ. 5.

Таблица 5

	32112	32113	32114
Общее количество идентифицированных белков	1313	1130	1362
Общее количество соотв. спектров	22408	20850	23248
Общее количество уникальных белков	12014	10761	13380

Таблица 6

Идентифицированные белки (1814) с

Средняя

помощью протеомики в

Номер доступа

относительная

плацентарных экзосомах

распространенность

Цитоплазматическая аконитатгидратаза spIP21399|ACOC_HU

145

OS=Homo sapiens GN=ACO1 PE=1 SV=3	MAN	
Гликопротеин клеточной поверхности MUC18 OS=Homo sapiens GN=MCAM PE=1 SV=2	splP43121 MUC18_HUMAN	131
Белок аргинин N-метилтрансферазы 1 OS=Homo sapiens GN=PRMT1 PE=1 SV=2	splQ99873 ANM1_HUMAN	119
Изоформы гуаниннуклеотид-связывающего белка G субъединицы альфа XLas OS=H sapiens GN=GNAS PE=1 SV=2	splQ5JWF2 GNAS1_HUMAN	99
Куллин-5 OS=Homo sapiens GN=CUL5 PE=1 SV=4	splQ93034 CUL5_HUMAN	91
Кальций-связывающий белок 39 OS=Homo sapiens GN=CAB39 PE=1 SV=1	splQ9Y376 CAB39_HUMAN	83
Глюкозидаза 2 субъединица бета OS=Homo sapiens GN=PRKCSH PE=1 SV=2	splP14314 GLU2B_HUMAN	72
Белок внутриклеточного хлоридного канала 5 OS=Homo sapiens GN=CLIC5 PE=1 SV=3	splQ9NZA1 CLIC5_HUMAN	72
Семафорин-3B OS=Homo sapiens GN=SEMA3B PE=2 SV=1	splQ13214 SEM3B_HUMAN	72
60S рибосомальный белок L22 OS=Homo sapiens GN=RPL22 PE=1 SV=2	splP35268 RL22_HUMAN	72
Сплайсингосомная РНК-геликаза DDX39B OS=Homo sapiens GN=DDX39B PE=1 SV=1	splQ13838 DX39B_HUMAN	71
Транскрипционный активаторный белок Pur-alpha OS=Homo sapiens GN=PURA PE=1 SV=2	splQ00577 PURA_HUMAN	68
Белок запрограммированной гибели	splQ9BUL8 PDC10_	66

клетки	10	OS=Homo sapiens	HUMAN	
GN=PDCD10 PE=1 SV=1				
Белок BROX, содержащий домен BRO1			sp Q5VW32 BROX_	
OS=Homo sapiens GN=BROX PE=1			HUMAN	66
SV=1				
Кинуренин-оксоглутарат трансаминаза			sp Q6YP21 KAT3_H	
3 OS=Homo sapiens GN=KYAT3 PE=1			UMAN	65
SV=1				
Ламинин субъединица альфа-5			sp O15230 LAMA5_	
OS=Homo sapiens GN=LAMA5 PE=1			HUMAN	64
SV=8				
Представитель 1 подсемейства E АТФ-связывающей кассеты			sp P61221 ABCE1_H	
OS=Homo sapiens GN=ABCE1 PE=1 SV=1			UMAN	61
Синтаксин-связывающий белок 3			sp O00186 STXB3_H	
OS=Homo sapiens GN=STXBP3 PE=1			UMAN	60
SV=2				
Протеасома субъединица бета типа-7			sp Q99436 PSB7_HU	
OS=Homo sapiens GN=PSMB7 PE=1			MAN	60
SV=1				
Гликоген [крахмал] синтаза, мышцы			sp P13807 GYS1_HU	
OS=Homo sapiens GN=GYS1 PE=1 SV=2			MAN	59
НАД(Ф)Н-гидрат эпимераза			sp Q8NCW5 NNRE_	
OS=Homo sapiens GN=NAXE PE=1 SV=2			HUMAN	59
Гипоксия-активированный белок 1			sp Q9Y4L1 HYOU1_	
OS=Homo sapiens GN=HYOU1 PE=1			HUMAN	57
SV=1				
Фактор свертывания крови XI			sp P03951 FA11_HU	
OS=Homo sapiens GN=F11 PE=1 SV=1			MAN	57
Гистон H1.0			sp P07305 H10_HUM	
OS=Homo sapiens GN=H1F0 PE=1 SV=3			AN	56
Субъединица 4 сигнасомы COP9			sp Q9BT78 CSN4_H	
OS=Homo sapiens GN=COPS4 PE=1			UMAN	56
SV=1				
40S рибосомальный белок S15a			sp P62244 RS15A_H	56

OS=Homo sapiens GN=RPS15A PE=1 SV=2	UMAN	
Белок ABHD11 OS=Homo sapiens GN=ABHD11 PE=1 SV=1	sp Q8NFV4 ABHDB_HUMAN	54
Ретинол-дегидрогеназа 1 OS=Homo sapiens GN=ALDH1A1 PE=1 SV=2	sp P00352 AL1A1_HUMAN	53
ГДФ-маннозо-4,6-дегидратаза OS=Homo sapiens GN=GMDS PE=1 SV=1	sp O60547 GMDS_HUMAN	53
Кетозамин-3-киназа OS=Homo sapiens GN=FN3KRP PE=1 SV=2	sp Q9HA64 KT3K_HUMAN	53
Белковая/нуклеинокислотная дегликаза DJ-1 OS=Homo sapiens GN=PARK7 PE=1 SV=2	sp Q99497 PARK7_HUMAN	52
Нектин-4 OS=Homo sapiens GN=NECTIN4 PE=1 SV=1	sp Q96NY8 NECT4_HUMAN	51
Cdc42-взаимодействующий белок 4 OS=Homo sapiens GN=TRIP10 PE=1 SV=3	sp Q15642 CIP4_HUMAN	50
WD повтор-содержащий белок 61 OS=Homo sapiens GN=WDR61 PE=1 SV=1	sp Q9GZS3 WDR61_HUMAN	49
Гликопротеин CD59 OS=Homo sapiens GN=CD59 PE=1 SV=1	sp P13987 CD59_HUMAN	47
Глицин-дегидрогеназа (декарбоксилирование), митохондриальная OS=Homo sapiens GN=GLDC PE=1 SV=2	sp P23378 GCSP_HUMAN	46
Гуаниннуклеотид-связывающий белок, субъединица альфа-11 OS=Homo sapiens GN=GNA11 PE=1 SV=2	sp P29992 GNA11_HUMAN	43
Серпин H1 OS=Homo sapiens GN=SERPINH1 PE=1 SV=2	sp P50454 SERPH_HUMAN	42
Альфа-2-антиплазмин OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3	sp P08697 A2AP_HUMAN	42

Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU PE=1 SV=6	splQ00839 HNRPU_H UMAN	42
40S рибосомальный белок S11 OS=Homo sapiens GN=RPS11 PE=1 SV=3	splP62280 RS11_HU MAN	41
3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназа, тип-2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B10 PE=1 SV=3	splQ99714 HCD2_HU MAN	41
SH3 домен-связывающий, богатый глутаминовой кислотой белок- подобный 3 OS=Homo sapiens GN=SH3BGRL3 PE=1 SV=1	splQ9H299 SH3L3_H UMAN	40
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин Q OS=Homo sapiens GN=SYNCRIP PE=1 SV=2	splO60506 HNRPQ_H UMAN	40
Протеогликан костного мозга OS=Homo sapiens GN=PRG2 PE=1 SV=2	splP13727 PRG2_HU MAN	39
Лизосомальная альфа-глюкозидаза OS=Homo sapiens GN=GAA PE=1 SV=4	splP10253 LYAG_HU MAN	39
Маннансвязывающая лектин- ассоциированная сериновая протеаза 1 OS=Homo sapiens GN=MASP1 PE=1 SV=3	splP48740 MASP1_H UMAN	38
Тубулин альфа-1A цепь OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1	splQ71U36 TBA1A_ HUMAN	37
Антиген CD97 OS=Homo sapiens GN=CD97 PE=1 SV=4	splP48960 CD97_HU MAN	35
V-образная протонная АТФаза субъединица В, мозговая изоформа OS=Homo sapiens GN=ATP6V1B2 PE=1 SV=3	splP21281 VATB2_H UMAN	35
Белок 5A, содержащий домен типа А фактора фон Виллебранда OS=Homo sapiens GN=VWA5A PE=2 SV=2	splO00534 VMA5A_ HUMAN	34

Интегрин альфа-3 OS=Homo sapiens GN=ITGA3 PE=1 SV=5	splP26006 ITA3_HUMAN	34
Лейцин-тРНК лигаза, цитоплазматическая OS=Homo sapiens GN=LARS PE=1 SV=2	splQ9P2J5 SYLC_HUMAN	34
Пептидил-пролил-цис-транс-изомераза FKBP3 OS=Homo sapiens GN=FKBP3 PE=1 SV=1	splQ00688 FKBP3_HUMAN	33
GTP-связывающий белок SAR1a OS=Homo sapiens GN=SAR1A PE=1 SV=1	splQ9NR31 SAR1A_HUMAN	33
Ras-связанный белок Rab-10 OS=Homo sapiens GN=RAB10 PE=1 SV=1	splP61026 RAB10_HUMAN	33
Вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина 3-30 OS=Homo sapiens GN=IGHV3-30 PE=1 SV=2	splP01768 HV330_HUMAN (+1)	32
Убиквитин карбоксил-терминальная гидролаза 14 OS=Homo sapiens GN=USP14 PE=1 SV=3	splP54578 UBP14_HUMAN	32
Митохондриальная процессинговая пептидаза субъединица бета OS=Homo sapiens GN=PMPCB PE=1 SV=2	splO75439 MPPB_HUMAN	31
Лейцил-цистинил-аминопептидаза OS=Homo sapiens GN=LNPEP PE=1 SV=3	splQ9UIQ6 LCAP_HUMAN	31
Серин/треонин-протеинкиназа 10 OS=Homo sapiens GN=STK10 PE=1 SV=1	splO94804 STK10_HUMAN	31
Белок MON2 гомолог OS=Homo sapiens GN=MON2 PE=1 SV=3	splQ7Z3U7 MON2_HUMAN	31
Компонент комплемента C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2	splP02748 C9_HUMAN	31
Белок теплового шока бета-6 OS=Homo sapiens GN=HSPB6 PE=1 SV=2	splO14558 HSPB6_HUMAN	31
Компонент комплемента C8 альфа цепь	splP07357 C8A_HUMAN	31

OS=Homo sapiens GN=C8A PE=1 SV=2	MAN	
Белок 37, содержащий тетратрикопептидный повтор OS=Homo sapiens GN=TTC37 PE=1 SV=1	splQ6PGP7 TTC37_H UMAN	30
Гасдермин-Е OS=Homo sapiens GN=GSDME PE=1 SV=2	splO60443 GSDME_ HUMAN	30
Ацил-белок тиоэстеразы 1 OS=Homo sapiens GN=LYPLA1 PE=1 SV=1	splO75608 LYPA1_H UMAN	30
Экспортин-1 OS=Homo sapiens GN=XPO1 PE=1 SV=1	splO14980 XPO1_HU MAN	29
Мембранный кофакторный белок OS=Homo sapiens GN=CD46 PE=1 SV=3	splP15529 MCP_HU MAN	28
Гидроксистероиддегидрогеназа- подобный белок 2 OS=Homo sapiens GN=HSDL2 PE=1 SV=1	splQ6YN16 HSDL2_ HUMAN	28
АТФаза ASNA1 OS=Homo sapiens GN=ASNA1 PE=1 SV=2	splO43681 ASNA_H UMAN	27
Аполипопротеин D OS=Homo sapiens GN=APOD PE=1 SV=1	splP05090 APOD_HU MAN	27
Тирозин-белок киназа Lyn OS=Homo sapiens GN=LYN PE=1 SV=3	splP07948 LYN_HU MAN	27
Эукариотический фактор инициации трансляции 3 субъединица A OS=Homo sapiens GN=EIF3A PE=1 SV=1	splQ14152 EIF3A_H UMAN	27
Гемопексин OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2	splP02790 HEMO_H UMAN	27
Белок цели Myb 1 OS=Homo sapiens GN=TOM1 PE=1 SV=2	splO60784 TOM1_H UMAN	27
Белок 2, содержащий домен EH OS=Homo sapiens GN=EHD2 PE=1 SV=2	splQ9NZN4 EHD2_H UMAN	26
Спектрин-бета цепь, эритроцитарный OS=Homo sapiens GN=SPTB PE=1 SV=5	splP11277 SPTB1_H UMAN	26
L-лактатдегидрогеназа В цепь OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1	splP07195 LDHB_HU MAN	26

SV=2

Префолдин субъединица 2 OS=Homo sapiens GN=PFDN2 PE=1 SV=1	splQ9UHV9 PFD2_HUMAN	26
[Пируватдегидрогеназа[ацетил-переносящая]]-фосфатаза 1, митохондриальная OS=H sapiens GN=PDP1 PE=1 SV=3	splQ9P0J1 PDP1_HUMAN	26
Белок волчаночный антикоагулянт OS=Homo sapiens GN=SSB PE=1 SV=2	splP05455 LA_HUMAN	26
DnaJ гомолог подсемейство B член 1 OS=Homo sapiens GN=DNAJB1 PE=1 SV=4	splP25685 DNJB1_HUMAN	26
Белок 5, повышающий экспрессию рецепторов OS=Homo sapiens GN=REEP5 PE=1 SV=3	splQ00765 REEP5_HUMAN	25
Кальпаин-1 каталитическая субъединица OS=Homo sapiens GN=CAPN1 PE=1 SV=1	splP07384 CAN1_HUMAN	25
2',3'-циклический-нуклеотид 3'-фосфодиэстераза OS=Homo sapiens GN=CNP PE=1 SV=2	splP09543 CN37_HUMAN	25
Миоферлин OS=Homo sapiens GN=MYOF PE=1 SV=1	splQ9NZM1 MYOF_HUMAN	25
Плазменный калликреин OS=Homo sapiens GN=KLKB1 PE=1 SV=1	splP03952 KLKB1_HUMAN	25
Моноцитарный дифференцировочный антиген CD14 OS=Homo sapiens GN=CD14 PE=1 SV=2	splP08571 CD14_HUMAN	24
Golgin подсемейство A член 3 OS=Homo sapiens GN=GOLGA3 PE=1 SV=2	splQ08378 GOGA3_HUMAN	24
Твинфилин-1 OS=Homo sapiens GN=TWF1 PE=1 SV=3	splQ12792 TWF1_HUMAN	24
Эукариотический фактор инициации трансляции 3 субъединица M OS=Homo	splQ7L2H7 EIF3M_HUMAN	23

sapiens GN=EIF3M PE=1 SV=1		
Niban-подобный белок 1 OS=Homo sapiens GN=FAM129B PE=1 SV=3	splQ96TA1 NIBL1_HUMAN	23
Гуаниннуклеотид-связывающий белок G(I)/G(S)/G(T) субъединица бета-1 OS=Homo sapiens GN=GNB1 PE=1 SV=3	splP62873 GBB1_HUMAN	23
Галактозид-связывающий растворимый лектин 13 OS=Homo sapiens GN=LGALS13 PE=1 SV=1	splQ9UHV8 PP13_HUMAN	22
Интегрин бета-1 OS=Homo sapiens GN=ITGB1 PE=1 SV=2	splP05556 ITB1_HUMAN	22
Простагландин Е-синтаза 3 OS=Homo sapiens GN=PTGES3 PE=1 SV=1	splQ15185 TEBP_HUMAN	22
Изолейцин-тРНК лигаза, цитоплазматическая OS=Homo sapiens GN=IARS PE=1 SV=2	splP41252 SYIC_HUMAN	22
бета-1-гликопротеин беременности 1 OS=Homo sapiens GN=PSG1 PE=1 SV=1	splP11464 PSG1_HUMAN	22
Белок плазматической мембраны адипоцита OS=Homo sapiens GN=APMAP PE=1 SV=2	splQ9HDC9 APMAP_HUMAN	22
Белок 93, содержащий суперспиральный домен OS=Homo sapiens GN=CCDC93 PE=1 SV=2	splQ567U6 CCD93_HUMAN	22
Белок транспортный белок Sec31A OS=Homo sapiens GN=SEC31A PE=1 SV=3	splO94979 SC31A_HUMAN	21
Субъединица 3 сигнасомы COP9 OS=Homo sapiens GN=COPS3 PE=1 SV=3	splQ9UNS2 CSN3_HUMAN	21
уридин 5'-монофосфат синтаза OS=Homo sapiens GN=UMPS PE=1 SV=1	splP11172 UMPS_HUMAN	21
Куллин-4B OS=Homo sapiens	splQ13620 CUL4B_H	20

GN=CUL4B PE=1 SV=4	UMAN	
Белок 7, связанный с ВА OS=Homo sapiens GN=LARP7 PE=1 SV=1	splQ4G0J3LARP7_HUMAN	20
Матриксная металлопротеиназа-9 OS=Homo sapiens GN=MMP9 PE=1 SV=3	splP14780MMP9_HUMAN	20
Активатор фактора роста гепатоцитов OS=Homo sapiens GN=HGFA PE=1 SV=1	splQ04756HGFA_HUMAN	20
Субъединица альфа-2 комплекса AP-2 OS=Homo sapiens GN=AP2A2 PE=1 SV=2	splO94973AP2A2_HUMAN	20
Ингибитор протеазы C1 плазмы OS=Homo sapiens GN=SERPING1 PE=1 SV=2	splP05155IC1_HUMAN	20

6.6. Пример 6. Анализ РНК плацентарных экзосом

[00164] Три образца рЕхо анализировали на их профиль РНК путем секвенирования. Вкратце, РНК из образцов рЕхо экстрагировали, преобразовывали в кДНК и секвенировали. Данные секвенирования затем сравнивали с базой данных для идентификации типа и идентификации всех данных секвенирования. В таблице 7 показан общий профиль результатов секвенирования РНК. РНК в рЕхо содержит тРНК, микроРНК и другие категории некодирующей РНК. МикроРНК является второй наиболее распространенной РНК в композиции образцов рЕхо. В этих трех образцах рЕхо идентифицировали в общей сложности 1500 различных микроРНК. Некоторые обычно присутствовали во всех трех образцах, а некоторые уникальным образом присутствовали в одном или двух образцах. Показан идентификатор гена, относительная частота и распространенность наиболее распространенных микроРНК. Известно, что микроРНК играют важную роль в осуществлении межклеточной коммуникации.

Таблица 7

Идентификатор гена	Хромосома	% от общего количества микроРНК
hsa-mir-26b	chr2	6,2606%
hsa-miR-26b-5p	chr2	6,2598%
hsa-mir-26a-2	chr12	4,1329%
hsa-mir-26a-1	chr3	4,1306%
hsa-miR-26a-5p	chr12	4,1306%
hsa-mir-30d	chr8	2,7200%
hsa-miR-30d-5p	chr8	2,7155%

hsa-mir-100	chr11	2,3286%
hsa-miR-100-5p	chr11	2,3186%
hsa-mir-21	chr17	1,5647%
hsa-miR-21-5p	chr17	1,5635%
hsa-mir-22	chr17	1,2528%
hsa-miR-22-3p	chr17	1,2507%
hsa-mir-99b	chr19	1,2358%
hsa-miR-99b-5p	chr19	1,2230%
hsa-mir-181a-2	chr9	1,0593%
hsa-mir-181a-1	chr1	1,0014%
hsa-miR-181a-5p	chr1	1,0004%
hsa-mir-199a-2	chr1	0,6194%
hsa-mir-199a-1	chr19	0,6193%
hsa-mir-199b	chr9	0,6192%
hsa-miR-199a-3p	chr1	0,6173%
hsa-miR-199b-3p	chr9	0,6173%
hsa-mir-517a	chr19	0,8630%
hsa-mir-517b	chr19	0,8625%
hsa-mir-221	chrX	0,7610%
hsa-miR-221-3p	chrX	0,7607%
hsa-mir-30a	chr6	0,7300%
hsa-miR-517b-3p	chr19	0,6874%
hsa-miR-517a-3p	chr19	0,6873%
hsa-mir-24-2	chr19	0,7529%
hsa-mir-24-1	chr9	0,7334%
hsa-miR-24-3p	chr19	0,7329%
hsa-mir-512-1	chr19	0,7532%
hsa-mir-512-2	chr19	0,7532%
hsa-miR-512-3p	chr19	0,7524%
hsa-mir-519a-1	chr19	0,7262%
hsa-mir-141	chr12	0,7506%
hsa-mir-103a-2	chr20	0,6143%
hsa-miR-103a-3p	chr20	0,6130%
hsa-mir-103a-1	chr5	0,6130%
hsa-miR-141-3p	chr12	0,7479%

hsa-miR-30a-5p	chr6	0,6009%
hsa-mir-200c	chr12	0,6287%
hsa-miR-200c-3p	chr12	0,6286%
hsa-mir-148a	chr7	0,3417%
hsa-miR-148a-3p	chr7	0,3408%
hsa-mir-519c	chr19	0,6193%
hsa-mir-516b-1	chr19	0,7180%
hsa-miR-516b-5p	chr19	0,7178%
hsa-mir-518e	chr19	0,5433%
hsa-miR-320a	chr8	0,9335%
hsa-mir-320a	chr8	0,9335%
hsa-mir-522	chr19	0,5108%
hsa-mir-23a	chr19	0,3359%
hsa-miR-23a-3p	chr19	0,3356%
hsa-mir-27b	chr9	0,3544%
hsa-miR-27b-3p	chr9	0,3525%
hsa-mir-519b	chr19	0,4531%
hsa-mir-523	chr19	0,4546%
hsa-miR-519a-5p	chr19	0,4557%
hsa-mir-517c	chr19	0,3725%
hsa-mir-486	chr8	0,4035%
hsa-miR-486-5p	chr8	0,4028%
hsa-miR-519b-5p	chr19	0,4490%
hsa-miR-519c-5p	chr19	0,4490%
hsa-miR-522-5p	chr19	0,4490%
hsa-miR-523-5p	chr19	0,4490%
hsa-miR-518e-5p	chr19	0,4487%
hsa-mir-143	chr5	0,2889%
hsa-miR-143-3p	chr5	0,2887%
hsa-mir-516b-2	chr19	0,5721%
hsa-mir-519a-2	chr19	0,2933%
hsa-mir-10b	chr2	0,2067%
hsa-miR-10b-5p	chr2	0,2065%
hsa-miR-519a-3p	chr19	0,2704%
hsa-mir-30e	chr1	0,2635%

hsa-mir-92a-1	chr13	0,3218%
hsa-mir-516a-1	chr19	0,2681%
hsa-mir-516a-2	chr19	0,2681%
hsa-miR-516a-5p	chr19	0,2676%
hsa-let-7a-3	chr22	0,3538%
hsa-let-7a-1	chr9	0,3546%
hsa-let-7a-5p	chr11	0,3544%
hsa-let-7a-2	chr11	0,3529%
hsa-mir-424	chrX	0,2370%
hsa-miR-92a-3p	chr13	0,2961%
hsa-mir-92a-2	chrX	0,2961%
hsa-mir-93	chr7	0,2251%
hsa-miR-93-5p	chr7	0,2249%
hsa-mir-526b	chr19	0,2720%
hsa-miR-1323	chr19	0,3653%
hsa-mir-1323	chr19	0,3653%
hsa-miR-526b-5p	chr19	0,2701%
hsa-let-7f-2	chrX	0,2072%
hsa-let-7f-5p	chr9	0,2072%
hsa-let-7f-1	chr9	0,2055%
hsa-miR-517c-3p	chr19	0,1967%
hsa-let-7b	chr22	0,2197%
hsa-let-7b-5p	chr22	0,2197%
hsa-mir-151a	chr8	0,2002%
hsa-miR-519c-3p	chr19	0,1702%
hsa-mir-148b	chr12	0,1442%
hsa-miR-107	chr10	0,1520%
hsa-mir-107	chr10	0,1520%
hsa-miR-148b-3p	chr12	0,1411%
hsa-let-7i	chr12	0,1502%
hsa-let-7i-5p	chr12	0,1502%
hsa-miR-101-3p	chr1	0,1174%
hsa-mir-101-2	chr9	0,1174%
hsa-mir-101-1	chr1	0,1162%
hsa-miR-424-3p	chrX	0,1552%

hsa-mir-519d	chr19	0,1433%
hsa-mir-27a	chr19	0,1629%
hsa-miR-517-5p	chr19	0,1751%
hsa-miR-27a-3p	chr19	0,1583%
hsa-mir-23b	chr9	0,1206%
hsa-miR-23b-3p	chr9	0,1205%
hsa-mir-10a	chr17	0,0945%
hsa-miR-10a-5p	chr17	0,0936%
hsa-miR-30e-3p	chr1	0,1370%
hsa-mir-1283-2	chr19	0,1558%
hsa-miR-30e-5p	chr1	0,1264%
hsa-miR-30a-3p	chr6	0,1291%
hsa-mir-191	chr3	0,1309%
hsa-miR-191-5p	chr3	0,1305%
hsa-miR-1283	chr19	0,1416%
hsa-mir-1283-1	chr19	0,1416%
hsa-mir-423	chr17	0,1596%
hsa-mir-520a	chr19	0,1325%
hsa-miR-151a-3p	chr8	0,1290%
hsa-mir-520d	chr19	0,1287%
hsa-miR-520d-3p	chr19	0,1263%
hsa-miR-520a-3p	chr19	0,1242%
hsa-mir-518c	chr19	0,1092%
hsa-miR-519d	chr19	0,1026%
hsa-mir-335	chr7	0,0681%
hsa-mir-524	chr19	0,1320%
hsa-mir-16-2	chr3	0,0867%
hsa-mir-25	chr7	0,1007%
hsa-miR-25-3p	chr7	0,1005%
hsa-miR-335-5p	chr7	0,0645%
hsa-mir-16-1	chr13	0,0833%
hsa-miR-16-5p	chr13	0,0829%
hsa-miR-192-5p	chr11	0,0956%
hsa-mir-192	chr11	0,0956%
hsa-miR-518c-3p	chr19	0,0930%

hsa-miR-423-3p	chr17	0,1019%
hsa-miR-424-5p	chrX	0,0818%
hsa-mir-140	chr16	0,0914%
hsa-miR-320b	chr1	0,1382%
hsa-mir-320b-2	chr1	0,1382%
hsa-mir-320b-1	chr1	0,1374%
hsa-miR-140-3p	chr16	0,0873%
hsa-miR-518e-3p	chr19	0,0946%
hsa-mir-518b	chr19	0,0883%
hsa-let-7g	chr3	0,0762%
hsa-let-7g-5p	chr3	0,0762%
hsa-miR-518b	chr19	0,0823%
hsa-miR-222-3p	chrX	0,0874%
hsa-mir-222	chrX	0,0875%
hsa-miR-524-3p	chr19	0,1032%
hsa-miR-20a-5p	chr13	0,0595%
hsa-mir-20a	chr13	0,0595%
hsa-miR-151a-5p	chr8	0,0712%
hsa-miR-186-5p	chr1	0,0752%
hsa-mir-186	chr1	0,0752%
hsa-mir-660	chrX	0,0606%
hsa-miR-660-5p	chrX	0,0604%
hsa-mir-125a	chr19	0,0953%
hsa-miR-203a	chr14	0,0536%
hsa-mir-203a	chr14	0,0536%
hsa-mir-106b	chr7	0,0669%
hsa-mir-520g	chr19	0,0731%
hsa-miR-451a	chr17	0,0587%
hsa-mir-451a	chr17	0,0589%
hsa-miR-522-3p	chr19	0,0618%
hsa-mir-378a	chr5	0,0840%
hsa-mir-30b	chr8	0,0724%
hsa-miR-181a-2-3p	chr9	0,0589%
hsa-mir-181b-2	chr9	0,0656%
hsa-miR-378a-3p	chr5	0,0836%

hsa-miR-181b-5p	chr1	0,0650%
hsa-miR-125a-5p	chr19	0,0842%
hsa-mir-584	chr5	0,0728%
hsa-miR-584-5p	chr5	0,0728%
hsa-miR-29a-3p	chr7	0,0496%
hsa-mir-29a	chr7	0,0497%
hsa-mir-518a-1	chr19	0,0680%
hsa-mir-518a-2	chr19	0,0680%
hsa-mir-181b-1	chr1	0,0616%
hsa-miR-30b-5p	chr8	0,0685%
hsa-miR-518a-3p	chr19	0,0662%
hsa-mir-28	chr3	0,0567%
hsa-mir-146b	chr10	0,0609%
hsa-miR-146b-5p	chr10	0,0607%
hsa-miR-520g	chr19	0,0636%
hsa-mir-515-1	chr19	0,0543%
hsa-mir-515-2	chr19	0,0543%
hsa-miR-106b-3p	chr7	0,0554%
hsa-mir-30c-2	chr6	0,0559%
hsa-mir-30c-1	chr1	0,0555%
hsa-miR-30c-5p	chr1	0,0547%
hsa-mir-518f	chr19	0,0510%

6.7. Пример 7. Плацентарная экзосома способствует миграции фибробластов кожи человека (ФКЧ)

[00165] Профиль цитокинов показывает, что рЕхо содержат хемотаксические факторы роста, что свидетельствует о том, что рЕхо должны выполнять функцию стимулирования миграции клеток. Для изучения этого вопроса провели Transwell-анализ миграции следующим образом: 750 мкл базальной среды DMEM (без сыворотки) помещали в нижнюю камеру планшета Transwell (24-луночный), добавляли рЕхо в объеме 50 мкл. Добавляли такой же объем ФСБ в качестве контроля. 1×10^5 ФКЧ высевали в верхнюю камеру планшета Transwell (размер пор 8 мкм). Через 6-24 часа клетки из верхней камеры планшета Transwell удаляли с помощью ватной палочки. Затем планшеты Transwell фиксировали в растворе, содержащем 1% этанол в ФСБ, с последующим окрашиванием 1% кристаллическим фиолетовым, растворенным в 1% этаноле-ФСБ. Мигрирующие клетки визуализировали с помощью микроскопа. Данные показывают пример результатов ФКЧ, которые мигрировали в нижнюю часть планшета Transwell, тогда как клеток, мигрировавших через лунку в планшете Transwell с контрольным ФСБ,

было значительно меньше. Исследование демонстрирует, что рЕхо могут стимулировать миграцию фибробластов кожи человека. См. ФИГ. 6.

6.8. Пример 8. Плацентарные экзосомы способствуют миграции эндотелиальных клеток пуповинной крови человека (HUVEC)

[00166] Также провели Transwell-анализ миграции следующим образом: 750 мкл базальной среды DMEM (без сыворотки) помещали в нижнюю камеру планшета Transwell (24-луночный), добавляли рЕхо в объеме 50 мкл. Добавляли такой же объем ФСБ в качестве контроля. 2×10^5 белков GFP, экспрессирующих HUVEC, высевали в верхнюю камеру планшетов Transwell (размер пор 8 мкм). Через 6-24 часа мигрирующие клетки визуализировали непосредственно с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (AMG). Исследование демонстрирует, что все три протестированные образца рЕхо могут стимулировать миграцию HUVEC во всех трех повторных лунках. Полная среда для HUVEC, которую использовали в качестве положительного контроля, продемонстрировала значительную миграцию клеток, а ФСБ, который использовали в качестве дополнительного контроля, продемонстрировал значительно меньшее количество мигрировавших клеток по сравнению с полными средами или исследуемыми лунками с рЕхо. См. ФИГ. 7.

6.9. Пример 9. Плацентарные экзосомы стимулируют пролиферацию HUVEC

[00167] Профили цитокинов рЕхо показывают наличие нескольких факторов роста (PGDF-AA, BB, VEGF), которые, как известно, принимают участие в росте HUVEC. Для изучения эффекта рЕхо на рост и пролиферацию HUVEC GFP, экспрессирующих HUVEC, высевали в объеме 1×10^4 клеток на 96-луночный планшет (с прозрачным дном и непрозрачными стенками) в 100 мкл полной среды для роста HUVEC. После высевания в течение 2 часов клетки прикрепляли к дну лунок. В лунки затем добавляли 25 мкл различных образцов рЕхо ($N=6$ на образец). Планшет затем оценивали измерением их интенсивности флуоресценции с помощью считывателя планшетов (Synergy H4, возбуждение 395 нм/испускание 509 нм) в день 0 и день 2 после высевания. Как показано на Фиг. 13, полные среды демонстрируют более высокие сигналы GFP (индикатор номера клетки) в период от дня 0 до дня 2. Контроль ФСБ, в котором полная среда разбавлена на 50%, показал незначительный рост по сравнению с полными средами. Все восемь различных образцов рЕхо продемонстрировали более высокий рост GFP в день 2. См. ФИГ. 8.

6.10. Пример 10. Плацентарные экзосомы стимулируют пролиферацию и образование колоний CD34+ клеток человека

[00168] Чтобы изучить эффекты рЕхо на пролиферацию гемопоэтических стволовых клеток, CD34+ клетки пуповинной крови человека (собственного производства) размораживали и культивировали в среде для размножения, содержащей смесь SCF, Flt-3, KL (среда A) с 10% FCS-IMDM при 1×10^4 /клеток на мл ($N=4$). В культуральные лунки добавляли 25 мкл ФСБ или 25 мкл образцов рЕхо (тестировали два образца рЕхо). Через одну неделю культивирования подсчитали общее количество клеток

в каждой лунке и оценили процентное содержание CD34⁺ клеток в культуре с помощью проточной цитометрии (FACS), используя антитела к CD34. Общее количество CD34⁺ клеток рассчитывают как общее количество клеток в лунке к % CD34⁺ клеток в культуре. Результаты показали, что обработанная обоими образцами рЕхо культура содержит значительно большее количество CD34⁺ клеток по сравнению с контрольной культурой ФСБ. рЕхо также протестировали в отношении их эффекта на CD34⁺ клетки в культуре колониеобразующих единиц (CFU). Культуры CFU создавали с помощью среды MethoCult H4434 (Stem Cell Technologies) и добавляли рЕхо или ФСБ в концентрации 50 мкл/мл. Через две недели культивирования подсчитывали общее количество CFU в каждой 35-мм чашке (N=3). Данные показали, что в присутствии рЕхо наблюдается значительно большее количество CFU по сравнению с контрольными культурами ФСБ. См. ФИГ. 9 и ФИГ. 10.

6.11. Пример 11. Ингибирование пролиферации раковых клеток

[00169] Данные микроРНК и данные цитокинов свидетельствуют о том, что рЕхо оказывают действие по ингибированию пролиферации раковых клеток. Образцы рЕхо использовали для изучения их эффекта на рост SKOV3 (клеточная линия рака яичника человека) в 96-луночном планшете. Клетки SKOV3 сконструированы для экспрессии люциферазы, поэтому измерение активности люциферазы является показателем клеточного роста. Использовали в общем 8 различных образцов рЕхо. 2000 клеток SKOV3 добавляли на 96-луночный планшет в 100 мкл среды для роста (DMEM-10% FCS). Через 2 часа в лунку (N=6) добавляли 40 мкл рЕхо и добавляли 60 мкл среды для роста. 40 мкл ФСБ использовали в качестве контроля. Условие полной среды достигалось путем добавления 100 мкл среды в лунки. После культивирования в течение 2 дней в инкубаторе активность люциферазы измеряли с помощью набора для анализа люциферазы (Promega) путем лизиса клеток и активность люциферазы измеряли испусканием люминесценции с помощью считывателя планшетов (Synergy H4). Данные показывают, что при каждой концентрации клеток обработанная рЕхо культура имела значительно более низкий индекс Lumindex по сравнению с контролем ФСБ. Эти данные указывают на то, что рЕхо ингибируют рост клеток SKOV3. См. ФИГ. 11.

[00170] Клеточную линию рака A549 (клеточная линия карциномы легкого человека) высевали в концентрации 1500 клеток/лунку на 96-луночный планшет (Xiceligen). Через 24 часа высевания добавляли рЕхо в трех разных дозах (5 мкл, 25 и 50 мкл) в среде для роста (100 мкл). Добавляли такое же количество ФСБ в качестве контроля. Рост клеток можно отслеживать с дня 1 по день 3 после высевания с помощью программного обеспечения, которое отображает прикрепление клеток в лунках. Данные продемонстрировали, что в присутствии рЕхо рост клеток, как показано в виде нормализованного клеточного индекса, был значительно ниже по сравнению с контролями ФСБ. Каждая кривая роста представляет собой средний клеточный индекс для трех независимых лунок. См. ФИГ. 12.

[00171] Образец рЕхо использовали для изучения его эффекта на рост MDA231

(клеточная линия рака молочной железы человека) в 96-луночном планшете с различными дозами клеток. Клетки MDA231 сконструированы для экспрессии люциферазы, поэтому измерение активности люциферазы является показателем клеточного роста. Различное количество клеток MDA231-люциферазы высевали на 96-луночные планшеты (в трех повторностях) и добавляли 25 мкл рЕхо#789. После культивирования в течение 2 дней в инкубаторе активность люциферазы измеряли с помощью набора для анализа люциферазы (Promega) путем лизиса клеток и активность люциферазы измеряли испусканием люминесценции с помощью считывателя планшетов (Synergy H4). Данные показывают, что при каждой концентрации клеток обработанная рЕхо культура имела значительно более низкий индекс Lumindex по сравнению с контролем ФСБ. Эти данные указывают на то, что рЕхо ингибируют рост клеток MDA231. См. ФИГ. 13.

6.12. Пример 12. Плацентарные экзосомы модулируют активацию и дифференцировку иммунных клеток

[00172] Для изучения эффекта рЕхо на иммунные клетки Т-клетки пуповинной крови человека метили флуоресцентным красителем РКН, а затем инкубировали с рЕхо или РНА в качестве стимуляции. После культивирования в RPMI+10% FCS в течение 5 дней клетки анализировали с помощью FACS с антителами, с помощью которых можно отличить общую культуру Т-клеток, а также подтипы различных типов Т-клеток, включая CD4, CD8, CD69, CD27. Данные показывают, что в присутствии рЕхо значение MFI CD3+ клеток аналогично с контрольной культурой, что указывает на то, что рЕхо сами по себе не влияют на пролиферацию Т-клеток. При стимуляции РНА значение MFI было значительно ниже, что указывает на пролиферацию клеток, в присутствии РНА и рЕхо значение MFI было аналогично значению отдельно для РНА, что указывает на то, что присутствие рЕхо не влияет на пролиферацию клеток. Было обнаружено, что уровень CD69+ клеток значительно выше в клетках, обработанных рЕхо, уровень CD69+ клеток значительно повышался в CD3+ клетках (Т-клетках), указывая на то, что рЕхо повышают активацию Т-клеток. Такое наблюдение было сделано как для Т-клеток пуповинной крови, так и для МКПК. Кроме того, было обнаружено, что рЕхо повышают процентное соотношение CD56+ клеток (NK) в МКПК. См. ФИГ. 14, ФИГ. 15, ФИГ. 16 и ФИГ. 17.

6.13. Пример 13. Выход экзосом из культивированной плаценты, плацентарного перфузата и PRP (плазма пуповинной крови)

[00173] Плацентарный перфузат и PRP (плазму пуповинной крови) выделяли аналогичным способом, как в случае ткани культивированной плаценты человека. В таблице ниже показано, что выход экзосом из плацентарного перфузата и PRP значительно ниже, чем из культивированной плаценты.

Таблица 8

Выход экзосом (мг), выделенных из плацентарного перфузата, PRP и культивированной плаценты

<i>Образцы/источник</i>	Перфузат	PRP	Культивированная
-------------------------	-----------------	------------	-------------------------

			плацента
1	0,30	0,07	114,7
2	0,02	0,39	88,8
3	0,21	0,67	103,4
4	0,25	0,47	70,0
5	0,36		63,1
6	1,35		97,45
7	0,23		70,46
Среднее значение	0,39	0,40	86,84
СО	0,44	0,25	19,50

Обсуждение

[00174] С помощью заявленных способов можно получить большие количества экзосом с уникальными и выгодными свойствами. Было показано, что экзосомы содержат многие белки и РНК, которые благодаря продемонстрированной функции экзосом считаются биоактивными. Экзосомы экспрессируют многие маркеры клеточной поверхности, которые могут выступать в качестве партнеров по связыванию, например, в качестве рецептора или лиганда, позволяя, таким образом, нацеливать такую биологическую активность на желаемые типы клеток.

[00175] Данные, представленные в настоящем документе, показывают полезность экзосом для широкого спектра применений, таких как описанные в таблице 9.

Таблица 9

Показания к применению рЕхо в области функциональной регенерации	Обоснование	Ссылки
Функциональная регенерация включает в себя без ограничения: инсульт, повреждение спинного мозга, поражения кожи, заживление ран, острый и хронический инфаркт миокарда	рЕхо содержат цитокины и факторы роста, которые участвуют в хемотаксисе. рЕхо продемонстрировали активность в отношении повышения миграции клеток. рЕхо продемонстрировали активность в отношении стимуляции пролиферации клеток HUVEC.	

Применение в области ортопедии, косметологии и регенеративной медицины	рЕхо содержат цитокины и факторы роста, которые участвуют в хемотаксисе. рЕхо продемонстрировали активность в отношении повышения миграции клеток. рЕхо продемонстрировали активность в отношении стимуляции пролиферации клеток HUVEC.
Применение для замедления старения	рЕхо содержат цитокины и факторы роста, которые участвуют в хемотаксисе. рЕхо продемонстрировали активность в отношении повышения миграции клеток. рЕхо продемонстрировали активность в отношении стимуляции пролиферации клеток HUVEC.
Регенерация волос	рЕхо содержат цитокины и факторы роста, которые участвуют в хемотаксисе. рЕхо продемонстрировали активность в отношении повышения миграции клеток. рЕхо продемонстрировали активность в отношении стимуляции пролиферации клеток HUVEC.
Недостаточность органов	рЕхо содержат цитокины и факторы роста, которые участвуют в хемотаксисе. рЕхо продемонстрировали активность в отношении

	повышения миграции клеток.	
	рЕхо продемонстрировали активность в отношении стимуляции пролиферации клеток HUVEC.	
	рЕхо содержат цитокины и факторы роста, которые участвуют в хемотаксисе.	
Нарушения со стороны сосудов	рЕхо продемонстрировали активность в отношении повышения миграции клеток.	
	рЕхо продемонстрировали активность в отношении стимуляции пролиферации клеток HUVEC.	
Эректильная дисфункция	рЕхо содержат VEGF, PDGF, FGF2, которые способствуют ангиогенезу. Дегенерация сосудистой сети может привести к эректильной дисфункции. рЕхо могут усилить ангиогенез.	Xie et al. (2008). Growth factors for therapeutic angiogenesis in hypercholesterolemic erectile dysfunction. Asian J Androl. 10:23-7
Защита при заживлении ран, вызванных облучением	рЕхо содержат FGF2. Было продемонстрировано, что FGF2 оказывают защитный эффект у крыс при заживлении ран, которые вызваны облучением и медленно зарастают.	Kinoda J. et al. (2018). Protective effect of FGF2 and low molecular-weight heparin/protamine nanoparticles on radiation-induced healing-impaired wound repair in rats. J. Radiat Res. 59:27-34.
Аксональная регенерация и восстановление двигательной функции после повреждения	рЕхо содержат FGF2. Было продемонстрировано, что FGF2 оказывают действие по стимулированию клеток зубной пульпы человека к	Nagashima et al. (2017). Sci Rep. Priming with FGF2 stimulates human dental pulp cells to promote axonal regeneration and locomotor

спинного мозга	ускорению аксональной регенерации и восстановления двигательной функции после повреждения спинного мозга.	function recovery after spinal cord injury. 7:13500.
Болезни печени	рЕхо содержат FGF2. Было продемонстрировано, что FGF2 оказывают действие по стимулированию экспрессии цитоглобина и активации звездчатых клеток печени.	Sato-Matsubara et al. (2017) et al. Fibroblast growth factor-2 regulates cytoglobin expression and activation of human hepatic stellate cells via JNK signaling. J. Biol Chem. 292:18961-18972.
Аксональная регенерация и восстановление двигательной функции после повреждения спинного мозга	рЕхо содержат FGF2. Было продемонстрировано, что FGF2 оказывают действие по стимулированию регенерации нервов и функционального восстановления после размождения подбородочного нерва.	Lee et al. (2017). Recombinant human fibroblast growth factor-2 promotes nerve regeneration and functional recovery after mental nerve crush injury. Neural Regen Res. 12:629-636.
Синдром поликистоза яичников	рЕхо содержат фракталкин. Было продемонстрировано, что фракталкин оказывает действие по восстановлению экспрессии StAR и прогестерона в зернистых клетках у пациентов с синдромом поликистоза яичников.	Huang et al. (2016). Fractalkine restore the decreased expression of StAR and progesterone in granulosa cells from patients with polycystic ovary syndrome. Sci. Rep. 6:26205.
Пародонтальная регенерация	рЕхо содержат FGF2 и PDGF-BB. FGF2 и PDGF-BB могут усиливать заболевания пародонта.	Li et al. (2018). Evaluation of recombinant human FGF-2 and PDGF-BB in periodontal regeneration: A systemic

		review and meta-analysis. Sci Rep. 7:65..
Рост волос	pЕхо содержат FGF2 и PDGF-BB, VEGF.	Bak et al. (2018) Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells engineered to overexpress growth factors accelerate outcomes in hair growth. Korea J. Physiol Pharmacol. 22:555-566.
Аксональная регенерация и восстановление двигательной функции после повреждения спинного мозга	и pЕхо содержат микроРНК MIR-26a-5p, которые вовлечены в аксонную регенерацию.	Sun et al. (2018). Network analysis of microRNAs, transcription factors, and target genes involved in axon regeneration. J Zhejiang Univer. Sci. 19:293-304.
Онкологические показания к применению pЕхо	pЕхо содержат указанные ниже противоопухолевые микроРНК	
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний, например, нейроглиому	микроРНК-26b: микроРНК (miR)-26b ингибирует нейроглиому (клетки глиомы U87)	Li YP et al. (2017). Effects of microRNA-26b on proliferation and invatioin of glioma cells and related mechanisms. Mol Med Rep 16:4165-4170.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний, например, рак толстой кишки	микроРНК-26b: подавляет пролиферацию клеток рака толстой кишки	Zhang Y et al (2014). MicroRNA-26b represses colon cancer cell proliferation by inhibiting lymphoid enhancer factor 1 expression. Mol Cancer Ther. 13:1942-51.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых	микроРНК-26b-5p: ингибирует опухолевые клеточные линии	Fan et al. (2018). MicroRNA-26-5p regulates cell proliferation, invasion, and

заболеваний, например, рак печени	внутрипеченочной холангиокарциномы человека RBE и HCCC-9810.	metastasis in human intrahepatic cholangiocarcinoma by targeting S100A7. <i>Oncol Lett.</i> 15:386-392.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний, например, рак мочевого пузыря	микроРНК-26-а-5p и микроРНК-26b-5p ингибируют рост клеток рака мочевого пузыря.	Niyamoto et al (2016). Tumor-suppressive miRNA-26a-5p and miR-26-5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний	микроРНК-26b-5p ингибирует гепатоцеллюлярную карциному	Wang Y et al. (2016). Regulation of proliferation, angiogenesis and apoptosis in hepatocellular carcinoma by miR-26b-5p. <i>Tumor Biol.</i> 37:10965-79.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний	mir-22 подавляет образование опухолей при раке молочной железы	Zhang X et al. (2017). miR-22 suppress tumorigenesis and improves radiosensitivity of breast cancer cells by targeting Sirt1. <i>Biol Res.</i> 50:27.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний	mir-22 подавляет клетки рака толстой кишки	Xia SS et al. (2017). MciroRNA-22 suppresses the growth, migration, and invasion of colorectal cancer celsl through a Sp1 negative feedback loop. <i>Oncotarget.</i> 30:36266-36278.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний	MiR-99B и Mir-99-B-5P ингибируют метастазирование клеток колоректального рака в печень	Li W et al. (2015). miRNA-99-5p suppresses liver metastasis of colorectal cancer by down-regulating mTOR. <i>Oncotarget</i> 6:24448-62.
Противоопухолевое лечение, включая все	mir-181a и mir-181b подавляют клетки глиомы	Shi et al. (2008). Has-mir-181a and has-mir-181b functions as

различные типы раковых заболеваний	человека, вызывают ингибирование роста, индуцируют апоптоз и ингибируют инвазию клеток глиомы.	tumor suppressors in human glioma cells. Brain Res. 1236:185-93.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний	микроРНК mir-199a-2, mir-199-a1, mir-199-B, mir-199A-1p, mir-199b-3p относятся к семейству противоопухолевых miR199, которые ингибируют миграцию и инвазию клеток рака головы и шеи	Koshizuka et al. (2017). Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer migration and invasion in head and neck cancer. Cancer Sci. 108:1681-1692.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний	Mir-221 и Mir-221-2p ингибируют пролиферацию клеток рака поджелудочной железы	Xie et al. (2018) MIR-221 inhibits proliferation of pancreatic cell cells via down regulation of SOCS3. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 22:1914-1921.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний	МикроРНК-30a ингибирует метастазирование колоректального рака путем снижения активности рецептора инсулиноподобного фактора роста 1	Liu YC et al. (2017) MicroRNA-30a inhibits colorectal cancer metastasis through down regulation of type 1 insulin like growth factor receptor.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний	miR-130-a-3p ингибирует миграцию и инвазию подобных стволовым клеткам клеток рака молочной железы человека	Kong et al. (2018). MiR-130-3p inhibits migration and invasion by regulating RAB5B in human breast cancer stem cell-like cells. Biochem Biophys Res Commun. 501:486-493.
Противоопухолевое лечение, включая все различные типы раковых заболеваний	miR-24-2 ингибирует рост клеток рака молочной	Manvati et al. (2105). miR-24-2 regulates genes in survival

различные типы раковых желез.
заболеваний, например,
рак молочной железы

Противоопухолевое
лечение, включая все
различные типы раковых
заболеваний, например,
рак поджелудочной
железы

Противоопухолевое
лечение, включая все
различные типы раковых
заболеваний, например,
рак поджелудочной
железы

Противоопухолевое
лечение, включая все
различные типы раковых
заболеваний, например,
рак мочевого пузыря

Противоопухолевое
лечение, включая все
различные типы раковых
заболеваний, например,
мелкоклеточный рак
легкого

Противоопухолевое
лечение, включая все
различные типы раковых
заболеваний, например,
гепатоцеллюлярную

miR-24-2 ингибирует рост
клеточных линий рака
поджелудочной железы

МикроРНК-24-1 ингибирует
инвазию и метастазирование
клеток гепатомы

МикроРНК-24-1 ингибирует
пролиферацию раковых
клеток.

miR-512-P способствует
подавлению
метастазирования при
немелкоклеточном раке
легкого

miR-141 ингибирует
гепатоцеллюлярную
карциному

pathway and demonstrates
potentials in reducing cellular
viability in combination with
docetaxel. *Gene*. 10:217-24.

Pandita et al. (2015).
Combined effect of
microRNA, nutraceuticals and
drug on pancreatic cancer cell
lines. *Chem Biol Interact*.
233:56-64.

Liu Y et al. (2017).
MicroRNA-24-1 suppress
mouse hepatoma cell invasion
and metastasis via directly
targeting O-GlcNAc
transferase. *Biomed
Pharmacother*. 91:731-738.

Inoguchi et al. (2014). Tumour
suppressive microRNA-24-1
inhibits cancer cell
proliferation through targeting
FOXO1 in bladder cancer.
FEBS Lett. 588:3170-9

Zhu et al. (2015). Inhibition of
RAC1-GEF DOCK3 by miR-
512-3p contributes to
suppression of metastasis in
non small cell lung cancer. *Int.
J. Biochem Cell Biol*. 61:103-
14.

Kim et al. (2018). Tumor-
suppressing miR-141- complex
loaded tissue-adhesive glue for
the locoregional treatment for
hepatocellular carcinoma

карциному

Противоопухолевое

лечение, включая все различные типы раковых заболеваний, например, папиллярный рак щитовидной железы

Mir-141-3p подавляет опухолевый рост и метастазирование

Fang et al (2018). MiR-141-3p suppresses tumor growth and metastasis in Papillary thyroid cancer via targeting Yin Yang 1. Anat Rec (Hoboken). Doi. 10.1002/ar. 23940.

Противоопухолевое

лечение, включая все различные типы раковых заболеваний, например, папиллярный рак щитовидной железы

Mir-141-3p подавляет рост и миграцию клеток остеосаркомы.

Wang et al. (2108). miR-141-3p is a key negative regulator of the EGFR pathway in osteosarcoma. Onco Targets Ther. 11:4461-4478.

Противоопухолевое

лечение, включая все различные типы раковых заболеваний, например, папиллярный рак щитовидной железы

Mir-148a подавляет рост и миграцию клеток рака предстательной железы

Liu et al. (2018). Long non-coding RNA CCAT1/miR-148a/PKCzeta prevents cell migration of prostate cancer by altering macrophage polarization. Prostate. Doi:10.1002/pro.23716.

Другие показания к применению рЕхо

Заживление ран

рЕхо содержат высокий уровень IL-8. IL-8, также известный как хемотаксический фактор нейтрофилов, имеет две основные функции. Он индуцирует хемотаксис в клетках-мишенях, преимущественно в нейтрофилах, но также и в других гранулоцитах, заставляя их мигрировать в

область инфекции. IL-8 также стимулирует фагоцитоз после того, как они придут на место. IL-8 также известен как мощный стимулятор ангиогенеза. В клетках-мишенях IL-8 индуцирует серию физиологических ответов, необходимых для миграции и фагоцитоза, таких как повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , экзоцитоз (например, выброс гистамина) и респираторный взрыв.

Заживление ран

рЕхo содержат PDGF-AA/BB: тромбоцитарный фактор роста (Platelet-derived growth factor - PDGF) является одним из многочисленных факторов роста, которые регулируют рост и деление клеток. В частности, PDGF играет значимую роль в образовании новых кровеносных сосудов, росте кровеносных сосудов из ткани уже существующих кровеносных сосудов, митогенезе, т. е. пролиферации, мезенхимальных клеток,

таких как фибробласты, остеобласты, теноциты, гладкомышечные клетки сосудов и мезенхимальные стволовые клетки, а также в хемотаксисе, направленной миграции, мезенхимальных клеток. Тромбоцитарный фактор роста представляет собой димерный гликопротеин, который может включать в себя две субъединицы А (PDGF-AA), две субъединицы В (PDGF-BB) или по одной субъединице каждого вида (PDGF-AB). PDGF - это мощный митоген для клеток мезенхимального происхождения, включая фибробласты, гладкомышечные клетки и глиальные клетки. Как у мышей, так и у людей, сигнальная сеть PDGF состоит из пяти лигандов: с PDGF-AA по -DD (включая -AB), а также из двух рецепторов: PDGFR-альфа и PDGFR-бета. Все PDGF функционируют как секретируемые дисульфид-связанные гомодимеры, однако только PDGFA и B могут образовывать

функциональные
гетеродимеры

Противовоспалительное
действие

рЕхо содержат IL-1RA. IL-1RA является членом семейства цитокина интерлейкина 1. IL1Ra секретируется клетками различных типов, включая иммунные клетки, эпителиальные клетки и адипоциты, и является природным ингибитором провоспалительного эффекта IL1 β . Этот белок ингибирует активность интерлейкина 1, альфа (IL1A) и интерлейкина 1, бета (IL1B) и модулирует множество иммунных и воспалительных ответов, связанных с интерлейкином 1.

Противоинфекционное действие, действие против ВИЧ, противовирусное действие, повышение цитотоксичности NK-клеток

рЕхo содержат высокий уровень RANTES (CCL5). CCL5 является белком 8kDa, классифицированным как хемотаксический цитокин или хемокин. CCL5 является хемотаксическим в отношении Т-клеток, эозинофилов и базофилов, а также играет активную роль в рекрутировании лейкоцитов в места воспаления. Благодаря конкретным цитокинам (т. е. IL-2 и IFN- γ), которые высвобождаются Т-клетками, CCL5 также индуцирует пролиферацию и активацию определенных естественных клеток-киллеров (NK-клеток) с образованием клеток СНАК (СС-хемокин-активированные киллеры). Он также является подавляющим ВИЧ фактором, высвобождаемым CD8+ Т-клетками.

Эквиваленты

[00176] Объем настоящего раскрытия не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации объекта изобретения, представленного в настоящем документе, в дополнение к описанным, будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеуказанного описания и сопроводительных фигур. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00177] В настоящем документе упоминаются различные публикации, патенты и

заявки на патент, описания которых в полном объеме включены посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения экзосом из плаценты или ее части, включающий в себя:

а) приведение в контакт плаценты или ее части, предпочтительно культивированной плаценты или ее части, с первой средой; и

б) получение первой фракции, содержащей популяцию экзосом, из указанной плаценты или ее части;

с) необязательно, приведение в контакт указанной плаценты или ее части со второй средой и получение второй фракции, содержащей популяцию экзосом, из указанной плаценты или ее части;

д) необязательно, приведение в контакт указанной плаценты или ее части с третьей средой и получение третьей фракции, содержащей популяцию экзосом, из указанной плаценты или ее части; и

е) необязательно, выделение популяции экзосом из указанных первой, второй и/или третьей фракций, предпочтительно путем последовательного центрифугирования и/или аффинной хроматографии, используя антитела или их связывающую часть, специфические для маркера или пептида, присутствующих на желаемой популяции экзосом, причем указанные антитела или их связывающая часть иммобилизованы на субстрате, таком как мембрана, смола, гранула или сосуд.

2. Способ по п. 1, в котором плацента или ее часть дополнительно содержит амниотическую мембрану.

3. Способ по п. 2, в котором плацента или ее часть представляет собой плаценту человека или ее часть.

4. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором первая, вторая и/или третья среды находятся в контакте с плацентой или ее частью в течение по меньшей мере 45 минут, например, 45 минут, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов, или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней, или в течение любого периода времени, который находится в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеупомянутых временных точек.

5. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором первая, вторая и/или третья среды находятся в контакте с плацентой или ее частью в течение по меньшей мере 7, 14, 28, 35 или 42 дней или в течение любого периода времени, который находится в диапазоне, определенном любыми двумя из вышеупомянутых временных точек.

6. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором плацента или ее часть является измельченной, гомогенизированной или обработанной ферментами.

7. Способ по любому из пп. 1-5, в котором указанная плацента или ее часть является по существу плоской или листообразной и была подвергнута децеллюляризации и по существу высушена, и при этом способ дополнительно включает в себя приведение в контакт жидкости, содержащей экзогенные клетки, с децеллюляризованной плацентой или ее частью так, чтобы засеять децеллюляризованную плаценту или ее часть указанными экзогенными клетками, и при этом приведение в контакт клеток с

децеллюляризованной плацентой или ее частью выполнялось перед приведением в контакт децеллюляризованной плаценты или ее части с первой средой.

8. Способ по п. 7, в котором указанные экзогенные клетки получают от субъекта, отличного от донора указанной плаценты или ее части.

9. Способ по п. 7 или 8, в котором жидкость представляет собой асцитную жидкость, кровь или плазму.

10. Способ по п. 7 или 8, в котором клетки происходят из органа.

11. Способ по п. 10, в котором клетки происходят из печени, почки, легкого или поджелудочной железы.

12. Способ по п. 7 или 8, в котором клетки представляют собой иммунные клетки.

13. Способ по п. 12, в котором клетки представляют собой Т-клетки или В-клетки.

14. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором первая среда содержит фосфатно-солевой буфер (ФСБ).

15. Способ по п. 9, в котором первая, вторая или третья фракции содержат экзосомы из асцитной жидкости, крови или плазмы.

16. Способ по п. 10, в котором первая, вторая или третья фракции содержат экзосомы из клетки органа.

17. Способ по п. 11, в котором клетка происходит из печени, почки, легкого или поджелудочной железы.

18. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором вторая среда содержит факторы роста.

19. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором третья среда содержит хелатор.

20. Способ по п. 19, в котором хелатор представляет собой фосфонат, тетранатриевую соль ВАРТА, ВАРТА/АМ, тетранатриевую соль реагента Di-Notrophen ТМ, EGTA/АМ, пиридоксаль изоникотиноилгидразин, N, N,N',N'-тетраakis-(2 пиридилметил)этилендиамин, 6-бром-N'-(2-гидроксibenзилиден)-2-метилхинолин-4-карбогидразид, тетраakis(ацетоксиметилловый эфир) 1,2-бис(2-аминофеноксi)этан-N, N,N',N'-тетрауксусной кислоты, (этилендиамин)тетрауксусную кислоту (EDTA), эдатамил, этилендиаминтетрауксусную кислоту, этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N, N,N',N'-тетрауксусную кислоту или тетранатриевую соль этиленгликоль-бис(β-аминоэтилэфир)-N, N,N',N'-тетрауксусной кислоты (EGTA) или любую их комбинацию.

21. Способ по любому из п. 19 или 20, в котором хелатор представляет собой EDTA или EGTA или их комбинацию.

22. Способ по любому из пп. 19-21, в котором хелатор представлен в третьей среде в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации.

23. Способ по любому из пп. 19-22, в котором EDTA в третьей среде представлена

в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации.

24. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором третья среда содержит протеазу.

25. Способ по п. 24, в котором протеаза представляет собой трипсин, коллагеназу, химотрипсин или карбоксипептидазу или любую их комбинацию.

26. Способ по п. 24 или 25, в котором протеаза представляет собой трипсин.

27. Способ по п. 24, в котором протеаза представлена в третьей среде в концентрации 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ или в концентрации, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями концентрации.

28. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, который дополнительно включает в себя приведение в контакт плаценты или ее части с дополнительным множеством сред, причем приведение в контакт приводит к получению множества фракций, содержащих экзосомы.

29. Способ по п. 28, в котором первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат глюкозу.

30. Способ по п. 28 или 29, в котором первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат ГМКСФ (GM-CSF).

31. Способ по любому из пп. 28-30, в котором первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат сыворотку.

32. Способ по любому из пп. 28-31, в котором первая, вторая, третья или дополнительные среды содержат DMEM.

33. Способ по любому из пп. 28-32, в котором первая, вторая, третья или дополнительная среда содержит антагонист AHR.

34. Способ по п. 33, в котором антагонист AHR представляет собой SR1.

35. Способ по п. 34, в котором SR1 присутствует в концентрации 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 200 нМ, 300 нМ, 400 нМ, 500 нМ, 600 нМ, 700 нМ, 800 нМ, 900 нМ или 1 мМ или в любой другой концентрации в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями.

36. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором первая среда находится в контакте с плацентой или ее частью, при этом температура поддерживается на уровне 0 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C или 40 °C или температуры, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями температуры.

37. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором вторая среда находится в контакте с плацентой или ее частью, при этом температура поддерживается

на уровне 0 °С, 5 °С, 10 °С, 15 °С, 20 °С, 25 °С, 30 °С, 35 °С или 40 °С или температуры, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями температуры.

38. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором третья среда находится в контакте с плацентой или ее частью, при этом температура поддерживается на уровне 0 °С, 5 °С, 10 °С, 15 °С, 20 °С, 25 °С, 30 °С, 35 °С или 40 °С или температуры, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями температуры.

39. Способ по любому из пп. 28-38, в котором дополнительное множество сред находится в контакте с плацентой или ее частью, при этом температура поддерживается на уровне 0 °С, 5 °С, 10 °С, 15 °С, 20 °С, 25 °С, 30 °С, 35 °С или 40 °С или температуры, которая находится в пределах диапазона, определенного любыми двумя вышеупомянутыми значениями.

40. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором первая, вторая, третья среды или дополнительное множество сред содержат антибиотики.

41. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором экзосомы выделяют из указанных первой, второй и/или третьей фракций или множества фракций способом, включающим в себя:

(а) прохождение первой, второй и/или третьей фракций или множества фракций через тканевый фильтр;

(b) выполнение первого центрифугирования фильтрата, собранного на этапе (а), с получением клеточного осадка и первого супернатанта;

(с) выполнение второго центрифугирования первого супернатанта с получением второго супернатанта; и

(d) выполнение третьего центрифугирования второго супернатанта с получением осадка экзосом; и необязательно

(е) ресуспендирование экзосом в растворе.

42. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором экзосомы содержат CD63, CD63-A, перфорин, Fas, TRAIL или гранзим В или любую их комбинацию.

43. Способ по п. 42, в котором экзосомы содержат CD63A.

44. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором экзосомы содержат сигнальную молекулу.

45. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, в котором экзосомы содержат цитокины, мРНК или микроРНК.

46. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, дополнительно включающий в себя выделение экзосом путем аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является селективной в отношении удаления экзосом, содержащих вирусные антигены, вирусные белки, бактериальные антигены, бактериальные белки, антигены грибов или белки грибов.

47. Способ по любому из вышеупомянутых пунктов, дополнительно включающий

в себя выделение экзосом с помощью одного или более дополнительных этапов аффинной хроматографии, причем один или более дополнительных этапов аффинной хроматографии являются селективными в отношении удаления экзосом, содержащих маркер воспаления и/или опухолевый маркер.

48. Композиция, содержащая экзосомы, полученные из плаценты человека, причем указанные экзосомы являются положительными на CD1c, CD20, CD24, CD25, CD29, CD2, CD3, CD8, CD9, CD11c, CD14, CD19, CD31, CD40, CD41b, CD42a, CD44, CD45, CD49e, CD4, CD56, CD62P, CD63, CD69, CD81, CD86, CD105, CD133-1, CD142, CD146, CD209, CD326, HLA-ABC, HLA-DRDPDQ, MCSP, ROR1, SSEA-4 или их комбинации.

49. Композиция по п. 48, в которой указанные экзосомы являются положительными на CD1c, CD20, CD24, CD25, CD29, CD2, CD3, CD8, CD9, CD11c, CD14, CD19, CD31, CD40, CD41b, CD42a, CD44, CD45, CD49e, CD4, CD56, CD62P, CD63, CD69, CD81, CD86, CD105, CD133-1, CD142, CD146, CD209, CD326, HLA-ABC, HLA-DRDPDQ, MCSP, ROR1 и SSEA-4.

50. Композиция по п. 48, в которой указанные экзосомы являются положительными на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD1c, CD20, CD24, CD25, CD29, CD2, CD3, CD8, CD9, CD11c, CD14, CD19, CD31, CD40, CD41b, CD42a, CD44, CD45, CD49e, CD4, CD56, CD62P, CD63, CD69, CD81, CD86, CD105, CD133-1, CD142, CD146, CD209, CD326, HLA-ABC, HLA-DRDPDQ, MCSP, ROR1 и SSEA-4.

51. Композиция по любому из пп. 48-50, в которой указанные экзосомы представляют собой CD3-, CD11b-, CD14-, CD19-, CD33-, CD192-, HLA-A-, HLA-B-, HLA-C-, HLA-DR-, CD11c- или CD34-.

52. Композиция по любому из пп. 48-50, в которой указанные экзосомы представляют собой CD3-, CD11b-, CD14-, CD19-, CD33-, CD192-, HLA-A-, HLA-B-, HLA-C-, HLA-DR-, CD11c- и CD34-.

53. Композиция по любому из пп. 48-52, в которой указанные экзосомы содержат молекулы некодирующей РНК.

54. Композиция по п. 53, в которой указанные молекулы РНК представляют собой микроРНК.

55. Композиция по п. 54, в которой указанные микроРНК выбраны из группы, состоящей из микроРНК из таблицы 7 и их комбинаций.

56. Композиция по п. 54, в которой указанные микроРНК выбраны из группы, состоящей из hsa-mir-26b, hsa-miR-26b-5p, hsa-mir-26a-2, hsa-mir-26a-1, hsa-miR-26a-5p, hsa-mir-30d, hsa-miR-30d-5p, hsa-mir-100, hsa-miR-100-5p, hsa-mir-21, hsa-miR-21-5p, hsa-mir-22, hsa-miR-22-3p, hsa-mir-99b, hsa-miR-99b-5p, hsa-mir-181a-2, hsa-mir-181a-1, hsa-miR-181a-5p и их комбинаций.

57. Композиция по любому из пп. 48-56, в которой указанные экзосомы содержат цитокин, выбранный из группы, состоящей из цитокинов из таблицы 3 и их комбинаций.

58. Композиция по любому из пп. 48-57, в которой указанные экзосомы содержат

рецептор цитокинов, выбранный из группы, состоящей из рецепторов цитокинов из таблицы 4 и их комбинаций.

59. Композиция по любому из пп. 48-58, в которой указанные экзосомы содержат белок, выбранный из группы, состоящей из белков из таблицы 6 и их комбинаций.

60. Композиция по любому из пп. 48-58, в которой указанные экзосомы содержат белок, выбранный из группы, состоящей из цитоплазматической аконитатгидратазы, гликопротеина клеточной поверхности MUC18, белка аргинин N-метилтрансферазы 1, гуаниннуклеотид-связывающего белка G субъединицы альфа, куллина-5, кальций-связывающего белка 39, глюкозидазы 2 субъединицы бета, белка внутриклеточного хлоридного канала 5, семафорина-3В, 60S рибосомального белка L22, сплайсингосомной РНК-геликазы DDX39В, транскрипционного активаторного белка Pur-alpha, белка запрограммированной гибели клетки 10, белка BROX, содержащего домен BRO1, кинуренин-оксоглутарат трансминазы 3, ламинин субъединицы альфа-5, представителя 1 подсемейства E АТФ-связывающей кассеты, синтаксин-связывающего белка 3, протеасомы субъединицы бета типа-7 и их комбинаций.

61. Композиция по любому из пп. 48-60, в которой указанные экзосомы содержат по меньшей мере одну маркерную молекулу на уровне по меньшей мере в два раза выше, чем экзосомы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток, пуповинной крови или плацентарного перфузата.

62. Композиция по любому из пп. 48-60, в которой указанные экзосомы содержат по меньшей мере одну маркерную молекулу на уровне по меньшей мере в два раза выше, чем экзосомы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток, пуповинной крови и плацентарного перфузата.

63. Композиция по любому из пп. 48-62, в которой указанные экзосомы выделяют из сред культуры цельной плаценты.

64. Композиция по любому из пп. 48-62, в которой указанные экзосомы выделяют из сред цельной культуры, содержащей доли плаценты или части плаценты.

65. Композиция по любому из пп. 48-64, в которой указанные экзосомы получают способом по любому из пп. 1-47.

66. Композиция по любому из пп. 48-65, которая предоставляется в форме, пригодной для внутривенного введения.

67. Композиция по любому из пп. 48-65, которая предоставляется в форме, пригодной для локальной инъекции.

68. Композиция по любому из пп. 48-65, которая предоставляется в форме, пригодной для местного введения.

69. Композиция по любому из пп. 48-65, которая предоставляется в форме, пригодной для ультразвуковой доставки.

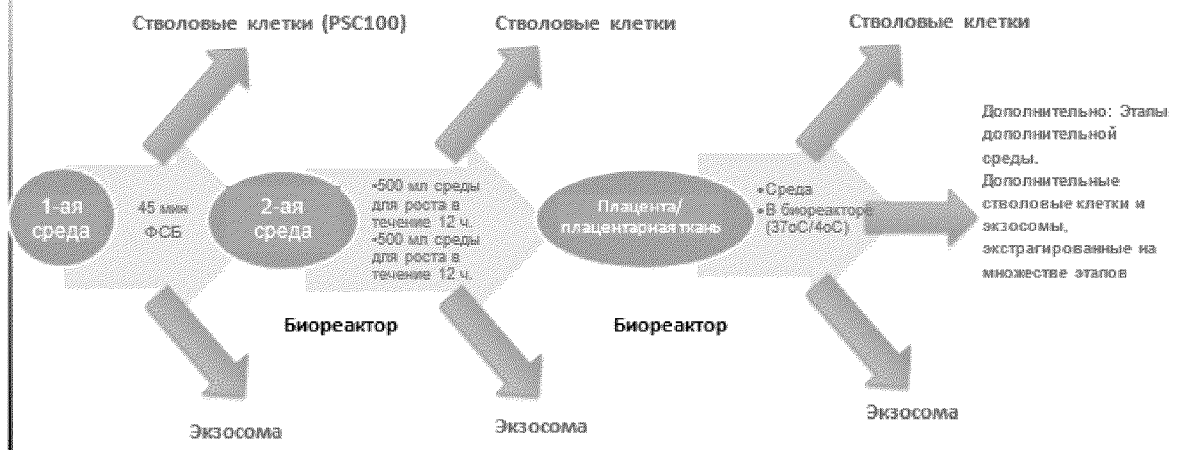
70. Способ повышения пролиферации иммунной клетки, включающий в себя приведение клетки в контакт с композицией по любому из пп. 48-65.

71. Способ по п. 70, в котором иммунная клетка представляет собой Т-клетку.

72. Способ по п. 70, в котором иммунная клетка представляет собой NK-клетку.
73. Способ по п. 70, в котором иммунная клетка представляет собой CD34+ клетку.
74. Способ ингибирования пролиферации раковой клетки, включающий в себя приведение клетки в контакт с композицией по любому из пп. 48-65.
75. Способ стимулирования ангиогенеза или васкуляризации у указанного субъекта, включающий в себя введение субъекту композиции по любому из пп. 48-65.
76. Способ модуляции иммунной системы указанного субъекта, включающий в себя введение субъекту композиции по любому из пп. 48-65.
77. Способ восстановления пораженной или поврежденной ткани у субъекта, включающий в себя введение субъекту композиции по любому из пп. 48-65.
78. Способ лечения рака у субъекта, включающий в себя введение субъекту композиции по любому из пп. 48-65.
79. Способ по любому из пп. 75-78, в котором указанный субъект является человеком.

По доверенности

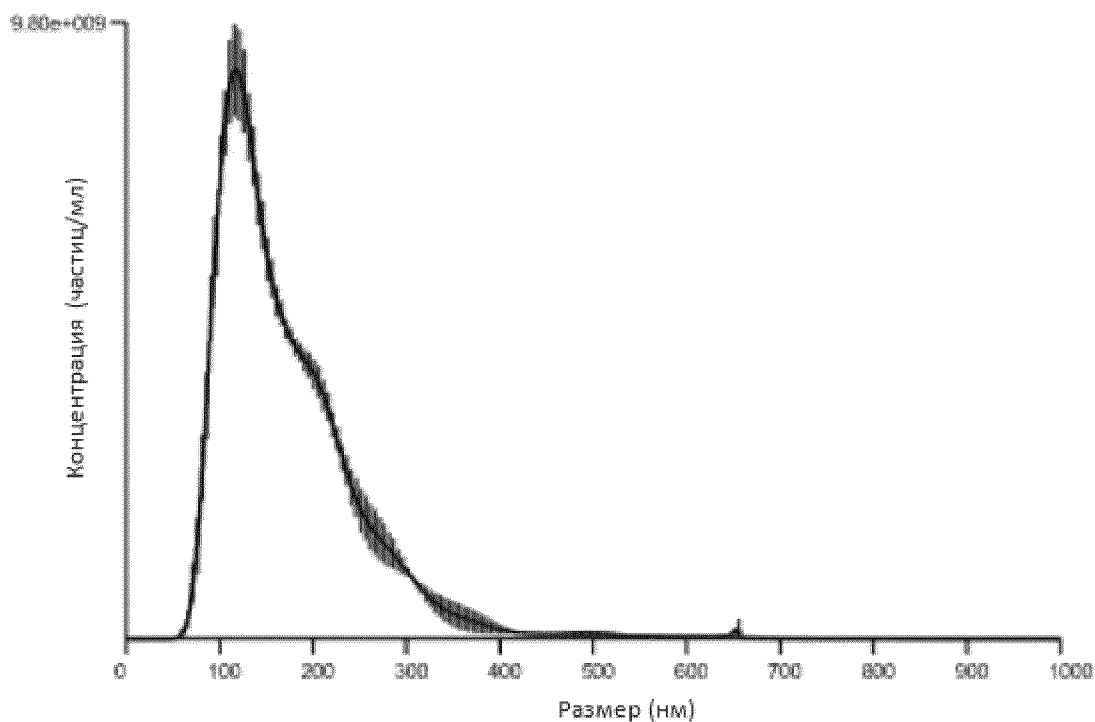
Культивирование плаценты в биореакторе с целью сбора клеток и экзосом



ФИГ. 1

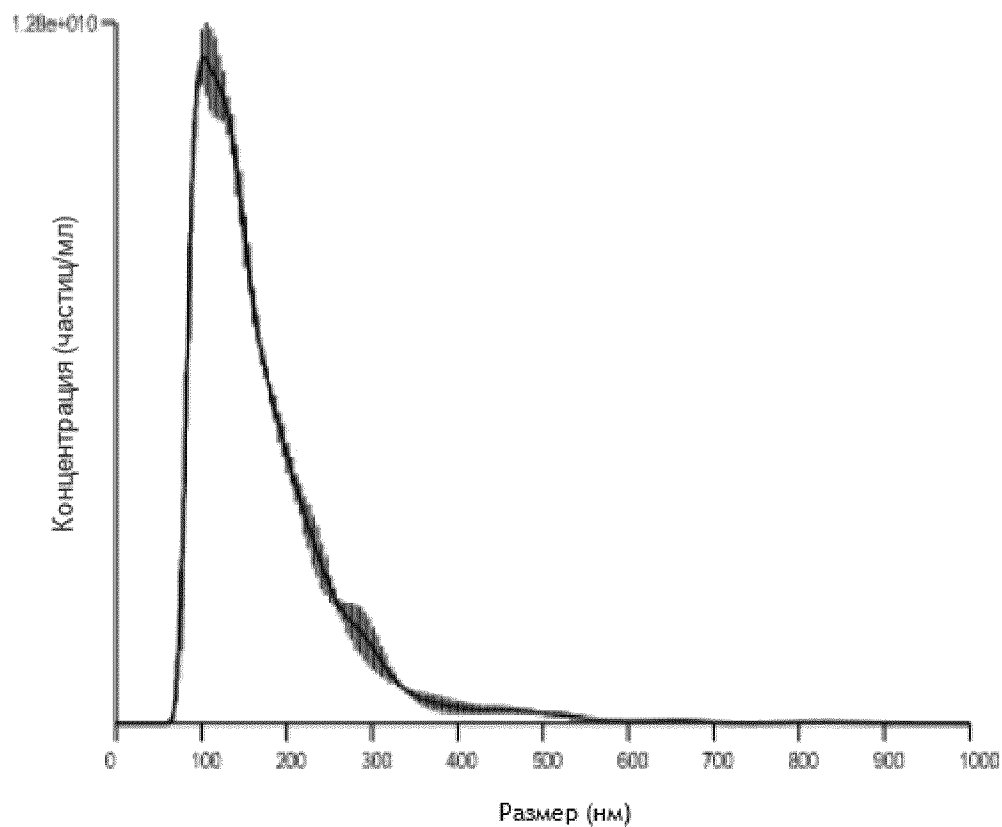
NANOSIGHT

Анализ отслеживания наночастиц (NTA) Версия 2.3 Сборка 2.3.5.0033.7-Beta7



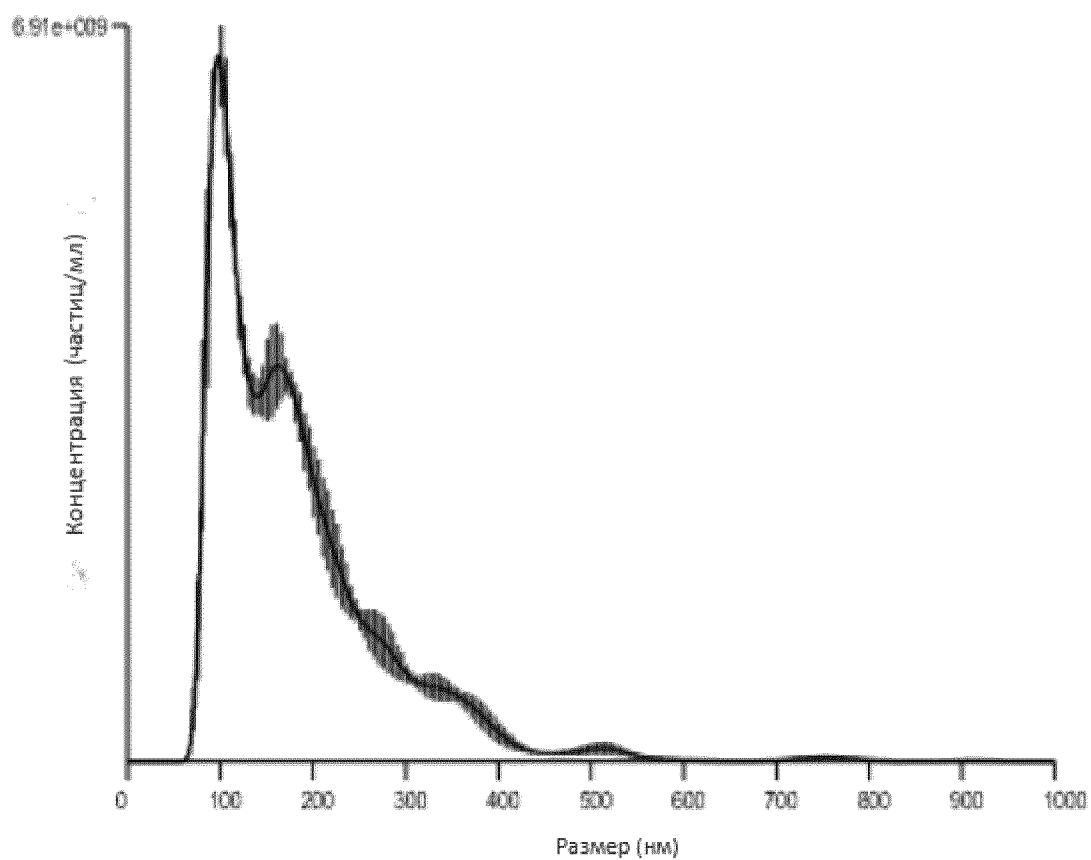
Распределение FTLA — средний размер/концентрация Красные столбцы ошибок указывают на ± 1 стандартную ошибку среднего значения

ФИГ. 2А



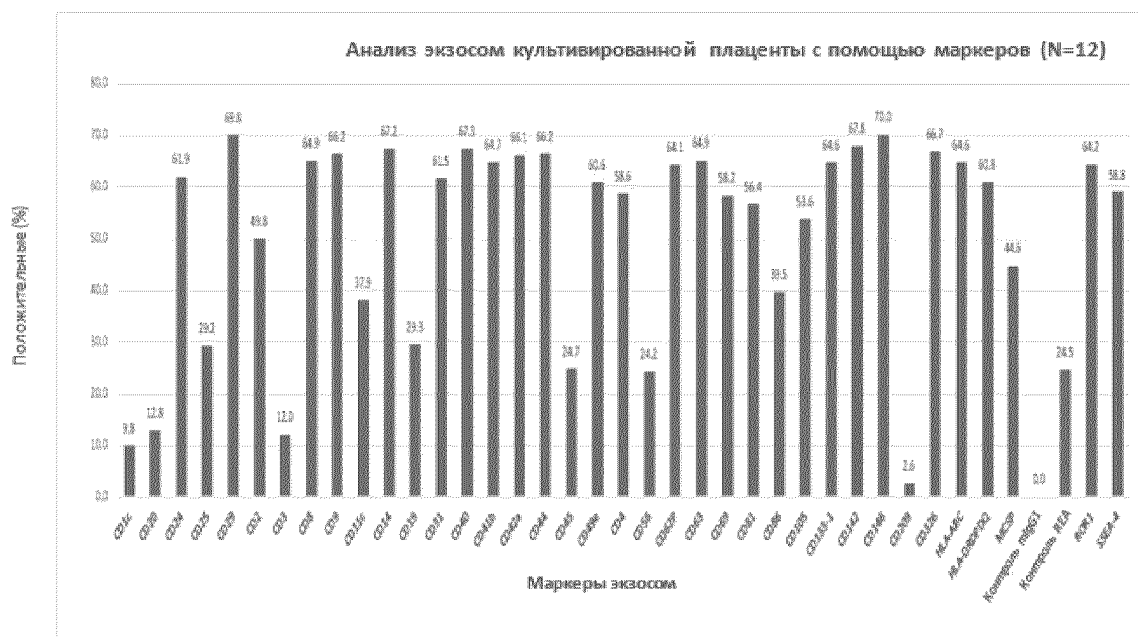
Распределение FTLA – Средний размер / концентрация Красные столбцы ошибок указывают на ± 1 стандартную ошибку среднего значения

ФИГ. 2В



Распределение FTLA — средний размер/концентрация Красные столбцы ошибок указывают на ± 1 стандартную ошибку среднего значения

ФИГ. 2С



ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

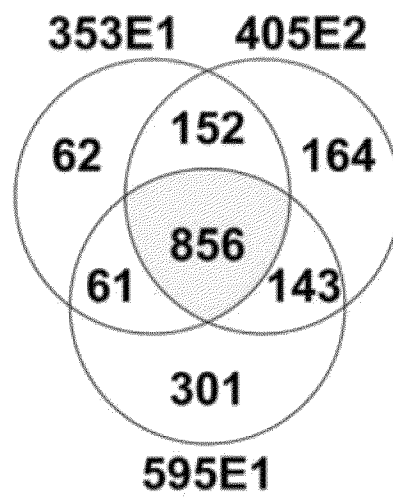


ФИГ. 3С



ФИГ. 4

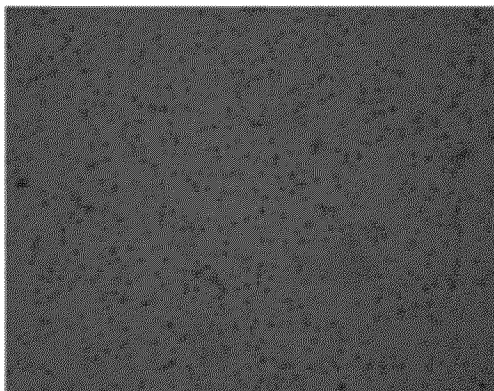
9/21



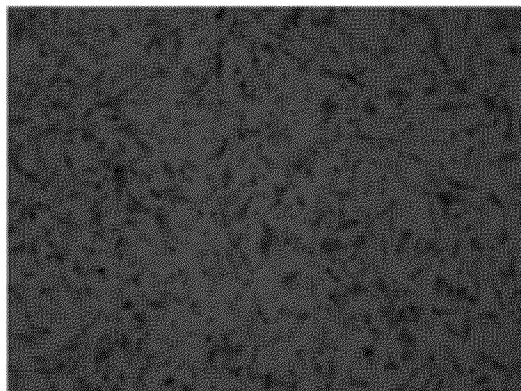
ФИГ. 5

10/21

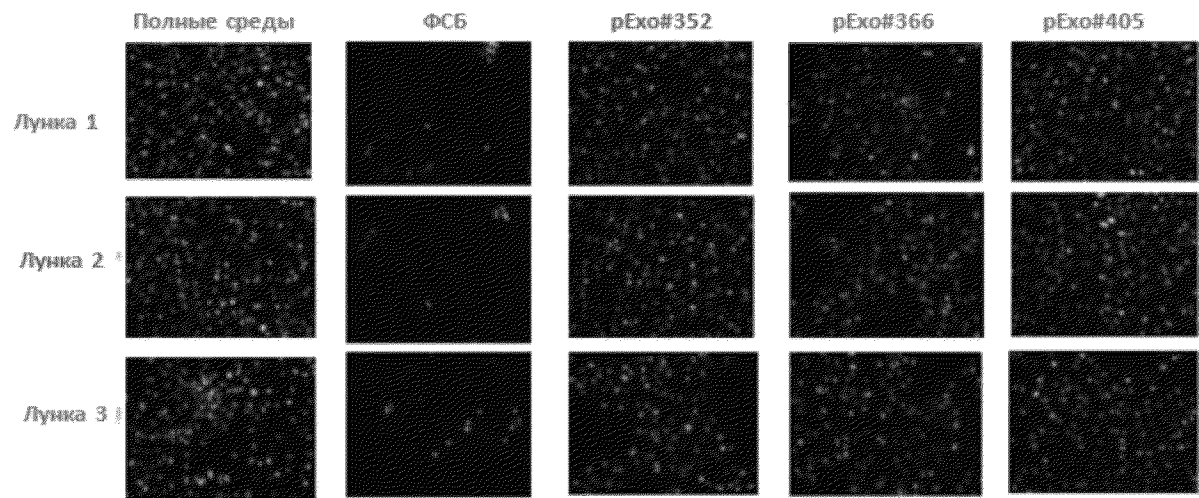
ФСБ



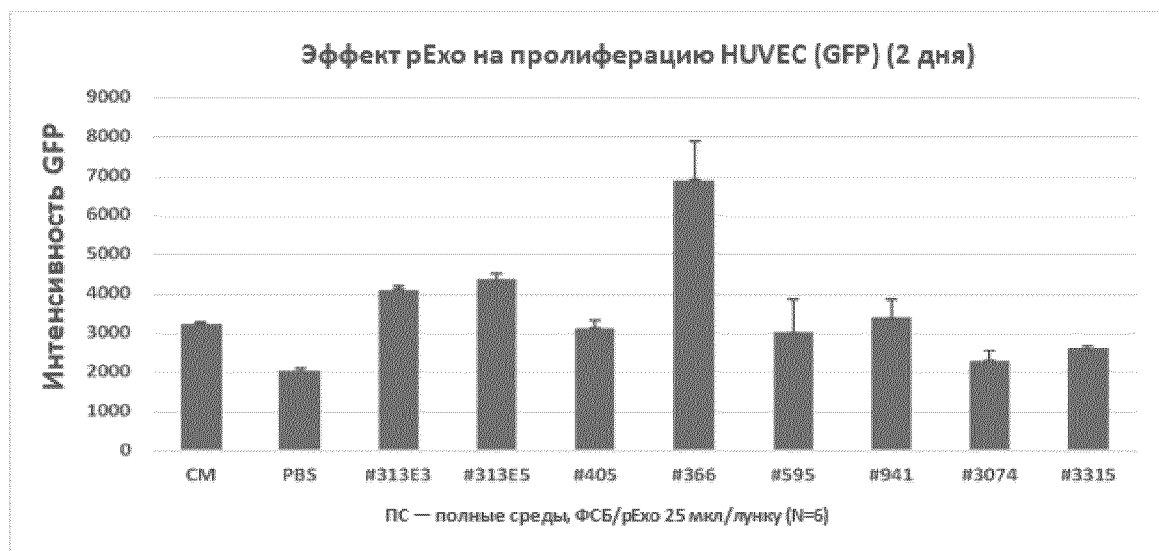
рЕхo



ФИГ. 6



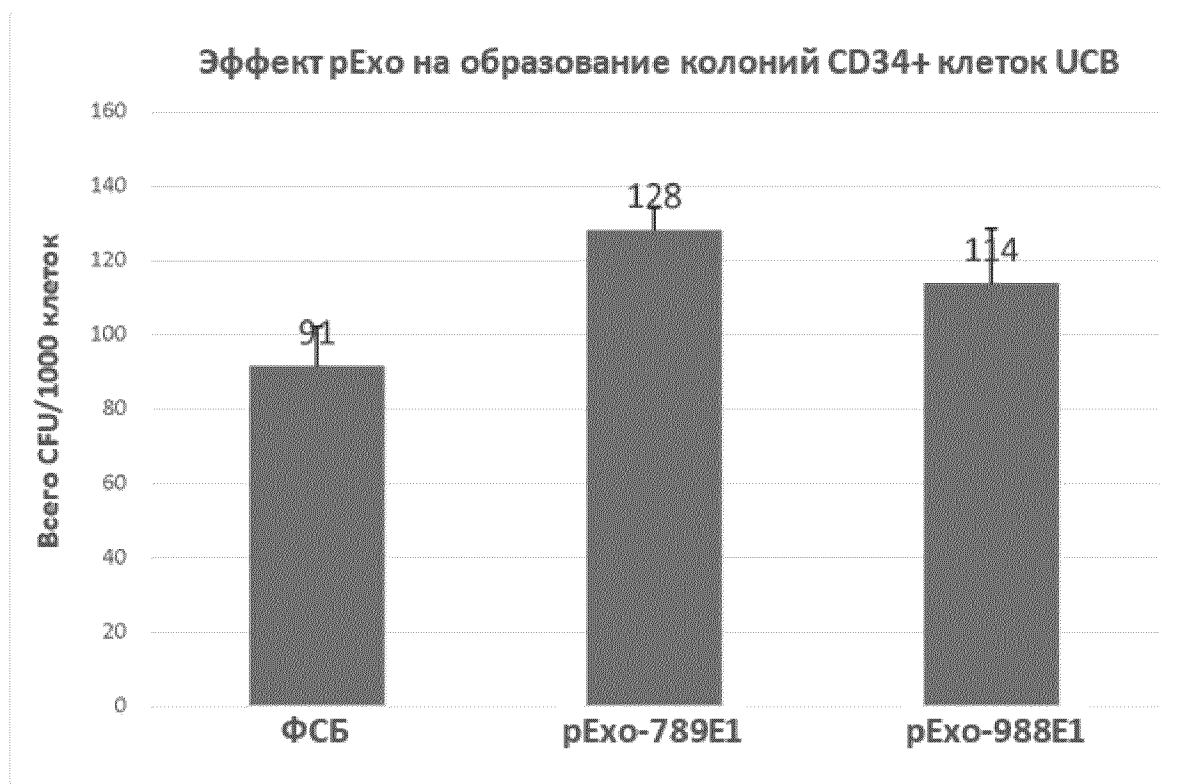
ФИГ. 7



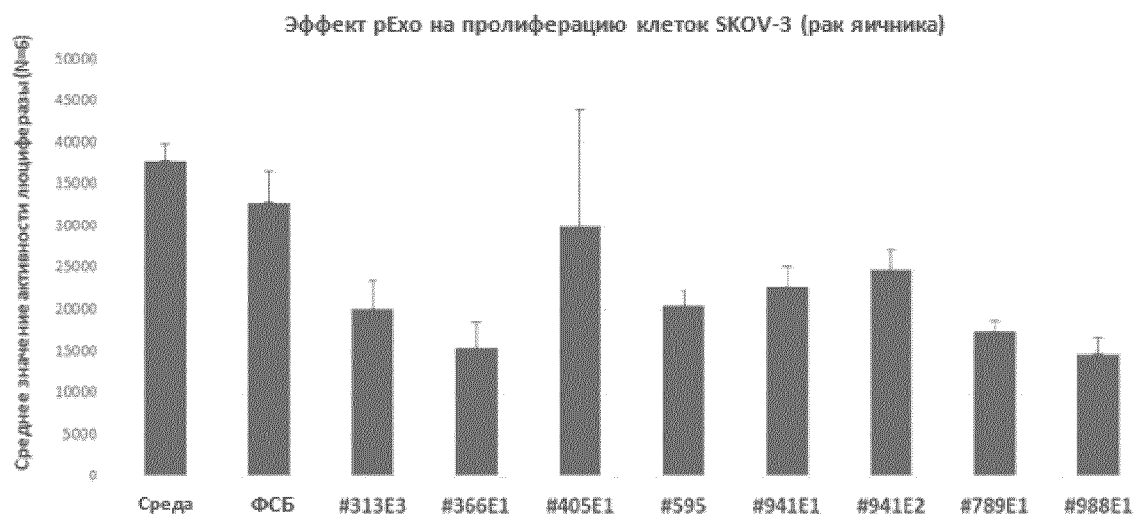
ФИГ. 8



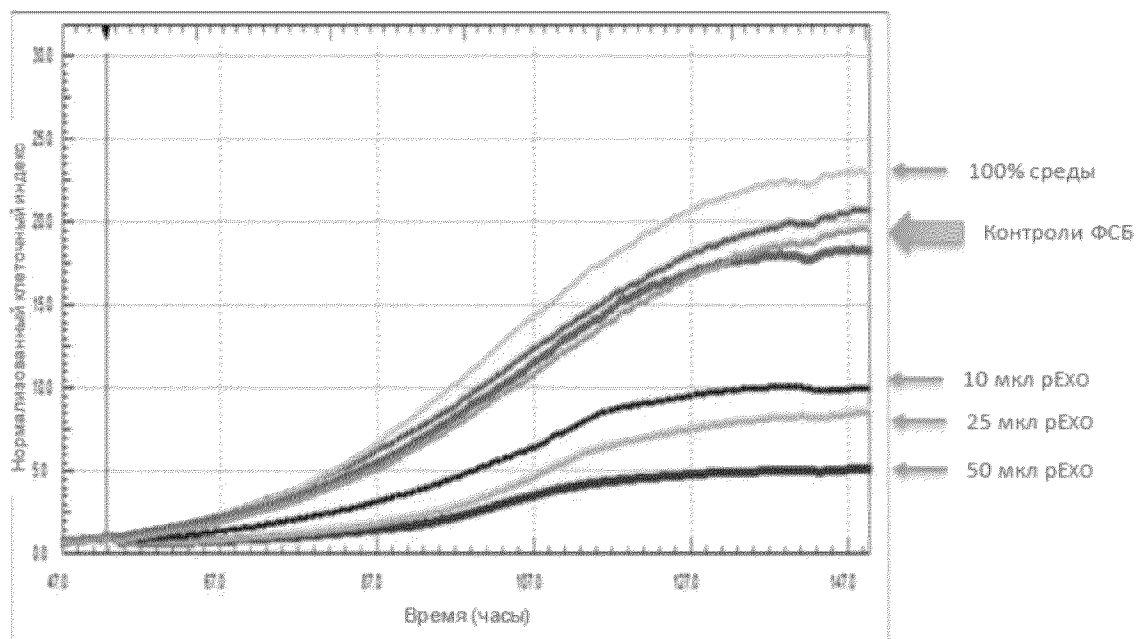
ФИГ. 9



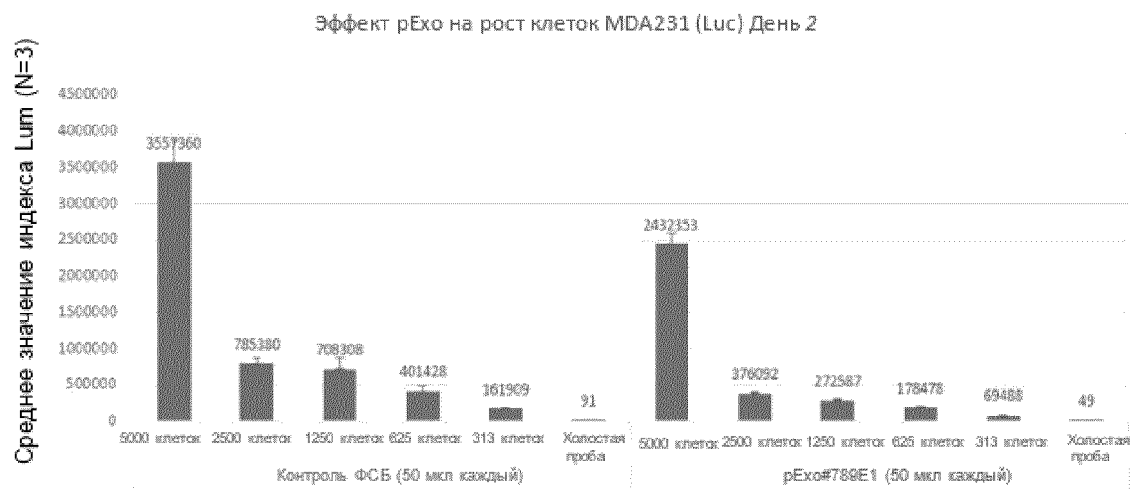
ФИГ. 10



ФИГ. 11

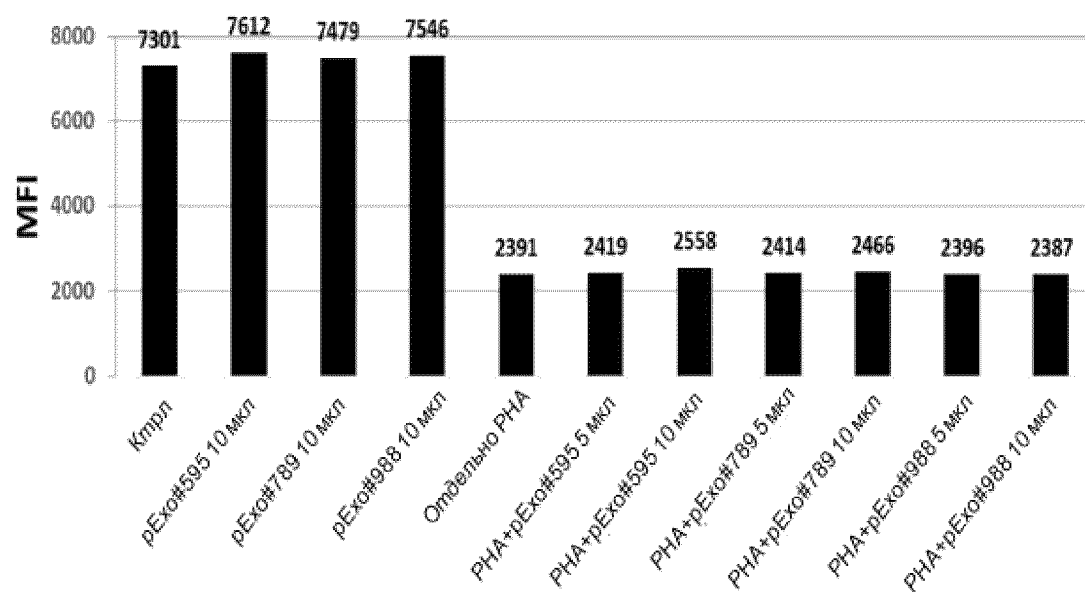


ФИГ. 12

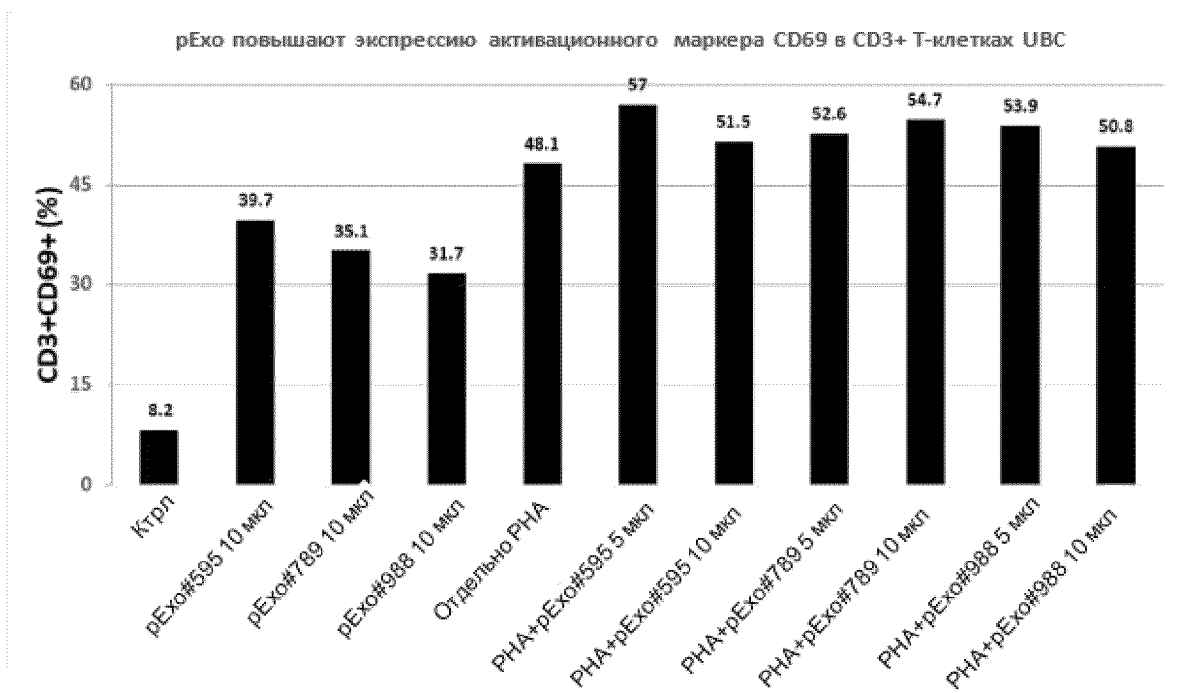


ФИГ. 13

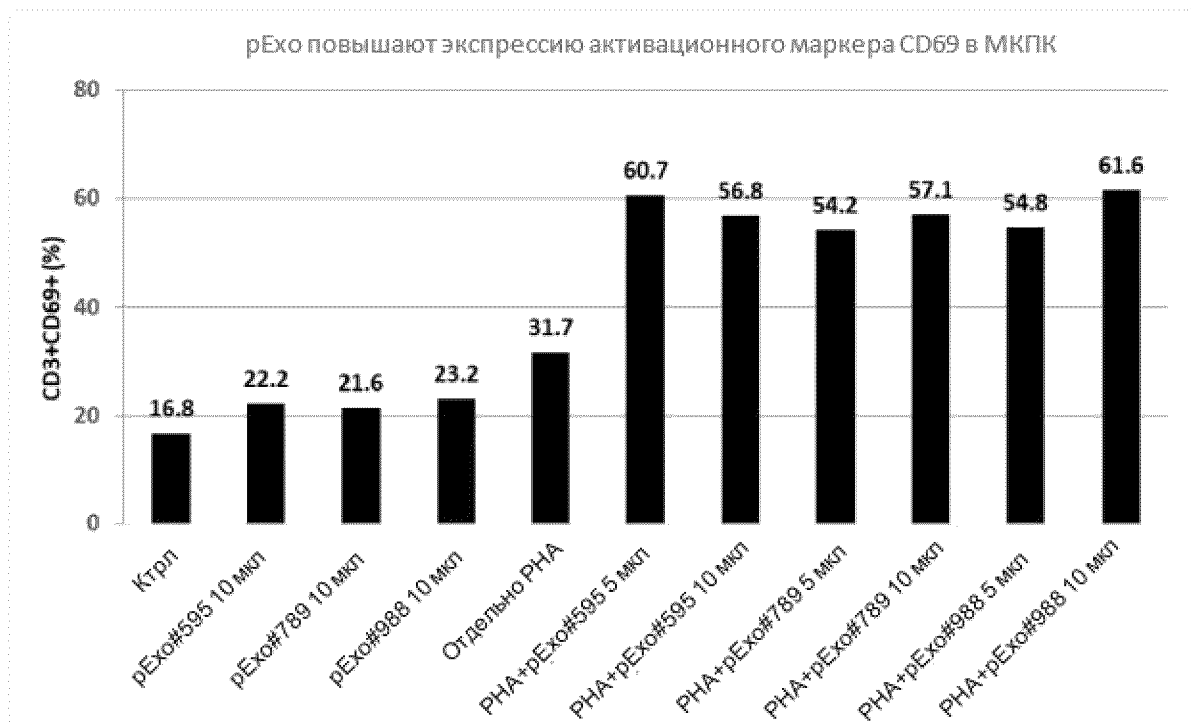
Эффект рЕхо на пролиферацию CD3+ Т-клеток (Т-клетки пуповинной крови)



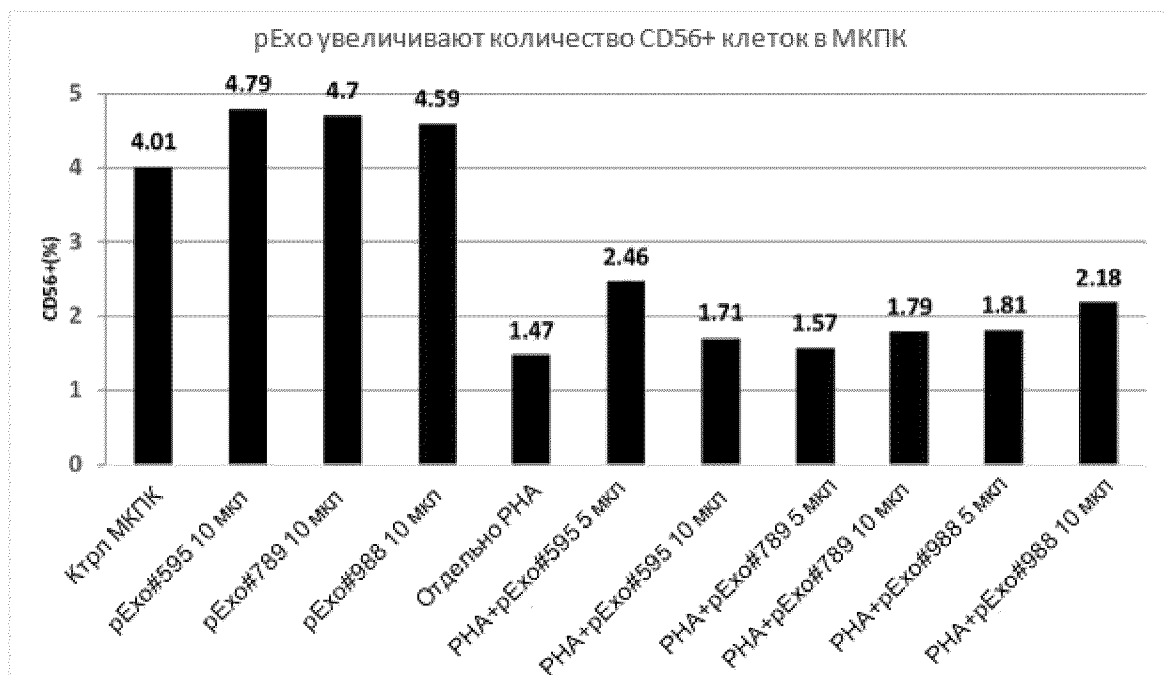
ФИГ. 14



ФИГ. 15



ФИГ. 16



ФИГ. 17