



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.16

(21) Номер заявки
201892536

(22) Дата подачи заявки
2017.05.04

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/407 (2015.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НОСИТЕЛИ, СОДЕРЖАЩИЕ микроРНК, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ФИБРОЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ГИПЕРГЛИКЕМИЕЙ

(31) **16168546.6**

(32) **2016.05.06**

(33) **EP**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/EP2017/060612**

(87) **WO 2017/191234 2017.11.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
УНИЦИТЕ ЭФ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Брицци Мария Феличе, Камусси Джовани (IT)

(74) Представитель:
Ловцов С.В., Левчук Д.В., Вилесов А.С., Коптева Т.В., Ясинский С.Я. (RU)

(56) SARA GALLO ET AL.: "Stem Cell-Derived, microRNA-Carrying Extracellular Vesicles: A Novel Approach to Interfering with Mesangial Cell Collagen Production in a Hyperglycaemic Setting", PLOS ONE, vol. 11, no. 9, 9 September 2016 (2016-09-09), page e0162417, XP055385670, DOI: 10.1371/journal.pone.0162417, the whole document
YAN WANG ET AL.: "Influence of erythropoietin on microvesicles derived from mesenchymal stem cells protecting renal function of chronic kidney disease", STEM CELL RESEARCH & THERAPY, vol. 45, no. 1, 22 December 2015 (2015-12-22), page 256, XP055292691, London, UK ISSN: 1757-6512, DOI: 10.1186/s13287-015-0095-0, page 4, right-hand column, last paragraph; figure 3, page 6, right-hand column, last paragraph; figure 6
JUAN HE ET AL.: "Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in

the mouse remnant kidney model", NEPHROLOGY, vol. 17, no. 5, 24 July 2012 (2012-07-24), pages 493-500, XP055292834, AU ISSN: 1320-5358, DOI: 10.1111/j.1440-1797.2012.01589.x, page 498, left-hand column, line 14, right-hand column, line 18; figure 4

FEDERICA COLLINO ET AL.: "Microvesicles Derived from Adult Human Bone Marrow and Tissue Specific Mesenchymal Stem Cells Shuttle Selected Pattern of miRNAs", PLOS ONE, vol. 5, no. 7, 27 July 2010 (2010-07-27), page e11803, XP055067748, DOI: 10.1371/journal.pone.0011803, cited in the application, table 3

FELIX JANSEN ET AL.: "Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism", JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE, 1 June 2015 (2015-06-01), pages n/a-n/a, XP055292589, RO, ISSN: 1582-1838, DOI: 10.1111/jcmm.12607, figures 3B, 4A

WO-A1-2014013258

WO-A2-2010151640

WO-A2-2012020307

SWETA RANI ET AL.: "Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications", MOLECULAR THERAPY, vol. 23, no. 5, 19 March 2015 (2015-03-19), pages 812-823, XP055292711, GB, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2015.44, the whole document

A.D. MCCLELLAND ET AL.: "miR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting PTEN and SMAD7", CLINICAL SCIENCE., vol. 129, no. 12, 11 November 2015 (2015-11-11), pages 1237-1249, XP055292594, GB, ISSN: 0143-5221, DOI: 10.1042/CS20150427, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к новому терапевтическому применению фармацевтически приемлемых носителей, содержащих miR222. В частности, настоящее изобретение относится к применению внеклеточных везикул (EV), которые содержат микроРНК miR222, в лечении фиброзного заболевания, вызванного гипергликемией, такого как диабетическая нефропатия и/или почечный фиброз.

Настоящее изобретение относится к новому терапевтическому лечению фиброзных заболеваний. Более конкретно, настоящее изобретение относится к применению фармацевтических носителей, таких как внеклеточные везикулы (EV), полученные из стволовых клеток, в лечении фиброзных заболеваний, вызванных гипергликемией. Основное внимание уделяется фиброзным почечным заболеваниям, таким как диабетическая нефропатия.

Фиброз часто наблюдается после повреждения ткани. Фиброз, индуцированный гипергликемией, представляет собой особый тип фиброза, обнаруживаемый у больных сахарным диабетом. Почка часто поражается такими фиброзными заболеваниями.

Сахарный диабет является основным фактором хронической болезни почек (CKD) в западных странах, на который приходится приблизительно 50% новых случаев. Почти у 40% страдающих сахарным диабетом развивается диабетическая нефропатия (DN), которая, таким образом, становится основной причиной почечного заболевания терминальной стадии (ESRD) в урбанизированных странах. Больные с CKD подвержены повышенному риску не только почечного заболевания терминальной стадии, но также сердечно-сосудистого заболевания и смерти. Необходимо определить новые цели для лучшего контроля DN, поскольку ESRD может проявляться, несмотря на строгий гликемический контроль и применение различных терапевтических подходов.

Ключевые патологические признаки DN ранней стадии включают в себя повреждение/потерю подоцитов и гипертрофию мезангиальных клеток (MC). Последующая экспансия популяции предшественников миофибробластов внутри почечной стромы и усиленный синтез белков внеклеточного матрикса (ECM) ведет к утолщению клубочковой базальной мембраны и тубулоинтерстициальному фиброзу.

Почечное структурное изменение в DN характеризуется скоростью ранней пролиферации как гломерулярных, так и тубулярных клеток, а также поздним накоплением белков внеклеточного матрикса, поскольку коллаген IV и фибронектин приводят к прогрессирующему увеличению мезангиальной массы.

Сообщалось, что роль miR заключается в обеспечении фиброзного процесса в различных патологических условиях, в том числе при DN. miR21 вызывает особый интерес в экспансии мезангиальных клеток. Недавно сообщалось, что miR21 также повышается в моче больных сахарным диабетом 2 типа. Сообщалось, что различные цели miR21 способствуют продуцированию коллагена и фиброзу. Повышающая регуляция PTEN, приводящая в результате к активации пути Akt-mTOR, в основном способствует данному процессу. На самом деле в предшествующем уровне техники было показано, что интерферирование с miR21 обращает гистологические аномалии почек в предклинической модели DN. Гены miR, подобно другим генам, могут регулироваться факторами транскрипции. В этом отношении miR-21 был описан как целевой ген STAT5 в клетках Jurkat, а также в клетках молочной железы в ответ на пролактин. С другой стороны, STAT5 сам мог контролироваться различными miR, в том числе miR222 и miR223, что указывает на чрезвычайную сложность сценария.

Клинические нефрологи и нефрологи-экспериментаторы работают в различных областях по улучшению исходов CDK. В частности, основное исследование с использованием *in vivo* и *in vitro* моделей в настоящее время направлено на определение молекулярной основы для основных путей, вовлеченных в прогрессирование CKD до ESRD, и на определение новых терапевтических подходов к ингибированию почечного фиброза.

MSC различного происхождения являются на данный момент наиболее широко исследованными стволовыми клетками в регенеративной медицине. Несмотря на то, что изначально предполагали, что MSC нацеливаются на поврежденные ткани и внедряются в них, где они дифференцируются и заменяют поврежденные клетки, в настоящее время положительные эффекты трансплантации MSC продемонстрировали, что они способны высвобождать трофические медиаторы. Некоторые исследования фокусировались на транспортерах внеклеточной РНК (exRNA), показывая, что они могут присутствовать в биологических жидкостях в форме везикул, в том числе экзосом и микровезикул. Поскольку эти везикулы имеют отличный биогенез, но обладают перекрывающимися признаками и биологической активностью, было предложено использование инклюзивного термина "внеклеточные везикулы" (EV). В последнее время EV стали уделять повышенное внимание как хорошо сохранившимся эволюционным механизмам связи между клетками. В частности, обнаружили, что полученные из стволовых клеток EV могут имитировать эффект клеток посредством горизонтального переноса функциональных РНК, miR, липидов и белков при системном или локальном введении в регенеративной медицине. EV, извлеченные из разных источников стволовых клеток, могут полностью или частично разделять их груз. Более того, может быть выявлено обогащение miR или белков в зависимости от их происхождения.

Хотя общие функции EV, полученных из стволовых клеток, были темой недавних исследований в различных патологических условиях, только частично исследовали то, как механически они защищают клетки от повреждающих факторов, например, в ответ на высокое содержание глюкозы.

В WO 2011/143499 описываются почечные стволовые клетки и их внеклеточные везикулы (EV), эффективные в лечении фиброза.

В WO 2015/052526 описывается эффект микрочастиц (т.е. внеклеточных везикул, EV) из нейронных стволовых клеток при лечении фиброза.

Для поиска нового терапевтического подхода к фиброзу, вызванному гипергликемией, авторы на-

стоящего изобретения анализировали эффекты EV, высвобождаемых из различных источников стволовых клеток, в отношении HG-индуцированного продуцирования коллагена (при этом "HG" означает "высокое содержание глюкозы"), уделяя особое внимание их эффектам в отношении экспрессии STAT5A, miR21, miR222, miR100 и TGF β . В частности, анализировали лечение диабетической нефропатии и почечного фиброза.

Как будет подробно показано в экспериментальном разделе настоящего описания, результаты их исследования показали, что EV, высвобожденные из различных типов стволовых клеток, защищают мезангиальные клетки от HG-индуцированного продуцирования коллагена. В частности, авторы настоящего изобретения отмечали, что EV, путем переноса микроРНК, обозначенной miR222, регулируют экспрессию STAT5, который, в свою очередь, контролирует miR21, экспрессию TGF β 1 и синтез матричных белков. Более того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что EV, путем управления изменениями в равновесии между miR21 и miR100 в реципиентной клетке, также могут опосредованно способствовать ингибированию продуцирования коллагена. Эти результаты указывают на то, что EV, высвобожденные из различных стволовых клеток, могут переносить соответствующий механизм для сохранения мезангиальных клеток от опосредованного HG повреждения.

Поэтому первый аспект настоящего изобретения относится к фармацевтически приемлемому носителю, несущему miR222, для применения в лечении фиброзного заболевания, вызванного гипергликемией, в частности диабетической нефропатии и/или почечного фиброза. Также предусматривается лечение других фиброзных заболеваний, вызванных гипергликемией, таких как кардиомиопатия, неалкогольная жировая болезнь печени (Ban and Twigg, 2009), в частности NASH (неалкогольный стеатогепатит), и диабетическая ретинопатия.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения фармацевтически приемлемый носитель дополнительно содержит микроРНК "miR100".

miR222 и miR100 представляют собой микроРНК (miRNA), известные *per se*; их признаки и последовательности можно найти, например, в базе данных, называемой miRBase, под номерами доступа MI0000299 и MI0000102 соответственно.

Фармацевтический эффект можно объяснить за счет микроРНК, содержащихся в фармацевтическом носителе. Предусматривается любая эффективная трансфекция целевой клетки с микроРНК для эффективного применения в лечении фиброзных заболеваний, вызванных гипергликемией. Эффективная трансфекция микроРНК требует подходящего фармацевтического носителя, предпочтительно в форме микро- или наночастицы. Такие носители коммерчески доступны, в том числе микроносители на основе альгината (GEM, Global Cell Solutions), на основе декстрана (Cytodex, GE Healthcare), на основе коллагена (Cultispher, Percell) и на основе полистирола (SoloHill Engineering).

В качестве альтернативы фармацевтическим носителем для микроРНК может быть вирусный вектор. В вирусных системах обычно используются ретровирусы, лентивирусы, аденовирусы или аденоассоциированные вирусы (AAV) в качестве векторов доставки, как раскрывается, например, в Ningning Yang. An overview of viral and nonviral delivery systems for microRNA. Int J Pharm Investig. 2015 Oct-Dec; 5(4): 179-181. Поэтому отбор и применение подходящего носителя для микроРНК находится в компетенции специалиста в данной области.

Еще более предпочтительным фармацевтическим носителем для микроРНК является везикула, такая как липосома или внеклеточная везикула (EV). Внеклеточные везикулы, такие как полученные из клеток микровезикулы или экзосомы, являются наиболее предпочтительными фармацевтическими носителями.

Поэтому согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения фармацевтически приемлемым носителем является внеклеточная везикула (EV), полученная из стволовой клетки, предпочтительно из взрослой стволовой клетки, более предпочтительно из мезенхимной стволовой клетки (MSC), такой как, например, стромальная стволовая клетка костного мозга, или стволовая клетка жировой ткани (ASC), или не являющаяся овальной клетка-предшественник печени человека (HLSC). HLSC и способ их получения раскрываются международной патентной заявкой, опубликованной как WO 2006126219.

Следующий аспект настоящего изобретения относится к композиции внеклеточных везикул, выделенных из кондиционированной среды стволовой клетки, предпочтительно из кондиционированной среды взрослой стволовой клетки, более предпочтительно из кондиционированной среды мезенхимной стволовой клетки (MSC) или стволовой клетки печени человека (HLSC), для применения в лечении фиброзного заболевания, вызванного гипергликемией, предпочтительно диабетической нефропатии, почечного фиброза, кардиомиопатии или неалкогольной жировой болезни печени, в частности NASH, или диабетической ретинопатии. Внеклеточные везикулы заявляемой композиции предпочтительно содержат микроРНК miR222 и необязательно микроРНК микроРНК100.

Внеклеточная везикула (EV) для применения в соответствии с настоящим изобретением является встречающейся в природе EV или, в качестве альтернативы, EV, которая была сконструирована с содержанием значительно более высокого количества miR222 или miR100 по сравнению со встречающейся в природе внеклеточной везикулой (EV) и которую получают путем загрузки miR222 или miR100 в выде-

ленную внеклеточную везикулу *ex vivo*.

В заявке на европейский патент, опубликованной как EP 2010663, специалисту в данной области представлены инструкции о конструировании EV со специфическими микроРНК. Известными специалистам в данной области методиками введения РНК в везикулы или экзосомы являются трансфекция или совместная инкубация. Известными способами трансфекции являются, например, электропорация, липофекция, микроинъекция, трансфекция вирусными и невирусными векторами, трансфекция с помощью магнита и сонопорация. Следовательно, сконструированная EV, в которую были введены miR222 или miR100 *ex vivo*, является другим аспектом настоящего изобретения.

Как проиллюстрировано в дополнительных подробностях в следующей экспериментальной части, подходящим способом оценивания значительно более высокого количества miR222 или miR100 по сравнению со встречающейся в природе внеклеточной везикулой (EV) является способ $\Delta\Delta CT$ анализа данных qPCR.

Выраженная как относительное значение эффективность загрузки, т.е. количество целевой молекулы (т.е. либо miR222, либо miR100), которое находится в сконструированной EV в соответствии с настоящим изобретением по сравнению с естественным количеством, является по меньшей мере 2-кратной. В качестве альтернативы эффективность загрузки может быть выражена в абсолютных величинах как число загруженных целевых молекул на EV. Предполагают, что это значение может варьировать приблизительно от 1×10^3 до приблизительно 1×10^5 целевых молекул/EV, что выше естественного количества.

Следующая экспериментальная часть, в которой раскрываются эксперименты, выполняемые авторами настоящего изобретения с EV, полученными из MSC и HLSC, представлена исключительно с целью иллюстрации и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, определяемого прилагаемой формулой изобретения.

Результаты, полученные авторами настоящего изобретения, демонстрируют, что в мезангиальных клетках HG управляет экспрессией TGF β и продуцированием коллагена через STAT5A-опосредованный путь. С помощью экспрессии конструкции $\Delta NSTAT5$ в мезангиальных клетках, культивируемых при HG, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что активация STAT5A контролирует экспрессию miR21. Авторы настоящего изобретения также показали, что EV, высвобожденные из MSC и HLSC, защищают мезангиальные клетки от индуцированного HG продуцирования коллагена. В частности, они отмечали, что EV с помощью переноса miR222 в мезангиальные клетки регулируют экспрессию STAT5A, что, в свою очередь, контролирует содержание miR21, экспрессию TGF β и синтез матричных белков. Эти результаты далее были подтверждены надэкспрессией miR222 в мезангиальных клетках, культивируемых в условиях HG. Более того, с помощью надэкспрессии miR100 авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что изменения равновесия между miR21 и miR100 в реципиентной клетке, являющиеся результатом переноса груза EV, приводят к подавлению mTOR и нарушению как экспрессии TGF β , так и продуцирования коллагена. Интересно, что эти эффекты выявляли только в культивируемых при HG клетках.

Пример 1.

Материалы и способы

Клеточные культуры

Человеческие мезангиальные клетки (MC) культивировали в DMEM с 1,0 г/л D-глюкозы (низкое содержание глюкозы, LG) или DMEM 25 мМ D-глюкозы (высокое содержание глюкозы, HG). MC также культивировали в DMEM с LG и HG без эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) в течение 24 ч в присутствии полученных из MSC или HLSC EV. То же число EV использовали для стимуляции MC во всех экспериментальных условиях (7000 EV/целевая клетка).

Выделение и количественная оценка полученных из MSC или HLSC EV

MSC и HLSC культивировали в среде EndoGRO без эмбриональной телячьей сыворотки в течение 24 ч для сбора EV из надосадочных жидкостей. После центрифугирования при 3000 g в течение 30 мин для удаления дебриса бесклеточные надосадочные жидкости подвергали дифференциальному ультрацентрифугированию при 10000 и 100000 g (ультрацентрифуга Beckman Coulter Optima L-90K; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) в течение 3 ч при 4°C. EV либо использовали свежими, либо хранили при -80°C после повторного суспендирования в DMEM, которую дополняли 1% DMSO (Deregibus, 2007). Замороженные EV промывали и пеллетировали с помощью ультрацентрифугирования при 100000 g для удаления DMSO перед клеточными экспериментами. Не наблюдали разницу в биологической активности между свежими и хранящимися EV. Содержание белка в EV оценивали количественно с использованием метода Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Любое возможное загрязнение тестировали с использованием анализа амебоцитов *Limulus* (концентрация <0,1 нг/мл) (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA, USA). Анализ распределения размеров EV выполняли с использованием NanoSight LM10 (NanoSight Ltd, Minton Park UK). Частицы в образцах иллюминировали с использованием источника лазерного излучения, рассеянный свет захватывали камерой и анализировали с использованием анализа отслеживания наночастиц (NTA). При NTA автоматически отслеживали и измеряли размер частиц в соответствии с броуновским движением и коэффициентом диффузии (Dt).

Клеточная пролиферация

Клеточную пролиферацию при условиях как LG, так и HG с EV или без EV анализировали путем непосредственного подсчета клеток тремя разными операторами.

Анализ вестерн-блоттинга

МС лизировали и получали концентрации белков, как описывалось ранее (Olgasi, 2014). 50 мкг белков подвергали SDS-PAGE, переносили на нитроцеллюлозные мембраны и обрабатывали, как описывалось ранее (Olgasi, 2014). Использовали денситометрический анализ для вычисления разниц в кратности индуцирования уровней белка, которые нормализовали к актину. Значения регистрировали как относительные количества.

Выделение РНК и количественная PCR в режиме реального времени (qRT-PCR)

Суммарную РНК выделяли из МС с использованием реагента TRIzol (Invitrogen) согласно инструкциям изготовителя. РНК оценивали количественно с помощью спектрофотометрии (Nanodrop ND-1000, Wilmington, DE, USA). Затем РНК из клеток обратно транскрибировали с использованием набора TaqMan microRNA RT, специфического по отношению к miR-222, или набора Syber Green microRNA RT, специфического по отношению к miR-21 и miR-100. Таким образом, РНК подвергали qRT-PCR с использованием аналитического набора TaqMan/Syber microRNA и системы выявления последовательностей ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Экспрессию miR нормализовали к небольшой ядерной РНК - RNU6B.

Транфекция МС с premiR-100 и premiR-222

Эксперименты с мутацией приобретения функции выполняли в мезангиальных клетках, трансфицированных либо с отрицательным контролем pre-miR, либо с pre-miR100 и предшественником premiR-222 (Applied Biosystem) согласно инструкциям изготовителя. Затем все белки, экстрагированные при клеточном лизисе этих образцов, подвергали вестерн-блоттингу и все РНК анализировали с помощью RT-PCR.

Перенос miR из EV в МС

Для анализа переноса miR-222 из EV в МС проводили эксперименты по переносу miR, как описывалось ранее у Yuan (Yuan, 2009). Инкубировали 5×10^5 клеток/лунка МС с ингибитором транскрипции α -аманитином (Lee, 2004) в отсутствие или в присутствии EV, предварительно обработанных РНКазой или не обработанных РНКазой. Суммарную РНК из МС, обработанную, как описано выше, подвергали qRT-PCR для экспрессии miR. А качестве опосредованного показателя переноса miR авторы настоящего изобретения определяли разницу в значениях Ct между обработанными α -аманитином клетками в отсутствие или в присутствии EV, предварительно обработанных РНКазой или не обработанных РНКазой; при этом положительное значение указывало на перенос miR в целевые клетки. Если сигнал не выявляли, то образцу приписывали значение Ct 40.

Транфекция доминантной негативной конструкции (Δ N) STAT5A

В отдельных экспериментах МС, культивируемые в течение 48 ч в присутствии или в отсутствие HG, временно трансфицировали с конструкцией Δ NSTAT5 (Defilippi, 2005, Zeoli, 2008). Затем клетки обрабатывали с получением клеточных экстрактов для анализа вестерн-блоттинга или выделения суммарной РНК для оценивания экспрессии miR21.

Анализ старения

Старение оценивали путем измерения активности кислой β -галактозидазы в N-ASC, которые дифференциально культивировали, как описывалось ранее (Togliatto, 2010).

Статистический анализ

Все данные представлены как среднее или процент $\pm$ s.e.m. Использовали тест Д'Агостино-Пирсона для тестирования нормальности. Данные биометрических измерений больных и контролей в анализах *in vitro* ангиогенеза, миграции, адгезии и старения, в экспериментах по экспрессии miR, клеточной пролиферации, мутации потери и приобретения функции и, наконец, в денситометрическом анализе для вестерн-блоттингов анализировали с использованием t-критерия Стьюдента для сравнения двух групп и с использованием однофакторного дисперсионного анализа, а затем критерия множественных сравнений Тьюки для 3 групп. Три эксперимента, выполненных в трех повторностях, служили минимальным размером выборки, обеспечивающим 90% статистическую мощность между экспериментальными группами с уровнем вероятности 0,05, двухсторонней гипотезой. Порог для статистической значимости устанавливали при $P < 0,05$ (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Все статистические анализы выполняли с использованием GraphPad Prism версии 5.04 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Результаты

Кратковременная стимуляция высоким содержанием глюкозы индуцирует пролиферацию мезангиальных клеток (МС), продуцирование коллагена IV типа и экспрессию miR21

Для имитации опосредованного острой гипергликемией повреждения мезангиальных клеток МС культивировали в среде с высоким содержанием глюкозы (25 мМ) в течение 48 ч. Анализировали пролиферацию и старение. Как показано на фиг. 1А, HG обеспечивает значительное усиление пролиферации МС, как показано рядом клеток и содержанием циклина D1 (фиг. 1В). Не выявляли изменения в числе

старееющих МС (фиг. 1С). Продуцирование коллагена МС является критерием гломерулярного повреждения. Таким образом, оценивали продуцирование коллагена в МС, вызванное НГ. Анализ вестерн-блоттинга как на суммарных клеточных лизатах, так и на надосадочных жидкостях показывал значительное усиление продуцирования коллагена IV типа по сравнению с обработанными при низком содержании глюкозы клетками (фиг. 1D и E). Усиление продуцирования коллагена указывает на то, что МС сдвигаются к фиброзному секреторному фенотипу. TGFβ, который уже продуцировался МС, дополнительно повышался при обработке НГ (фиг. 1F). miR21, хорошо известная микроРНК, вовлекаемая в диабетическую нефропатию, как известно, индуцирует экспансию матрикса мезангиальных клеток. Последовательно установили, что обработка с НГ индуцирует экспрессию miR21 (фиг. 1G). Исследовали вовлечение этого пути передачи сигнала.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что даже в МС, обработанных с НГ, может быть выявлен высокий уровень mTOR (фиг. 1H).

EV из MSC и HLSC ингибируют продуцирование коллагена и экспрессию miR21 в МС.

EV извлекали из MSC и HLSC и анализировали на предмет пролиферации МС и продуцирования коллагена. Таким образом, МС, культивируемые при концентрации с LG или НГ в течение 48 ч, культивировали в бессывороточной среде и подвергали обработке с EV в течение 18 ч. Как показано на фиг. 2A, EV не влияют на пролиферацию МС. Однако при оценке продуцирования коллагена извлеченные из MSC и HLSC EV значительно снижали продуцирование коллагена (фиг. 2B и C). Затем выявляли подавление экспрессии miR21 (фиг. 2D), mTOR (фиг. 2E, F) и TGFβ (фиг. 2G, H).

Полученные из MSC и HLSC EV регулируют экспрессию STAT5A в МС, подверженных НГ.

Наблюдение того, что EV, полученные из MSC и HLSC, нарушают экспрессию miR21, побудило авторов настоящего изобретения исследовать, может ли STAT5A участвовать в ее регуляции. С этой целью МС, обработанные с НГ в присутствии или в отсутствие EV, анализировали на предмет активации STAT5A. Как показано на фиг. 3A, STAT5A испытывал активацию в ответ на обработку с НГ, эффект, который ингибировали обработкой с EV (фиг. 3B, C). Наблюдение, что снижение экспрессии STAT5A выявляли в таких экспериментальных условиях, дает веские основания предполагать возможность того, что груз EV может регулировать его экспрессию. Чтобы исследовать эту возможность, конструкцию ΔNSTAT5A трансфицировали в МС (фиг. 3D) и анализировали экспрессию miR21. Как показано на фиг. 3E, ингибирование активации STAT5A приводило к подавлению miR21 в обработанных с НГ МС. Затем при анализе продуцирования коллагена в таких экспериментальных условиях обнаружили, что его экспрессия почти полностью подавлялась. Интересно отметить, что также показали, что ингибирование пути передачи сигнала STAT5A также предупреждает опосредованную НГ экспрессию TGFβ (фиг. 3F).

Груз miR в EV регулирует экспрессию STAT5A.

Ранее сообщали о miRNomic в EV MSC и HLSC (Collino 2010). Авторы настоящего изобретения исследовали, могут ли быть miR, экспрессированные в EV из таких клеточных источников, подходящими для регулирования пути передачи сигнала, активированного с помощью НГ. Они включали в себя miR222. miR222, как сообщалось, является посттранскрипционным регулятором STAT5A. Поэтому экспрессию miR222 оценивали в культивируемых с НГ МС, обработанных с помощью EV. Как показано на фиг. 4A, miR222 подавляется при обработке с НГ, в то время как повышается при обработке EV. То, что этот эффект зависел от высвобождения содержащихся в EV miR222 в МС, демонстрировали в экспериментах, выполняемых в присутствии аманитина и EV, предварительно обработанных РНКазой или не обработанных РНКазой (фиг. 4B). Для дополнительного подтверждения результатов выполняли эксперименты с мутацией приобретения функции с использованием МС, трансфицированных premiR222 и культивируемых в условиях с НГ. Как и ожидалось, надэкспрессия miR222 приводила к резкому снижению содержания STAT5A, а также содержания miR21 в клетке, экспрессии TGFβ и продуцирования коллагена в обработанных с НГ МС (фиг. 4D-F). Что еще более важно, такое явление не происходило в культивируемых при LG МС, что указывает на то, что специфический путь передачи сигнала индуцируется гипергликемической средой.

Опосредованное EV подавление miR21 может обеспечивать посттранскрипционную активность miR100, которая способствует ингибированию продуцирования коллагена.

Авторы настоящего изобретения исследовали, может ли miR100 также способствовать опосредованным EV эффектам. Сначала оценивали экспрессию miR100 в МС, подвергаемых обработке с EV. Как показано на фиг. 5A, тогда как содержание miR100 в МС повышалось при обработке с НГ, изменения в ее содержании не выявляли после обработки с EV. Однако, поскольку равновесие внутриклеточных miR может управлять специфическими биологическими реакциями, авторы настоящего изобретения предполагали, что пониженное внутриклеточное содержание miR21, ассоциированное с обработкой с EV, может оказывать положительный эффект в отношении посттранскрипционной активности miR100. Для подтверждения данной гипотезы выполняли эксперименты с мутацией потери функции с использованием premiR100 на обработанных с НГ МС. Действительно, данные, представленные на фиг. 5B, показывают, что, если экспрессия miR100 благоприятна для miR21, она может управлять сигналами, опосредованными подавлением mTOR, что приводит к ингибированию экспрессии TGFβ и продуцированию коллагена в

МС (фиг. 5С, D). Опять же, надэкспрессия miR100 не влияла на МС-культивируемые с LG МС (фиг. 5С, D). В совокупности эти данные показывают, что тонкая настройка содержания miR в реципиентных клетках, ассоциированных с обработкой с EV, также может способствовать их целебным свойствам.

Пример 2.

In vivo модель диабетической нефропатии: лечение с EV,
полученными из стволовых клеток (SC-EV)

Проводили экспериментальное исследование для изучения того, могут ли EV, высвобожденные из различных источников стволовых клеток или сыворотки крови, влиять на повреждение при экспериментальной диабетической нефропатии. С этой целью мышей подвергали обработке стрептозотоцином (STZ) (35 мг/кг в течение 4 последовательных суток, i.p.) для получения животной модели гипергликемии. После проявления сахарного диабета в момент времени ноль (T0) диабетических мышей подвергали 5 обработкам EV (по 1×10^{10} на каждую) один раз в неделю (T7, T14, T21 и T28). Через 1 месяц после проявления сахарного диабета (T30, конечная точка) измеряли следующие параметры: гликемию, массу, соотношение альбумина к креатинину в моче, pH мочи, содержание креатинина в плазме (CREA). Кроме того, почки подвергали следующим гистологическим анализам: гломерулярный и интерстициальный фиброз, гломерулярная площадь, боуменово пространство, тубулярное повреждение. Полученные результаты представлены на фиг. 6-8, которые демонстрируют результаты, полученные для каждой из следующих групп мышей: 10 здоровых мышей; 15 диабетических мышей (DN); 10 обработанных полученными из MSC EV мышей; 10 обработанных полученными из сыворотки крови EV мышей; 10 обработанных полученными из ASC EV мышей и 6 обработанных полученными из HLSC EV мышей.

На фиг. 6 показано, что креатинин в плазме повышался у диабетических мышей и что значительное снижение креатинина в плазме происходило у мышей, обработанных с EV из всех источников. На фиг. 7 показано, что существенное улучшение в отношении снижения отложения коллагена в клубочках и в интерстициальном пространстве наблюдалось у диабетических мышей, обработанных с EV. На фиг. 8 показано, что обработка со всеми тестируемыми EV приводила к существенному улучшению тубулярного повреждения по сравнению с диабетическими мышами. Все данные выражали как среднее $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, против DN, ** $p < 0,001$ против DN. Более того, для EV из всех источников показано значительное снижение в ACR и существенное восстановление значения pH.

Пример 3.

Внеклеточные везикулы, обогащенные микроРНК путем трансфекции
стволовых клеток: способ конструирования EV

Для обогащения содержания микроРНК в полученных их стволовых клеток EV мезенхимные стволовые клетки (MSC) трансфицировали путем электропорации с использованием системы трансфекции Neon (Invitrogen) согласно инструкциям изготовителя. Использовали 600 пмоль имитатора, который не присутствует во встречающихся в природе MSC, т.е. cel-miR-39, для обогащения 1×10^6 MSC, которые высевали в полную среду, дополненную эмбриональной телячьей сывороткой (FCS), и без антибиотиков. Скремблированный имитатор использовали в качестве отрицательного контроля (SCR).

На следующие сутки среду заменяли и трансфицированные клетки инкубировали на протяжении ночи в RPMI без FCS. Надосадочную жидкость собирали и центрифугировали при 2000 g в течение 15 мин для удаления клеточного дебриса и апоптических телец, а затем концентрировали при 4°C с использованием ультрафильтрационных установок (Amicon Ultra-PL 3, Millipore) с порогом молекулярной массы 3 кДа. Концентрированную среду (CM), содержащую EV, дополняли 1% диметилсульфоксида и держали при -80°C до применения.

Анализ РНК выполняли путем осаждения концентрированной среды, содержащей EV, с использованием PEG при 4°C на протяжении ночи. Осадок EV дважды промывали с помощью PBS 1x и РНК экстрагировали с использованием набора RNA/DNA/Protein Purification Plus (Norgen Biotek). Образцы РНК ретротранскрибировали и выполняли количественную PCR в режиме реального времени с системой miScript PCR (Qiagen). Использовали RNU6B или RNU48 в качестве конститутивных контролей (CTL). EV из MSC, подвергнутых электропорации без нацеливания (cel-miR-39) и без скремблирования, также использовали в качестве дополнительного контроля (EP).

На фиг. 9 показаны полученные результаты, выраженные касательно RQ (относительного количества) и кратности изменения, полученные путем применения сравнительного способа или способа $\Delta\Delta C^T$ анализа данных qPCR для вычисления эффективности загрузки.

В сравнительном способе или способе $\Delta\Delta C^T$ анализа данных qPCR значения C^T , полученные из двух разных экспериментальных образцов РНК, непосредственно нормализовали к конститутивному гену, а затем сравнивали. Сначала вычисляли разницу между значениями C^T (ΔC^T) представляющего интерес гена и конститутивного гена для каждого экспериментального образца. Затем вычисляли разницу в значениях ΔC^T между экспериментальными и контрольными образцами $\Delta\Delta C^T$ (т.е. калибраторами).

Кратность изменения в экспрессии представляющего интерес гена между двумя образцами тогда составляет

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C^T}$$

В рассматриваемом эксперименте RQ вычисляли, как изложено ниже:

$$\Delta C^T = C^T_{\text{цели}} - C^T_{\text{эталона}} \quad (C^T = \text{порог цикла}),$$

при этом целью является cel-miR-39, а эталоном является конститутивный контроль (RNU6B или RNU48).

$\Delta\Delta C^T = \Delta C^T$ тестируемого образца - ΔC^T калибраторного образца, при этом калибраторным образцом являются EV, полученные из необработанных клеток, а тестируемым образцом являются EV, полученные из обработанных клеток.

На фиг. 9 показано, что MSC могут быть эффективно загружены молекулами микроРНК с помощью электропорации и что целевые молекулы микроРНК присутствуют как в самих MSC, так и в EV, полученных из загруженных MSC. Количество целевой микроРНК, загруженной в EV, приблизительно в 100 раз ниже количества целевой микроРНК, загруженной в MSC.

Поэтому реальная оценка эффективности загрузки, выраженная в виде числа загруженных целевых молекул/EV, находится в диапазоне от 1×10^3 до 1×10^5 .

Верхний предел этого диапазона основан на фиг. 5a в Fuhrmann et al. (2014), которая показывает эффективность загрузки, варьирующей от приблизительно 10^4 до 10^5 , а также на подсчете с помощью NTA частиц EV, полученных при трансфекции MSC с различными типами микроРНК.

Ссылки.

C R Ban and S M Twigg., Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. Vasc Health Risk Manag. 2008;4(3):575-96.

Ningning Yang. An overview of viral and nonviral delivery systems for microRNA. Int J Pharm Investig. 2015 Oct-Dec; 5(4): 179–181.

Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G., Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA (2007), Blood, 110(7):2440-8.

Olgasi, C., et al. DNA vaccination against membrane-bound Kit ligand: a new approach to inhibiting tumour growth and angiogenesis. Eur J Cancer. 50, 234–246 (2014).

Yuan, A., et al. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. PLoS One. 4, e4722 (2009).

Lee, Y., et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J. 23, 4051-4060 (2004).

Togliatto G, Trombetta A, Dentelli P et al. Unacylated ghrelin rescues endothelial progenitor cell function in individuals with type 2 diabetes. Diabetes. 59, 1016–1025 (2010).

Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, Tetta C, Camussi G., Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs (2010), PLoS One. 2010 Jul 27;5(7):e11803.

Fuhrmann G. et al J Control Release. 2015 May 10;205:35-44. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.11.029. Epub 2014 Dec 4.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение фармацевтически приемлемого носителя, несущего микроРНК miR222, для лечения фиброзного заболевания, вызванного гипергликемией.

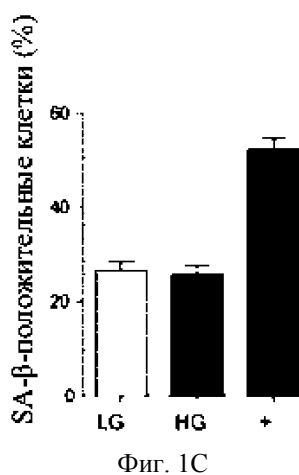
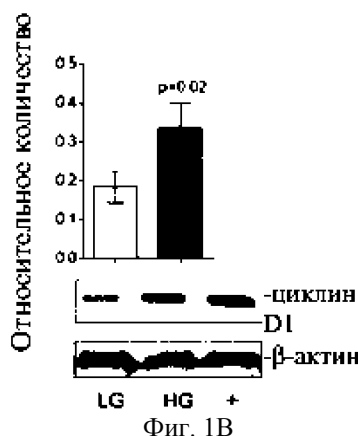
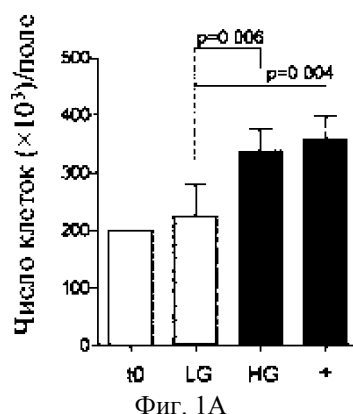
2. Применение по п.1, где указанный фармацевтически приемлемый носитель дополнительно несет микроРНК miR100.

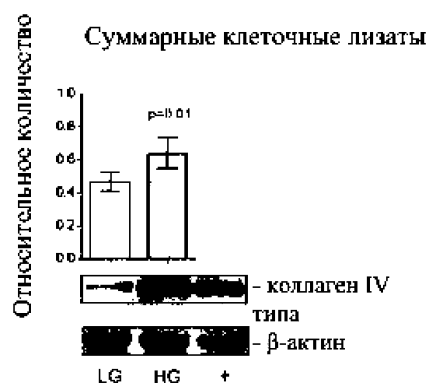
3. Применение по любому из пп.1 или 2, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой микро- или наночастицу, и при этом микроРНК или множество микроРНК содержатся внутри микро- или наночастицы или присоединены к поверхности микро- или наночастицы.

4. Применение по любому из пп.1-3, где фармацевтически приемлемым носителем является внеклеточная везикула (EV).

5. Применение по любому из пп.1-5, где фармацевтически приемлемым носителем является внеклеточная везикула (EV), полученная из стволовой клетки.

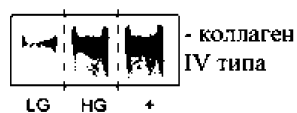
6. Применение по п.5, где внеклеточная везикула (EV) получена из взрослой стволовой клетки.
7. Применение по п.6, где внеклеточная везикула (EV) получена из мезенхимной стволовой клетки (MSC), клетки-предшественника печени человека (HLSC), не являющейся овальной, или стволовой клетки жировой ткани (ASC).
8. Применение по любому из пп.4-7, где внеклеточной везикулой (EV) является встречающаяся в природе EV или EV, сконструированная с содержанием miR222 и необязательно miR100.
9. Применение по п.8, где внеклеточная везикула (EV) сконструирована с содержанием miR222 и miR100.
10. Применение по любому из пп.1-9, где фиброзное заболевание выбрано из группы, состоящей из диабетической нефропатии, почечного фиброза, кардиомиопатии, неалкогольной жировой болезни печени, в частности NASH, и диабетической ретинопатии.



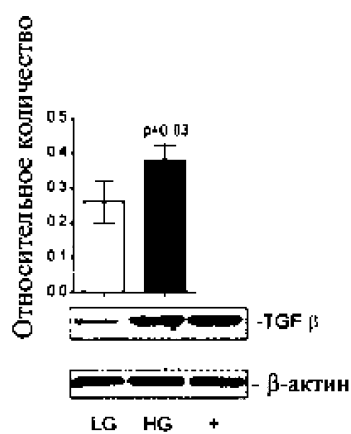


Фиг. 1D

Клеточные супернатанты

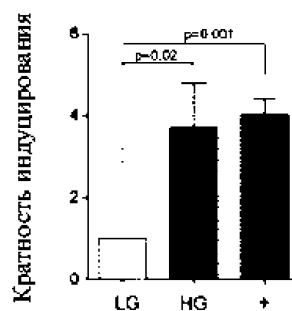


Фиг. 1E

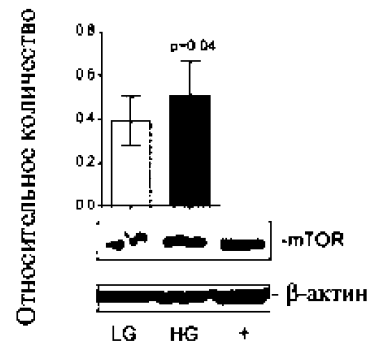


Фиг. 1F

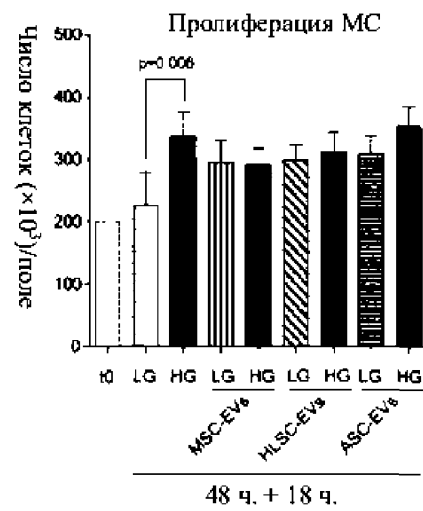
Экспрессия miR-21



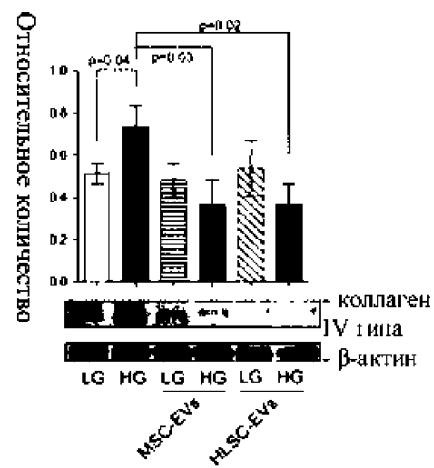
Фиг. 1G



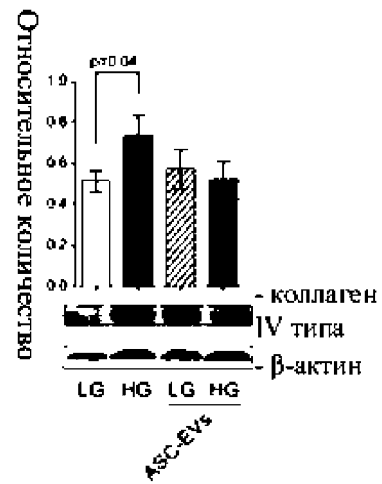
Фиг. 1Н



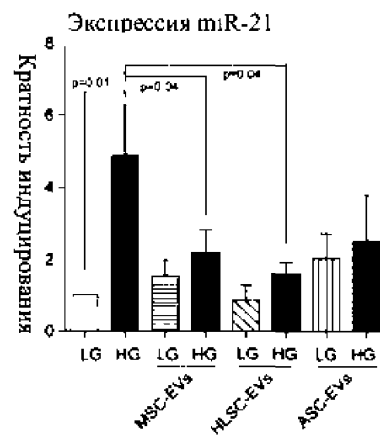
Фиг. 2А



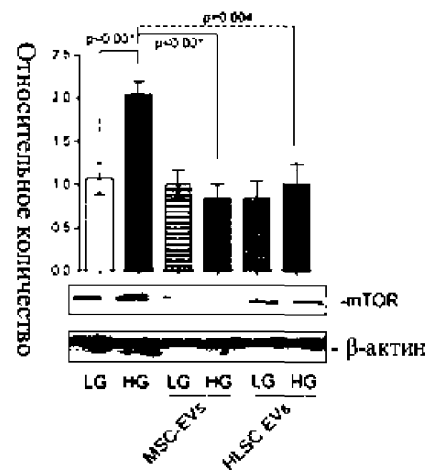
Фиг. 2В



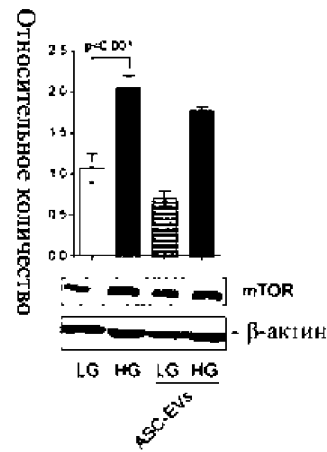
Фиг. 2С



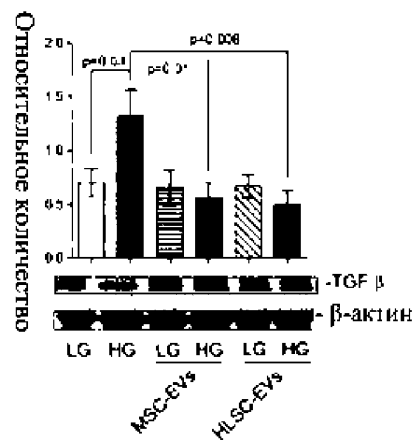
Фиг. 2D



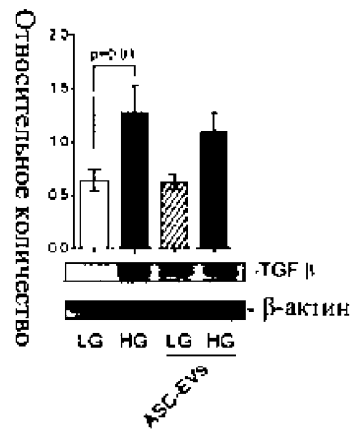
Фиг. 2Е



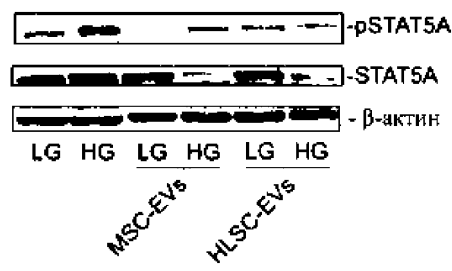
Фиг. 2F



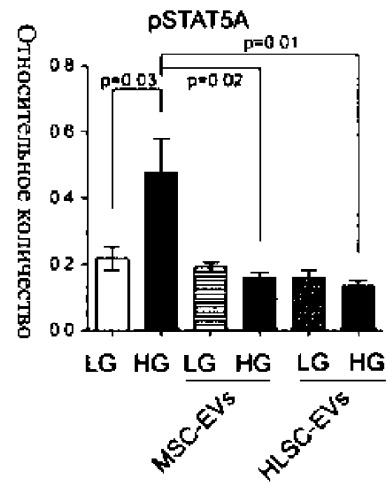
Фиг. 2G



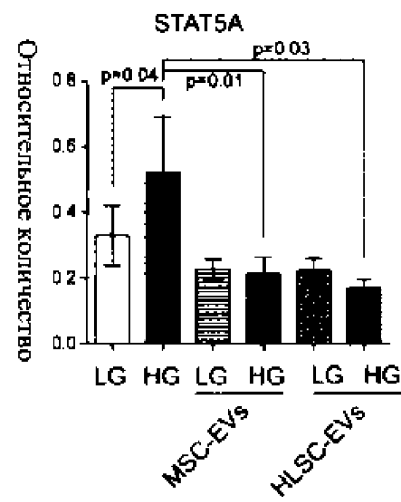
Фиг. 2H



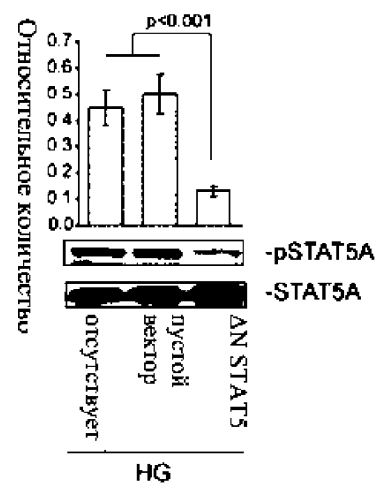
Фиг. 3A



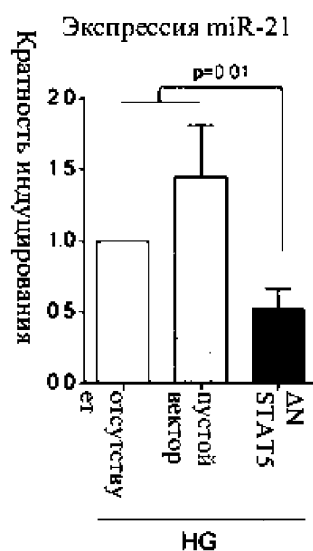
Фиг. 3В



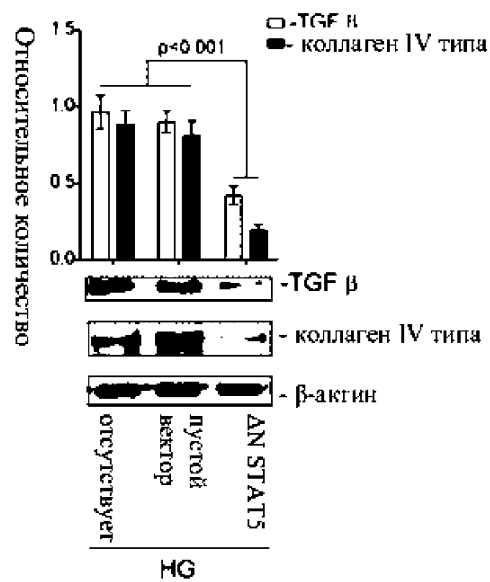
Фиг. 3С



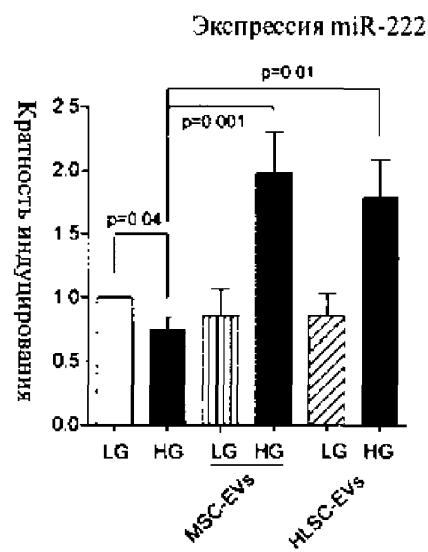
Фиг. 3D



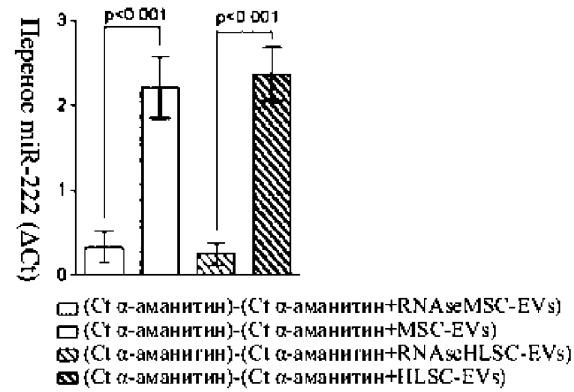
Фиг. 3E



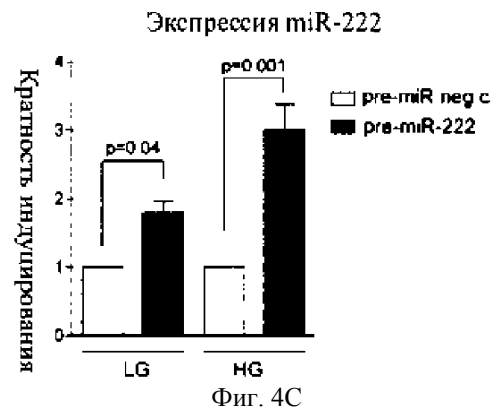
Фиг. 3F



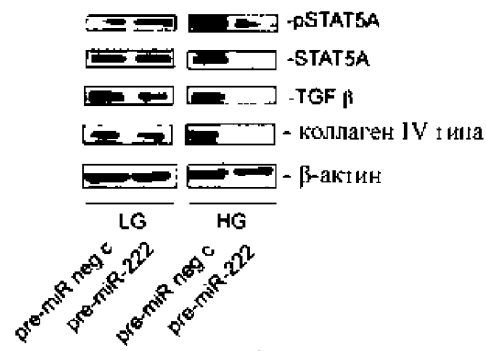
Фиг. 4A



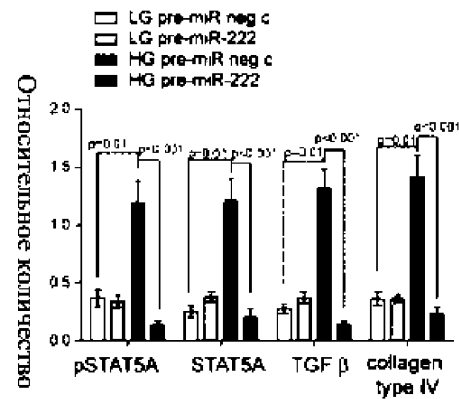
Фиг. 4B



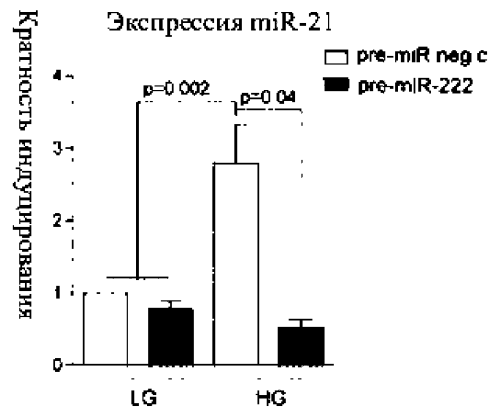
Фиг. 4C



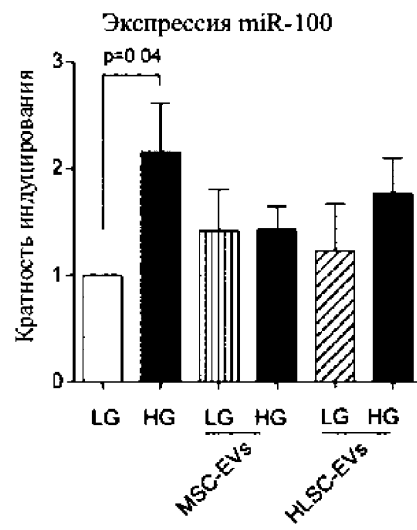
Фиг. 4D



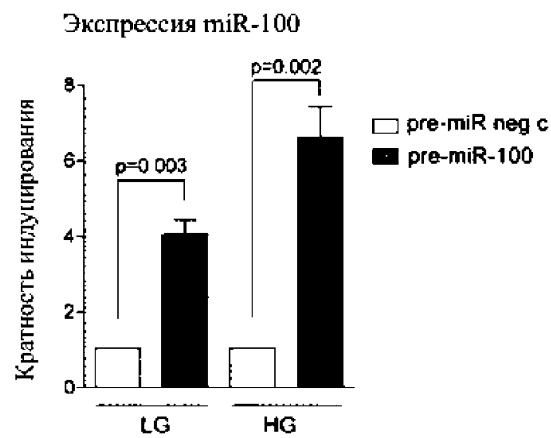
Фиг. 4E



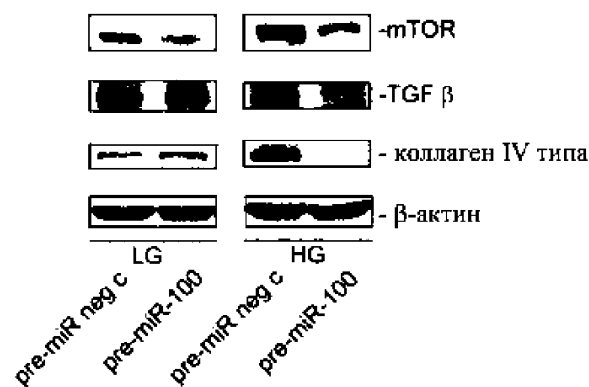
Фиг. 4F



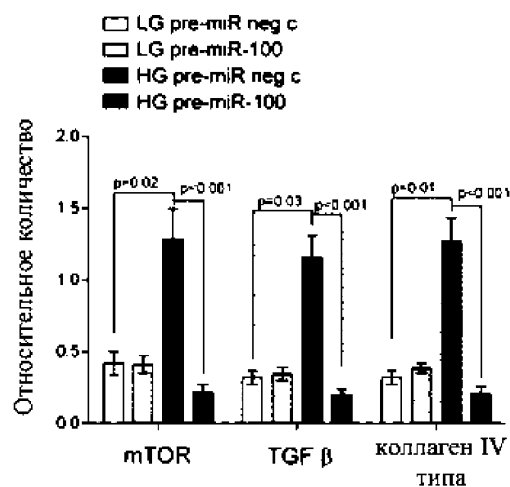
Фиг. 5A



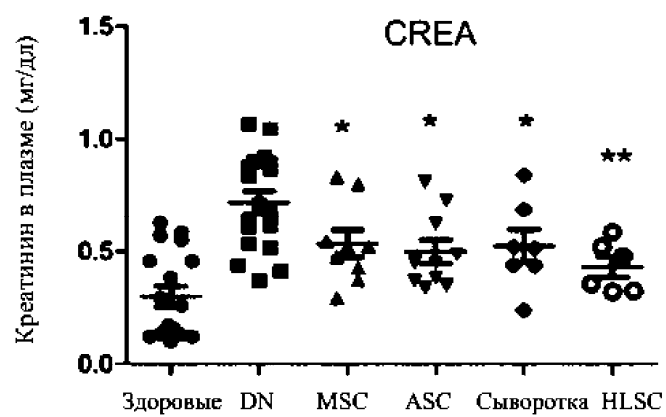
Фиг. 5B



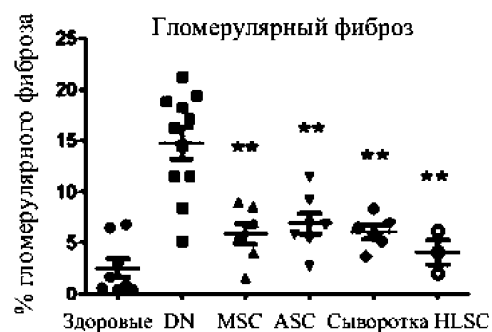
Фиг. 5C



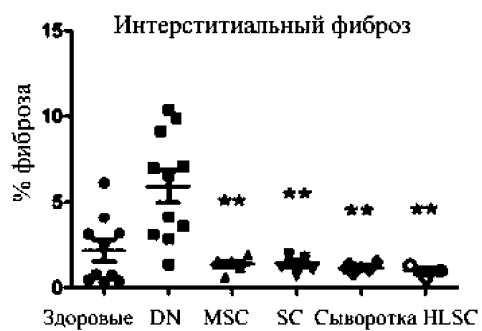
Фиг. 5D



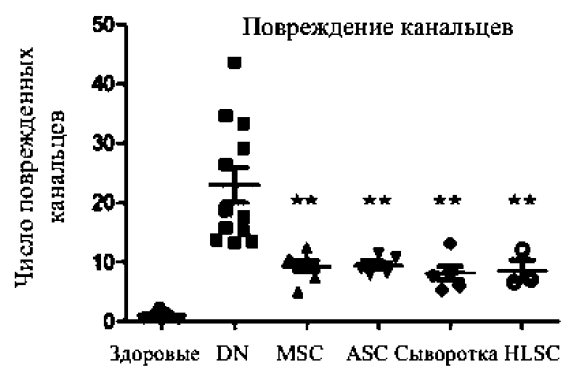
Фиг. 6



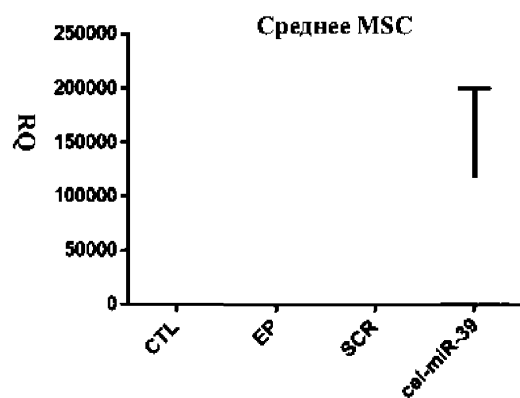
Фиг. 7A



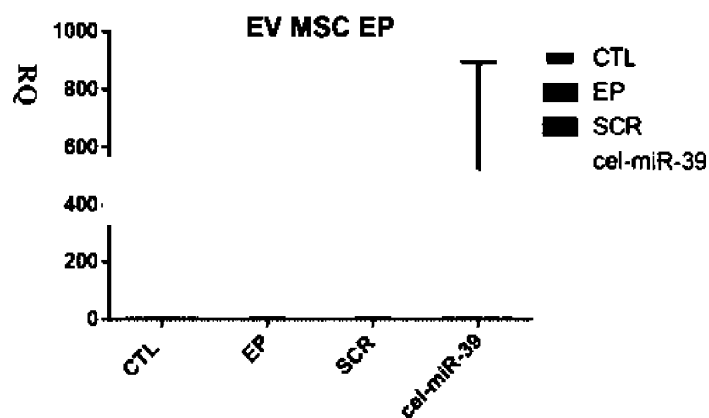
Фиг. 7В



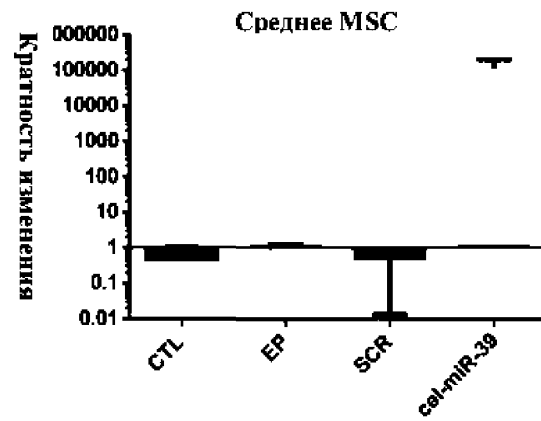
Фиг. 8



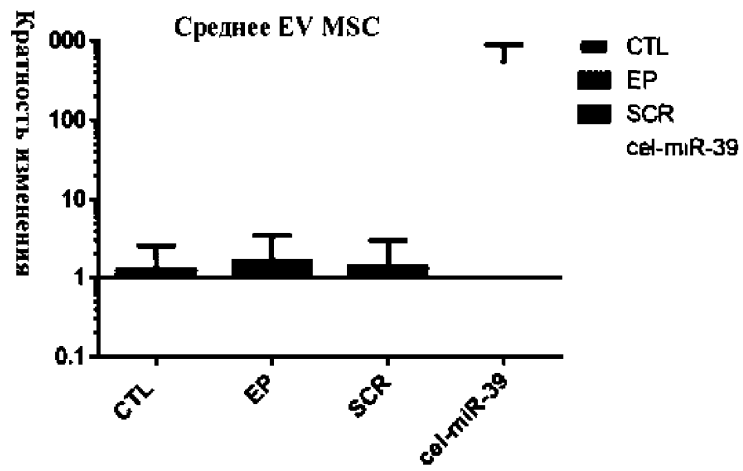
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 9C



Фиг. 9D



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2