

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390650** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.06.09

(51) Int. Cl. *A61K 35/28* (2015.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.08.20

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МИКРОВЕЗИКУЛ
ИЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОМОЗГОВОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

(31) **63/068,517**

(32) **2020.08.21**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/046883**

(87) **WO 2022/040516 2022.02.24**

(71) Заявитель:

ЮНИВЕРСИТИ ОФ МАЙАМИ (US)

(72) Изобретатель:

Бадиавас Евангелос В. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны способы лечения различных заболеваний с применением микровезикул, полученных из мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения.

202390650
A1

202390650

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577278EA/022

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МИКРОВЕЗИКУЛ ИЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОМОЗГОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по проходящей экспертизу предварительной заявке на патент США 63/068,517, поданной 21 августа 2021 года, все содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[002] Настоящее изобретение относится к областям медицины, клеточной биологии, молекулярной биологии и генетики. В частности, настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения различных заболеваний с применением микровезикул из мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Отношения между кожей и другими тканями организма, такими как костный мозг, сложны и зависят от взаимодействия и обмена информацией и сигналами, включающими секретлируемые белки. Костный мозг играет ключевую роль в поддержании гомеостаза кожи. Взаимосвязь костного мозга с кожей комплексно поддерживается посредством его секрета - совокупности белков, продуцируемых костным мозгом, которые могут выполнять свои функции в кожных тканях.

[004] У пациентов с дисфункцией костного мозга кожа может демонстрировать первые признаки первопричинной патологии посредством, например, развития хронических ран, изменений пигментации и инфекции (см. Badiavas EV, Ford D, Liu P, Kouttab N, Morgan J, Richards A et al., Long-term bone marrow culture and its clinical potential in chronic wound healing. Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 2007; 15:856-65). Было показано, что у лиц с генетическими мутациями, приводящими к появлению таких дерматологических фенотипов, как формы буллезного эпидермолиза, для ослабления кожной патологии эффективна трансплантация костного мозга (см. Wagner JE, Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Hordinsky M, Keene DR, Woodley DT et al., Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. N Engl J Med 2010; 363:629-39). Поскольку мезенхимальные клетки костного мозга (МСК-КМ), как было показано, могут применяться при различных заболеваниях, включая заживление ран, но одновременно с этим приживление и выживание в других тканях после трансплантации очень низкое, точные механизмы того, каким образом у пациентов достигаются положительные результаты при применении клеточной терапии, еще предстоит полностью исследовать (см. Isakson M, de Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJ. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. Stem Cells Int 2015:831095;

Badiavas EV, Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. Arch Dermatol 2003; 139:510-6; и Dash NR, Dash SN, Routray P, Mohapatra S, Mohapatra PC. Targeting nonhealing ulcers of lower extremity in human through autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Rejuvenation Res 2009; 12:359-66). Способы лечения таких различных заболеваний существенно расширятся, если благоприятные эффекты будут опосредованы секретомом клеток костного мозга, независимо от прямого приживления клеток в коже.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[005] В описании предложены композиции и способы лечения различных заболеваний с применением микровезикул из мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения.

[006] В одном аспекте настоящего изобретения, предложен способ лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из пруригинозного буллезного эпидермолиза; приобретенного буллезного эпидермолиза; дистрофического буллезного эпидермолиза претибиаляльного типа; дистрофического буллезного эпидермолиза типа Барта; несиндромальной врожденной патологии ногтей 8; дистрофического буллезного эпидермолиза с субкорнеальным расщеплением; и транзитного буллезного дермолиза новорожденных, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают коллаген VII типа. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене COL7A1. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок коллаген VII в клетки субъекта.

[007] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой пруригинозный буллезный эпидермолиз. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов пруригинозного буллезного эпидермолиза у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы буллезного пруригинозного эпидермолиза выбраны из группы, состоящей из зуда, пузырей, хронических ран, образования рубцов, повышенного риска кожных инфекций, милиумов, хрупкости кожи, дистрофии ногтей, лихенифицированных бляшек, альбопапулоидных элементов и эксфолиированных пруригитных бляшек.

[008] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой приобретенный буллезный эпидермолиз. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов приобретенного буллезного эпидермолиза у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы приобретенного буллезного эпидермолиза выбраны из группы, состоящей из образования пузырей, милиумов, заживления ран со значительным рубцеванием, кожного зуда и покраснения кожи.

[009] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой дистрофический буллезный эпидермолиз претибиаляльного типа. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов

дистрофического буллезного эпидермолиза претибиального типа у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы дистрофического буллезного эпидермолиза претибиального типа выбирают из группы, состоящей из претибиальных пузырей, пруригоподобных гиперкератотических очагов, дистрофии ногтей, альбопапулоидных элементов и гипертрофических рубцов.

[010] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой дистрофический буллезный эпидермолиз по типу синдрома Барта. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов дистрофического буллезного эпидермолиза типа Барта у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы дистрофического буллезного эпидермолиза типа Барта выбраны из группы, состоящей из врожденной локализованной аплазии кожи, ломкости кожи и деформации ногтей.

[011] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой несиндромальную врожденную патологию ногтей 8. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов несиндромальной врожденной патологии ногтей 8 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы несиндромальной врожденной патологии ногтей 8 включают дистрофию ногтей на пальцах стоп и/или погружение ногтевой пластины в ногтевое ложе с деформированным и узким выступающим краем.

[012] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой дистрофический буллезный эпидермолиз с субкорнеальным расщеплением. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов дистрофического буллезного эпидермолиза с субкорнеальным расщеплением у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы дистрофического буллезного эпидермолиза с субкорнеальным расщеплением выбраны из группы, состоящей из пузырей, милиумов, атрофических рубцов и дистрофии ногтей.

[013] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой транзиторный буллезный дермолиз новорожденных. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов транзиторного буллезного дермолиза новорожденных у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы транзиторного буллезного дермолиза новорожденных выбраны из группы, состоящей из субэпидермальных пузырей, редуцированных или аномальных якорных фибрилл в дермо-эпидермальном соединении и электронно-плотных включений в кератиноцитах.

[014] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения синдрома Альпорта 2 аутосомно-рецессивного типа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают коллаген IV типа. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов синдрома Альпорта 2 аутосомно-рецессивного типа у субъекта. В некоторых вариантах осуществления,

симптомы синдрома Альпорта 2 аутомно-рецессивного типа выбраны из группы, состоящей из гломерулонефрита, дефектов базальной мембраны клубочков, почечной недостаточности, нейросенсорной глухоты, лентиконуса, бледных пятен парамакулярной зоны и гематурии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене COL4A4. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок коллагена IV типа в клетки субъекта.

[015] В еще одном аспекте изобретения предложен способ лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из простого буллезного эпидермолиза с мышечной дистрофией; простого буллезного эпидермолиза с пилорической атрезией; буллезного эпидермолиза типа Огна; простого буллезного эпидермолиза с дистрофией ногтей; и конечностно-поясной мышечной дистрофии аутомно-рецессивного типа 17 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают плектин. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене PLEC1. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок плектин в клетки субъекта.

[016] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой простой буллезный эпидермолиз с мышечной дистрофией. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов простого буллезного эпидермолиза с мышечной дистрофией у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы простого буллезного эпидермолиза с мышечной дистрофией выбраны из группы, состоящей из геморрагических пузырей, образования пузырей на уровне полудесмосом, дистрофии ногтей, ладонно-подошвенной кератодермии, эрозий кожи и слизистых оболочек полости рта.

[017] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой простой буллезный эпидермолиз с пилорической атрезией. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов простого буллезного эпидермолиза с пилорической атрезией у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы простого буллезного эпидермолиза с пилорической атрезией выбраны из группы, состоящей из образования пузырей, хрупкости кожи, милиумов, дистрофии ногтей, рубцовой алопеции и гипотрихоза.

[018] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой буллезный эпидермолиз типа Огна. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов буллезного эпидермолиза типа Огна у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы буллезного эпидермолиза типа Огна выбраны из группы, состоящей из гематом на коже, хрупкости кожи, образования пузырей и аномальных внутриклеточных пластинок прикрепления полудесмосом.

[019] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой простой буллезный эпидермолиз с дистрофией ногтей. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов

простого буллезного эпидермолиза с дистрофией ногтей у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы простого буллезного эпидермолиза с дистрофией ногтей включают образование пузырей на коже и/или дистрофию ногтей.

[020] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой конечностно-поясную мышечную дистрофию аутосомно-рецессивного типа 17. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов конечностно-поясной мышечной дистрофии аутосомно-рецессивного типа 17 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы конечностно-поясной мышечной дистрофии аутосомно-рецессивного типа 17 выбраны из группы, состоящей из слабости проксимальных мышц, слабости тазобедренного и плечевого поясов, выраженной асимметричной атрофии четырехглавой мышцы бедра и атрофии двуглавой мышцы плеча.

[021] В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из простого буллезного эпидермолиза аутосомно-рецессивного типа 2 и наследственной сенсорной и вегетативной нейропатии 6 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают антиген буллезного пемфигоида 1. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене BPAG1.

[022] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок антигена буллезного пемфигоида 1 в клетки субъекта.

[023] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой простой буллезный эпидермолиз аутосомно-рецессивного типа 2. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов простого буллезного эпидермолиза аутосомно-рецессивного типа 2, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы простого буллезного эпидермолиза аутосомно-рецессивного типа 2 выбраны из группы, состоящей из пузырей на тыльной, латеральной и подошвенной поверхностях стоп, индуцированных травмой пузырей на стопах и лодыжках и аномальных полудесмосом с плохо сформированными внутренними бляшками.

[024] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой наследственную сенсорную и вегетативную нейропатию 6. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов наследственной сенсорной и вегетативной нейропатии 6 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы наследственной сенсорной и вегетативной нейропатии 6 выбраны из группы, состоящей из дегенерации клеток задних корешков и вегетативных ганглиев, сенсорных расстройств и вегетативных расстройств.

[025] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения эпидермолитического гиперкератоза у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают кератин 1. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают

или уменьшают один или более симптомов эпидермолитического гиперкератоза у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы эпидермолитического гиперкератоза выбраны из группы, состоящей из внутриэпидермальных пузырей, утолщения рогового слоя, пигментации кожи и эрозий на участках травм и эритродермии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене KRT1. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок кератин 1 в клетки субъекта.

[026] В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения доброкачественной семейной пузырчатки у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают hSPCA1. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов доброкачественной семейной пузырчатки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы доброкачественной семейной пузырчатки выбраны из группы, состоящей из пузырей, эрозий кожи, сыпи, потрескавшейся кожи и акантолиза. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене ATP2C1. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок hSPCA1 в клетки субъекта.

[027] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения синдрома Чедиака-Хигаси у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают регулятор лизосомального транспорта. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов синдрома Чедиака-Хигаси у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы синдрома Чедиака-Хигаси выбраны из группы, состоящей из гипопигментации, тяжелого иммунодефицита, склонности к кровотечениям, неврологических расстройств, аномального внутриклеточного транспорта в лизосому и из лизосомы и гигантских телец-включений в различных типах клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене LYST. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок регулятор лизосомального транспорта в клетки субъекта.

[028] В еще одном аспекте предложен способ лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из синдрома атаксии-телеангиэктазии; Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза; и В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают сериновую протеинкиназу АТМ. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене АТМ. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок сериновую протеинкиназу АТМ в клетки субъекта.

[029] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой синдром атаксии-телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов синдрома атаксии-

телеангиэктазии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы синдрома атаксии-телеангиэктазии выбраны из группы, состоящей из прогрессирующей мозжечковой атаксии, расширения кровеносных сосудов в конъюнктиве и глазных яблоках, иммунодефицита, задержки роста и нарушения полового созревания.

[030] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой острый Т-клеточный лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза выбраны из группы, состоящей из анемии, частых инфекций из-за низкого количества нормальных лейкоцитов, частых инфекций, лихорадки, пурпуры и носовых кровотечений и кровоточивости десен из-за низкого количества тромбоцитов.

[031] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления, симптомы Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза выбраны из группы, состоящей из повышенного количества лейкоцитов, преобладания пролимфоцитов, выраженной спленомегалии, лимфаденопатии, поражений кожи и серозного выпота.

[032] В некоторых вариантах осуществления, состояние представляет собой В-клеточный хронический лимфолейкоз. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза выбраны из группы, состоящей из накопления зрелых CD5+ В-лимфоцитов, лимфаденопатии, иммунодефицита и недостаточности костного мозга.

[033] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения туберозного склероза 2 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают туберин. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов туберозного склероза 2 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы туберозного склероза 2 выбраны из группы, состоящей из гамартом, гамартий, эпилепсии, трудностей с обучением, поведенческих расстройств и поражений кожи. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене TSC2. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок туберин в клетки субъекта.

[034] В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения язв при диабетической стопе у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают FOXM1A. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы облегчают или

уменьшают один или более симптомов диабетических язв стопы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы язв при диабетической стопе включают открытые язвы или раны на стопе субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене FOXM1A. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок FOXM1A в клетки субъекта.

[035] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения, в котором микровезикулы получают из мезенхимальных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления, мезенхимальные стволовые клетки представляют собой мезенхимальные стволовые клетки костного мозга.

[036] В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения, в котором микровезикулы получают из биологической жидкости и осаждают из биологической жидкости при использовании полиэтиленгликоля.

[037] В еще одном аспекте изобретения предложен способ лечения, в котором микровезикулы вводят в кожу и/или ногти субъекта.

[038] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения, в котором микровезикулы вводят посредством трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[039] На **ФИГ. 1** показана блок-схема плана исследования Примера 1, в котором уникальные белки были идентифицированы из секретома мезенхимальных клеток костномозгового происхождения (МСК-КМ) четырех доноров костного мозга.

[040] На **ФИГ. 2** графически представлено число белков, полученных из секретома МСК-КМ четырех доноров костного мозга из Примера 1, классифицированных по клеточным компонентам.

[041] На **ФИГ. 3** графически представлено число белков, полученных из секретома МСК-КМ четырех доноров костного мозга из Примера 1, классифицированных по биологическим процессам.

[042] На **ФИГ. 4** графически представлено число белков, полученных из секретома МСК-КМ четырех доноров костного мозга из Примера 1, классифицированных по функциям лигандов.

[043] На **ФИГ. 5** графически представлено число белков, полученных из секретома МСК-КМ четырех доноров костного мозга из Примера 1, классифицированных по молекулярным функциям.

[044] На **ФИГ. 6** графически представлено число белков, полученных из секретома МСК-КМ четырех доноров костного мозга из Примера 1, классифицированных по связи с заболеваниями.

[045] На **ФИГ. 7** показан один вариант осуществления устройства, описанного в настоящем документе, которое облегчает осветление биологической жидкости и сбор осажденных микровезикул с помощью фильтрации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[046] Перед описанием изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается описанными конкретными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, служит исключительно для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, так как объем изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[047] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно известно среднему специалисту в области, к которой относится данное изобретение.

[048] При использовании в настоящем документе термин "приблизительно", в случае его использования в отношении конкретного указанного числового значения, означает, что значение может отличаться от указанного значения не больше чем на 1%. Например, при использовании в настоящем документе выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101 и все промежуточные значения (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

[049] При использовании в настоящем документе термины "лечить", "лечение" и т.п. означают облегчение симптомов, устранение причины симптомов на временной или постоянной основе, либо предотвращение или замедление появления симптомов указанного нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления, субъекта, подлежащего лечению, выбирают на основании присутствия симптомов нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта сначала диагностируют нарушение или состояние, а затем проводят лечение такого нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления, нарушение или состояние представляет собой одно или больше из описанных ниже.

[050] Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут использоваться при практической реализации изобретения, далее описаны типичные способы и материалы. Все публикации, указанные в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством отсылки.

Способы лечения состояний, связанных с коллагеном VII типа

[051] В некоторых вариантах осуществления изобретения, предложены способы лечения пруригинозного буллезного эпидермолиза; приобретенного буллезного эпидермолиза; дистрофического буллезного эпидермолиза претибиального типа; дистрофического буллезного эпидермолиза типа Барта; несиндромального врожденной патологии ногтей 8; дистрофического буллезного эпидермолиза с субкорнеальным расщеплением; или транзиторного буллезного дермолиза новорожденных, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества микровезикул.

[052] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене COL7A1.

[053] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок коллаген VII в клетки субъекта. Коллаген VII типа присутствует в базальной мембране многослойного плоского эпителия и образует якорные фибриллы, которые способствуют

организации и прикреплению базальной мембраны эпителия при взаимодействии с белками внеклеточного матрикса, такими как коллаген IV типа.

Пруригинозный буллезный эпидермолиз

[054] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с пруригинозным буллезным эпидермолизом. Пруригинозная форма буллезного эпидермолиза, также называемая пруригинозным БЭ, является клинически гетерогенным подтипом дистрофического буллезного эпидермолиза, вызванного мутацией в гене коллагена VII типа. Из-за отсутствия коллагена VII в коже, у пациентов с пруригинозным буллезным эпидермолизом наблюдается интенсивное образование пузырей на коже, приводящее к распространяющимся на обширных участках хроническим ранам, рубцам и повышенному риску инфекций. Заболевание начинается в раннем детском возрасте, но в некоторых случаях со второго или третьего десятилетия жизни. Наследование может быть аутосомно доминантным или рецессивным. Пруригинозный буллезный эпидермолиз связан с мутациями гена COL7A1.

[055] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков пруригинозного буллезного эпидермолиза, или у которых был диагностирован пруригинозный буллезный эпидермолиз.

[056] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с пруригинозным буллезным эпидермолизом. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с пруригинозным буллезным эпидермолизом, включают зуд, пузыри, хронические раны, формирование рубцов, повышенный риск кожных инфекций, милиумы, хрупкость кожи, дистрофию ногтей, лихенифицированные бляшки, альбопапулоидные элементы и эксфолиированные пруритные бляшки.

Приобретенный буллезный эпидермолиз

[057] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с приобретенным буллезным эпидермолизом. Приобретенный буллезный эпидермолиз (ПриБЭ) представляет собой аутоиммунную приобретенную пузырчатку, возникающую в результате образования аутоантител к коллагену VII типа. Это редкое аутоиммунное заболевание характеризуется образованием субэпителиальных пузырей в коже и слизистых оболочках в ответ на повреждение. Пузыри, связанные с приобретенным буллезным эпидермолизом, как правило, локализуются в областях, которые легко травмируются, таких как руки, ноги, колени, локти и ягодицы.

[058] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых

вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков приобретенного буллезного эпидермолиза, или у которых был диагностирован приобретенный буллезный эпидермолиз.

[059] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с приобретенным буллезным эпидермолизом. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с приобретенным буллезным эпидермолизом, включают образование пузырей, милиумы, заживление ран со значительным рубцеванием, кожный зуд и покраснение кожи.

Дистрофический буллезный эпидермолиз претибиального типа

[060] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с дистрофическим буллезным эпидермолизом претибиального типа. Дистрофический буллезный эпидермолиз претибиального типа (ДБЭ-ПТ) представляет собой форму дистрофического буллезного эпидермолиза, характеризующуюся претибиальными пузырями, которые развиваются в пруригоподобные гиперкератотические поражения. Преимущественно поражаются претибиальные области, не затрагивая колени и другие участки кожи. Другие клинические признаки включают дистрофию ногтей, альбопапулоидные элементы и гипертрофические рубцы без претибиального преобладания. Фенотип демонстрирует значительную межиндивидуальную вариабельность. Наследование аутосомно-доминантное. Дистрофический буллезный эпидермолиз претибиального типа связан с мутациями гена COL7A1.

[061] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков дистрофического буллезного эпидермолиза претибиального типа, или у которых был диагностирован дистрофический буллезный эпидермолиз претибиального типа.

[062] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с дистрофическим буллезным эпидермолизом претибиального типа. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с дистрофическим буллезным эпидермолизом претибиального типа, включают претибиальные пузыри, пруригоподобные гиперкератотические очаги, дистрофию ногтей, альбопапулоидные элементы и гипертрофические рубцы.

Дистрофический буллезный эпидермолиз типа Барта

[063] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с дистрофическим

буллезным эпидермолизом типа Барта. Дистрофический буллезный эпидермолиз типа Барта (ДБЭ-Б) - аутосомно-доминантная форма дистрофического буллезного эпидермолиза, характеризующаяся врожденной локализованной аплазией кожи, ломкостью кожи и деформацией ногтей. Дистрофический буллезный эпидермолиз типа Барта связан с мутациями гена COL7A1.

[064] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков дистрофического буллезного эпидермолиза типа Барта, или у которых был диагностирован дистрофический буллезный эпидермолиз типа Барта.

[065] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с дистрофическим буллезным эпидермолизом типа Барта. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с дистрофическим буллезным эпидермолизом типа Барта, включают врожденную локализованную аплазию кожи, хрупкость кожи и деформацию ногтей.

Несиндромальная врожденная патология ногтей 8

[066] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с несиндромальной врожденной патологией ногтей 8. Патология ногтей, несиндромальная врожденная, 8 (NDNC8) представляет собой онихопатию, характеризующуюся изолированной дистрофией ногтей на ногах. Изменения ногтей наиболее выражены на больших пальцах ног и заключаются в погружении ногтевой пластины в ногтевое ложе с деформированным и узким выступающим краем. Было обнаружено, что такая форма изолированной дистрофии ногтей пальцев стопы выделяется как аутосомно-доминантный признак в семьях, в которых другой член имеет аутосомно-рецессивное заболевание кожи, дистрофический буллезный эпидермолиз или транзиторный преходящий буллезный дермолиз новорожденных. Патология ногтей, несиндромальная врожденная, 8 связана с мутациями гена COL7A1.

[067] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков несиндромальной врожденной патологии ногтей 8, или у которых диагностирована несиндромальная врожденная патология ногтей 8.

[068] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с несиндромальной врожденной патологией ногтей 8. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с несиндромальной врожденной патологией ногтей

8, включают дистрофию ногтей пальцев стоп и погружение ногтевой пластины в ногтевое ложе с деформированным и узким выступающим краем.

Дистрофический буллезный эпидермолиз с субкорнеальным расщеплением

[069] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с дистрофическим буллезным эпидермолизом с субкорнеальным расщеплением. Дистрофический буллезный эпидермолиз с субкорнеальным расщеплением представляет собой пузырьчатку с трещинами разного размера непосредственно под уровнем рогового слоя. Дистрофический буллезный эпидермолиз с субкорнеальным расщеплением связан с мутациями гена COL7A1.

[070] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков дистрофического буллезного эпидермолиза с субкорнеальным расщеплением, или у которых диагностирован дистрофический буллезный эпидермолиз с субкорнеальным расщеплением.

[071] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с дистрофическим буллезным эпидермолизом, с субкорнеальным расщеплением. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с дистрофическим буллезным эпидермолизом и подкорнеальным расщеплением, включают пузыри, милиумы, атрофические рубцы и дистрофию ногтей.

Транзиторный буллезный дермолиз новорожденных

[072] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с транзиторным буллезным дермолизом новорожденных. Транзиторный буллезный дермолиз новорожденных (ТБДН) - неонатальная форма дистрофического буллезного эпидермолиза, характеризующаяся образованием пузырей в результате даже легкой травмы. Транзиторный буллезный дермолиз новорожденных является наследственным заболеванием, связанным с COL7A1.

[073] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков преходящего буллезного дермолиза новорожденных, или у которых был диагностирован транзиторный буллезный дермолиз новорожденных.

[074] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с транзиторным буллезным дермолизом новорожденных. В некоторых вариантах

осуществления, симптомы, связанные с транзиторным буллезным дермолизом новорожденных, включают субэпидермальные пузыри, редуцированные или аномальные якорные фибриллы в дермо-эпидермальном соединении и электронно-плотные включения в кератиноцитах.

Способы лечения состояний, связанных с коллагеном IV типа

[075] В некоторых вариантах осуществления изобретения, предложены способы лечения синдрома Альпорта 2 аутосомно-рецессивного типа, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества микровезикул.

[076] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене COL4A4.

[077] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок коллагена IV типа в клетки субъекта. Коллаген IV типа является основным структурным компонентом базальной мембраны кожи и клубочков, он формирует сетчатую структуру вместе с ламининами, протеогликанами и энтактином (нидогеном).

Синдром Альпорта 2, аутосомно-рецессивный

[078] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с аутосомно-рецессивным синдромом Альпорта 2. Аутосомно-рецессивный синдром Альпорта 2 представляет собой синдром, характеризующийся прогрессирующим гломерулонефритом, дефектами базальной мембраны клубочков, почечной недостаточностью, нейросенсорной глухотой и специфическими аномалиями глаз (лентиконозные и макулярные пятна). Нарушение демонстрирует значительную гетерогенность в том аспекте, что семьи различаются по возрасту терминальной стадии почечной недостаточности и возникновению глухоты. Потеря белка может привести к доброкачественной семейной гематурии. Аутосомно-рецессивный синдром Альпорта 2 характеризуется непрогрессирующей изолированной микроскопической гематурией, которая не приводит к почечной недостаточности. Патологические изменения характеризуются истончением базальной мембраны клубочков. Аутосомно-рецессивный синдром Альпорта 2 связан с мутациями гена COL4A4.

[079] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков аутосомно-рецессивного синдрома Альпорта 2, или у которых был диагностирован аутосомно-рецессивный синдром Альпорта 2.

[080] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с аутосомно-рецессивным синдромом Альпорта 2. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с аутосомно-рецессивным синдромом Альпорта 2, включают гломерулонефрит, дефекты базальной мембраны клубочков, почечную недостаточность,

нейросенсорную глухоту, лентиконоз, макулярные пятна и гематурию.

Способы лечения состояний, связанных с плектином

[081] В некоторых вариантах осуществления изобретения, предложены способы лечения простого буллезного эпидермолиза с мышечной дистрофией; простого буллезного эпидермолиза с пилорической атрезией; буллезного эпидермолиза типа Огна; простого буллезного эпидермолиза с дистрофией ногтей; или конечностно-поясной мышечной дистрофии аутосомно-рецессивного типа 17, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества микровезикул.

[082] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене PLEC1.

[083] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок плектин в клетки субъекта. Плектин также называется PCN, PLTN, белком полудесмосом 1, HD1 и плектином-1. Плектин соединяет промежуточные филаменты с микротрубочками и микрофиламентами, а также прикрепляет промежуточные филаменты к десмосомам или полудесмосомам. Плектин связывает мышечные белки, такие как актин, с мембранными комплексами в мышцах. Плектин также играет важную роль в поддержании механической целостности мышечных волокон.

Простой буллезный эпидермолиз с мышечной дистрофией

[084] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, ассоциированных с простым буллезным эпидермолизом с мышечной дистрофией. Простой буллезный эпидермолиз с мышечной дистрофией (ПБЭ-МД) представляет собой форму буллезного эпидермолиза, характеризующуюся сочетанием образования пузырей на уровне полудесмосомы и поздней мышечной дистрофии. Простой буллезный эпидермолиз с мышечной дистрофией - редкий, угрожающий жизни подтип базального простого буллезного эпидермолиза с аутосомно-рецессивным типом наследования. Простой буллезный эпидермолиз с мышечной дистрофией связан с мутациями гена PLEC1.

[085] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков простого буллезного эпидермолиза с мышечной дистрофией, или у которых был диагностирован простой буллезный эпидермолиз с мышечной дистрофией.

[086] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с простым буллезным эпидермолизом с мышечной дистрофией. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с простым буллезным эпидермолизом с мышечной дистрофией, включают геморрагические пузыри, образование пузырей на уровне полудесмосомы, дистрофию ногтей, ладонно-подошвенную кератодермию и эрозии кожи и слизистых оболочек полости рта.

Простой буллезный эпидермолиз с пилорической атрезией

[087] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с простым буллезным эпидермолизом с пилорической атрезией. Простой буллезный эпидермолиз с пилорической атрезией является аутосомно-рецессивным генодерматозом, характеризующимся интенсивным образованием пузырей на коже при рождении и врожденной пилорической атрезией. Смерть обычно наступает в младенческом возрасте. Простой буллезный эпидермолиз с пилорической атрезией связан с мутациями гена PLEC1.

[088] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков простого буллезного эпидермолиза с пилорической атрезией, или у которых был диагностирован простой буллезный эпидермолиз с пилорической атрезией.

[089] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с простым буллезным эпидермолизом с пилорической атрезией. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с простым буллезным эпидермолизом с пилорической атрезией, включают образование пузырей, хрупкость кожи, милиумы, дистрофию ногтей, рубцовую алопецию и гипотрихоз.

Буллезный эпидермолиз типа Огна

[090] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с буллезным эпидермолизом типа Огна. Простой буллезный эпидермолиз типа Огна (ПБЭ-О) представляет собой форму интраэпидермального буллезного эпидермолиза, характеризующуюся генерализованными гематомами на коже, хрупкостью кожи с образованием нерубцующихся пузырей и небольшими геморрагическими пузырями на руках. На ультраструктурном уровне он отличается от других форм буллезного эпидермолиза появлением пузырей, образующихся в базальных клетках над полудесмосомами, и аномальными внутриклеточными пластинами прикрепления полудесмосом. Буллезный эпидермолиз типа Огна связан с мутациями гена PLEC1.

[091] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков буллезного эпидермолиза типа Огна, или у которых был диагностирован буллезный эпидермолиз типа Огна.

[092] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с

буллезным эпидермолизом типа Огна. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с буллезным эпидермолизом типа Огна, включают гематомы на коже, хрупкость кожи, образование пузырей и аномальные внутриклеточные пластины прикрепления полудесмосом.

Простой буллезный эпидермолиз с дистрофией ногтей

[093] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с простым буллезным эпидермолизом с дистрофией ногтей. Простой буллезный эпидермолиз с дистрофией ногтей (ПБЭ-ДН) представляет собой форму буллезного эпидермолиза, дерматологического заболевания, характеризующегося образованием пузырей на коже и дистрофией ногтей. Простой буллезный эпидермолиз с дистрофией ногтей связан с мутациями гена PLEC1.

[094] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков простого буллезного эпидермолиза с дистрофией ногтей, или у которых был диагностирован простой буллезный эпидермолиз с дистрофией ногтей.

[095] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с простым буллезным эпидермолизом с дистрофией ногтей. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с простым буллезным эпидермолизом и дистрофией ногтей, включают образование пузырей на коже и дистрофию ногтей.

Мышечная дистрофия, конечностно-поясная, аутосомно-рецессивного типа 17

[096] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с конечностно-поясной мышечной дистрофией аутосомно-рецессивного типа 17. Конечностно-поясная дистрофия аутосомно-рецессивного типа 17 представляет собой форму конечностно-поясной мышечной дистрофии, характеризующейся возникновением в раннем детском возрасте слабости и атрофии проксимальных мышц без вовлечения кожи. Конечностно-поясная мышечная дистрофия аутосомно-рецессивного типа 17 связана с мутациями гена PLEC1.

[097] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков конечностно-поясной мышечной дистрофии аутосомно-рецессивного типа 17, или у которых была диагностирована конечностно-поясная мышечная дистрофия аутосомно-рецессивного типа 17.

[098] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с

конечно-поясной мышечной дистрофией аутосомно-рецессивного типа 17. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с конечно-поясной мышечной дистрофией аутосомно-рецессивного типа 17, включают слабость проксимальных мышц, слабость тазобедренного и плечевого поясов, выраженную асимметричную атрофию четырехглавой мышцы бедра и атрофию двуглавой мышцы плеча.

Способы лечения состояний, ассоциированных с антигеном буллезного пемфигоида 1

[009] В некоторых вариантах осуществления изобретения, предложены способы лечения простого буллезного эпидермолиза аутосомно-рецессивного типа 2 или наследственной сенсорной и вегетативной нейропатии 6, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества микровезикул.

[0100] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене BPAG1, также известную как DST и BP230.

[0101] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок антигена буллезного пемфигоида 1 в клетки субъекта. Антиген буллезного пемфигоида 1 также известен как дистонин, BPA (антиген буллезного пемфигоида), белок мышечной дистонии и белок бляшек полудесмосом. Антиген буллезного пемфигоида 1 представляет собой линкерный белок цитоскелета, который действует в качестве соединителя между промежуточными филаментами, актином и сетями микротрубочек цитоскелета. Он требуется для прикрепления промежуточных филаментов к актиновому цитоскелету в нервных и мышечных клетках, либо кератинсодержащих промежуточных филаментов к полудесмосомам в эпителиальных клетках.

Простой буллезный эпидермолиз аутосомно-рецессивного типа 2

[0102] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с простым буллезным эпидермолизом аутосомно-рецессивного типа 2. Простой буллезный эпидермолиз аутосомно-рецессивного типа 2 (EBSB2) представляет собой форму буллезного эпидермолиза, дерматологического заболевания, характеризующегося локализованным образованием пузырей на тыльной, латеральной и подошвенной поверхностях стоп. Простой буллезный эпидермолиз аутосомно-рецессивного типа 2, характеризуется образованием пузырей в результате травмы, в основном на стопах и лодыжках. У субъектов с простым буллезным эпидермолизом аутосомно-рецессивного типа 2 ультраструктурный анализ биопсии кожи показывает аномальные полудесмосомы с плохо сформированными внутренними бляшками. Простой буллезный эпидермолиз аутосомно-рецессивного типа 2 связан с мутациями гена BPAG1.

[0103] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют

один или более симптомов или признаков простого буллезного эпидермолиза аутосомно-рецессивного типа 2, или у которых был диагностирован простой буллезный эпидермолиз аутосомно-рецессивного типа 2.

[0104] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с простым буллезным эпидермолизом аутосомно-рецессивного типа 2. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с простым буллезным эпидермолизом аутосомно-рецессивного типа 2, включают образование пузырей на тыльной, боковой и подошвенной поверхностях стоп, травматические пузыри на стопах и лодыжках и аномальные полудесмосомы с плохо сформированными внутренними бляшками.

Наследственная сенсорная и вегетативная нейропатия 6

[0105] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с наследственной сенсорной и вегетативной нейропатией 6. Наследственная сенсорная и вегетативная нейропатия 6 (HSAN6) представляет собой форму наследственной сенсорной и вегетативной нейропатии, которая представляет собой генетически и клинически гетерогенную группу нарушений, характеризующихся дегенерацией клеток задних корешков и вегетативных ганглиев, а также сенсорными и/или вегетативными нарушениями. Наследственная сенсорная и вегетативная нейропатия 6 представляет собой тяжелое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся неонатальной гипотонией, затруднениями дыхания и питания, задержкой психомоторного развития, вегетативными аномалиями, включая нестабильную сердечно-сосудистую функцию, отсутствием роговичных рефлексов, приводящим к рубцеванию роговицы, арефлексией и отсутствием аксон-рефлекса после внутрикожной инъекции гистамина. Наследственная сенсорная и вегетативная нейропатия 6 связана с мутациями гена *BPAG1*.

[0106] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков наследственной сенсорной и вегетативной нейропатии 6, или у которых была диагностирована наследственная сенсорная и вегетативная нейропатия 6.

[0107] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с наследственной сенсорной и вегетативной нейропатией 6. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с нейропатией, наследственной сенсорной и вегетативной 6, выбраны из группы, состоящей из дегенерации клеток дорсальных корешков и вегетативных ганглиев, сенсорных аномалий и вегетативных аномалий.

Способы лечения заболеваний, ассоциированных с кератином 1

[0108] В некоторых вариантах осуществления изобретения, предложены способы

лечения эпидермолитического гиперкератоза, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества микровезикул.

[0109] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене KRT1.

[0110] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок кератин 1 в клетки субъекта. Кератины представляют собой группу фибриллярных белков, которые формируют структурный каркас кератиноцитов, составляющих кожу, волосы и ногти. Кератин 1 взаимодействует либо с кератином 9, либо с кератином 10, образуя гетеродимерные промежуточные филаменты, которые затем собираются в прочные сети, которые обеспечивают прочность при растяжении и упругость кожи для защиты ее от внешних повреждений.

Эпидермолитический гиперкератоз

[0111] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с эпидермолитическим гиперкератозом. Дефекты кератина 1 являются причиной эпидермолитического гиперкератоза, также известного как врожденная буллезная ихтиозиформная эритродермия. Эпидермолитический гиперкератоз - наследственное кожное заболевание, характеризующееся образованием внутриэпидермальных пузырей, выраженным утолщением рогового слоя, пигментацией кожи и эрозиями в местах травм, которые присутствуют с момента рождения. Эпидермолитический гиперкератоз связан с мутациями гена KRT1.

[0112] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков эпидермолитического гиперкератоза, или у которых был диагностирован эпидермолитический гиперкератоз.

[0113] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с эпидермолитическим гиперкератозом. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с эпидермолитическим гиперкератозом, включают внутриэпидермальные пузыри, утолщение рогового слоя, пигментацию кожи и эрозии в местах травм и эритродермию.

Способы лечения состояний, связанных с hSPCA1

[0114] В некоторых вариантах осуществления изобретения, предложены способы лечения доброкачественной семейной пузырчатки, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества микровезикул.

[0115] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене ATR2C1.

[0116] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок

hSPCA1 в клетки субъекта. Белок HSPCA1 также известен как кальций-транспортирующая АТФаза и представляет собой магнийзависимый фермент, который катализирует гидролиз АТФ в сочетании с транспортом кальция.

Доброкачественная семейная пузырчатка

[0117] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с доброкачественной семейной пузырчаткой. Доброкачественная семейная пузырчатка, также известная как болезнь Хейли-Хейли, представляет собой редкое заболевание кожи, которое обычно проявляется в молодом зрелом возрасте. Заболевание характеризуется красными, воспаленными участками кожи и пузырями, которые чаще всего возникают в естественных складках кожи. Доброкачественная семейная пузырчатка связана с мутациями гена АТР2С1.

[0118] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков доброкачественной семейной пузырчатки, или у которых была диагностирована доброкачественная семейная пузырчатка.

[0119] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с доброкачественной семейной пузырчаткой. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с доброкачественной семейной пузырчаткой, включают пузыри, эрозии кожи, сыпь, трещины на коже и акантолиз.

Способы лечения состояний, связанных с регулятором лизосомального транспорта

[0120] В некоторых вариантах осуществления изобретения, предложены способы лечения синдрома Чедиака-Хигаси, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества микровезикул.

[0121] В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется мутация в гене LYST, также известном как CHS.

[0122] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют регулятор лизосомального транспорта в клетки субъекта. Регулятор лизосомального транспорта может требоваться для сортировки резидентных эндосомальных белков в поздние мультивезикулярные эндосомы посредством механизма, включающего микротрубочки.

Синдром Чедиака-Хигаси

[0123] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с синдромом Чедиака-Хигаси. Синдром Чедиака-Хигаси является редким аутосомно-рецессивным заболеванием. Большинство пациентов умирают в раннем возрасте, если им не провести

аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Синдром Чедиака-Хигаси связан с мутациями гена *LYST*.

[0124] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков синдрома Чедиака-Хигаси, или у которых был диагностирован синдром Чедиака-Хигаси.

[0125] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с синдромом Чедиака-Хигаси. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с синдромом Чедиака-Хигаси, включают гипопигментацию, тяжелый иммунодефицит, склонность к кровотечениям, неврологические нарушения, аномальный внутриклеточный транспорт в лизосому и из лизосомы и гигантские тельца включения в различных типах клеток.

Способы лечения состояний, связанных с сериновой протеинкиназой АТМ

[0126] В некоторых вариантах осуществления изобретения, предложены способы лечения синдрома атаксии-телеангиэктазии; Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза; Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза; и В-клеточного хронического лимфолейкоза, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества микровезикул.

[0127] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене АТМ.

[0128] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок сериновую протеинкиназу АТМ (мутантный при атаксии телеангиэктазии белок) в клетки субъекта. Сериновая протеинкиназа АТМ представляет собой серин/треониновую протеинкиназу, которая активирует сигнализацию контрольных точек при разрывах двойных цепей (DSB), апоптозе и генотоксических стрессах, таких как ионизирующее ультрафиолетовое излучение диапазона А (УФ-А), действуя, таким образом, в качестве сенсора повреждения ДНК.

Синдром атаксии-телеангиэктазии

[0129] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с синдромом атаксии-телеангиэктазии. Атаксия-телеангиэктазия (АТ) является редким рецессивным нарушением. Пациенты имеют сильную предрасположенность к раку, и приблизительно у 30% больных развиваются опухоли, в частности лимфомы и лейкозы. Клетки больных очень чувствительны к повреждению ионизирующим излучением и устойчивы к ингибированию синтеза ДНК после облучения.

[0130] Синдром атаксии-телеангиэктазии связан с мутациями гена АТМ.

[0131] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей

микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков синдрома атаксии-телеангиэктазии, или у которых был диагностирован синдром атаксии-телеангиэктазии.

[0132] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с синдромом атаксии-телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с синдромом атаксии-телеангиэктазии, включают прогрессирующую мозжечковую атаксию, расширение кровеносных сосудов в конъюнктиве и глазных яблоках, иммунодефицит, задержку роста и нарушение полового созревания.

Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз

[0133] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с острым Т-клеточным лимфобластным лейкозом. Острый Т-клеточный лимфобластный лейкоз (Т-ОЛЛ) представляет собой тип острого лейкоза, что означает, что он агрессивный и быстро прогрессирует. Он поражает стволовые клетки, из которых образуются лимфоидные клетки, в частности один из типов лейкоцитов, называемые Т-лимфоцитами. Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз связан с мутациями гена АТМ.

[0134] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза, или у которых был диагностирован острый Т-клеточный лимфобластный лейкоз.

[0135] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с острым Т-клеточным лимфобластным лейкозом. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с острым Т-клеточным лимфобластным лейкозом, включают анемию, частые инфекции из-за низкого количества нормальных лейкоцитов, частые инфекции, лихорадку, пурпуру, носовые кровотечения и кровоточивость десен из-за низкого количества тромбоцитов.

Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз

[0136] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с Т-клеточным пролимфоцитарным лейкозом. Клиническое течение Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза (ТПЛЛ) крайне агрессивное, с плохим ответом на химиотерапию и короткой выживаемостью. Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз встречается как у взрослых в форме спорадического заболевания, так и у молодых пациентов с атаксией-телеангиэктазией.

[0137] Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз связан с мутациями гена АТМ.

[0138] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, или у которых был диагностирован Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз.

[0139] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с Т-клеточным пролимфоцитарным лейкозом. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с Т-клеточным пролимфоцитарным лейкозом, включают повышенное количество лейкоцитов, преобладание пролимфоцитов, выраженную спленомегалию, лимфаденопатию, кожные поражения и серозный выпот.

В-клеточный хронический лимфолейкоз

[0140] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с В-клеточным хроническим лимфолейкозом. В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) представляет собой разновидность В-клеточной неходжкинской лимфомы и характеризуется весьма вариабельной клинической картиной. В-клеточный хронический лимфолейкоз является наиболее распространенной формой лейкоза у пожилых людей. В-клеточный хронический лимфолейкоз связан с мутациями гена ATM.

[0141] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков хронического В-клеточного лимфолейкоза, или у которых был диагностирован В-клеточный хронический лимфолейкоз.

[0142] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом, включают накопление зрелых CD5+ В-лимфоцитов, лимфаденопатию, иммунодефицит и недостаточность костного мозга.

Способы лечения состояний, связанных с туберином

[0143] В некоторых вариантах осуществления изобретения, предложены способы лечения туберозного склероза 2, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества микровезикул.

[0144] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене TSC2.

[0145] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок туберин в клетки субъекта. В комплексе с TSC1 туберин ингибирует опосредованное питательными веществами или стимулированное факторами роста фосфорилирование S6K1

и EIF4EBP1 путем негативной регуляции сигнализации mTORC1. Туберин действует как ГТФаза-активирующий белок (GAP) для малой ГТФазы RHEB, которая является прямым активатором протеинкиназной активности mTORC1. Туберин также стимулирует собственную ГТФазную активность Ras-родственных белков RAP1A и RAB5.

Туберозный склероз 2

[0146] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с туберозным склерозом 2. Туберозный склероз 2 (TSC2) представляет собой аутосомно-доминантное мультисистемное заболевание, которое особенно поражает головной мозг, почки, сердце и кожу. Клинические проявления включают эпилепсию, трудности в обучении, поведенческие проблемы и поражения кожи. Судороги могут не поддаваться купированию, и преждевременная смерть может наступить по целому ряду причин, связанных с заболеванием. Туберозный склероз 2 связан с мутациями гена TSC2.

[0147] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков туберозного склероза 2, или у которых был диагностирован туберозный склероз 2.

[0148] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с туберозным склерозом 2. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с туберозным склерозом 2, включают гамартомы, гамартии, эпилепсию, затруднения при обучении, поведенческие расстройства и поражения кожи.

Способы лечения состояний, связанных с FOXM1A

[0149] В некоторых вариантах осуществления изобретения, предложены способы лечения язв при диабетической стопе, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества микровезикул.

[0150] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мутацию в гене FOXM1A.

[0151] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы доставляют белок FOXM1A в клетки субъекта. Фактор транскрипции Forkhead box M1 (FOXM1) играет важную роль в онкогенезе, FOXM1A является одной из изоформ FOXM1.

Язвы при диабетической стопе

[0152] В некоторых вариантах осуществления, изобретение охватывает способы лечения или облегчения состояний или осложнений, связанных с язвами при диабетической стопе. Язвы на ногах являются частым осложнением плохо контролируемого сахарного диабета и образуются в результате распада кожной ткани и обножения более глубоких слоев. Частота случаев диабета 2-го типа повышается с возрастом, тогда как воспроизводство β -клеток уменьшается. Кроме того, фактор

транскрипции FoxM1 требуется для репликации β -клеток в различных ситуациях, а его экспрессия снижается с возрастом. Поэтому увеличение белка FOXM1A может играть некую роль в облегчении симптомов, связанных с язвами при диабетической стопе.

[0153] Способы, представленные в изобретении, включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, включающей микровезикулы. В некоторых вариантах осуществления, "нуждающийся в этом субъект" означает человека или не относящееся к человеку животное, которые демонстрируют один или более симптомов или признаков язв при диабетической стопе, или у которых были диагностированы язвы при диабетической стопе.

[0154] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы вводят нуждающемуся в этом субъекту для облегчения симптомов или осложнений, связанных с язвами при диабетической стопе. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с язвами при диабетической стопе, включают открытые раны на ноге субъекта.

Способы выделения микровезикул, описанных в настоящем документе

[0155] При использовании в настоящем документе термин "микровезикулы" относится к везикулам, включающим липидные бислои, сформированные из плазматической мембраны клеток. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы имеют разный размер, в пределах от приблизительно 2 нм до приблизительно 5000 нм. Клетка, из которой сформирована микровезикула, в настоящем документе именуется "клеткой-хозяином". Микровезикулы включают, без ограничения, внеклеточные везикулы (ВВ), эктосомы, микрочастицы, микровезикулы, нановезикулы, отсоединяющиеся везикулы (shedding vesicles), мембранные частицы и т.п.

[0156] Микровезикулы экспонируют мембранные белки из своей клетки-хозяина на поверхности своей мембраны и могут также внутри содержать молекулы из клетки-хозяина, такие как, например, мРНК, миРНК, тРНК, рНК, ДНК, липиды, белки или инфекционные частицы. Эти молекулы могут представлять собой рекомбинантные молекулы, введенные в клетку-хозяина, или образовываться из них. Микровезикулы играют важную роль в межклеточной коммуникации и могут действовать локально и дистально в организме, вызывая изменения в клетках путем слияния с клеткой-мишенью, вводя молекулы, транспортируемые на поверхности и/или внутри микровезикулы, в клетку-мишень. Например, микровезикулы были связаны с противоопухолевой реверсией, раком, опухолевой иммуносупрессии, метастазом, взаимодействиями опухоли-стромы, ангиогенезом и регенерацией ткани. Микровезикулы также могут использоваться для диагностики заболевания, поскольку они, как было показано, несут биомаркеры нескольких заболеваний, включая, например, болезнь сердца, ВИЧ и лейкоз.

[0157] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы выделяют согласно способам из патента США 10,500,231, включенного в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

[0158] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, содержащей микровезикулы, в способе, включающем

следующие этапы:

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

[0159] В одном варианте осуществления биологическую жидкость осветляют с помощью центрифугирования. В дополнительном варианте осуществления биологическую жидкость осветляют с помощью фильтрации.

[0160] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают с помощью центрифугирования. В альтернативном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают с помощью фильтрации.

[0161] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, содержащей микровезикулы, в способе, включающем следующие этапы:

- a) получение биологической жидкости, содержащей микровезикулы,
- b) осветление биологической жидкости для удаления клеточного дебриса,
- c) осаждение микровезикул путем добавления осаждающего вещества в очищенную биологическую жидкость,
- d) сбор осажденных микровезикул и промывку материала для удаления осаждающего вещества,
- e) суспендирование промытых микровезикул в растворе, и
- f) обработку микровезикул для анализа содержания нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, малых молекул и/или белков.

[0162] В одном варианте осуществления биологическую жидкость очищают с помощью центрифугирования. В альтернативном варианте осуществления биологическую жидкость очищают с помощью фильтрации.

[0163] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают с помощью центрифугирования. В альтернативном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают с помощью фильтрации.

[0164] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложены реагенты и наборы для выделения микровезикул из биологических жидкостей согласно способам, описанным в настоящем документе.

[0165] Биологической жидкостью может быть периферическая кровь, сыворотка крови, плазма крови, асцитная жидкость, моча, спинномозговая жидкость (СМЖ), мокрота, слюна, костный мозг, синовиальная жидкость, водянистая влага, амниотическая жидкость, ушная сера, грудное молоко, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, сперма

(включая секрет предстательной железы), Куперова жидкость или предсеменная жидкость, женский эякулят, пот, кал, волосы, слезная жидкость, кистозная жидкость, плевральная и перитонеальная жидкость, перикардальная жидкость, лимфа, химус, лимфа, желчь, тканевая жидкость, менструальные выделения, гной, кожное сало, рвотная масса, вагинальные выделения, секрет слизистых оболочек, жидкость после промывания кишечника, панкреатический сок, промывные жидкости из синусов, бронхолегочные аспираты или другие промывные жидкости.

[0166] Биологическая жидкость также может быть получена из бластоцеля, пуповинной крови или материнской крови, которые может иметь эмбриональное или материнское происхождение. Биологическая жидкость также может быть получена из образца ткани или биопсии.

[0167] В некоторых вариантах осуществления, биологическую жидкость получают из костного мозга или аспиратов костного мозга. В одном варианте осуществления биологическая жидкость является средой культивирования клеток. В одном варианте осуществления среду культивирования клеток кондиционируют с использованием тканей и/или клеток перед выделением микровезикул согласно способам, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, МСК-КМ, полученные из костного мозга или аспирата костного мозга, культивируют в культуральной среде, чтобы обеспечить получение и сбор секрета МСК-КМ. В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования не содержит сыворотку.

[0168] Термин "кондиционированная" или "кондиционированная среда" относится к среде, в которой выращивают популяцию клеток или ткани, или их комбинацию, и популяция клеток или ткани, или их комбинация вводит факторы в питательную среду. В одном таком применении популяцию клеток или ткани, или их комбинацию удаляют из среды, при этом факторы, которые вырабатывают клетки, остаются в ней. В одном варианте осуществления продуцируемыми факторами являются микровезикулы. Среду можно кондиционировать с помощью любого подходящего способа, выбранного специалистом в данной области. Например, среду можно культивировать в соответствии со способами, описанными в EP1780267A2, включенном в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

[0169] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из клеток или тканей, которые были предварительно обработаны перед выделением микровезикул. Предварительная обработка может включать, например, культивирование в определенной среде, среде, которая содержит по меньшей мере одну добавку, фактор роста, среду без сыворотки или их комбинацию. В альтернативе предварительная обработка может включать контакт клеток или тканей с добавками (например, интерлейкином, VEGF, индукторами факторов транскрипции, факторами транскрипции, гормонами, нейромедиаторами, фармацевтическими соединениями, микроРНК), трансформирующими агентами (например, липосомами, вирусами, трансфицированными агентами и т.д.). В альтернативе предварительная обработка может включать воздействие

на клетки или ткани измененных физических условий (например, гипоксии, холодового шока, теплового шока и т.п.).

[0170] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из кондиционированной среды с использованием клеток или ткани, которые были предварительно обработаны перед выделением микровезикул. Предварительная обработка может включать, например, культивирование в определенной среде, среде, которая содержит по меньшей мере одну добавку, фактор роста, среду без сыворотки или их комбинацию. В альтернативе предварительная обработка может включать контакт клеток или тканей с добавками (например, интерлейкином, VEGF, индукторами факторов транскрипции, факторами транскрипции, гормонами, нейромедиаторами, фармацевтическими соединениями, микроРНК), трансформирующими агентами (например, липосомами, вирусами, трансфицированными агентами и т.д.). В альтернативе предварительная обработка может включать воздействие на клетки или ткани измененных физических условий (например, гипоксии, холодового шока, теплового шока и т.п.).

[0171] Хотя способы, описанные в настоящем документе, можно проводить при любой температуре, специалист в данной области может легко оценить то, что некоторые биологические жидкости могут разлагаться, при этом такое разложение снижается, если образец хранится при температуре ниже температуры, при которой разлагается биологическая жидкость. В одном варианте осуществления способ, описанный в настоящем документе, проводят при 4°C. В альтернативном варианте по меньшей мере один этап способа, описанного в настоящем документе, проводят при 4°C. В некоторых вариантах осуществления, биологическую жидкость могут разбавлять перед тем, как она будет подвергнута способам, описанным в настоящем документе. Разбавление может требоваться для вязких биологических жидкостей, чтобы уменьшить вязкость образца, если вязкость образца слишком большая, для получения достаточного выхода микровезикул. Разведение может быть разведением 1:2. В альтернативе разведение может быть разведением 1:3. В альтернативе разведение может быть разведением 1:4. В альтернативе разведение может быть разведением 1:5. В альтернативе разведение может быть разведением 1:6. В альтернативе разведение может быть разведением 1:7. В альтернативе разведение может быть разведением 1:8. В альтернативе разведение может быть разведением 1:9. В альтернативе разведение может быть разведением 1:10. В альтернативе разведение может быть разведением 1:20. В альтернативе разведение может быть разведением 1:30. В альтернативе разведение может быть разведением 1:40. В альтернативе разведение может быть разведением 1:50. В альтернативе разведение может быть разведением 1:60. В альтернативе разведение может быть разведением 1:70. В альтернативе разведение может быть разведением 1:80. В альтернативе разведение может быть разведением 1:90. В альтернативе разведение может быть разведением 1:100.

[0172] Биологическую жидкость могут разбавлять любым разбавителем, если разбавитель не влияет на функциональную и/или структурную целостность микровезикул. Средний специалист в данной области сумеет с легкостью выбрать подходящий

разбавитель. Разбавителями может быть, например, фосфатно-солевой буферный раствор, среда для культивирования клеток и т.п.

[0173] В одном варианте биологическую жидкость осветляют посредством приложения центробежной силы для удаления клеточного дебриса. Центробежная сила, приложенная к биологической жидкости, является достаточной для удаления любых клеток, лизированных клеток, остатков тканей из биологической жидкости, но при этом приложенная центробежная сила имеет недостаточную величину и/или продолжительность воздействия для удаления микровезикул. Биологическая жидкость может требовать разбавления для облегчения осветления.

[0174] Продолжительность воздействия и величина центробежной силы, используемой для осветления биологической жидкости, могут изменяться в зависимости от ряда факторов, легко определяемых средним специалистом в данной области, включая, например, биологическую жидкость, рН биологической жидкости, требуемую чистоту выделяемых микровезикул, требуемый размер выделяемых микровезикул, требуемую молекулярную массу микровезикул и т.п. В одном варианте осуществления к биологической жидкости приложена центробежная сила 2000 g в течение 30 минут.

[0175] Осветленную биологическую жидкость подвергают контакту с осаждающим веществом для осаждения микровезикул. В одном варианте осуществления осаждающим веществом может быть любое вещество, которое окружает микровезикулы и вытесняет сольватную воду. Такие осаждающие вещества могут быть выбраны из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, декстрана и полисахаридов.

[0176] В альтернативном варианте осуществления осаждающее вещество может вызывать агрегацию микровезикул.

[0177] В альтернативном варианте осуществления осаждающее вещество выбрано из группы, состоящей из ионов кальция, ионов магния, ионов натрия, ионов аммония, ионов железа, органических растворителей, таких как сульфат аммония, и флокулянтов, таких как альгинат.

[0178] Осветленную биологическую жидкость подвергают контакту с осаждающим веществом в течение периода времени, достаточного для осаждения микровезикул. Период времени, достаточный для осаждения микровезикул, может изменяться в зависимости от ряда факторов, легко определяемых средним специалистом в данной области, включая, например, биологическую жидкость, рН биологической жидкости, требуемую чистоту выделяемых микровезикул, требуемый размер выделяемых микровезикул, требуемую молекулярную массу микровезикул и т.п. В одном варианте осуществления период времени, достаточный для осаждения микровезикул, составляет 6 часов.

[0179] В одном варианте осуществления осветленную биологическую жидкость подвергают контакту с осаждающим веществом в течение периода времени, достаточного для осаждения микровезикул, при 4°C.

[0180] Концентрация осаждающего вещества, используемого для осаждения

микровезикул из биологической жидкости, может изменяться в зависимости от ряда факторов, легко определяемых специалистом в данной области, включая, например, биологическую жидкость, рН биологической жидкости, требуемую чистоту выделенных микровезикул, требуемый размер выделенных микровезикул, требуемую молекулярную массу микровезикул и т.п.

[0181] В одном варианте осуществления осаждающим веществом является полиэтиленгликоль. Молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, может составлять от приблизительно 200 Да до приблизительно 10000 Да. В одном варианте молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, может превышать 10000 Да. В некоторых вариантах осуществления, молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, составляет 10000 Да или 20000 Да. На выбор молекулярной массы может влиять множество факторов, включающих, например, вязкость биологической жидкости, требуемую чистоту микровезикул, требуемый размер микровезикул, используемую биологическую жидкость и т.п. В одном варианте осуществления молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, может составлять от приблизительно 200 Да до приблизительно 8000 Да или приблизительно является любой из 200 Да, 300 Да, 400 Да, 600 Да, 1000 Да, 1450 Да, 1500 Да, 2000 Да, 3000 Да, 3350 Да, 4000 Да, 6000 Да, 8000 Да, 10000 Да, 20000 Да или 35000 Да, включая любые диапазоны или молекулярные массы между указанными значениями.

[0182] В одном варианте осуществления молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, составляет приблизительно 6000 Да.

[0183] В одном варианте осуществления средняя молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, составляет приблизительно 8000 Да.

[0184] В одном варианте осуществления средняя молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, составляет приблизительно 10000 Да.

[0185] В одном варианте осуществления средняя молекулярная масса полиэтиленгликоля, используемого в описанных в настоящем документе способах, составляет приблизительно 20000 Да.

[0186] Концентрация полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, может составлять от приблизительно 0,5% мас/об до приблизительно 100% мас/об. На концентрацию полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, может влиять множество факторов, включающих, например, вязкость биологической жидкости, требуемую чистоту микровезикул, требуемый размер микровезикул, используемую биологическую жидкость и т.п.

[0187] В некоторых вариантах осуществления, полиэтиленгликоль используют в концентрации, описанной в настоящем документе, например, в концентрации приблизительно от 5% до 25% мас/об. В некоторых вариантах осуществления, концентрация составляет приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% или 15% или находится в диапазоне между любыми двумя из указанных значений.

[0188] В одном варианте осуществления концентрация полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, составляет приблизительно 8,5% мас/об.

[0189] В одном варианте осуществления концентрация полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, составляет приблизительно 6% мас/об.

[0190] В одном варианте осуществления используется полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу 6000 Да, в концентрации 8,5% мас/об. В одном варианте полиэтиленгликоль разбавляют 0,4 М хлоридом натрия.

[0191] В одном варианте осуществления концентрация полиэтиленгликоля, используемого в способах, описанных в настоящем документе, обратно пропорциональна средней молекулярной массе полиэтиленгликоля. Например, в одном варианте осуществления используется полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой 4000 Да в концентрации 20% мас/об. В альтернативном варианте осуществления используется полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой 8000 Да в концентрации 10% мас/об. В альтернативном варианте осуществления используется полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой 20000 Да в концентрации 4% мас/об.

[0192] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают путем приложения центробежной силы. Центробежная сила является достаточной и приложена в течение времени, достаточного для того, чтобы микровезикулы образовали осадок, но недостаточна для повреждения микровезикул.

[0193] Продолжительность воздействия и величина центробежной силы, используемой для осаждения микровезикул из биологической жидкости, может изменяться в зависимости от ряда факторов, легко определяемых средним специалистом в данной области, включающих, например, биологическую жидкость, pH биологической жидкости, требуемую чистоту выделенных микровезикул, требуемый размер выделенных микровезикул, требуемую молекулярную массу микровезикул и т.п. В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают путем приложения центробежной силы $10000\times g$ в течение 60 минут.

[0194] Осажденные микровезикулы могут промывать любой жидкостью при условии, что жидкость не нарушает функциональную и/или структурную целостность микровезикул. Средний специалист в данной области может легко выбрать подходящую жидкость. Жидкости могут быть, например, фосфатно-солевым буферным раствором, средой для культивирования клеток и т.п.

[0195] В одном варианте осуществления стадия промывки обеспечивает удаление

осаждающего вещества. В одном варианте осуществления микровезикулы промывают с помощью центрифужной фильтрации с использованием фильтрующего устройства с отсечением по молекулярной массе 100 кДа.

[0196] Выделенные микровезикулы можно суспендировать в любой жидкости при условии, что жидкость не нарушает функциональную и/или структурную целостность микровезикул. Средний специалист в данной области может легко выбрать подходящую жидкость. Жидкости могут быть, например, фосфатно-солевым буферным раствором, средой для культивирования клеток и т.п.

[0197] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы могут дополнительно обработаны. Дополнительная обработка может заключаться в выделении микровезикул определенного размера. В альтернативе дополнительная обработка может заключаться в выделении микровезикул определенного диапазона размеров. В альтернативе дополнительная обработка может заключаться в выделении микровезикул определенной молекулярной массы. В альтернативе дополнительная обработка может заключаться в выделении микровезикул определенного диапазона молекулярной массы. В альтернативе дополнительная обработка может заключаться в выделении микровезикул, экспонирующих или содержащих специфическую молекулу.

[0198] В одном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, дополнительно обрабатывают для выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 1000 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, дополнительно обрабатывают для выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 500 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, дополнительно обрабатывают для выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 400 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, дополнительно обрабатывают для выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 300 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, дополнительно обрабатывают для выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 200 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, дополнительно обрабатывают для выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 100 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, дополнительно обрабатывают для выделения препарата микровезикул, имеющих размер

от приблизительно 2 нм до приблизительно 50 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, дополнительно обрабатывают для выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 20 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В альтернативном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, дополнительно обрабатывают для выделения препарата микровезикул, имеющих размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 10 нм, как определено с помощью электронной микроскопии.

[0199] В одном варианте осуществления последующую очистку проводят с использованием способа, выбранного из группы, состоящей из иммуноаффинной, ВЭЖХ, тангенциальной проточной фильтрации, разделения/распределения фаз и микрофлюидных технологий.

[0200] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы дополнительно обрабатывают для анализа молекул, экспонированных на микровезикулах или содержащихся внутри них. Анализируемые молекулы выбраны из группы, состоящей из нуклеиновой кислоты, углевода, липида, малых молекул, ионов, метаболитов, белка и их комбинаций.

[0201] В одном варианте осуществления микровезикулы получают из среды, кондиционированной с использованием культивируемых клеток. Любая культивируемая клетка или популяция клеток могут использоваться в способах, описанных в настоящем документе. Клетки могут быть стволовыми клетками, первичными клетками, линиями клеток, эксплантатами тканей или органов или любой их комбинацией. Клетки могут быть аллогенными, аутологичными или ксеногенными по происхождению.

[0202] В одном варианте осуществления клетки представляют собой клетки, полученные из аспирата костного мозга. В одном варианте осуществления клетки, полученные из аспирата костного мозга, представляют собой мезенхимальные стволовые клетки костного мозга. В одном варианте осуществления клетки, полученные из аспирата костного мозга, представляют собой моноклеарные клетки. В одном варианте осуществления клетки, полученные из аспирата костного мозга, представляют собой смесь моноклеарных клеток и мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения.

[0203] В одном варианте осуществления мезенхимальные стволовые клетки костномозгового происхождения выделяют из аспирата костного мозга путем культивирования аспирата костного мозга в пластиковых флаконах для культур тканей в течение приблизительно до 4 дней, с последующей промывкой для удаления неадгерентных клеток.

[0204] В одном варианте осуществления моноклеарные клетки выделяют из аспирата костного мозга путем центрифугирования низкой плотности с использованием градиента фиколла и сбора моноклеарных клеток на поверхности раздела.

[0205] В одном варианте осуществления перед выделением микровезикул в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, клетки культивируют, выращивают или поддерживают при соответствующей температуре и газовой смеси (обычно 37°C, 5% CO₂ для клеток млекопитающих) в клеточном инкубаторе. Условия культивирования изменяются в широких пределах для каждого типа клеток и могут быть легко определены средним специалистом в данной области.

[0206] В одном варианте осуществления изменяется одно или больше условий культивирования. В одном варианте осуществления такое изменение приводит к другому фенотипу.

[0207] В одном варианте осуществления, если клеткам необходима сыворотка в их среде культивирования, то для того, чтобы начать процедуру выделения микровезикул, в среду для культивирования клеток добавляют сыворотку, не содержащую микровезикулы, а затем добавляют ее к клеткам, подлежащим кондиционированию. Микровезикулы собирают из кондиционированной среды для культивирования клеток. Сыворотку можно истощать любым подходящим способом, таким как, например, ультрацентрифугирование, фильтрация, преципитация и т.п. Выбор среды, концентрации сыворотки и условий культивирования зависит от множества факторов, которые легко может оценить средний специалист в данной области, включающих, например, тип культивируемых клеток, требуемую чистоту микровезикул, требуемый фенотип культивируемой клетки и т.п. В одном варианте осуществления среда для культивирования клеток, которая кондиционирована для процедуры выделения микровезикул, представляет собой среду для культивирования клеток такого же типа, в которой клетки культивировали до процедуры выделения микровезикул.

[0208] В одном варианте осуществления, чтобы начать процедуру выделения микровезикул, среду для культивирования клеток удаляют и добавляют к подлежащим кондиционированию клеткам бессывороточную среду. Затем микровезикулы собирают из кондиционированной бессывороточной среды. Выбор среды и условий культивирования зависит от множества факторов, которые легко может оценить средний специалист в данной области, включающих, например, тип культивируемых клеток, требуемую чистоту микровезикул, требуемый фенотип культивируемой клетки и т.п. В одном варианте осуществления в бессывороточную среду добавляют по меньшей мере один дополнительный фактор, который способствует или повышает выживание клеток в бессывороточной среде. Такой фактор может, например, обеспечивать трофическую поддержку клеток, ингибировать или предотвращать апоптоз клеток.

[0209] Клетки культивируют в среде культивирования в течение периода времени, достаточного для того, чтобы клетки смогли секретировать микровезикулы в среду культивирования. Период времени, достаточный для секреции клетками микровезикул в среду культивирования, зависит от множества факторов, которые легко может оценить средний специалист в данной области, включающих, например, тип культивируемых клеток, требуемую чистоту микровезикул, требуемый фенотип культивируемых клеток,

требуемый выход микровезикул и т.п.

[0210] Затем микровезикулы удаляют из среды культивирования с помощью способов, описанных в настоящем документе.

[0211] В одном варианте осуществления перед процедурой выделения микровезикул клетки обрабатывают по меньшей мере одним средством, выбранным из группы, состоящей из противовоспалительного соединения, антиапоптотического соединения, ингибитора фиброза, соединения, которое способно усиливать ангиогенез, иммунодепрессивного соединения, соединения, способствующего выживанию клеток, химиотерапевтического средства, соединения, способного усиливать клеточную миграцию, нейрогенного соединения и фактора роста. В одном варианте осуществления при культивировании клеток в среде, из которой собирают микровезикулы, клетки обрабатывают по меньшей мере одним средством, выбранным из группы, состоящей из противовоспалительного соединения, антиапоптотического соединения, ингибитора фиброза, соединения, способного усиливать ангиогенез, иммунодепрессивного соединения, соединения, способствующего выживанию клеток, и фактора роста.

[0212] В одном варианте осуществления противовоспалительное соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в патенте США 6,509,369, полностью включенном в настоящее описание посредством отсылки.

[0213] В одном варианте осуществления антиапоптотическое соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в патенте США 6,793,945, полностью включенном в настоящее описание посредством отсылки.

[0214] В одном варианте осуществления ингибитор фиброза может быть выбран из соединений, раскрытых в патенте США 6,331,298, полностью включенном в настоящее описание посредством отсылки.

[0215] В одном варианте осуществления соединение, которое способно усиливать ангиогенез, может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2004/0220393 или в заявке на патент США 2004/0209901, которые полностью включены в настоящий документ посредством отсылки.

[0216] В одном варианте осуществления иммунодепрессивное соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2004/0171623, полностью включенной в настоящее описание посредством отсылки.

[0217] В одном варианте осуществления соединение, которое способствует выживанию клеток, может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2010/0104542, полностью включенной в настоящее описание посредством отсылки.

[0218] В одном варианте осуществления фактор роста может быть по меньшей мере одной молекулой, выбранной из группы, состоящей из членов семейства TGF- β , включающего TGF- β 1, 2 и 3, костные морфогенетические белки (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 и -13), факторы роста фибробластов 1 и 2, тромбоцитарный фактор роста-AA, -AB и -BB, обогащенной тромбоцитами плазмы, инсулиноподобного фактора роста (IGF-I, II), фактора роста и дифференцировки (GDF-5, -6, -8, -10, -15), фактора роста клеток

эндотелия сосудов (VEGF), плейотрофина, эндотелина и т.д. Другие фармацевтические соединения могут включать, например, никотинамид, индуцируемый гипоксией фактор 1-альфа, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), GLP-1 и GLP-2 Mimetic body, и II, Эксендин-4, Nodal, ноггин, NGF, ретиноевую кислоту, паратиреоидный гормон, тенасцин-С, тропоэластин, пептиды-производные тромбина, кателицидины, дефензины, ламинин, биологические пептиды, содержащие клеточносвязывающие и гепаринсвязывающие домены адгезивных белков внеклеточного матрикса, таких как фибронектин и витронектин, и ингибиторы MAPK, такие как, например, соединения, раскрытые в заявке на патент США 2004/0209901 и заявке на патент США 2004/0132729, которые полностью включены в настоящее описание посредством отсылки.

[0219] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, содержащей среду для культивирования клеток, кондиционированную с использованием культуры мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, включающую следующие этапы:

- a) получение популяции мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения и посев во флаконы при разведении клеток 1:4,
- b) культивирование клеток в среде, пока клетки не станут конфлюэнтными на 80-90%,
- c) удаление и осветление среды для удаления клеточного дебриса,
- d) осаждение микровезикул путем добавления осаждающего вещества в осветленную среду культивирования,
- e) сбор осажденных микровезикул и промывку материала для удаления осаждающего вещества, и
- f) суспендирование промытых микровезикул в растворе для хранения или последующего применения.

[0220] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, содержащей среду для культивирования клеток, кондиционированную с использованием культуры моноклеарных клеток костномозгового происхождения, включающую следующие этапы:

- a) получение популяции моноклеарных клеток костномозгового происхождения и посев во флаконы при разведении клеток 1:4,
- b) культивирование клеток в среде, пока клетки не станут конфлюэнтными на 80-90%,
- c) удаление и осветление среды для удаления клеточного дебриса,
- d) осаждение микровезикул добавлением осаждающего вещества в осветленную питательную среду,
- e) сбор осажденных микровезикул и промывку материала для удаления осаждающего вещества, и
- f) суспендирование промытых микровезикул в растворе для хранения или последующего применения.

[0221] В одном варианте осуществления мезенхимальные стволовые клетки костномозгового происхождения культивируют в среде, содержащей α -МЕМ, с добавкой 20% фетальной телячьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина/глутамин, при 37°C в 95% увлажненном воздухе с 5% CO₂.

[0222] В одном варианте осуществления моноклеарные клетки костномозгового происхождения культивируют в среде, содержащей α -МЕМ, с добавкой 20% фетальной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина/глутамин, при 37°C в 95% увлажненном воздухе с 5% CO₂.

[0223] В одном варианте осуществления среду освещают с помощью центрифугирования.

[0224] В одном варианте осуществления осаждающим веществом является полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу 6000. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль используется в концентрации приблизительно 8,5 мас/об %. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль разбавлен раствором хлорида натрия, имеющим конечную концентрацию 0,4 М.

[0225] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают с помощью центрифугирования.

[0226] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы промывают с помощью центрифужной фильтрации с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 100 кДа при использовании фосфатно-солевого буферного раствора.

[0227] Биологическая жидкость, включающая плазму крови: В одном варианте осуществления микровезикулы получают из плазмы крови. Плазма может быть получена от здорового лица или, в альтернативе, от лица с определенным фенотипом заболевания.

[0228] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, включающей плазму крови, включающем следующие этапы:

- a) получение плазмы и разведение плазмы средой для культивирования клеток,
- b) осаждение микровезикул путем добавления осаждающего вещества к разбавленной плазме,
- c) сбор осажденных микровезикул и промывку материала для удаления осаждающего вещества, и
- d) суспендирование промытых микровезикул в растворе для хранения или последующего применения.

[0229] В одном варианте осуществления плазму разбавляют средой для культивирования 1:10. В одном варианте средой для культивирования является α -МЕМ.

[0230] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы выделяют из плазмы в соответствии со способами из патента США 10,500,231, полностью включенного в настоящий документ посредством отсылки.

[0231] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы выделяют из мочи в соответствии со способами из патента США 10,500,231, полностью включенного в настоящий документ посредством отсылки.

[0232] В одном варианте осуществления осаждающим веществом является полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу 6000. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль используют в концентрации приблизительно 8,5 мас/об %. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль разбавляют раствором хлорида натрия, имеющим конечную концентрацию 0,4 М.

[0233] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают с помощью центрифугирования.

[0234] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы промывают с помощью центрифужной фильтрации с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 100 кДа при использовании фосфатно-солевого буферного раствора.

[0235] Биологическая жидкость, включающая аспират костного мозга: В одном варианте осуществления микровезикулы получают из аспирата костного мозга. В одном варианте микровезикулы получают из клеточной фракции аспирата костного мозга. В одном варианте микровезикулы получают из бесклеточной фракции аспирата костного мозга.

[0236] В одном варианте осуществления микровезикулы получают из клеток, культивируемых из аспирата костного мозга. В одном варианте осуществления клетки, культивируемые из аспирата костного мозга, используют для кондиционирования среды для культивирования клеток, из которой выделяют микровезикулы.

[0237] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из биологической жидкости, включающей аспират костного мозга, включающем следующие этапы:

- a) получение аспирата костного мозга и разделение аспирата костного мозга на бесклеточную часть и клеточную часть,
- b) разведение бесклеточной части,
- c) осветление разведенной бесклеточной части для удаления клеточного дебриса,
- d) осаждение микровезикул в бесклеточной части путем добавления осаждающего вещества к разбавленной бесклеточной части,
- e) сбор осажденных микровезикул и промывку материала для удаления осаждающего вещества, и
- f) суспендирование промытых микровезикул в растворе для хранения или последующего применения.

[0238] В одном варианте осуществления бесклеточную часть разбавляют средой для культивирования 1:10.

[0239] В одном варианте осуществления средой для культивирования является α -МЕМ.

[0240] В одном варианте осуществления разведенную бесклеточную часть осветляют с помощью центрифугирования.

[0241] В одном варианте осуществления осаждающим веществом является полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу 6000. В одном варианте

осуществления полиэтиленгликоль используют в концентрации приблизительно 8,5 мас/об %. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль разбавляют раствором хлорида натрия, имеющим конечную концентрацию 0,4 М.

[0242] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают с помощью центрифугирования.

[0243] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы промывают с помощью центрифужной фильтрации с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 100 кДа при использовании фосфатно-солевого буферного раствора.

[0244] В одном варианте осуществления клеточную часть дополнительно обрабатывают для выделения и сбора клеток. В одном варианте осуществления клеточную часть дополнительно обрабатывают для выделения и сбора мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения. В одном варианте осуществления клеточную часть дополнительно обрабатывают для выделения и сбора мононуклеарных клеток костномозгового происхождения. В одном варианте осуществления клеточную часть используют для кондиционирования среды, из которой позже могут быть получены микровезикулы.

[0245] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из клеточной части. Клеточную часть могут инкубировать в течение некоторого периода времени перед выделением микровезикул. В альтернативе микровезикулы могут выделять из клеточной части сразу же после сбора клеточной части.

[0246] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы выделяют из среды культивирования, кондиционированной с использованием стволовых клеток костномозгового происхождения, в соответствии со способами из патента США 10,500,231, полностью включенного в настоящий документ посредством отсылки. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы выделяют из среды культивирования, кондиционированной с использованием аспирата костного мозга, в соответствии со способами из патента США 10,500,231, полностью включенного в настоящее описание посредством отсылки. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы выделяют из среды культивирования длительной культуры клеток костного мозга в соответствии со способами из патента США 10,500,231, полностью включенного в настоящее описание посредством отсылки.

[0247] В одном варианте осуществления клеточную часть также обрабатывают по меньшей мере одним средством, выбранным из группы, состоящей из противовоспалительного соединения, антиапоптотического соединения, ингибитора фиброза, соединения, способного усиливать ангиогенез, иммунодепрессивного соединения, соединения, которое способствует выживанию клеток, химиотерапевтического средства, соединения, способного усиливать клеточную миграцию, нейрогенного соединения и фактора роста.

[0248] В одном варианте осуществления противовоспалительное соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в патенте США 6,509,369, полностью

включенном в настоящее описание посредством отсылки.

[0249] В одном варианте осуществления антиапоптотическое соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в патенте США 6,793,945, полностью включенном в настоящее описание посредством отсылки.

[0250] В одном варианте осуществления ингибитор фиброза может быть выбран из соединений, раскрытых в патенте США 6,331,298, полностью включенном в настоящее описание посредством отсылки.

[0251] В одном варианте осуществления соединение, которое способно усиливать ангиогенез, может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2004/0220393 или заявке на патент США 2004/0209901, которые полностью включены в настоящий документ посредством отсылки.

[0252] В одном варианте осуществления иммунодепрессивное соединение может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2004/0171623, полностью включенной в настоящее описание посредством отсылки.

[0253] В одном варианте осуществления соединение, которое способствует выживанию клеток, может быть выбрано из соединений, раскрытых в заявке на патент США 2010/0104542, полностью включенной в настоящее описание посредством отсылки.

[0254] В одном варианте осуществления фактор роста может быть по меньшей мере одной молекулой, выбранной из группы, состоящей из членов семейства TGF- β , включающих TGF- β 1, 2 и 3, костные морфогенетические белки (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12 и -13), факторы роста фибробластов-1 и -2, тромбоцитарный фактор роста-AA, -AB и -BB, обогащенной тромбоцитами плазмы, инсулиноподобного фактора роста (IGF-I, II), фактора роста и дифференцировки (GDF-5, -6, -8, -10, -15), фактора роста клеток эндотелия сосудов (VEGF), плейотрофина, эндотелина и т.д. Другие фармацевтические соединения могут включать, например, никотинамид, индуцируемый гипоксией фактор 1-альфа, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), GLP-1 и GLP-2 Mimetibody, и II, Эксендин-4, Nodal, ноггин, NGF, ретиноевую кислоту, паратиреоидный гормон, тенаascin-C, тропоэластин, пептиды-производные тромбина, кателицидины, дефензины, ламинин, биологические пептиды, содержащие клеточносвязывающие и гепаринсвязывающие домены адгезивных белков внеклеточного матрикса, таких как фибронектин и витронектин, и ингибиторы MAPK, такие как как, например, соединения, раскрытые в заявке на патент США 2004/0209901 и заявке на патент США 2004/0132729, которые включены в настоящее описание посредством отсылки во всей своей полноте. В одном варианте осуществления клеточную часть культивируют в гипоксических условиях. В одном варианте осуществления клеточную часть подвергают тепловому шоку.

[0255] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы выделяют из клеточной культуры с помощью ультрацентрифугирования. В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы выделяют из клеточной культуры с помощью ультрацентрифугирования в соответствии со способами из патента США 10,500,231, включенного посредством отсылки в настоящем документе во всей своей полноте.

[0256] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из клеточной культуры с помощью ультрацентрифугирования в соответствии со следующим способом:

Клетки культивируют в среде с добавкой несодержащей микровезикул сыворотки (сыворотка может быть обеднена микровезикулами с помощью ультрацентрифугирования, фильтрации, преципитации и т.д.). После культивирования клеток в течение некоторого периода времени, среду удаляют, переносят в конические пробирки и центрифугируют при $400\times g$ в течение 10 минут при $4^{\circ}C$ для осаждения клеток. Затем супернатант переносят в новые конические пробирки и центрифугируют при $2000\times g$ в течение 30 минут при $4^{\circ}C$ для дополнительного удаления клеток и клеточного дебриса. После этого может последовать еще один этап центрифугирования (например, $10000\times g$ в течение 30 минут для дополнительного удаления клеточного дебриса и/или удаления более крупных микровезикул). Полученный супернатант переносят в ультрацентрифужные пробирки, взвешивают для получения одинакового веса и подвергают ультрацентрифугированию при $70000+ \times g$ в течение 70 минут при $4^{\circ}C$ для осаждения микровезикул. Раствор подвергают ультрацентрифугированию при $70000+ \times g$ в течение 70 минут при $4^{\circ}C$ для осаждения микровезикул. Осадок, обогащенный микровезикулами, ресуспендируют в небольшом объеме (приблизительно 50-100 мкл) соответствующего буфера (например, PBS).

[0257] В одном варианте осуществления осаждающим веществом является полиэтиленгликоль, имеющий среднюю молекулярную массу 6000. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль используют в концентрации приблизительно 8,5 мас/об %. В одном варианте осуществления полиэтиленгликоль разбавляют раствором хлорида натрия, имеющим конечную концентрацию 0,4 М.

[0258] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы осаждают полиэтиленгликолем в соответствии со способами из патента США 10,500,231, полностью включенного в настоящий документ посредством отсылки. В одном варианте осуществления микровезикулы осаждают полиэтиленгликолем в соответствии со следующим способом:

Клетки культивируют в среде с добавлением не содержащей микровезикулы сыворотки (сыворотка может быть обеднена микровезикулами путем ультрацентрифугирования, фильтрации, преципитации и т.д.). После культивирования клеток в течение некоторого периода времени, среду удаляют, переносят в конические пробирки и центрифугируют при $400\times g$ в течение 10 минут при $4^{\circ}C$ для осаждения клеток. Затем супернатант переносят в новые конические пробирки и центрифугируют при $2000\times g$ в течение 30 минут при $4^{\circ}C$ для дополнительного удаления клеток и клеточного дебриса. После этого может последовать еще один этап центрифугирования (например, $10000\times g$ в течение 30 минут для дополнительного удаления клеточного дебриса и удаления более крупных частиц).

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

Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в соответствующем буфере (например, PBS). Его можно сразу использовать для последующих реакций или подвергать дополнительной очистке. Дополнительные процедуры очистки могут включать использование центрифужных фильтров (например, MWCO 100 кДа), иммуноаффинной очистки, ВЭЖХ, фильтрации в тангенциальном потоке, разделение/распределение фаз, микрофлюидные технологии и т.д.

[0260] В одном варианте осуществления осажденные микровезикулы собирают с помощью центрифугирования.

[0261] В одном варианте осуществления выделенные микровезикулы промывают с помощью центрифужной фильтрации с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 100 кДа при использовании фосфатно-солевого буферного раствора.

[0262] В альтернативном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, биологические жидкости очищают с помощью фильтрации. В альтернативном варианте осажденные микровезикулы собирают с помощью фильтрации. В альтернативном варианте биологические жидкости осветляют и собирают осажденные микровезикулы с помощью фильтрации. В некоторых вариантах осуществления, фильтрация биологической жидкости или осажденных микровезикул требует приложения внешней силы. Внешней силой может быть сила тяжести, либо нормальная сила тяжести, либо центробежная сила. В альтернативе внешней силой может быть вакуум.

[0263] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложено устройство для облегчения осветления биологической жидкости с помощью фильтрации. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложено устройство для облегчения сбора осажденных микровезикул с помощью фильтрации. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложено устройство, которое облегчает осветление биологической жидкости и сбор осажденных микровезикул с помощью фильтрации. В одном варианте устройство также промывает микровезикулы.

[0264] В одном варианте осуществления устройство представляет собой устройство, показанное на ФИГ. 7. В этом варианте осуществления биологическая жидкость добавляется во внутреннюю камеру. Внутренняя камера имеет первый фильтр с размером пор, который позволяет проходить микровезикулам, задерживая во внутренней камере любые частицы с размером больше размера микровезикулы. В одном варианте размер пор фильтра внутренней камеры составляет 1 мкм. В этом варианте осуществления, при прохождении биологической жидкости из внутренней камеры через фильтр, частицы крупнее 1 мкм задерживаются во внутренней камере, а все остальные частицы собираются в области между дном внутренней камеры и вторым фильтром.

[0265] Второй фильтр имеет размер пор, который не позволяет проходить микровезикулам. В одном варианте размер пор второго фильтра внутренней камеры составляет 0,01 мкм. В этом варианте осуществления, при прохождении биологической жидкости через второй фильтр, микровезикулы задерживаются в области между дном внутренней камеры и вторым фильтром, а все оставшиеся частицы и жидкость

собираются на дне устройства.

[0266] Специалист в данной области техники сумеет легко оценить, что устройство может иметь больше двух фильтров с разными размерами пор для отбора, например, микровезикул требуемого размера.

[0267] В одном варианте осуществления к биологической жидкости во внутренней камере добавляют осаждающее вещество. В другом варианте осуществления к фильтрату добавляют осаждающее вещество после его прохождения через первый фильтр. Фильтрующие мембраны, используемые в устройстве, описанном в настоящем документе, могут быть изготовлены из любого подходящего материала при условии, что фильтрующая мембрана не взаимодействует с биологической жидкостью или не связывается с компонентами в биологической жидкости. Например, фильтрующие мембраны могут быть изготовлены из материала с низким связыванием, такого как, например, полиэфирсульфон, нейлон-6, политетрафторэтилен, полипропилен, дзета-модифицированное микростекловолокно, нитроцеллюлоза, ацетат целлюлозы, поливинилиденфторид, регенерированная целлюлоза.

[0268] В одном варианте осуществления микровезикулы выделяют из среды культивирования, кондиционированной с использованием стволовых клеток костномозгового происхождения. В другом варианте осуществления микровезикулы выделяют из среды культивирования, кондиционированной с использованием стволовых клеток костномозгового происхождения, в соответствии со способами из патента США 10,500,231, полностью включенного в настоящее описание посредством отсылки.

Анализ характеристик микровезикул

[0269] В одном варианте осуществления микровезикулы имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 5000 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В дополнительном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 1000 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В дополнительном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 500 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В дополнительном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 400 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В дополнительном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 300 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В дополнительном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 200 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В дополнительном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 100 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В дополнительном варианте

осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 50 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В дополнительном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 20 нм, как определено с помощью электронной микроскопии. В дополнительном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, имеют размер от приблизительно 2 нм до приблизительно 10 нм, как определено с помощью электронной микроскопии.

[0270] В одном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, имеют молекулярную массу по меньшей мере 100 кДа.

[0271] Микровезикулы, выделенные согласно способам, описанным в настоящем документе, могут использоваться для терапии. В альтернативе микровезикулы, описанные в настоящем документе, могут использоваться для изменения или модификации клеток или тканей. В случае, когда микровезикулы, описанные в настоящем документе, используются для изменения или модификации клеток или тканей, микровезикулы могут быть нагружены, помечены РНК, ДНК, липидами, углеводами, белками, лекарственными средствами, малыми молекулами, метаболитами или их комбинациями, которые будут изменять или модифицировать клетку или ткань. В альтернативе микровезикулы могут быть выделены из клеток или тканей, которые экспрессируют и/или содержат РНК, ДНК, липиды, углеводы, белок, лекарственные средства, малые молекулы, метаболиты или их комбинации.

[0272] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы имеют характеристики микровезикул, описанные в патенте США 10,500,231, полностью включенном в настоящий документ посредством отсылки.

[0273] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы, описанные в настоящем документе, имеют границы, которые являются более гладкими, ровными и кажутся более "интактными" по сравнению с микровезикулами, выделенными путем выделения с помощью ультрацентрифугирования.

[0274] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы, описанные в настоящем документе, содержат экзосомальные маркеры, включающие, без ограничения перечисленными: HSP 70 и CD63. В некоторых вариантах осуществления, экзосомы содержат фактор транскрипции STAT3. В некоторых вариантах осуществления, экзосомы содержат активированную фосфорилированную форму фосфо-STAT3.

[0275] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы, описанные в настоящем документе, способствуют пролиферации и миграции фибробластов, как описано в патенте США 10,500,231, полностью включенном в настоящий документ посредством отсылки.

[0276] В некоторых вариантах осуществления, микровезикулы, описанные в настоящем документе, демонстрируют захват клетками, как описано в патенте США 10,500,231, полностью включенном в настоящий документ посредством отсылки.

Фармацевтические композиции

[0277] Микровезикулы, описанные в настоящем документе, могут применяться в качестве терапии для лечения заболевания.

[0278] В одном варианте осуществления микровезикулы, описанные в настоящем документе, используются для доставки молекул в клетки. Доставка молекул может применяться при лечении или предупреждении заболевания. В одном варианте осуществления доставку осуществляют в соответствии со способами, описанными в заявке РСТ WO04014954A1, полностью включенной в настоящий документ посредством отсылки. В альтернативном варианте осуществления доставку осуществляют в соответствии со способами, описанными в заявке РСТ WO 2007126386A1, полностью включенной в настоящий документ посредством отсылки. В альтернативном варианте осуществления доставку осуществляют в соответствии со способами, описанными в заявке РСТ WO 2009115561A1, полностью включенной в настоящий документ посредством отсылки. В альтернативном варианте осуществления доставку осуществляют в соответствии со способами, описанными в заявке РСТ WO 2010119256A1, полностью включенной в настоящий документ посредством отсылки.

[0279] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который может способствовать функциональной регенерации и организации сложных структур тканей. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который может регенерировать гемопоэтическую ткань у пациента с апластической анемией. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который может регенерировать по меньшей мере одну ткань у пациента с пораженной, поврежденной или отсутствующей кожей, выбранную из группы, состоящей из: эпителиальной ткани, стромальной ткани, нервной ткани, сосудистой ткани и придаточных структур кожи. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который может регенерировать ткань и/или клетки из всех трех зародышевых листков.

[0280] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который используется для модуляции иммунной системы пациента.

[0281] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, который повышает выживаемость ткани или клеток, трансплантированных пациенту. В одном варианте осуществления пациент получает лечение выделенным препаратом микровезикул перед трансплантацией ткани или клеток. В альтернативном варианте пациент получает лечение выделенным препаратом микровезикул после трансплантации ткани или клеток. В альтернативном варианте ткань или клетки обрабатывают выделенным препаратом микровезикул. В одном варианте ткань или клетки перед трансплантацией обрабатывают выделенным препаратом микровезикул.

[0282] В одном варианте осуществления пациент получает трансплантат ткани или

клеток, где ткань или клетки доставляют микровезикулы пациенту. В некоторых вариантах осуществления, трансплантированная ткань или клетки являются мезенхимальными стволовыми клетками. В некоторых вариантах осуществления, мезенхимальные стволовые клетки являются мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга.

[0283] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный препарат микровезикул, содержащий по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из РНК, ДНК, липида, углевода, метаболита, белка и их комбинации из клетки-хозяина. В одном варианте осуществления клетка-хозяин генно-инженерно модифицирована для экспрессии по меньшей мере одной молекулы, выбранной из группы, состоящей из РНК, ДНК, липида, углевода, метаболита, белка и их комбинации. В одном варианте осуществления выделенный препарат микровезикул, содержащий по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из РНК, ДНК, липида, углевода, метаболита, белка и их комбинации из клетки-хозяина, применяется в качестве терапевтического средства.

[0284] Для терапевтического применения в некоторых вариантах осуществления, МВ комбинируют с фармацевтически приемлемым носителем. При использовании в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает буферы, носители и вспомогательные вещества, подходящие для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с разумным соотношением выгоды/риска. Носитель(и) должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместим с другими ингредиентами составов и не токсичен для реципиента. Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, растворители, дисперсионные среды, покрытия, изотонические вещества и вещества, задерживающие всасывание, и т.п., которые совместимы с фармацевтическим введением. Применение таких сред и веществ для фармацевтически активных веществ известно в уровне техники.

[0285] Таким образом, композиции ВВ, описанные в настоящем документе, могут включать по меньшей мере одно из любых подходящих вспомогательных веществ, таких как, без ограничения, разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант и т.п. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества являются предпочтительными. Неограничивающие примеры и способы приготовления таких стерильных растворов хорошо известны в уровне техники, например, без ограничения, описаны в Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990. Обычно могут выбирать фармацевтически приемлемые носители, которые подходят для способа введения, растворимости и/или стабильности композиции ВВ, как хорошо известно в данной области или описано в настоящем документе.

[0286] Фармацевтические вспомогательные вещества и добавки, используемые в настоящей композиции, включают, без ограничения, белки, пептиды, аминокислоты,

липиды и углеводы (например, сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; производные сахаров, такие как альдиты, альдоновые кислоты, этерифицированные сахара и т.п., а также полисахариды или полимеры сахаров), которые могут присутствовать по отдельности или в комбинации, составляя отдельно или в комбинации 1-99,99% по весу или объему. Примеры белковых вспомогательных веществ включают сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), рекомбинантный человеческий альбумин (рЧА), желатин, казеин и т.п. Репрезентативные аминокислоты/компоненты молекулы антитела, которые также могут влиять на буферную функцию, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т.п.

[0287] Углеводные вспомогательные вещества, подходящие для применения в изобретении, включают, например, моносахариды, такие как фруктозу, мальтозу, галактозу, глюкозу, D-маннозу, сорбозу и т.п.; дисахариды, такие как лактозу, сахарозу, трегалозу, целлобиозу и т.п.; полисахариды, такие как раффинозу, мелецитозу, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), миоинозит и т.п. Предпочтительными углеводными вспомогательными веществами для применения в настоящем изобретении являются маннит, трегалоза и раффиноза.

[0288] Композиции ВВ также могут включать буфер или регулятор pH; как правило, буфер представляет собой соль, полученную из органической кислоты или основания. Репрезентативные буферы включают соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, уксусной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты или фталевой кислоты; Трис, трометамин гидрохлорид или фосфатные буферы.

[0289] Кроме того, композиции ВВ согласно изобретению могут включать полимерные вспомогательные вещества/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фикоиллы (полимерный сахар), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин), полиэтиленгликоли, ароматизаторы, противомикробные средства, подсластители, антиоксиданты, антистатики, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как "TWEEN 20" и "TWEEN 80"), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатообразователи (например, ЭДТА).

[0290] Эти и другие известные фармацевтические вспомогательные вещества и/или добавки, подходящие для применения в композициях молекул антител согласно изобретению, известны в уровне техники, например, как перечислено в "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), и в "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998). Предпочтительными материалами в качестве носителей или вспомогательных веществ являются углеводы (например, сахариды и альдиты) и буферы (например, цитрат) или полимерные

соединения.

[0291] В настоящем изобретении предложены стабильные композиции, включающие МВ в фармацевтически приемлемом составе. Составы с консервантами содержат по меньшей мере один известный консервант или необязательно выбранный из группы, состоящей из по меньшей мере одного фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, нитрита фенилртути, феноксиэтанола, формальдегида, хлорбутанола, хлорида магния (например, гексагидрата), алкилпарабена (метил, этил, пропил, бутил и т.п.), хлорида бензалкония, хлорида бензетония, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смеси в водном разбавителе. Может использоваться любая подходящая концентрация или смесь, известная в данной области, такая как 0,001-5% или включающая любой диапазон или значение в нем, такое как, без ограничения, 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или любой диапазон или значение в нем. Неограничивающие примеры включают отсутствие консерванта, 0,1-2% м-крезола (например, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9 или 1,0%), 0,1-3% бензилового спирта (например, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0 или 2,5%), 0,001-0,5% тимеросала (например, 0,005 или 0,01%), 0,001-2,0% фенола (например, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9 или 1,0%), 0,0005-1,0% алкилпарабена(ов) (например, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9 или 1,0%) и т.п.

[0292] Фармацевтические композиции, содержащие МВ, как раскрыто в настоящем документе, могут быть представлены в единичной лекарственной форме и могут быть изготовлены любым подходящим способом. Фармацевтическая композиция должна иметь такой состав, который совместим с ее предполагаемым путем введения. Примерами путей введения являются внутривенное (в/в), внутрикожное, ингаляционное, чрескожное, наружное, чресслизистое и ректальное введение. Предпочтительным путем введения МВ является наружное введение. Подходящие составы могут быть изготовлены способами, известными в области фармацевтики. Например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) выше. Компоненты состава, подходящие для парентерального введения, включают стерильный разбавитель, такой как воду для инъекций, раствор хлорида натрия, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновую кислоту или бисульфит натрия; хелатообразующие вещества, такие как ЭДТА; буферные вещества, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и регуляторы тоничности, такие как хлорид натрия или декстрозу.

[0293] Носитель должен быть стабильным в условиях производства и хранения и должен быть предохранен от воздействия микроорганизмов. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

[0294] Фармацевтические составы предпочтительно являются стерильными. Стерилизацию можно проводить любым подходящим способом, например, с помощью фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Если композиция лиофилизирована, стерилизацию фильтрованием могут проводить до или после лиофилизации и восстановления.

[0295] Композиции согласно настоящему изобретению могут иметь различные формы. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии и липосомы. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции находятся в форме растворов для инъекций или инфузий. Предпочтительным способом введения является парентеральное (например, внутривенное, подкожное, внутриглазное, внутрибрюшинное, внутримышечное) введение. В предпочтительном варианте препарат вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В другом предпочтительном варианте препарат вводят внутримышечно или подкожно.

[0296] Фразы "парентеральное введение" и "вводимый парентерально" при использовании в настоящем документе означают способы введения, отличающиеся от энтерального и наружного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутриартериальное, интратекальное, интракапсулярное, интраорбитальное, интравитреальное, внутрисердечное, внутрикожное, внутрибрюшинное, транстрахеальное, ингаляционное, подкожное, субкутикулярное, внутрисуставное, субкапсулярное, субарахноидальное, интраспинальное, эпидуральное и интрастернальное введение и инфузию.

[0297] В настоящем изобретении предложен набор, включающий упаковочный материал и по меньшей мере один флакон, включающий раствор МВ с предписанными буферами и/или консервантами, необязательно в водном разбавителе. Водный разбавитель необязательно дополнительно включает фармацевтически приемлемый консервант. Консерванты включают консерванты, выбранные из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил, этил, пропил, бутил и т.п.), хлорида бензалкония, хлорида бензетония, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смеси. Концентрация консерванта, используемого в составе, является концентрацией, достаточной для обеспечения противомикробного эффекта. Такие концентрации зависят от выбранного консерванта и могут быть легко определены специалистом в данной области.

[0298] Другие вспомогательные вещества, например, изотонические вещества, буферные вещества, антиоксиданты, вещества, усиливающие действие консервантов, необязательно и предпочтительно могут быть добавлены в разбавитель. Изотоническое вещество, такое как глицерин, обычно используется в известных концентрациях. Может быть добавлен физиологически приемлемый буфер для улучшения контроля pH.

Композиции могут охватывать широкий диапазон значений pH, таких как от приблизительно pH 4,0 до приблизительно pH 10,0, от приблизительно pH 5,0 до приблизительно pH 9,0 или от приблизительно pH 6,0 до приблизительно pH 8,0.

[0299] Другие добавки, такие как фармацевтически приемлемые солюбилизаторы, такие как TWEEN 20 (полиоксиэтилен(20)сорбитан монолаурат), TWEEN 40 (полиоксиэтилен(20)сорбитан монопальмитат), TWEEN 80 (полиоксиэтилен(20)сорбитан моноолеат), Pluronic F68 (блок-сополимеры полиоксиэтилена полиоксипропилена) и ПЭГ (полиэтиленгликоль), или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 или 80 или полосамер 184 или 188, полиолы Pluronic®, другие блок-сополимеры и хелатообразователи, такие как ЭДТА и ЭГТА, могут дополнительно добавлять в составы или композиции для уменьшения агрегации. Такие добавки особенно полезны, если для введения состава используется насос или пластиковый контейнер. Присутствие фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества снижает склонность белка к агрегации.

[0300] Для введения МВ субъекту могут использоваться различные системы доставки. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, введение МВ производят наружно, необязательно с добавлением повязки, бинта, медицинской ленты, прокладки, марли и т.п. Подходящие повязки для облегчения наружной доставки хорошо известны в данной области и доступны в продаже. В других вариантах осуществления, МВ вводят путем легочной доставки, например, интраназального введения или перорального ингаляционного введения. Легочная доставка может осуществляться с помощью шприца или ингаляционного устройства (например, небулайзера, аэрозольного дозирующего ингалятора, многодозового жидкостного ингалятора, парового аэрозольного устройства, ингалятора сухого порошка и т.п.). Подходящие способы легочной доставки хорошо известны в данной области и доступны в продаже.

[0301] Любой из составов, описанных выше, можно хранить в жидкой или замороженной форме и, необязательно, можно подвергать процессу консервации.

[0302] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, изобретения ВВ, описанные в настоящем документе, применяются для доставки одного или больше биоактивных веществ в клетку-мишень. Предполагается, что термин "биоактивное вещество" включает, без ограничения перечисленными, белки (например, немембраносвязанные белки), пептиды (например, немембраносвязанные пептиды), факторы транскрипции, нуклеиновые кислоты и т.п., которые экспрессируются в клетке и/или в клеточной жидкости и добавляются в процессе очистки и/или получения ВВ, описанных в настоящем документе, и/или фармацевтических соединений, белков (например, немембраносвязанных белков), пептидов (например, немембраносвязанных пептидов), факторов транскрипции, нуклеиновых кислот и т.п., контакту с которыми ВВ, описанные в настоящем документе, подвергают во время одной или более стадий очистки и/или получения, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, биоактивное вещество представляет собой белок коллагена VII, мРНК

коллагена VII, активатор сигнализации STAT3 (например, интерферон, эпидермальный фактор роста, интерлейкин-5, интерлейкин-6, MAP-киназу, c-src нерецепторную тирозинкиназу или другую молекулу, которая фосфорилирует и/или иным образом активирует STAT3) и/или канонический активатор Wnt (см., например, публикацию McBride et al. (2017) Transgenic expression of a canonical Wnt inhibitor, kallistatin, is associated with decreased circulating CD19+ B lymphocytes in the peripheral blood. International Journal of Hematology, 1-10. DOI: 10.1007/s12185-017-2205-5, полностью включенную в настоящее описание посредством отсылки). В некоторых вариантах осуществления, биоактивное вещество представляет собой белок коллаген IV типа и/или мРНК коллагена IV типа. В некоторых вариантах осуществления, биоактивное вещество представляет собой белок плектин и/или мРНК плектина. В некоторых вариантах осуществления, биоактивное вещество представляет собой белок антиген буллезного пемфигоида 1 и/или мРНК антигена буллезного пемфигоида 1. В некоторых вариантах осуществления, биоактивное вещество представляет собой белок кератин 1 и/или мРНК кератина 1. В некоторых вариантах осуществления, биоактивное вещество представляет собой белок hSPCA1 и/или мРНК hSPCA1. В некоторых вариантах осуществления, биоактивное вещество представляет собой белок регулятор лизосомального транспорта и/или мРНК регулятора лизосомального транспорта. В некоторых вариантах осуществления, биоактивное вещество представляет собой белок сериновую протеинкиназу ATM и/или мРНК сериновой протеинкиназы ATM. В некоторых вариантах осуществления, биоактивное вещество представляет собой белок туберин и/или мРНК туберина. В некоторых вариантах осуществления, биоактивное вещество представляет собой белок FOXM1A и/или мРНК FOXM1A. В других вариантах осуществления, биоактивное вещество представляет собой одно или несколько фармацевтических соединений, известных в данной области.

[0303] Специалистам в данной области будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации способов, описанных в настоящем документе, могут быть выполнены с использованием подходящих эквивалентов, без отступления от объема вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе. Далее, после подробного описания некоторых вариантов осуществления, их можно будет более конкретно понять при обращении к следующим примерам, которые включены исключительно в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения. Все патенты, заявки на патент и источники, описанные в настоящем документе, полностью включены посредством отсылки во всех отношениях.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Анализ секрета мезенхимальных стволовых клеток костного мозга

Обзор

[0304] Для идентификации белков в секрете мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения, которые относятся к структуре и заболеванию кожи,

были получены аспиранты костного мозга четырех здоровых доноров. МСК-КМ каждого донора выделяли и отдельно культивировали с последующим инкубированием в бессывороточной культуральной среде, чтобы обеспечить продукцию и сбор секрета МСК-КМ. Для анализа выделяли внеклеточные везикулы. Масс-спектрометрию и Proteome Discoverer использовали для идентификации белков, секретируемых у каждого из четырех здоровых доноров. Функциональную классификацию белков проводили при использовании базы данных UniProt Knowledgebase.

Методы

[0305] *Доноры костного мозга*: Сбор первичного костного мозга донора-человека был одобрен Экспертным советом (IRB) Университета Майами и в соответствии с правилами Междисциплинарного института стволовых клеток. Все эксперименты проводились согласно соответствующим руководствам и правилам и соответствовали Хельсинкской декларации. Информированное согласие было получено у всех участников, и все 4 участника дали разрешение на публикацию результатов, полученных с использованием тканей и клеток, и, при необходимости, на публикацию любой идентифицирующей личностной информации, включая изображения. Донорами костного мозга являлись: 33-летний мужчина (донор 1), 33-летняя женщина (донор 2), 28-летняя женщина (донор 3) и 28-летний мужчина (донор 4). В соответствии со стандартной практикой в отношении доноров костного мозга в Междисциплинарном институте стволовых клеток, все 4 донора сдали с отрицательным результатом тест на антитела к ВИЧ-1/ВИЧ-2, антитела к HTLV I/II, антитела к ВГС, тест на нуклеиновую кислоту ВИЧ-1, нуклеиновую кислоту ВГС, HBsAg, антитела к HBc (IgG и IgM), антитела к ЦМВ, нуклеиновую кислоту ВЗН, ИФА на *T. cruzi* (болезнь Шагаса), антикардиолипиновый тест RPR на сифилис, и не имели клинических данных/сведений в анамнезе/результатов лабораторных исследований, позволяющих предположить наличие болезни Крейтцфельда-Якоба. Костный мозг (примерно 80 мл) аспирировали из задних концов гребня подвздошной кости в соответствии со стандартной практикой программ трансплантации костного мозга (КМ) Университета Майами. Костный мозг аспирировали в гепаринизированные шприцы, и транспортировали маркированные шприцы при комнатной температуре в Центр надлежащей производственной практики (GMP) в Междисциплинарном институте стволовых клеток Университета Майами. Костный мозг (КМ) обрабатывали с использованием среды для разделения лимфоцитов (LSM; удельный вес 1,077) с получением обогащенных в градиенте плотности мононуклеарных клеток (МНК). Клетки разводили буфером Plasmalyte A или PBS и наслаивали на LSM с использованием конических пробирок для выделения МНК в соответствии с установленными стандартными рабочими методиками. МНК промывали буфером Plasmalyte A или PBS, содержащим 1% человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Образцы промытых клеток отбирали для определения общего количества жизнеспособных ядросодержащих клеток. Сначала МСК культивировали в среде альфа-МЕМ с добавкой 2 mM L-глутамина, 20% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 100

единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Экспансию проводили во флаконах в инкубаторе с увлажнением при 37°C, 5% CO₂. МСК снимали с сосудов для культивирования с помощью обработки трипсином, пассировали и криоконсервировали на третьем пассаже перед использованием в последующих экспериментах. В GMP подтверждали, что МСК представляли собой живые, CD105⁺, CD45⁻ клетки, стерильные и не содержащие микоплазму и эндотоксины.

[0306] *Выделение секрета и внеклеточных везикул*: Кондиционированную бессывороточную среду собирали у каждого донора и выделяли внеклеточные везикулы (ВВ) при использовании набора ExoQuick-TC® ULTRA EV Isolation Kit для сред для культур тканей (номер по кат. EQUltra-20TC-1) в соответствии с инструкциями производителя. Проводили дот-блоттинг для подтверждения, что внеклеточные везикулы были выделены без клеточных примесей (чипы с антителами к экзосомам Exo-Check, номер по кат. EXORAY200A-4, номер по кат. EXORAY210A-8) в соответствии с инструкциями производителя.

[0307] *Обработка образцов ВВ перед масс-спектрометрическим анализом*: Лизис ВВ проводили следующим образом (все реагенты Sigma, если не указано иное). Выделенные внеклеточные везикулы центрифугировали в течение 10 минут при 2000×g при 4°C. Образцы быстро сушили в вакууме до полного высыхания образца. Добавляли 50 мкл 20 mM Tris-2% SDS. Смесь нагревали при 95°C в течение 30 секунд, охлаждали в течение 30 секунд и повторяли цикл в общей сложности в течение 5 минут. Образцы обрабатывали ультразвуком в течение 1 минуты. Белки осаждали холодным ацетоном. Образцы быстро сушили в вакууме до высыхания и ресуспендировали в 100 мкл бикарбоната аммония. Добавляли 8 мкг белка, центрифугировали 10 мин и быстро сушили в вакууме до высыхания образца. К образцам добавляли 8 мкл 50 mM бикарбоната аммония (pH 7,8). Образцы денатурировали 15 мкл 10 M мочевины в 50 mM бикарбоната аммония (pH 7,8). Образцы восстанавливали с использованием 2 мкл 125 ДТТ в 50 mM бикарбоната аммония (pH 7,8). Образцы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы подвергали алкилированию с использованием 5 мкл [90 mM йодацетамида в 50 mM бикарбоната аммония, pH (7,8)] и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Образцы гасили 3,33 мкл 125 mM ДТТ в 50 mM бикарбоната аммония (pH 7,8). Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч в темноте. Бикарбонат аммония (50 mM) добавляли для разбавления мочевины до 1 молярной концентрации. Образцы расщепляли трипсином при соотношении 1:30 вес/вес фермента к белку и инкубировали в течение ночи при 37°C в течение 18 часов. Для остановки реакции трипсина добавляли муравьиную кислоту (50%) (5:100 об/об муравьиной кислоты к образцу). Образцы обессоливали при использовании центрифужных наконечников Pierce C18 Spin Tips (Thermo Scientific). К образцу добавляли трифторуксусную кислоту (ТФУ) (2,5%), доводя концентрацию ТФУ до 0,05%; было подтверждено значение pH меньше 4. Используемые наконечники C18 Spin Tips помещали в центрифужный адаптер, смачивали наконечник 0,1% ТФУ в 80%

ацетонитриле (ACN) и центрифугировали в течение 1 минуты. После удаления фильтрата образец добавляли в центрифужный наконечник C18 Spin Tip и центрифугировали при 1000×g в течение 1 минуты; этот процесс повторяли, пока весь образец не проходил через C18 Spin Tip. Затем центрифужный наконечник переносили в новую микроцентрифужную пробирку. Образец элюировали при добавлении 20 мкл 0,1% ТФУ в 80% ACN и центрифугировали при 1000×g в течение 1 минуты; эту стадию повторяли снова для дополнительного элюирования образца. Образец быстро сушили в вакууме до высыхания. Образцы восстанавливали в 50 мкл 2% ацетонитрила в воде для ЖХ-МС с 0,1% муравьиной кислотой с поледующим анализом ЖХ-МС/МС.

[0308] *Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и масс-спектрометрия*: Следующие методы проводили, как описано ранее (см. Musada GR, Dvorianchikova G, Myer C, Ivanov D, Bhattacharya SK, Hackam AS. The effect of extrinsic Wnt/beta-catenin signaling in Muller glia on retinal ganglion cell neurite growth. Dev Neurobiol 2020). Вкратце, для обращенно-фазового хроматографического разделения использовали систему Easy-nLC 1000 (Thermo) с колонкой Acclaim PepMap RSLC 75 мкм × 15 см, nanoViper (Thermo). В качестве растворителей использовали воду для ЖХ-МС и ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты. Анализ пептидов проводили с использованием масс-спектрометра Q Exactive (Thermo) с подогреваемым источником электрораспылительной ионизации (HESI), работающим в режиме детектирования положительных ионов. Для идентификации белков на основе данных МС/МС использовали программное обеспечение Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific) с использованием поисковых систем Sequest HT. Данные при поиске сравнивали с последовательностями Homo sapiens в базе данных белковых последовательностей Uniprot. Параметры поиска включали: допуск по массе предшественника 10 м.д. и 0,02 Да для фрагментов, 2 пропущенных расщепления трипсином, окисление (Met) и ацетилирование (N-конец белка) в качестве переменных модификаций, карбамидометилирование (Cys) в качестве постоянной модификации. Проверку алгоритмом Percolator PSM использовали со следующими параметрами: строгий уровень ложноположительных результатов 0,01, ослабленный FDR 0,1, максимальное ΔCn 0,05, проверка на основе q-значения. Были получены пептиды с высокой достоверностью и исключены пептиды с низкой и средней достоверностью.

Обзор результатов

[0309] Секретом доноров 1-4 содержал 3373, 3457, 3523 и 3267 уникально идентифицируемых белковых продуктов соответственно. В секретоме всех четырех здоровых доноров было обнаружено 636 общих белков. Белки были классифицированы по клеточным компонентам, биологическим процессам, функциям лигандов и взаимосвязью с заболеваниями. Здесь описано открытие белков, обнаруженных в секретоме всех четырех доноров, особенно таких, которые связаны с гомеостазом кожи и кожным заболеванием. Эти белки включали белки базальной мембраны коллаген IV типа (образует плотную пластинку), коллаген VII типа (образует якорные фибриллы и содержит мутации

при дистрофическом буллезном эпидермолизе), плектин и антиген буллезного пемфигоида 1 (которые являются частью полудесмосомы и содержат мутации при различных формах простого буллезного эпидермолиза), белки кератиноцитов, такие как эпиплакин, кератин 1, растворимый е-кадгерин, и, что примечательно, белки, которые традиционно не считались частью секретома: кальций-транспортирующая АТФаза hSPCA1 (последняя кодируется ATR2C1, содержит мутации при доброкачественной семейной пузырьчатке/болезни Хейли-Хейли), туберин (TSC2, содержит мутации при туберозном склерозе), регулятор лизосомального транспорта (LYST, содержит мутации при синдроме Чедиака-Хигаси) и сериновая протеинкиназа ATM (содержит мутации при атаксии-телеангиэктазии).

[0310] Данный пример демонстрирует, что секретом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека содержит важные белки, участвующие в гомеостазе и заболевании кожи. Секретом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга содержит белки, общие среди доноров. Эти белки важны для структуры базальной мембраны, и некоторые кодируют белки, содержащие мутации при генодерматозах.

Подробные результаты

[0311] Секретом МСК-КМ каждого донора костного мозга 1-4 включал: 3398, 3486, 3566 и 3293 уникально идентифицируемых белка соответственно. Как показано на ФИГ. 1, это включало в общей сложности 636 уникальных белков из секретома МСК-КМ четырех доноров костного мозга. Белки классифицировали по известной функциональности, указанной в базе данных UniProt Knowledgebase (uniprot.org). Полный список функциональной классификации можно найти при поиске на сайте UniProt.org и выборе ключевых слов ("yourlist:M20200525A94466D2655679D1FD8953E075198DA8E760DF0").

[0312] Как показано на ФИГ. 2, в категории клеточных компонентов, общих для всех 4 доноров, большинство классифицируемых белков были связаны с клеточной мембраной (177 белков). Следующими по представленности были белки, связанные с цитоплазмой клетки (111 белков). Примечательно то, что третьими по распространенности оказались белки, связанные с ядром (94 белка). Белки, связанные с отростками клеток, были четвертыми по представленности (30 белков). Белки, традиционно считавшиеся "секретируемыми", были пятой по представленности категорией (22 белка). Полный список категорий клеточных компонентов представлен на ФИГ. 2. Как показано на ФИГ.3, при изучении 'биологических процессов' белков, общих для всех 4 доноров, наиболее распространенная категория белков была связана с функцией транспорта (52 белка). Второй по представленности категорией были белки, связанные с транскрипцией (32 белка). Третьими по представленности были белки, связанные с регуляцией клеточного цикла (20 белков). Белки, ассоциированные с путем убиквитинирования-конъюгации, были четвертыми по представленности (15 белков). Белки, участвующие в регуляции повреждения ДНК (14 белков), клеточной адгезии (10 белков) и клеточной дифференцировке (10 белков), были следующими по

представленности категориями. Другие категории биологических процессов показаны на ФИГ. 3. Как показано на ФИГ. 4, в категории связывания лигандов многие белки, общие для всех 4 доноров, были классифицированы как металлосвязывающие белки (92 белка). В частности, большинство белков, по-видимому, связываются с цинком (65 белков). Также были распространены нуклеотидсвязывающие белки (62 белка). Часто встречались кальцийсвязывающие белки (27 белков). Также были обнаружены белки, которые связывают магний (13 белков), железо (6 белков) и липиды (6). На ФИГ. 4 представлены дополнительные лиганд-связывающие группы. Как показано на ФИГ.5, в отношении молекулярной функции, большинство белков, общих для всех 4 доноров, были классифицированы как трансферазы (44 белка), гидролазы (41 белок), ДНК-связывающие (32 белка), рецепторы (28), гуанин-нуклеотид рилизинг-факторы (15 белков), моторные белки (15 белков), РНК-связывающие белки (13 белков), актин-связывающие белки (12 белков), белки, связанные с развитием (12 белков), трансдукторы (12 белков) и регуляторы хроматина (11 белков).

[0313] Как показано на ФИГ. 6, многие белки, общие для всех 4 доноров, были продуктами генов, содержащих мутации при различных заболеваниях (70 белков). Наиболее распространенные группы включали белки, связанные с умственной отсталостью (20 белков) и нейродегенерацией (18 белков). Глухота (7 белков), цилиопатия (7 белков), эпилепсия (5 белков), ожирение (4 белка), карликовость (3 белка), буллезный эпидермолиз (3 белка) и пигментный ретинит (3 белка). Были обнаружены общие для всех 4 доноров белки, которые были особенно важны для структуры и функции кожи. Как показано в таблице 1 ниже, были идентифицированы белки, которые в значительной степени связаны с базальной мембраной кожи, полудесмосомой и гомеостазом кератиноцитов. Эти белки включали коллаген IV типа (формирующий плотную пластинку базальной мембраны кожи), коллаген VII типа (формирующий якорные фибриллы и содержащий мутации при аутосомно-рецессивном и при аутосомно-доминантном дистрофическом буллезном эпидермолизе), плектин (содержащий мутации при простом буллезном эпидермолизе с пилорической атрезией и мышечной дистрофией) и антиген буллезного пемфигоида 1 (который одновременно является частью полудесмосомы и содержит мутации при форме аутосомно-рецессивного простого буллезного эпидермолиза). Связанные с кератиноцитами белки включали эпиплакин, кератин 1, растворимый е-кадгерин (Таблица 1) и кальций-транспортирующую АТФазу hSPCA1 (последняя кодируется ATR2C1 и содержит мутации при доброкачественной семейной пузырчатке/болезни Хейли-Хейли) (Таблица 2). Кроме того, белки, связанные с нейрокожными синдромами, такие как туберин (TSC2, содержащий мутации при туберозном склерозе); и белки, связанные с иммунной системой, которые приводят к кожным фенотипам, такие как регулятор лизосомального транспорта (LYST, содержащий мутации при синдроме Чедиака-Хигаси) и сериновая протеинкиназа ATM (содержащая мутации при атаксии-телеангиэктазии) (Таблица 2).

Таблица 1: Выбранные белки из секретома всех 4 доноров МСК-КМ,

связанные со структурой базальной мембраны и полудесмосомы

Название(я) белка	Название(я) гена	Функция(и)	Связь с заболеванием (ями)
Коллаген альфа-4 (IV) цепочка	COL4A4	Коллаген IV типа является основным структурным компонентом кожи и базальной мембраны клубочков, формирующим сетчатую структуру вместе с ламининами, протеогликанами и энтактином (нидогеном).	Глубокие ожоги приводят к потере коллагена IV типа. Эффективная нерубцующая регенерация зависит от восстановления коллагена IV типа в регенерированной базальной мембране. Синдром Альпорта 2 аутосомно-рецессивного типа; синдром, характеризующийся прогрессирующим гломерулонефритом, дефектами базальной мембраны клубочков, почечной недостаточностью, нейросенсорной глухотой и специфическими глазными нарушениями (лентиконус и макулярные пятна). Этот синдром демонстрирует значительную гетерогенность в том отношении, что семьи различаются по возрасту терминальной стадии почечной недостаточности и возникновению глухоты. Потеря белка может привести к доброкачественной семейной гематурии. Аутосомно-доминантное состояние, характеризующееся непрогрессирующей изолированной микроскопической гематурией, которая не приводит к почечной недостаточности. Патологические

			изменения характеризуются истончением базальной мембраны клубочков.
Коллаген (VII), альфа-1 цепь (длинноцепочечный коллаген)	COL7A1	Белок базальной мембраны многослойного плоского эпителия, который формирует якорные фибриллы, которые могут способствовать организации и адгезии базальной мембраны эпителия при взаимодействии с белками внеклеточного матрикса (ЕСМ), такими как коллаген IV типа	<p>- Приобретенный буллезный эпидермолиз (ПриБЭ), аутоиммунное приобретенное кожное заболевание, характеризующееся образованием пузырей и вызванное образованием аутоантител к коллагену VII типа.</p> <p>- Дистрофический буллезный эпидермолиз, аутосомно-доминантного типа (ДДБЭ). Группа аутосомно-доминантных пузырчаток, характеризующихся разделением тканей, которое происходит под дермально-эпидермальной базальной мембраной на уровне якорных фибрилл. Выделяют различные клинические типы с разной степенью тяжести: от тяжелых калечащих форм до легких форм с ограниченным и локализованным рубцеванием и реже внекожными проявлениями.</p> <p>- Дистрофический буллезный эпидермолиз, аутосомно-рецессивного типа (РДБЭ). Группа аутосомно-рецессивных пузырчаток, характеризующихся разделением тканей, которое происходит под дермо-эпидермальной базальной мембраной на уровне якорных фибрилл. Выделяют</p>

		<p>различные клинические типы с разной степенью тяжести, от тяжелых калечащих форм, таких как дистрофический буллезный эпидермолиз типа Аллопо-Сименса, до легких форм с ограниченным локальным рубцеванием и менее частыми внекожными проявлениями. Легкие формы включают легкий буллезный эпидермолиз и ограниченный буллезный эпидермолиз.</p> <p>- Транзиторный буллезный дермолиз новорожденных (ТБДН). ТБДН - неонатальная форма дистрофического буллезного эпидермолиза, характеризующаяся субэпидермальными пузырями, редуцированными или аномальными якорными фибриллами в дермо-эпидермальном соединении и электронноплотными включениями в кератиноцитах. ТБДН проходит спонтанно или резко уменьшается в течение первых месяцев и лет жизни.</p> <p>- Дистрофический буллезный эпидермолиз претибиального типа (ДБЭ-ПТ). Форма дистрофического буллезного эпидермолиза, характеризующаяся претибиальными пузырями, которые превращаются в пруригоподобные гиперкератотические</p>
--	--	---

		<p>очаги. Преимущественно поражает претибиаальные области, не затрагивая колени и другие участки кожи. Другие клинические признаки включают дистрофию ногтей, альбопапулоидные поражения кожи и гипертрофические рубцы без преобладания претибиаального отдела. Фенотип демонстрирует значительную межиндивидуальную вариабельность. Наследование по аутосомно-доминантному типу.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Дистрофический буллезный эпидермолиз типа Барта (ДБЭ): аутосомно-доминантная форма дистрофического буллезного эпидермолиза, характеризующаяся врожденной локализованной аплазией кожи, ломкостью кожи и деформацией ногтей. - Пруригинозный буллезный эпидермолиз. Отдельный клинический подтип дистрофического буллезного эпидермолиза. Он характеризуется хрупкостью кожи, образованием пузырей, рубцов, интенсивным зудом и эксфолированными пруригными бляшками. Манифестация в раннем детском возрасте, но в некоторых случаях позднее начало на втором или третьем
--	--	--

			<p>десятилетия жизни. Наследование может быть аутосомно-доминантным или рецессивным.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Несиндромальная врожденная патология ногтей 8. Заболевание ногтей, характеризующееся изолированной дистрофией ногтей на пальцах стоп. Изменения ногтей наиболее выражены на больших пальцах ног и заключаются в погружении ногтевой пластины в ногтевое ложе с деформированным и узким выступающим краем. - Дистрофический буллезный эпидермолиз с субкорнеальным расщеплением. Буллезное кожное заболевание с трещинами разного размера непосредственно под уровнем рогового слоя. Клинические признаки включают пузыри, милиумы, атрофические рубцы, дистрофию ногтей, поражение полости рта и конъюнктивы, как при дистрофическом буллезном эпидермолизе.
Плектин (PCN) (PLTN) (Белок полудесмосом 1) (HD1) (Плектин-1)	PLEC1	Соединяет промежуточные филаменты с микротрубочками и микрофиламентами и прикрепляет промежуточные филаменты к десмосомам или	- Простой буллезный эпидермолиз с мышечной дистрофией (ПБЭ-МД). Форма буллезного эпидермолиза, характеризующаяся сочетанием образования пузырей на уровне

		<p>полудесмосомам. Также может связывать мышечные белки, такие как актин, с мембранными комплексами в мышцах. Может присутствовать не только в сети филаментов, но и участвовать в регуляции их динамики. Структурный компонент мышцы. Изоформа 9 играет основную роль в поддержании целостности миофибрилл.</p>	<p>полудесмосомы с поздним началом мышечной дистрофии.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Простой буллезный эпидермолиз, тип Огна (ПБЭ-О). Форма интраэпидермального буллезного эпидермолиза, характеризующаяся генерализованными гематомами на коже, ломкостью кожи с образованием нерубцующихся пузырей и небольшими геморрагическими пузырями на руках. На ультраструктурном уровне он отличается от классических случаев ПБЭ-К, ПБЭ-ВК и ПБЭ-ДМ появлением пузырей, возникающих в базальных клетках над полудесмосомами, и аномальными внутриклеточными пластинками прикрепления полудесмосом. - Конечностно-поясная мышечная дистрофия аутосомно-рецессивного типа 17. Форма конечностно-поясной мышечной дистрофии, характеризующаяся появлением в раннем детском возрасте слабости проксимальных мышц. Конечностно-поясные мышечные дистрофии характеризуются проксимальной слабостью, слабостью тазобедренного и плечевого поясов и выраженной асимметричной атрофией четырехглавой
--	--	--	---

			<p>мышцы бедра и двуглавой мышцы плеча.</p> <p>- Простой буллезный эпидермолиз с дистрофией ногтей (ПБЭ-ДН). Форма буллезного эпидермолиза, дерматологического заболевания, характеризующегося образованием пузырей на коже. У пациентов с ПБЭ-ДН также проявляется дистрофия ногтей.</p>
<p>Дистонин (антиген буллезного пемфигоида массой 230 кДа) (230/240 кДа антиген буллезного пемфигоида) (Антиген буллезного пемфигоида 1) (ВРА) (Антиген буллезного пемфигоида) (Белок мышечной дистонии) (Белок бляшки полудесмосомы)</p>	<p>DST, BP230, BPAG1</p>	<p>Линкерный белок цитоскелета. Действует как соединитель промежуточных филаментов, сетей актина и микротрубочек цитоскелета. Необходим для прикрепления либо промежуточных филаментов к актиновому цитоскелету в нервных и мышечных клетках, либо кератинсодержащих промежуточных филаментов к полудесмосомам в эпителиальных клетках. Белки могут подвергаться самоагрегации с образованием филаментов или двумерной сети. Регулирует организацию и стабильность сети микротрубочек сенсорных нейронов, обеспечивая аксонный транспорт. Опосредует стыковку моторного</p>	<p>- Простой буллезный эпидермолиз аутосомно-рецессивного типа 2 (EBSB2). Форма буллезного эпидермолиза, дерматологического заболевания, характеризующегося локализованными пузырями на тыльной, боковой и подошвенной поверхностях стоп. EBSB2 характеризуется появлением пузырей, вызванных травмой, в основном на стопах и лодыжках. Ультраструктурный анализ биопсии кожи показывает аномальные полудесмосомы с плохо сформированными внутренними бляшками.</p> <p>- Наследственная нейропатия, сенсорная и вегетативная, 6 (HSAN6). Форма наследственной сенсорной и вегетативной невропатии, генетически и клинически гетерогенная группа заболеваний,</p>

		<p>комплекса динеина/динактина с везикулярным грузом для ретроградного аксонного транспорта.</p>	<p>характеризующаяся дегенерацией клеток задних корешков и вегетативных ганглиев, а также сенсорными и/или вегетативными нарушениями. HSN6 - тяжелое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся неонатальной гипотонией, затруднениями при дыхании и питании, задержкой психомоторного развития и вегетативными нарушениями, включая лабильную сердечно-сосудистую функцию, отсутствие роговичных рефлексов, приводящее к рубцеванию роговицы, арефлексию и отсутствием аксон-рефлекса после внутрикожной инъекции гистамина.</p>
<p>Эпиплакин (эпидермальный антиген массой 450 кДа)</p>	<p>ЕРРК1, ЕРІРL</p>	<p>Линкерный белок цитоскелета, который соединяется с промежуточными филаментами и контролирует их реорганизацию в ответ на стресс. При ответе на механический стресс, такой как заживление ран, связан с механизмом клеточной подвижности за счет замедления миграции и пролиферации кератиноцитов и ускорения связывания кератина в пролиферирующих кератиноцитах, что способствует</p>	<p>Антигенная мишень при паранеопластической пузырчатке</p>

		<p>архитектуре ткани. Однако при заживлении ран эпителий роговицы также положительно регулирует дифференцировку и пролиферацию клеток и отрицательно регулирует миграцию, контролируя морфогенез и целостность эпителия роговицы. При ответе на клеточный стресс играет роль в реорганизации кератиновых филаментов, вероятно, путем защиты кератиновых филаментов от ращепления. При поражениях печени и поджелудочной железы играет защитную роль, сопровождая вызванную заболеванием реорганизацию промежуточных филаментов.</p>	
Кератин 1	KRT1	<p>Кератины представляют собой группу фибриллярных белков, которые образуют структурный каркас для кератиноцитов, формирующих кожу, волосы и ногти. Кератин 1 взаимодействует либо с кератином 9, либо с кератином 10, образуя гетеродимерные промежуточные филаменты, которые затем собираются в прочные сети, обеспечивающие прочность на</p>	<p>Дефекты кератина 1 являются причиной эпидермолитического гиперкератоза, также известного как буллезная врожденная ихтиозиформная эритродермия, наследственное заболевание кожи, характеризующееся образованием внутриэпидермальных пузырей, заметным утолщением рогового слоя, пигментацией кожи и эрозиями в местах травм, которые присутствуют с рождения.</p>

		растяжение и упругость кожи, предохраняя ее от внешнего повреждения.	
Е-кадгерин (растворимый, фрагмент)	CDH1	Кадгерины являются кальцийзависимыми белками клеточной адгезии, необходимыми для адгезии между кератиноцитами	Ассоциирован с различными патологиями, в том числе с новообразованиями (желудка, яичников, эндометрия, молочной железы), поскольку способствует адгезии эпителиальных клеток (по-видимому, не является патогенным фактором). Недавние исследования показали, что растворимый е-кадгерин стимулирует ангиогенез опухоли, однако стимуляция ангиогенеза в незлокачественной ткани может быть полезной, например, для восстановления и регенерации кожи.
FOXМ1А	FOXМ1А	Фактор транскрипции Forkhead box M1 (FOXМ1) играет важные роли в онкогенезе, FOXМ1А является одной из изоформ FOXМ1.	Частота случаев диабета 2-го типа повышается с возрастом, тогда как репликация β-клеток снижается. Кроме того, фактор транскрипции FохM1 требуется для репликации β-клеток в различных ситуациях, при этом его экспрессия снижается с возрастом. Таким образом, повышение белка FOXМ1А может играть роль при облегчении симптомов, связанных с язвами при диабетической стопе.

Таблица 2: Выбранные белки из секрета всех 4 доноров МСК-КМ, связанные с другими геномными синдромами с кожными проявлениями

Белок	Ген	Функция	Связь с заболеванием
Кальций-транспортирующая	АТР2С1	Этот магний-зависимый фермент	Доброкачественная семейная пузырьчатка

АТФаза (ЕС 7.2.2.10)		катализирует гидролиз АТФ, сопряженный с транспортом кальция	(болезнь Хейли-Хейли)
Регулятор лизосомального транспорта (гомолог Beige)	LYST, CHS	Может требоваться для сортировки эндосомальных резидентных белков в поздних мультивезикулярных эндосомах посредством механизма, включающего микротрубочки	Синдром Чедиака-Хигаси. Редкое ауточное рецессивное нарушение, характеризующее гипопигментацией, тяжелым иммунодефицитом, склонностью к кровотечениям, неврологическими нарушениями, нарушением внутриклеточного транспорта в лизосому и из лизосомы и гигантскими тельцами включения в клетках различных типов. Большинство пациентов умирает в раннем возрасте, если им не провести аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток.
Сериновая протеинкиназа АТМ (ЕС 2.7.11.1) (содержит мутации при атаксии-телеангиэктазии) (А-Т мутантная)	АТМ	Серин/треониновая протеинкиназа, которая активирует сигнализацию контрольных точек при двухцепочечных разрывах (DSB), апоптозе и генотоксических стрессах, таких как ионизирующее ультрафиолетовое излучение типа А (UVA), действуя в качестве сенсора повреждения ДНК. Распознает субстратную консенсусную последовательность [ST]-Q. Фосфорилирует 'Ser-139' варианта гистона	Атаксия-телеангиэктазия (АТ). Редкое рецессивное заболевание, характеризующее прогрессирующей мозжечковой атаксией, расширением сосудов конъюнктивы и глазных яблок, иммунодефицитом, задержкой роста и нарушением полового созревания. Больные имеют высокую предрасположенность к раку; примерно у 30% пациентов развиваются опухоли, особенно лимфомы и лейкозы. Клетки пораженных лиц крайне чувствительны к повреждению при

		<p>H2AX при двухцепочечных разрывах (DSB), регулируя механизм ответа на повреждение ДНК. Также играет роль в исключении аллелей пре-B-клеток, процессе, который приводит к экспрессии одного аллеля тяжелой цепи иммуноглобулина для усиления клональности и моноспецифичного распознавания В-клеточным рецептором антигена (BCR), экспрессируемым на отдельных В-лимфоцитах. После введения разрывов ДНК комплекс RAG на одном аллеле иммуноглобулина, действует путем опосредования перестановки второго аллеля на прицентромерный гетерохроматин, предотвращая доступ к комплексу RAG и рекомбинацию второго аллеля. Также участвует в передаче сигналов и регуляции клеточного цикла. Может действовать как супрессор опухоли. Необходим для активации ABL1 и SAPK. Фосфорилирует DYRK2, CHEK2, p53/TP53, FANCD2, NFKBIA, BRCA1, STIP, нибрин (NBN), TERF1, RAD9, UBQLN4 и DCLRE1C.</p>	<p>ввоздействии ионизирующего излучения и устойчивы к ингибированию синтеза ДНК после облучения. Дефекты в ATM могут способствовать развитию острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза (ТОЛЛ) и Т-пролимфоцитарного лейкоза (ТПЛЛ). ТПЛЛ характеризуется высоким количеством лейкоцитов с преобладанием пролимфоцитов, выраженной спленомегалией, лимфаденопатией, поражением кожи и серозным выпотом. Клиническое течение крайне агрессивное, с плохим ответом на химиотерапию и коротким периодом выживаемости. ТПЛЛ встречается как у взрослых в виде спорадического заболевания, так и у пациентов младшего возраста с АТ. Дефекты в ATM могут способствовать В-клеточному хроническому лимфоцитарному лейкозу (ВХЛЛ). ВХЛЛ является наиболее распространенной формой лейкоза у пожилых людей. Характеризуется накоплением зрелых CD5+ В-лимфоцитов, лимфаденопатией, иммунодефицитом и недостаточностью костного мозга.</p>
--	--	---	--

		<p>Может участвовать в транспорте везикул и/или белков. Может участвовать в развитии Т-клеток, функции гонад и неврологической функции. Играет роль в репликационно-зависимом расщеплении мРНК гистонов. Связывает концы ДНК.</p> <p>Фосфорилирование DYRK2 в ядре в ответ на генотоксический стресс предотвращает ее MDM2-опосредованное убиквитинирование и последующее расщепление протеасомой.</p> <p>Фосфорилирует ATF2, который стимулирует ее функцию в ответ на повреждение ДНК.</p> <p>Фосфорилирует ERCC6, который требуется для ее активности ремоделирования хроматина при двухцепочечных разрывах ДНК.</p>	
Туберин	TSC2	<p>В комплексе с TSC1 этот супрессор опухоли ингибирует опосредованное питательными веществами или стимулируемое факторами роста фосфорилирование S6K1 и EIF4EBP1 путем негативной регуляции сигнализации mTORC1. Действует как ГТФаза-активирующий белок (GAP) для малой</p>	<p>Туберозный склероз 2 (TSC2). Аутосомно-доминантное мультисистемное заболевание, поражающее преимущественно головной мозг, почки, сердце и кожу. Характеризуется присутствием гамартом (доброкачественных новообразований преимущественно клеточного или тканевого типа, которые обычно встречаются в</p>

		<p>ГТФазы RHEB, прямого активатора протеинкиназной активности mTORC1. Также может участвовать в опосредованном микротрубочками транспорте белков (по подобию). Также стимулирует собственную ГТФазную активность Ras-родственных белков RAP1A и RAB5.</p>	<p>органе) и гамартий (аномалий развития комбинации тканей). Клинические проявления включают эпилепсию, затруднения при обучении, поведенческие расстройства и поражения кожи. Судороги могут плохо поддаваться купированию, и преждевременная смерть может наступить по целому ряду причин, связанных с заболеванием.</p>
--	--	---	--

Выводы

[0314] Эти данные в высокой степени подтверждают такую концепцию, что стволовые клетки костного мозга (которые, как известно, циркулируют в кровотоке) могут способствовать целостности кожи и координации заживления ран посредством предоставления своих секреторируемых грузовых белков. Анализ секретома мезенхимальных стволовых клеток костного мозга 4 здоровых доноров выявил новый секреторируемый белковый груз. Терапия стволовыми клетками, хотя и эффективная во многих случаях, сопряжена с риском реакции "трансплантат против хозяина" и злокачественной трансформации, поэтому понимание того, может ли подход, основанный только на секретома, обеспечить полезные белковые факторы для пораженной кожи, имеет большое клиническое значение. Многие белки, традиционно считавшиеся внутриклеточными белками, были обнаружены в секретома после выделения внеклеточных везикул из секретома. Это - новое исследование, в котором изучали общие признаки секретома здоровых доноров костного мозга и то, каким образом этот общий белковый груз выявил несколько важных структурных и функциональных белков, связанных с гомеостазом кожи и кожными заболеваниями.

[0315] Значительная часть обычных белков классифицируется как мембранные белки, что указывает на значительное присутствие межклеточного транспорта белков посредством внеклеточных везикул. Наиболее распространенным обнаруженным биологическим процессом был "транспорт", что подчеркивает важную роль секретома МСК костного мозга в транспорте важных белков в соответствующие реципиентные ткани и клетки. Другие важные процессы, такие как регуляция транскрипции, клеточного цикла и повреждения ДНК, могут помочь в объяснении некоторых положительных эффектов, наблюдаемых во многих предыдущих исследованиях эффектов МСК-КМ при различных заболеваниях, включая заживление острых и хронических ран.

[0316] Коллаген VII типа присутствует в базальной мембране многослойного

плоского эпителия и формирует якорные фибриллы, которые способствуют организации и прикреплению эпителиальной базальной мембраны при взаимодействии с белками внеклеточного матрикса, такими как коллаген IV типа. При его отсутствии в коже у пациентов с дистрофическим буллезным эпидермолизом или пруритинозным буллезным эпидермолизом развиваются тяжелые пузыри, что приводит к возникновению обширных хронических ран, рубцеванию и повышенному риску инфекций. Предыдущие исследования выявили потенциальные положительные эффекты трансплантации костного мозга у пациентов с рецессивным дистрофическим буллезным эпидермолизом, частично за счет регенерации коллагена VII, присутствующего в базальной мембране у пациентов с буллезным эпидермолизом (Wagner JE, Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Hordinsky M, Keene DR, Woodley DT et al. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *N Engl J Med* 2010; 363:629-39). Ранее было показано, что коллаген VII типа очищается совместно с ВВ МСК-КМ (McBride JD, Rodriguez-Menocal L, Candanedo A, Guzman W, Garcia-Contreras M, Badiavas EV. Dual mechanism of type VII collagen transfer by bone marrow mesenchymal stem cell extracellular vesicles to recessive dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts. *Biochimie* 2018; 155:50-8). Это новое исследование показало, что коллаген VII типа присутствовал в секретоме 4 здоровых доноров и очищался совместно с внеклеточными везикулами всех 4 доноров. В дальнейших биохимических исследованиях предстоит выяснить, происходит ли ассоциация коллагена VII типа с везикулами путем прямого связывания с липидной мембраной, при посредстве белка-партнера по связыванию или других молекулярных сил (таких как аффинность между гидрофобными макромолекулами).

[0317] Коллаген IV типа также был обнаружен в секретоме МСК-КМ всех 4 доноров. Коллаген IV типа является основным структурным компонентом базальных мембран - плотной пластинки кожи и основы базальной мембраны клубочков в почках - образуя сеть вместе с ламининами, протеогликанами и энтактином (нидогеном) (Abreu-Velez AM, Howard MS. Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes, *N Am J Med Sci* 2012; 4:1-8). Когда кожа подвергается глубокому повреждению, компоненты базальной мембраны, включая плотную пластинку и коллаген IV типа, должны организованно регенерировать, чтобы предотвратить рубцевание. Было показано, что коллаген IV типа индуцируется стволовыми клетками костного мозга в моделях генетического заболевания почек (болезни Альпорта) на животных (Sugimoto H, Mundel TM, Sund M, Xie L, Cosgrove D, Kalluri R. Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:7321-6). Это исследование подтверждает концепцию, что МСК-КМ продуцируют коллаген IV типа, который является полезным субстратом для заживления кожных ран.

[0318] Данное исследование показало, что плектин был обнаружен в секретоме 4 здоровых доноров КМ-МСК. Плектин соединяет промежуточные филаменты с микротрубочками и микрофиламентами и прикрепляет промежуточные филаменты к десмосомам или полудесмосомам. Плектин связывает мышечные белки, такие как актин, с

мембранными комплексами в мышцах и играет основную роль в поддержании целостности мышечных волокон. Когда плектин подвергается мутации, это приводит к формам простого буллезного эпидермолиза с мышечной дистрофией и/или пилорической атрезией, а также простому буллезному эпидермолизу типа Огна (при котором у пациентов развиваются обширно распространенные пузыри на уровне полудесмосомы) (Pfundner E, Rouan F, Uitto J. Progress in epidermolysis bullosa: the phenotypic spectrum of plectin mutations. *Exp Dermatol* 2005; 14:241-9). Это исследование уникально тем, что демонстрирует потенциал секретома МСК-КМ для восстановления кожи у пациентов с подтипами простого буллезного эпидермолиза с дефицитом плектина.

[0319] Антиген буллезного пемфигоида 1 (BPAG1/дистонин) представляет собой линкерный белок цитоскелета, который действует как соединитель между промежуточными филаментами, актином и сетями микротрубочек цитоскелета. Мутация в BPAG1 приводит к простому буллезному эпидермолизу аутосомно-рецессивного типа 2, характеризующемуся локализованными пузырями на дорсальной, латеральной и подошвенной поверхностях стоп и пузырями, образующимися в результате травмы, в основном на стопах и лодыжках. Ультраструктурный анализ биопсии кожи показывает аномальные полудесмосомы с плохо сформированными внутренними бляшками (Groves RW, Liu L, Dopping-Hepenstal PJ, Markus HS, Lovell PA, Ozoemena L et al. A homozygous nonsense mutation within the dystonin gene coding for the coiled-coil domain of the epithelial isoform of BPAG1 underlies a new subtype of autosomal recessive epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol* 2010; 130:1551-7). Это исследование показало, что МСК-КМ 4 здоровых доноров секретировали BPAG1. Это исследование подтверждает, что секретом МСК-КМ может уменьшать интенсивность аутосомно-рецессивного 2 подтипа простого буллезного эпидермолиза.

[0320] КМ-МСК всех 4 доноров секретировали эпиплакин, который представляет собой линкерный белок цитоскелета, который соединяется с промежуточными филаментами и контролирует их реорганизацию в ответ на стресс, такой как механический стресс, такой как заживление ран (Jang SI, Kalinin A, Takahashi K, Marekov LN, Steinert PM. Characterization of human epiplakin: RNAi-mediated epiplakin depletion leads to the disruption of keratin and vimentin IF networks. *J Cell Sci* 2005; 118:781-93). Эпиплакин связан с аппаратом клеточной подвижности, замедляя миграцию и пролиферацию кератиноцитов и ускоряя связывание кератина в пролиферирующих кератиноцитах, способствуя тем самым тканевой структуре. В ответ на клеточный стресс эпиплакин играет роль в реорганизации кератиновых филаментов, по-видимому, посредством защиты кератиновых филаментов от разрушения. Это исследование является новым, поскольку позволило обнаружить, что МСК-КМ продуцируют эпиплакин.

[0321] Кератин 1 был обнаружен в секретоме всех 4 доноров. Кератины представляют собой группу фибриллярных белков, которые образуют структурный каркас для кератиноцитов, формирующих кожу, волосы и ногти. Хотя его продукцию обычно связывают с кератиноцитами, в этом исследовании кератин 1 был обнаружен в секретоме

МСК-КМ всех четырех доноров. Кератин 1 взаимодействует либо с кератином 9, либо с кератином 10, образуя гетеродимерные промежуточные филаменты, которые затем собираются в прочные сети, обеспечивающие прочность на растяжение и упругость кожи, предохраняя ее от внешних повреждений. Принимая во внимание то, что генетические мутации в кератине 1 обычно являются аутосомно-доминантными и приводят к эпидермолитическому гиперкератозу, можно считать, что любая поврежденная кожная ткань (кожа, волосы, ногти) потенциально нуждается в источнике кератина 1 (особенно если кератиноциты в коже были повреждены). Это исследование подтверждает важную роль секретома МСК-КМ в обеспечении источника кератина 1 для поддержания кожи во время гомеостаза, восстановления и регенерации.

[0322] E-кадгерин представляет собой кальцийзависимый белок клеточной адгезии, который необходим для адгезии между кератиноцитами и, как известно, продуцируется клетками костного мозга (Turel KR, Rao SG. Expression of the cell adhesion molecule E-cadherin by the human bone marrow stromal cells and its probable role in CD34(+) stem cell adhesion. *Cell Biol Int* 1998; 22:641-8). Это исследование показало, что E-кадгерин был обнаружен в секретома очищенных внеклеточных везикул МСК-КМ 4 здоровых доноров. Учитывая его роль в адгезии эпителиальных клеток, его связывают с различными патологиями. Он также был связан со стимуляцией ангиогенеза опухоли и, как было обнаружено, локализуется на поверхности экзосом (Tang MKS, Yue PYK, Ip PP, Huang RL, Lai HC, Cheung ANY et al., Soluble E-cadherin promotes tumor angiogenesis and localizes to exosome surface, *Nat Commun* 2018; 9:2270).

[0323] Белок, называемый hSPCA1 (кодируемый геном ATP2C1), был обнаружен в секретома МСК-КМ всех 4 доноров. Этот белок представляет собой кальциевый насос, использующий АТФ в качестве источника энергии и служащий для переноса ионов кальция и марганца через мембраны в аппарате Гольджи (Micaroni M, Giacchetti G, Plebani R, Xiao GG, Federici L; ATP2C1 gene mutations in Hailey-Hailey disease and possible roles of SPCA1 isoforms in membrane trafficking; *Cell Death Dis* 2016; 7:e2259). Дефектные формы этого белка приводят к нарушению адгезии между кератиноцитами (частично из-за последующей дисфункции кадгерина), что приводит к акантолизу патологически и образованию пузырей клинически. Дефектный hSPCA1 приводит к заболеванию, называемому доброкачественной семейной пузырчаткой (Хейли-Хейли). Это исследование подтверждает, что секретом донорских МСК-КМ будет эффективно уменьшать последствия доброкачественной семейной пузырчатки.

[0324] Регулятор лизосомального транспорта (кодируемый геном LYST) был обнаружен в секретома всех 4 доноров МСК-КМ. Регулятор лизосомального транспорта, по-видимому, необходим для сортировки резидентных белков эндосом в поздние мультивезикулярные эндосомы посредством механизма с участием микротрубочек (Song Y, Dong Z, Luo S, Yang J, Lu Y, Gao B et al., Identification of a compound heterozygote in LYST gene: a case report on Chediak-Higashi syndrome, *BMC Med Genet* 2020; 21:4). Если пациенты имеют дефектный регулятор лизосомального транспорта, у них развивается

синдром Чедиака-Хигаси, редкое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся гипопигментацией, тяжелым иммунодефицитом, склонностью к кровотечениям, неврологическими нарушениями, нарушением внутриклеточного транспорта в лизосомы и из лизосом и присутствием гигантских телец включения в различных типах клеток. Большинство пациентов умирают в раннем возрасте, если им не провести аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Данное исследование подтверждает, что благоприятные эффекты трансплантации костного мозга у этих пациентов могут быть опосредованы, по меньшей мере, частично, циркулирующей формой регулятора лизосомального транспорта, который может проникать во многие реципиентные ткани.

[0325] Серин/треониновая протеинкиназа ATM, которая активирует сигнализацию контрольных точек при двухцепочечных разрывах, апоптозе и генотоксических стрессах, таких как ионизирующее ультрафиолетовое излучение, была обнаружена в секрете всех 4 доноров МСК-КМ. Также считается, что эта киназа участвует в передаче сигналов и контроле клеточного цикла и может действовать как супрессор опухоли. При мутации ATM у пациентов развивается атаксия-телеангиэктазия, редкое рецессивное заболевание, характеризующееся прогрессирующей мозжечковой атаксией, расширением кровеносных сосудов в конъюнктиве, иммунодефицитом, задержкой роста и нарушением полового созревания. Больные имеют сильную предрасположенность к раку; примерно у 30% пациентов развиваются опухоли, в частности лимфомы и лейкозы. Данное исследование подтверждает, что МСК-КМ могут улучшить фенотип атаксии-телеангиэктазии.

[0326] Туберин представляет собой белок, кодируемый геном TSC-2, который, в комплексе с TSC1, как опухолевой супрессор ингибирует опосредованное питательными веществами или стимулированное фактором роста фосфорилирование факторов роста путем негативной регуляции сигнализации mTORC1 (Henske EP, Jozwiak S, Kingswood JC, Sampson JR, Thiele EA. Tuberous sclerosis complex. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2:16035). Мутации туберина приводят к фенотипу комплекса туберозного склероза, который представляет собой аутосомно-доминантное мультисистемное заболевание, поражающее мозг, почки, сердце и кожу. Для него характерны гамартомы (доброкачественные новообразования преимущественно клеточного или тканевого типа, которые обычно присутствуют в органе). Клинические проявления включают эпилепсию, затруднения при обучении, поведенческие расстройства и поражения кожи. Судороги могут плохо поддаваться купированию, ипреждевременная смерть может наступить по целому ряду причин, связанных с заболеванием. Это исследование показало, что туберин экспрессируется в секрете здоровых доноров МСК-КМ.

[0327] Данное исследование подтверждает, что грузовые белки, которые были обнаружены у всех 4 доноров костного мозга, могут быть выделены из секрета МСК-КМ и доставлены в ткани реципиента, особенно у пациентов, у которых отсутствуют функциональные белки, ответственные за фенотипы заболевания. Это исследование также подтверждает, что секретом МСК-КМ эффективен для уменьшения интенсивности

различных дерматологических заболеваний.

[0328] Это исследование позволило идентифицировать белки в секрете здоровых доноров МСК-КМ. Ранее считалось, что некоторые из этих белков не секретировались клетками какого-либо типа. Внеклеточные везикулы МСК-КМ могут способствовать переносу важных внутриклеточных белков между клетками, что объясняет положительный эффект, наблюдаемый после трансплантации костного мозга при таких дерматологических заболеваниях, как буллезный эпидермолиз. Данное исследование подтверждает, что секретом МСК-КМ, а не сами клетки, эффективен для облегчения различных вышеуказанных дерматологических заболеваний.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из пруригинозного буллезного эпидермолиза; приобретенного буллезного эпидермолиза; дистрофического буллезного эпидермолиза претибиального типа; дистрофического буллезного эпидермолиза типа Барта; несиндромальной врожденной патологии ногтей 8; дистрофического буллезного эпидермолиза с субкорнеальным расщеплением; и транзиторного буллезного дермолиза новорожденных, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы, включают коллаген VII типа.

2. Способ по п.1, где состоянием является пруригинозный буллезный эпидермолиз.

3. Способ по п.2, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов пруригинозного буллезного эпидермолиза у субъекта.

4. Способ по п.3, где симптомы пруригинозного буллезного эпидермолиза выбраны из группы, состоящей из зуда, пузырей, хронических ран, образования рубцов, повышенного риска инфекций кожи, милиумов, хрупкости кожи, дистрофии ногтей, лихенифицированных бляшек, альбопапулоидных элементов и эксфолиированных пруригитных бляшек.

5. Способ по п.1, где состоянием является приобретенный буллезный эпидермолиз.

6. Способ по п.5, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов приобретенного буллезного эпидермолиза у субъекта.

7. Способ по п.6, где симптомы приобретенного буллезного эпидермолиза выбраны из группы, состоящей из образования пузырей, милиумов, заживления ран со значительным рубцеванием, кожного зуда и покраснения кожи.

8. Способ по п.1, где состоянием является дистрофический буллезный эпидермолиз претибиального типа.

9. Способ по п.8, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов дистрофического буллезного эпидермолиза претибиального типа у субъекта.

10. Способ по п.9, где симптомы дистрофического буллезного эпидермолиза претибиального типа выбран из группы, состоящей из претибиальных пузырей, пруригоподобных гиперкератотических очагов, дистрофии ногтей, альбопапулоидных элементов кожи и гипертрофических рубцов.

11. Способ по п.1, где состоянием является дистрофический буллезный эпидермолиз типа Барта.

12. Способ по п.11, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов дистрофического буллезного эпидермолиза типа Барта у субъекта.

13. Способ по п.12, где симптомы дистрофического буллезного эпидермолиза типа Барта выбраны из группы, состоящей из врожденной локализованной аплазии кожи, хрупкости кожи и деформации ногтей.

14. Способ по п.1, где состоянием является несиндромальная врожденная патология ногтей 8.

15. Способ по п.14, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов несиндромальной врожденной патологии ногтей 8 у субъекта.

16. Способ по п.15, где симптомы несиндромальной врожденной патологии ногтей 8 включают дистрофию ногтей на пальцах стоп и/или погружение ногтевой пластины в ногтевое ложе с деформированным и узким выступающим краем.

17. Способ по п.1, где состоянием является дистрофический буллезный эпидермолиз с субкорнеальным расщеплением.

18. Способ по п.17, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов дистрофического буллезного эпидермолиза с субкорнеальным расщеплением у субъекта.

19. Способ по п.18, где симптомы дистрофического буллезного эпидермолиза с субкорнеальным расщеплением выбраны из группы, состоящей из пузырей, милиумов, атрофического рубцевания и дистрофии ногтей.

20. Способ по п.1, где состоянием является транзиторный буллезный дермолиз новорожденных.

21. Способ по п.20, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов транзиторного буллезного дермолиза новорожденных у субъекта.

22. Способ по п.21, где симптомы транзиторного буллезного дермолиза новорожденных выбраны из группы, состоящей из субэпидермальных пузырей, уменьшенных или аномальных якорных фибрилл в дермо-эпидермальном соединении и электронно-плотные включения в кератиноцитах.

23. Способ по любому из пп.1-22, где субъект имеет мутацию в гене COL7A1.

24. Способ по п.23, где микровезикулы доставляют белок коллаген VII в клетки субъекта.

25. Способ лечения синдрома Альпорта 2 аутосомно-рецессивного типа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают коллаген IV типа.

26. Способ по п.25, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов синдрома Альпорта 2 аутосомно-рецессивного типа у субъекта.

27. Способ по п.26, где симптомы синдрома Альпорта 2 аутосомно-рецессивного типа выбраны из группы, состоящей из гломерулонефрита, дефектов базальной мембраны клубочков, почечной недостаточности, нейросенсорной глухоты, лентиконуса, макулярных пятен и гематурии.

28. Способ по любому из пп.25-27, где субъект имеет мутацию в гене COL4A4.

29. Способ по п.28, где микровезикулы доставляют белок коллаген IV типа в клетки субъекта.

30. Способ лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из простого буллезного эпидермолиза с мышечной дистрофией; простого буллезного эпидермолиза с пилорической атрезией; буллезного эпидермолиза типа Огна; простого буллезного эпидермолиза с дистрофией ногтей; и конечностно-поясной мышечной дистрофии

аутосомно-рецессивного типа 17, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают плектин.

31. Способ по п.30, где состоянием является простой буллезный эпидермолиз с мышечной дистрофией.

32. Способ по п.31, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов простого буллезного эпидермолиза с мышечной дистрофией у субъекта.

33. Способ по п.32, где симптомы простого буллезного эпидермолиза с мышечной дистрофией выбраны из группы, состоящей из геморрагических пузырей, образования пузырей на уровне полудесмосомы, дистрофии ногтей, ладонно-подошвенной кератодермии и эрозий кожи и слизистых оболочек полости рта.

34. Способ по п.30, где состоянием является простой буллезный эпидермолиз с пилорической атрезией.

35. Способ по п.34, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов простого буллезного эпидермолиза с пилорической атрезией у субъекта.

36. Способ по п.35, где симптомы простого буллезного эпидермолиза с пилорической атрезией выбраны из группы, состоящей из образования пузырей, хрупкости кожи, милиумов, дистрофии ногтей, рубцовой алопеции и гипотрихоз.

37. Способ по п.30, где состоянием является буллезный эпидермолиз типа Огна.

38. Способ по п.37, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов буллезного эпидермолиза типа Огна у субъекта.

39. Способ по п.38, где симптомы буллезного эпидермолиза типа Огна выбраны из группы, состоящей из гематом на коже, хрупкости кожи, образования пузырей и аномальных внутриклеточных пластинок прикрепления полудесмосом.

40. Способ по п.30, где состоянием является простой буллезный эпидермолиз с дистрофией ногтей.

41. Способ по п.40, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов простого буллезного эпидермолиза с дистрофией ногтей у субъекта.

42. Способ по п.41, где симптомы простого буллезного эпидермолиза с дистрофией ногтей включают образование пузырей на коже и/или дистрофию ногтей.

43. Способ по п.30, где состоянием является конечностно-поясная мышечная дистрофия аутосомно-рецессивного типа 17.

44. Способ по п.43, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов конечностно-поясной мышечной дистрофии аутосомно-рецессивного типа 17 у субъекта.

45. Способ по п.44, где симптомы конечностно-поясной мышечной дистрофии аутосомно-рецессивного типа 17 выбраны из группы, состоящей из слабости проксимальных мышц, слабости тазобедренного и плечевого поясов, выраженной асимметричной атрофии четырехглавой мышцы бедра и атрофии двуглавой мышцы плеча.

46. Способ по любому из пп.30-45, где субъект имеет мутацию в гене PLEC1.
47. Способ по п.46, где микровезикулы доставляют белок плектин в клетки субъекта.
48. Способ лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из простого буллезного эпидермолиза аутосомно-рецессивного типа 2 и наследственной сенсорной и вегетативной нейропатии 6, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают антиген буллезного пемфигоида 1.
49. Способ по п.48, где состоянием является простой буллезный эпидермолиз аутосомно-рецессивного типа 2.
50. Способ по п.49, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов простого буллезного эпидермолиза аутосомно-рецессивного типа 2 у субъекта.
51. Способ по п.50, где симптомы простого буллезного эпидермолиза аутосомно-рецессивного типа 2 выбраны из группы, состоящей из образования пузырей на дорсальных, латеральных и плантарных поверхностях стоп, индуцированного травмой образования пузырей на стопах и лодыжках, и аномальных полудесмосом с плохо сформированными внутренними бляшками.
52. Способ по п.48, где состоянием является наследственная сенсорная и вегетативная нейропатия 6.
53. Способ по п.52, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов наследственной сенсорной и вегетативной нейропатии у субъекта.
54. Способ по п.53, где симптомы наследственной сенсорной и вегетативной нейропатии выбраны из группы, состоящей из дегенерации клеток задних корешков и вегетативных ганглиев, сенсорных расстройств и вегетативных расстройств.
55. Способ по любому из пп.48-54, где субъект имеет мутацию в гене BPAG1.
56. Способ по п.55, где микровезикулы доставляют белок антигена буллезного пемфигоида 1 в клетки субъекта.
57. Способ лечения эпидермолитического гиперкератоза у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включает кератин 1.
58. Способ по п.57, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов эпидермолитического гиперкератоза у субъекта.
59. Способ по п.58, где симптомы эпидермолитического гиперкератоза выбраны из группы, состоящей из интраэпидермального образования пузырей, утолщения рогового слоя, пигментации кожи и эрозий в местах травмы и эритродермии.
60. Способ по любому из пп.57-59, где субъект имеет мутацию в гене KRT1.
61. Способ по п.60, где микровезикулы доставляют белок кератин 1 в клетки субъекта.
62. Способ лечения доброкачественной семейной пузырчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества

микровезикул, где микровезикулы включают hSPCA1.

63. Способ по п.62, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов доброкачественной семейной пузырчатки у субъекта.

64. Способ по п.63, где симптомы доброкачественной семейной пузырчатки выбраны из группы, состоящей из пузырей, эрозии кожи, сыпи, трещин на коже и акантолиза.

65. Способ по любому из пп.62-64, где субъект имеет мутацию в гене ATP2C1.

66. Способ по п.65, где микровезикулы доставляют белок hSPCA1 в клетки субъекта.

67. Способ лечения синдрома Чедиака-Хигаси у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают регулятор лизосомального транспорта.

68. Способ по п.67, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов синдрома Чедиака-Хигаси у субъекта.

69. Способ по п.68, где симптомы синдрома Чедиака-Хигаси выбраны из группы, состоящей из гипопигментации, тяжелого иммунодефицита, склонности к кровотечениям, неврологических расстройств, нарушения внутриклеточного транспорта в лизосому и из лизосомы и присутствия гигантских телец включения в различных типах клеток.

70. Способ по любому из пп.67-69, где субъект имеет мутацию в гене LYST.

71. Способ по п.70, где микровезикулы доставляют белок регулятор лизосомального транспорта в клетки субъекта.

72. Способ лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из синдрома атаксии-телеангиэктазии; Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза; и В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают сериновую протеинкиназу ATM.

73. Способ по п.72, где состоянием является синдромом атаксии-телеангиэктазии.

74. Способ по п.73, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов синдрома атаксии-телеангиэктазии у субъекта.

75. Способ по п.74, где симптомы синдрома атаксии-телеангиэктазии выбраны из группы, состоящей из прогрессирующей мозжечковой атаксии, расширения кровеносных сосудов в конъюнктиве и глазных яблоках, иммунодефицита, задержки роста и нарушения полового созревания.

76. Способ по п.72, где состоянием является Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз.

77. Способ по п.76, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза у субъекта.

78. Способ по п.77, где симптомы Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза выбраны из группы, состоящей из анемии, частых инфекций из-за низкого количества нормальных лейкоцитов, частых инфекций, лихорадки, пурпуры и носовых кровотечений

и кровоточивости десен из-за низкого количества тромбоцитов.

79. Способ по п.72, где состоянием является Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз.

80. Способ по п.79, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза.

81. Способ по п.80, где симптомы Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза выбраны из группы, состоящей из повышенного количества лейкоцитов, преобладания пролимфоцитов, выраженной спленомегалии, лимфаденопатии, поражений кожи и серозного выпота.

82. Способ по п.72, где состоянием является В-клеточный хронический лимфолейкоз.

83. Способ по п.82, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов В-клеточного хронического лимфолейкоза у субъекта.

84. Способ по п.83, где симптомы В-клеточного хронического лимфолейкоза выбраны из группы, состоящей из накопления зрелых CD5+ В-лимфоцитов, лимфаденопатии, иммунодефицита и недостаточности костного мозга.

85. Способ по любому из пп.72-84, где субъект имеет мутацию в гене ATM.

86. Способ по п.85, где микровезикулы доставляют белок сериновую протеинкиназу ATM в клетки субъекта.

87. Способ лечения туберозного склероза 2 у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают туберин.

88. Способ по п.87, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов туберозного склероза 2 у субъекта.

89. Способ по п.88, где симптомы туберозного склероза 2 выбраны из группы, состоящей из гамартом, гамартий, эпилепсии, трудностей с обучением, поведенческих расстройств и поражений кожи.

90. Способ по любому из пп.87-89, где субъект имеет мутацию в гене TSC2.

91. Способ по п.90, где микровезикулы доставляют белок туберин в клетки субъекта.

92. Способ лечения язв при диабетической стопе у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества микровезикул, где микровезикулы включают FOXM1A.

93. Способ по п.92, где микровезикулы облегчают или уменьшают один или более симптомов язв при диабетической стопе у субъекта.

94. Способ по п.93, где симптомы язв при диабетической стопе включают открытые язвы или раны на стопе субъекта.

95. Способ по любому из пп.92-94, где субъект имеет мутацию в гене FOXM1A.

96. Способ по п.95, где микровезикулы доставляют белок FOXM1A в клетки субъекта.

97. Способ по любому из пп.1-96, где микровезикулы получены из мезенхимальных стволовых клеток.

98. Способ по п.97, где мезенхимальные стволовые клетки являются мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга.

99. Способ по любому из предыдущих пп., где микровезикулы получают из биологической жидкости и осаждают из биологической жидкости при использовании полиэтиленгликоля.

100. Способ по любому из предыдущих пп., где микровезикулы вводят в кожу и/или ногти субъекта.

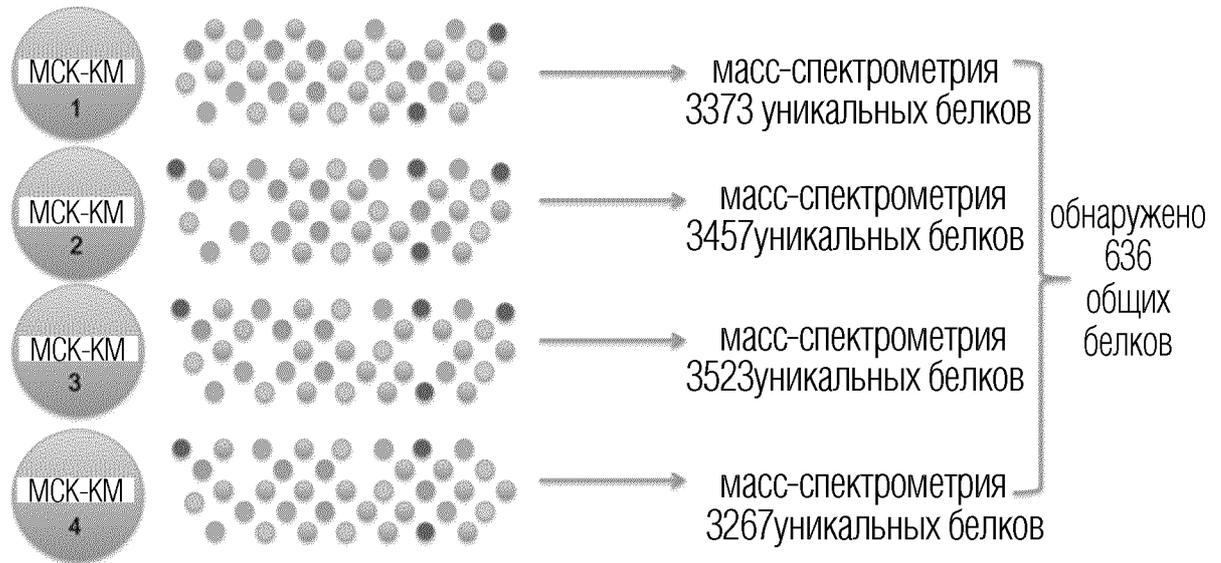
101. Способ по любому из пп.1-98, где микровезикулы вводят посредством трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток.

102. Композиция, содержащая микровезикулы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток, где микровезикулы включают по меньшей мере одно действующее вещество, включающее коллаген VII типа, коллаген IV типа, плектин, антиген буллезного пемфигоида 1, кератин 1, hSPCA1, сериновую протеинкиназу ATM, туберин, FOXM1A или их смеси.

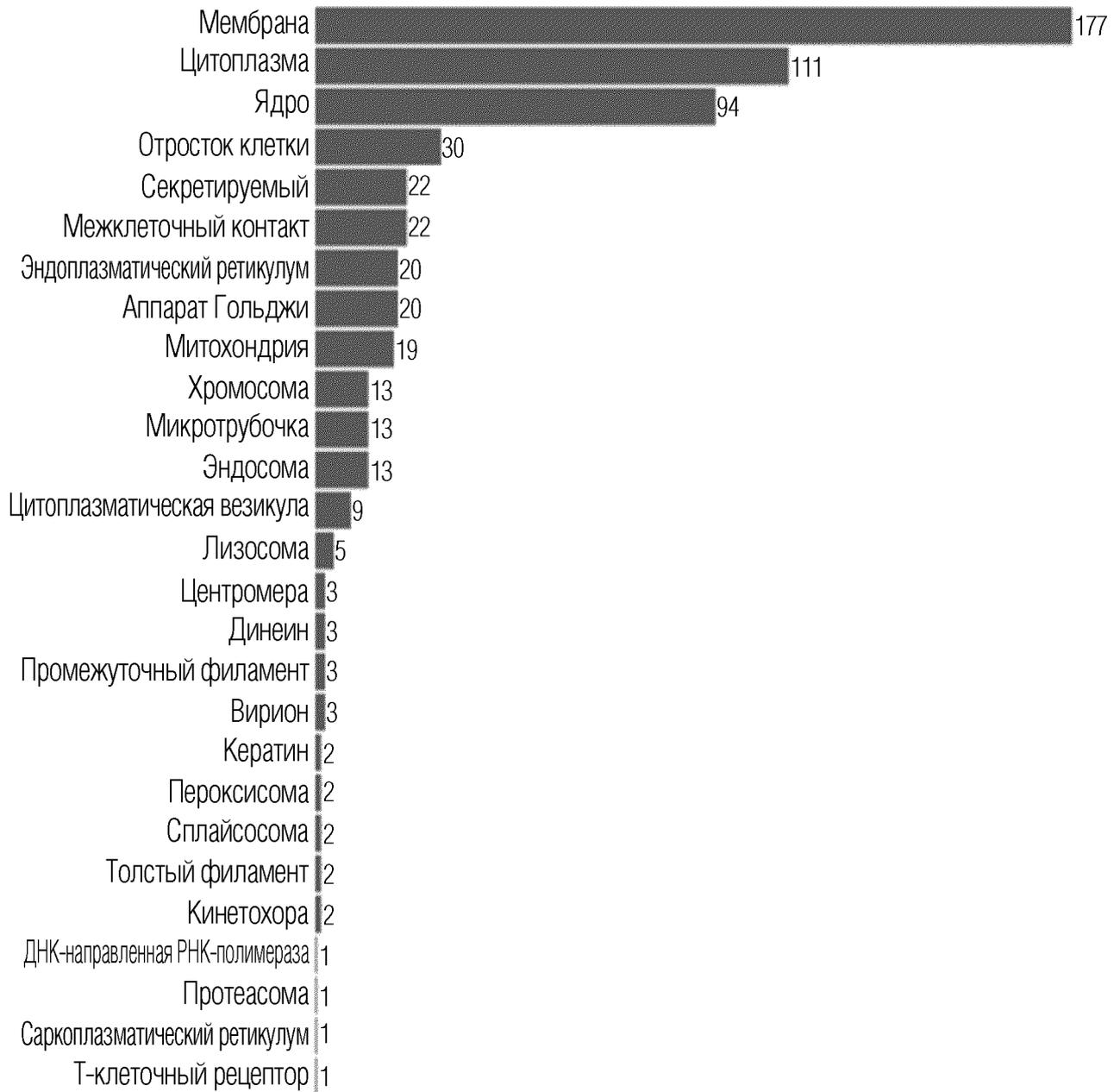
103. Композиция по п.102, где мезенхимальные стволовые клетки представляют собой мезенхимальные стволовые клетки костномозгового происхождения.

По доверенности

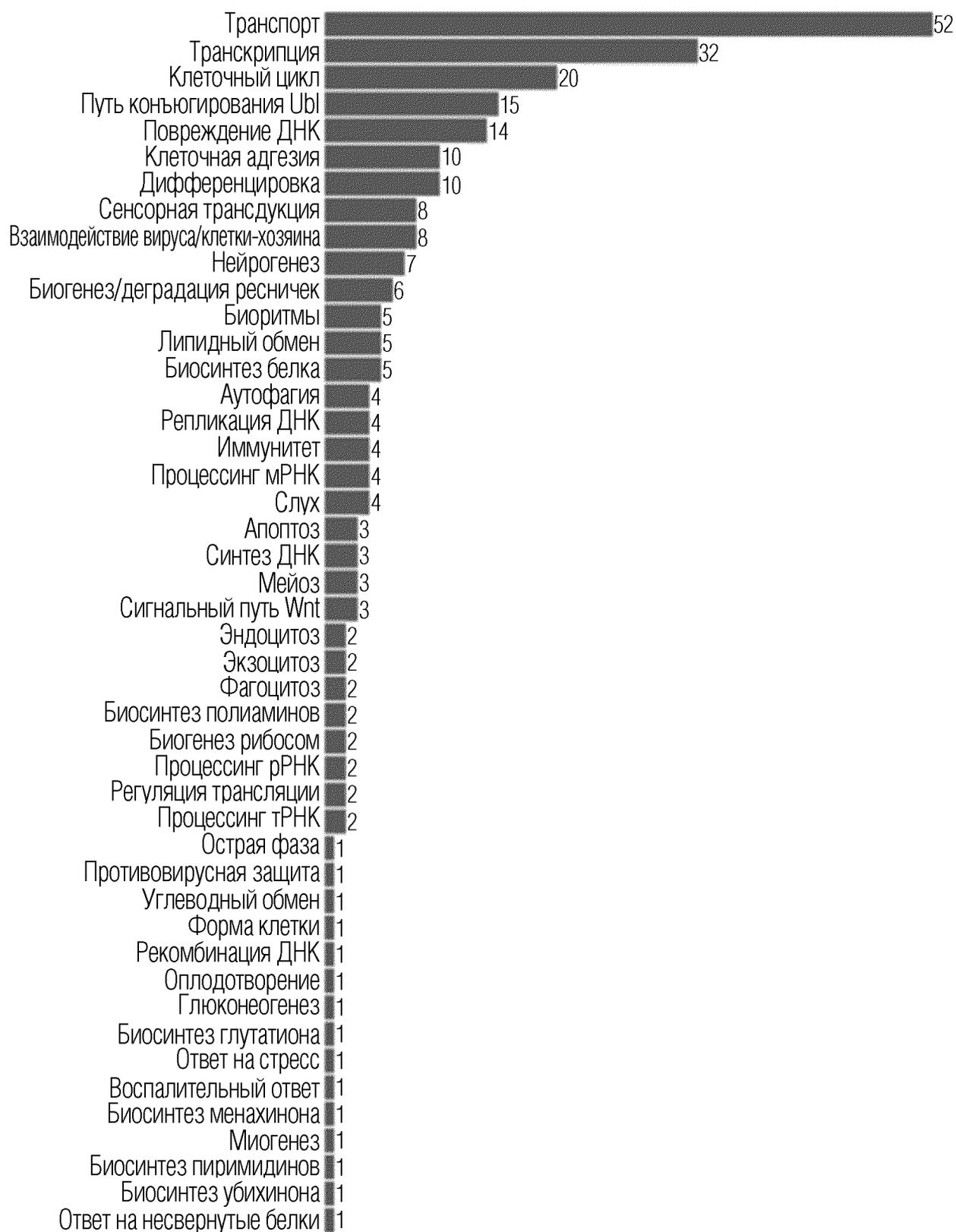
Здоровые доноры



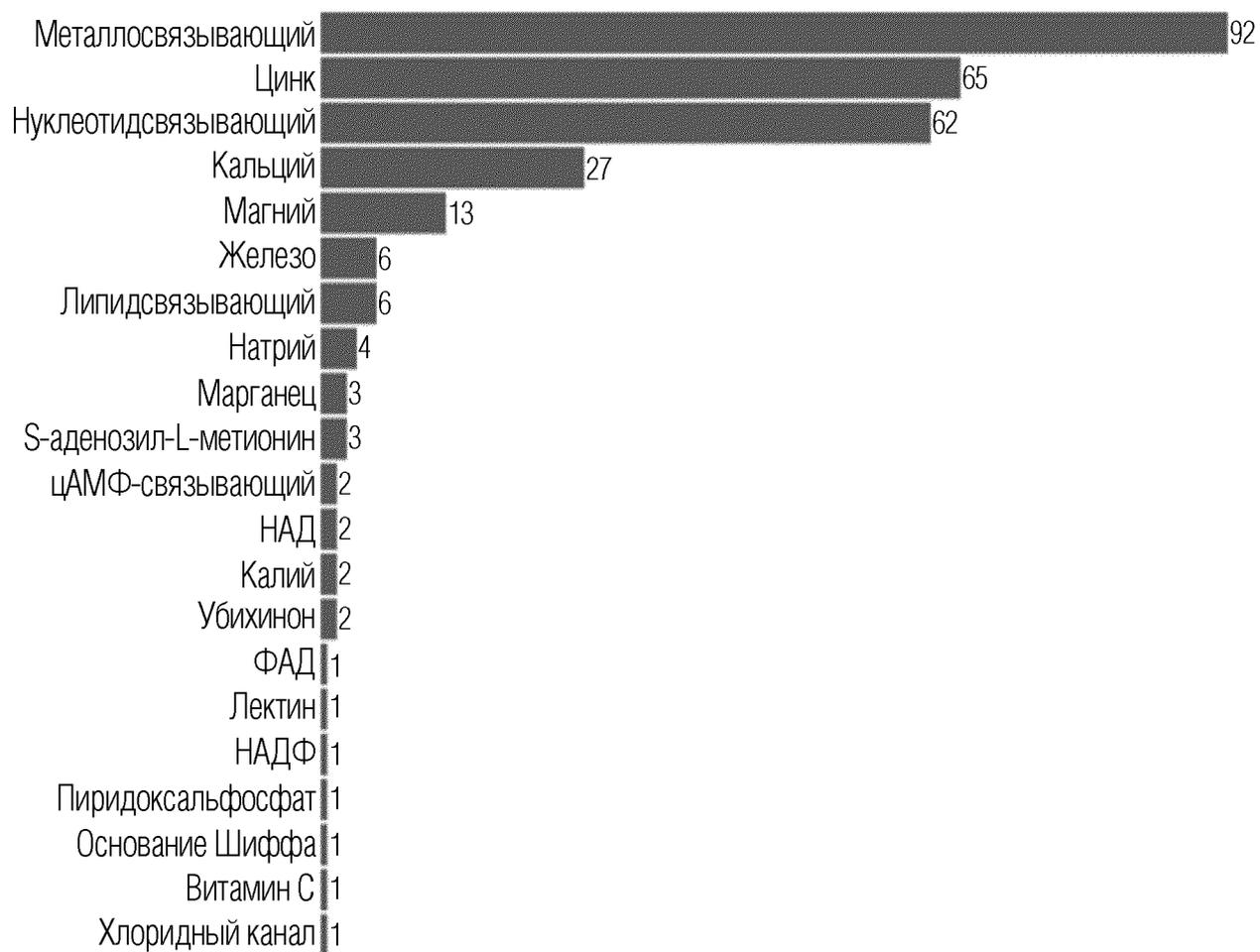
ФИГ. 1



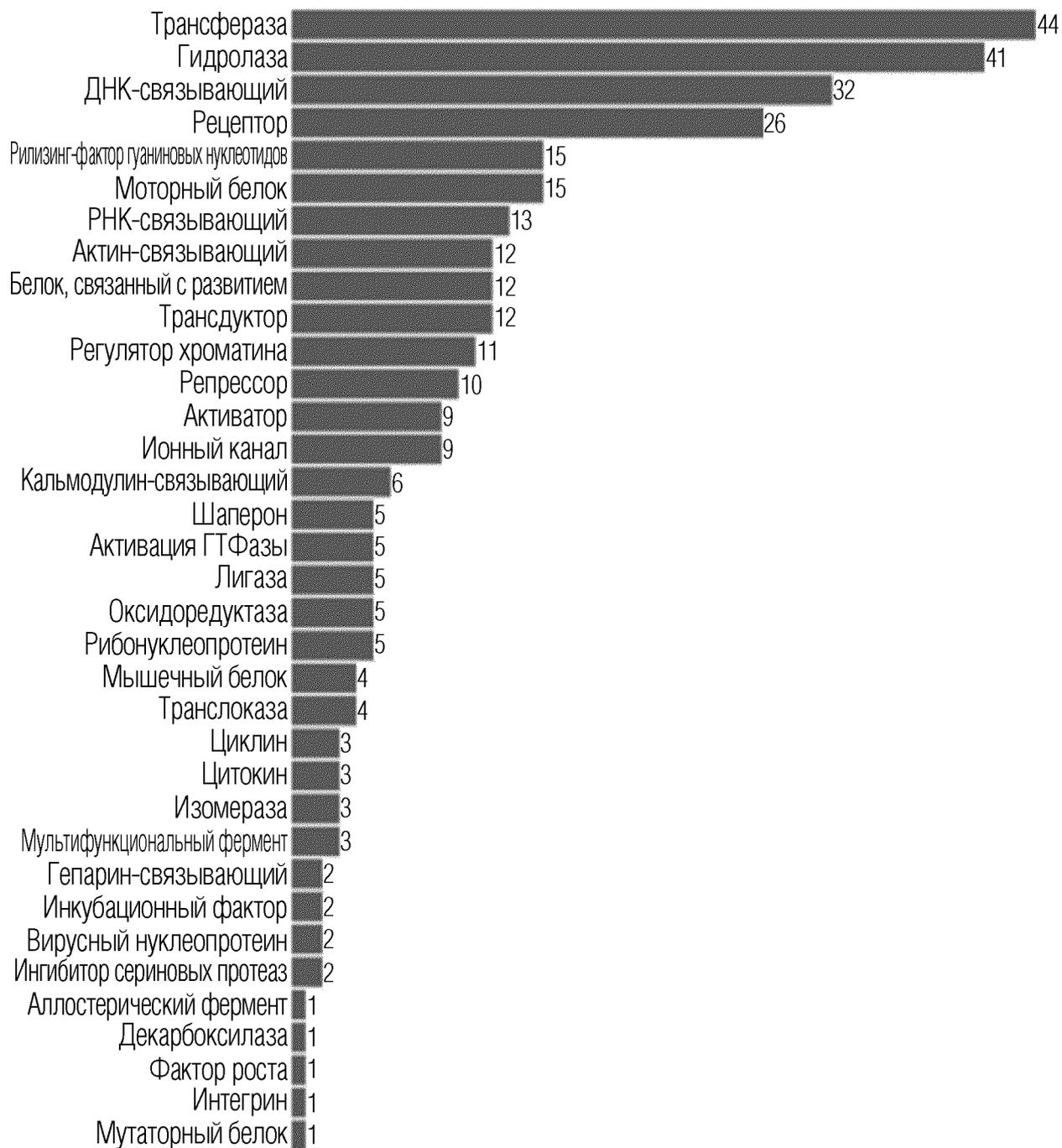
ФИГ. 2



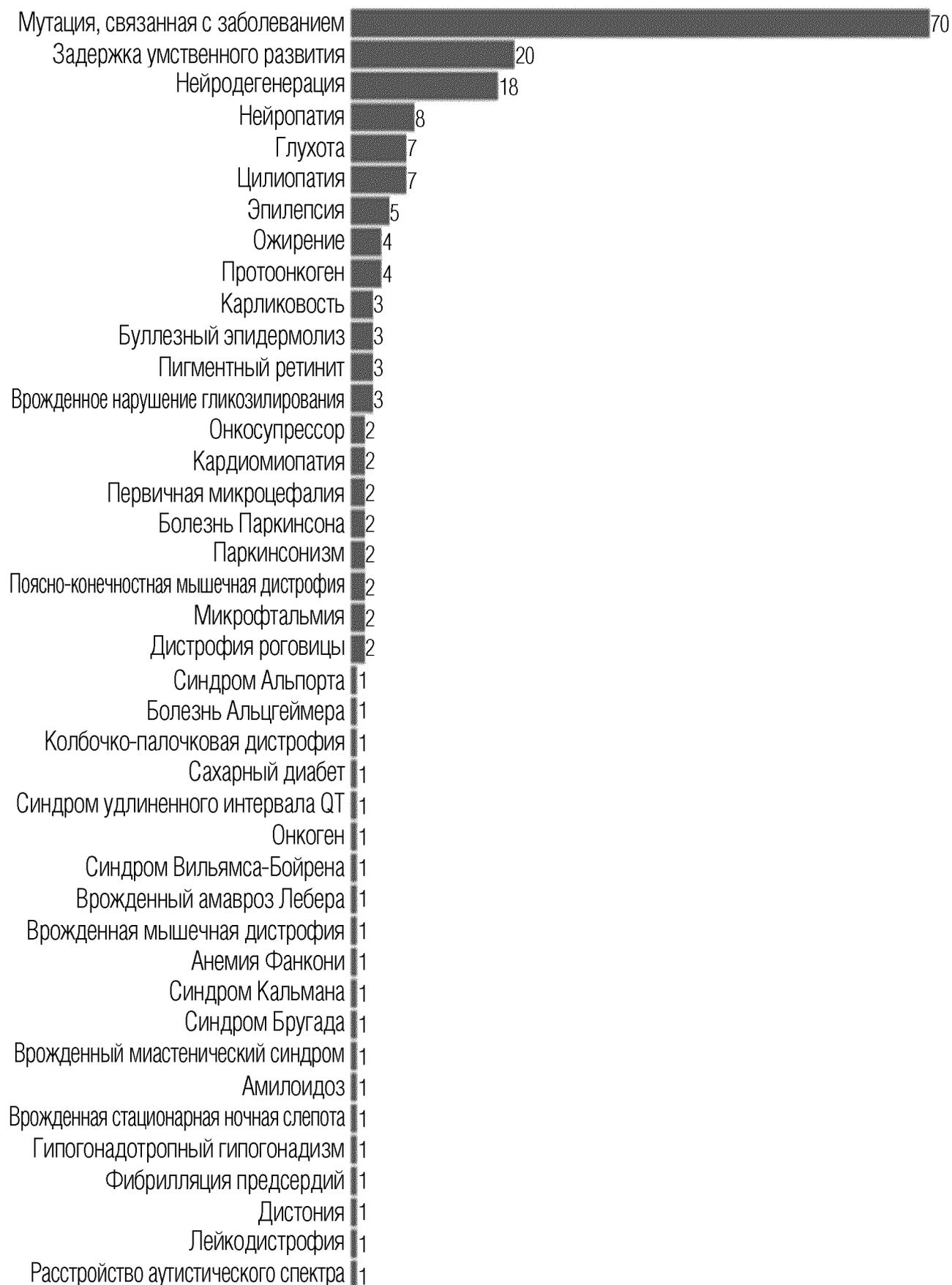
ФИГ. 3



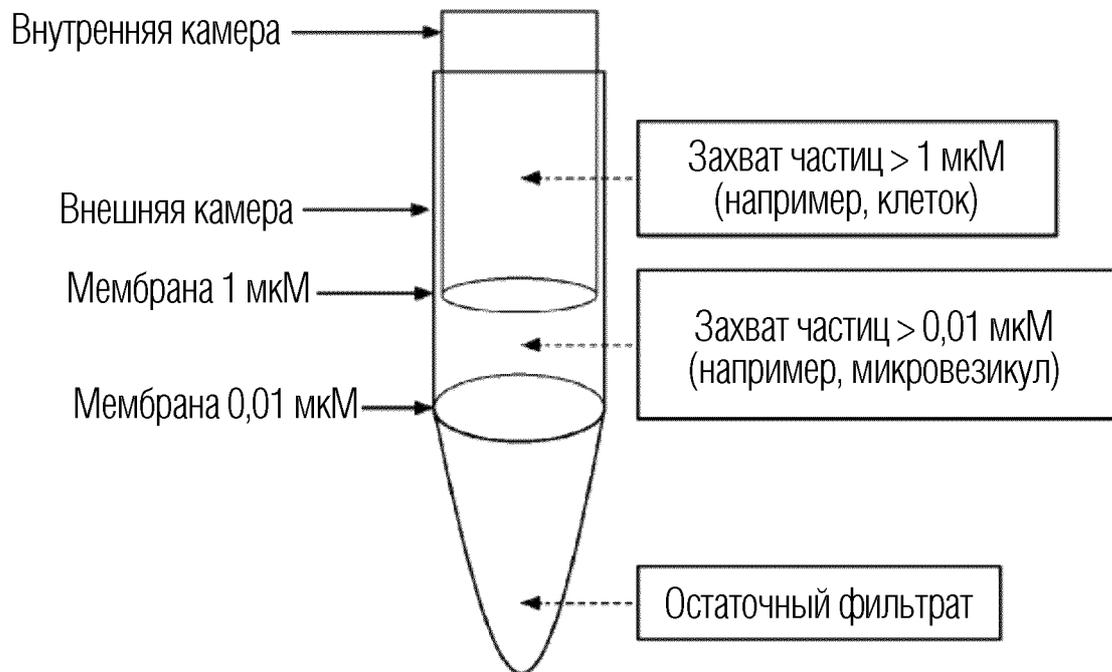
ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7