

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392005 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.29

(51) Int. Cl. *A61K 35/28* (2015.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.10.19

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ЭКЗОСОМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ СУСТАВНОГО ХРЯЩА

(31) 202210620951.3

(32) 2022.06.02

(33) CN

(86) PCT/CN2022/126040

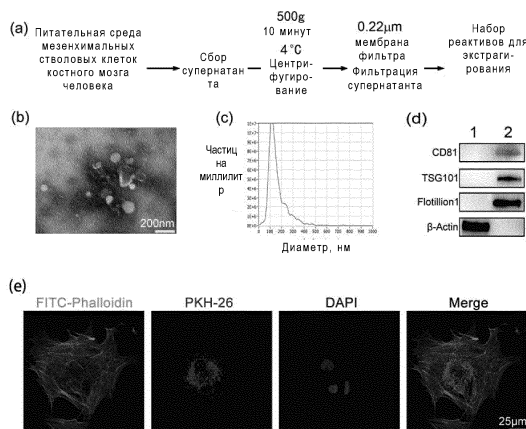
(87) WO 2023/179000 2023.09.28

(71) Заявитель:
НАНЬТУН УНИВЕРСИТИ (CN)

(72) Изобретатель:
Сунь Чэн, Гу Сяосун, Гун Лэйлэй,
Цун Мэн, Ян Хунвэй, Чжан Юй, Ли
Мэйюань, Ван Сяоминь, Сюй Лай
(CN)

(74) Представитель:
Забегалева У.Г., Давыдова Е.Л.,
Мурашев П.М. (RU)

(57) Изобретение относится к области биомедицины, а точнее к способу получения экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и их применению для восстановления повреждений суставного хряща. Экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга продуцируют питательной средой, стимулирующей мезенхимальные стволовые клетки костного мозга. После пассирования из питательной среды экзосомы выделяют из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Более того, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга получают из костного мозга подвздошной кости или бедренной кости. Внеклеточные везикулы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, имеют типичные характеристики экзосом. Кроме того, приготовленные экзосомы улучшают жизненную силу хондроцитов и способствуют пролиферации и перемещению хондроцитов. В модели повреждений суставного хряща кролика приготовленные экзосомы могут эффективно способствовать восстановлению хряща.



A1

202392005

202392005

A1

Применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления повреждений суставного хряща

1. Область техники

5 Изобретение относится к области биомедицины, а точнее к способу получения экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и их применению для стимуляции жизненной активности хондроцитов, стимулирующего влияния на пролиферацию хондроцитов, усиления перемещения хондроцитов и восстановления повреждения хряща.

10

2. Уровень техники

Хрящ состоит из коллагена, протеогликанов, гликозаминогликанов, гликопротеинов, небольшого количества клеток и 60-80% воды. Хондроциты и окружающий внеклеточный матрикс (ЕСМ) вместе составляют хрящевую единицу, которая считается основной структурной, функциональной и метаболической 15 единицей хряща. В нормальном хряще хондроциты синтезируют коллаген, протеогликан и гликозаминогликан для поддержания стабильного состояния (гомеостаза) хряща или замены поврежденного хряща. Хрящ играет важную роль в человеческом организме, выдерживая нагрузки и уменьшая трение костей между 20 суставами. Однако во взрослой хрящевой ткани отсутствуют кровеносные сосуды или нервы, поэтому способность поврежденной хрящевой ткани к самовосстановлению очень ограничена. Более того, функциональное нарушение хряща часто тесно связано с возникновением дегенеративных заболеваний суставов. Например, дегенеративный артрит, сенильный артрит, 25 гипертрофический артрит и другие болезни. Клинические методы лечения дегенеративного заболевания суставов включают методы с хирургическим вмешательством и без хирургического вмешательства. Нехирургическое лечение в

основном основано на пероральных нестероидных противовоспалительных препаратах, внутрисуставных инъекциях лекарств и реабилитационных упражнениях. Хотя это может облегчить боль и улучшить симптомы в краткосрочной перспективе, но долгосрочный эффект не является положительным.

5 Хирургическое лечение включает микропереломы, эндопротезирование суставов, имплантацию аутологичных хондроцитов, трансплантацию ювенильного аллогенного хряща, трансплантацию аутологичного хряща и др. Однако из-за ограничений этих различных хирургических процедур, включая фиброзно-хрящевую дисплазию, ограниченную доступность тканей, 10 дедифференцировку первичных хондроцитов, это приводит к потере функции. Кроме того, наряду с возможным воспалением вокруг донорского хряща срочно необходимы новые альтернативные терапевтические стратегии для регенерации хряща. Клинически доказано, что лечение повреждения хряща, основанное на дифференцировочном потенциале стволовых клеток, имеет большой потенциал 15 развития. В то же время, чтобы избежать ограничений онкогенности стволовых клеток, паракринный эффект внеклеточных везикул, высвобождаемых стволовыми клетками, особенно экзосомами, играет важную роль для восстановления поврежденного хряща.

20 **Сущность изобретения**

Задачей настоящего изобретения является создание экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, которые можно использовать для стимуляции активности хондроцитов, повышения пролиферации хондроцитов, усиления активности перемещения хондроцитов и восстановления повреждений хряща.

25 Экзосомы могут улучшать жизнеспособность хондроцитов, способствовать пролиферации клеток и повышать способность к миграции клеток. Лечение экзосомами может значительно способствовать восстановлению дефектного

хряща и значительно улучшить регенерацию дефектного хряща.

Предлагается применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при приготовлении лекарственных средств для лечения заболеваний суставного хряща, при этом экзосомы мезенхимальных стволовых
5 клеток костного мозга получают путем стимуляции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга питательной средой. После пассирования из питательной среды выделяют экзосомы из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Более того, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга получают из костного мозга подвздошной кости или бедренной кости.

10 Кроме того, применение представляет собой любое из следующего:

применение при приготовлении препаратов для повышения активности жизнеспособности хондроцитов;

применение при приготовлении препаратов для стимулирования пролиферации хондроцитов;

15 применение при приготовлении препаратов для стимулирования перемещения хондроцитов;

применение при приготовлении лекарств для восстановления повреждений хряща.

Вышеупомянутая питательная среда является полной питательной средой.

20 Кроме того, условия культивирования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга: 37°C, 5% CO₂.

Дополнительно костный мозг добавляют к полной среде продуванием и перемешиванием, помещают в инкубатор для выращивания, на 3-й день меняют половину среды, на 6-й день - полностью. В дальнейшем среду меняют каждые 2
25 дня до тех пор, пока клетки не вырастут на 80-90%, а затем переходят к поколению P1. После трехразового пассирования получают первичные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга.

Далее при выращивании мезенхимальных стволовых клеток костного мозга клетки доращивают до экспоненциальной фазы роста, среду отбрасывают, промывают PBS и заменяют 2%-ной безвезикулярной сывороточной средой для выращивания до тех пор, пока клетки не вырастут на 80-90%. Затем собранный супернатант (надосадочная жидкость) и фильтрат используют для экстракции экзосом.

Дополнительно экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга собирают с помощью мембранной аффинной фильтрации на спин-колонке.

Отфильтрованный супернатант добавляют в равном объеме с буферным раствором ХВР. После смешивания его добавляют в спин-колонку с аффинной мембраной для обработки, и экзосомы, адсорбированные на колонке, элюируют (очищают) буфером ХЕ.

Кроме того, фильтрацию выполняют через мембранный фильтр 0,2 мкм.

Дополнительно после равномерного перемешивания добавляют на аффинную мембранную спин-колонку для обработки и центрифугируют 500 грамм в течение 1 минуты.

Положительный эффект

Изобретение предлагает применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для получения лекарственных средств, которые необходимы для лечения заболеваний суставного хряща. Более того, экзосомы могут улучшать активность жизнеспособности хондроцитов, способствовать пролиферации клеток и повышать активность передвижения клеток. Также лечение экзосомами может значительно способствовать восстановлению поврежденного хряща.

Описание прилагаемых чертежей

Фиг. 1 иллюстрирует извлечение и идентификацию экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. (а) Процесс экстракции экзосом из

мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. (b) Белковая идентификация экзосом из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. (c) Анализ экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга с помощью трекера наночастиц. (d) Белковая идентификация экзосом из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. 1: Образец общего белка мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. 2: Образцы белков экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Экспрессию белка анализировали методом western blot. (e) Определение интернализации экзосом в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга. FITC-Phalloidin: флуоресцеин изотиоцианат-фаллоидин, который используют для маркировки цитоскелета. РКН-26: красный флуоресцеин, используемый для маркировки экзосом. DAPI: 4',6-диамидино-2-фенилиндолин, который используют для маркировки ядер. Merge представляет собой объединённое изображение.

На фиг. 2 показано, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга способствуют жизнеспособности хондроцитов и пролиферации клеток. (a) Экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга повышают жизнеспособность хондроцитов. (b) Экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга способствуют пролиферации хондроцитов. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, метод статистической проверки гипотез Т-критерия Стьюдента.

Фиг. 3 показывает, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга способствуют миграции хондроцитов. (a) Хондроциты обрабатывали экзосомами мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, и способность клеток к передвижению была обнаружена с помощью анализа заживления ран. (b) Количественный анализ результатов эксперимента по заживлению ран. *** $p < 0,001$, однофакторный дисперсионный анализ.

Фиг. 4 представляет собой анализ кинетики интернализации экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в хондроцитах. (a)

Интернализация экзосом мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга. Экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга были помечены РКН26, меченые экзосомы были использованы для лечения хондроцитов, а внутриклеточные сигналы РКН26 были обнаружены в разные моменты времени.

- 5 (b) Количественный анализ интенсивности РКН26 экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в хондроцитах в разные моменты времени. FITC-Phalloidin: флуоресцеин изотиоцианат-фаллоидин, используемый для маркировки цитоскелета. РКН-26: красный флуоресцеин, используемый для маркировки экзосом. DAPI: 4',6-диамидино-2-фенилиндол, используемый для
10 маркировки ядер. Merge - это это объединённое изображение изображение. *** $p < 0,001$, однофакторный дисперсионный анализ.

На фиг. 5 показано, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга способствуют восстановлению хряща. (a) Экспериментальный процесс. (b) Внешний вид суставного хряща коленного сустава кролика. (c) Нанесения
15 вещества гематоксилин-эозином (hematoxylin-eosin staining) на коленный хрящ кролика.

На фиг. 6 показано, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга способствуют восстановлению хряща. (a) Окрашивание Saf-O/Fast Green. (b) Регенерация хряща оценивалась в соответствии с критериями оценки
20 Международного общества скелетологии. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, однофакторный дисперсионный анализ.

Конкретные примеры осуществления

1. Ход эксперимента

- 25 1. Экстракция, выращивание и идентификация экзосом из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека.

Образцы костного мозга человека были получены из подвздошной кости или

бедра 6 здоровых взрослых (средний возраст 35 лет, диапазон 30-40 лет; мужчины: 3, женщины: 3). Поместили 1 мл извлеченного костного мозга человека в чашку Петри диаметром 60 мм, затем добавили 8 мл полной среды и хорошо перемешали путем продувки. Полная среда представляла собой среду для выращивания клеток DMEM, дополненную 10% фетальной бычьей сывороткой, 1% пенициллином и стрептомицином. Далее материал эксперимента выращивали в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂. Затем на третьи сутки меняли половину среды, а на шестые сутки - всю среду. В дальнейшем среду меняли каждые 2 дня до роста клеток на 80-90%, а затем перешли и в поколение P1. Таким образом, после трехразового пассирования были получены относительно чистые первичные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, а клетки поколения P3-P5 использованы для последующих экспериментов.

2. Извлечение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга

Клетки росли до экспоненциальной фазы роста, среду выбрасывали, промывали один раз PBS и заменяли 2%-ной сывороточной средой без везикул для культивирования. Среда с 2% безвезикулярной сывороткой представляла собой эмбриональную бычью сыворотку, используемую для приготовления среды для культивирования клеток после удаления везикул ультрацентрифугированием (100000 грамм, 16 часов, 4°C). Состав среды: среда для культивирования клеток DMEM, содержащая 2% эмбриональной бычьей сыворотки без везикул, 1% пенициллина и стрептомицина. Когда клетки вырастали до 80-90%, супернатант собирали, фильтровали через фильтр 0,2 мкм и фильтрат использовали для экстракции экзосом. Затем перенесли фильтрат, отфильтрованный фильтром 0,2 мкм, в новую пробирку, добавили равный объем буферного раствора ХВР, осторожно поворачивали пробирку 5 раз и перемешивали раствор. Затем добавили смесь в колонку exoEasy Kit набора экзосом и центрифугировали 500 грамм в течение 1 минуты. Проточный раствор слили и снова добавили образец до полной

фильтрации смеси. Затем поместили колонку в ту же пробирку для сбора, добавили 10 мл буферного раствора XWP и центрифугировали при 5000 г в течение 5 минут, чтобы удалить остаточную жидкость в колонке. Нижнюю часть жидкости отбросили. Более того, колонку перенесли в новую пробирку (коллектор) для сбора. Адсорбированные на колонке экзосомы элюировали буферным раствором ХЕ. Полученные экзосомы хранили в холодильнике при -80°C для последующих экспериментов.

3. Идентификация экзосом

(1) Экзосомы ресуспендировали в PBS, а размер частиц и концентрацию экзосом определяли с помощью анализа траекторий наночастиц (NTA).

(2) Раствор экзосом наносили на полиметилвинилацетат и покрытые углеродом медные сетки 300 меш, оставляли при комнатной температуре на 3 минуты, а затем наносили 1,5% уранил ацетата. Сетка изображалась, наблюдалась и фотографировалась с помощью просвечивающего электронного микроскопа.

(3) Western Blot (Анализ белков) использовали для обнаружения экспрессии белков, связанных с экзосомами мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, включая CD81, Flotillin-1 и TSG101.

4. Экстракция хондроцитов и выращивание

Экстракция хондроцитов выполнялась следующим образом. (1) Срезы хряща брали из коленных суставов 4-недельных новозеландских кроликов. (2) Нарезали его на мелкие кусочки. (3) После трех промывок PBS. переваривали 0,25% трипсином в течение 30 минут. (4) Удалили супернатант, добавили 0,2% коллагеназы типа 2 и поместили его в инкубатор с 5% CO₂ при 37°C для переваривания в течение ночи. (5) Фильтровали через фильтр 200 меш и центрифугировали фильтрат 500 г в течение 5 минут. (6) Осадок ресуспендировали в полной среде хондроцитов и выращивали в инкубаторе.

Пассирование хондроцитов выполнялось следующим образом. (1)

Использовали среду каждые 2 дня, пока количество клеток не выросло на 80-90%.

(2) После двукратной промывки PBS добавили соответствующий объем 0,25% трипсина для расщепления. Затем остановили расщепление после выращивания, собрали клетки и ресуспендировали посевной (культуральный) планшет после центрифугирования. (3) Таким образом очищенные первичные хондроциты получили после одного пассирования, а хондроциты пассирования P1-P3 использовали для последующих экспериментов.

5. Анализ жизнеспособности хондроцитов

В 96-луночный культуральный планшет засеяли хондроциты плотностью 5×10^3 /мл. Через 4 ч после инокуляции среду заменили 2% сывороткой без везикул, к культурной среде добавляли различные концентрации экзосом ($5,0 \times 10^8$ /мл, $1,0 \times 10^9$ /мл, $2,0 \times 10^9$ /мл) и выращивали в течение 24 часов. Затем добавили 1/10 от общего среднего объема раствора ССК-8. Поместили культуральный планшет в инкубатор при 37°C и инкубировали в течение 2-4 часов. Затем измеряли поглощение при длине волны 450 нм.

6. Анализ пролиферации хондроцитов

В 96-луночные культуральные планшеты засеяли хондроциты с плотностью 5×10^3 /мл. Через 4 ч после инокуляции среду заменили 2%-ной сывороткой без везикул и к культуре на 24 ч добавили приготовленные экзосомы ($1,0 \times 10^9$ /мл). При этом аспирировали среду в каждую лунку, добавили в каждую лунку по 50 мкл среды EdU и инкубировали в течение 2 часов. Затем удалили среду, промыли PBS, добавили 100 мкл фиксирующего раствора и фиксировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Кроме того, добавили 100 мкл раствора глицина с концентрацией 2 мг/мл и провели реакцию нейтрализации в течение 5 минут. Добавили 100 мкл PBS и промывали в течение 5 минут. Добавили 100 мкл 0,5% TritonX-100 в PBS для реакции в течение 10 минут и промывали PBS в течение 5 минут. Добавили 100 мкл окрашивающего реакционного раствора и инкубировали

при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте. Добавили 100 мкл 0,5% TritonX-100 в PBS, чтобы промыть дважды, каждый раз в течение 10 минут. Добавили 100 мкл раствора для окрашивания красителем Hoechst и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут в темноте. Затем промыли шейкером для обесцвечивания PBS 3 раза, каждый раз по 5-10 минут. В итоге изображения клеток получили с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS FL Auto.

7. Эксперимент методом «царапины»

Устройство ibidi использовалось для осуществления эксперимента с методом «царапины» следующим образом. (1) Устройство с 2 отверстиями вставляли в предварительно покрытую маленькую чашку для проведения теста на заживление раны. (2) Приготавливали предварительно обработанную клеточную суспензию, то есть ресуспендировали клетки в питательной среде без сыворотки. При этом добавляли клеточную суспензию в концентрации 2×10^5 /мл (100 мкл) на лунку. (3) Через 12 часов использовали стерильный пинцет, чтобы осторожно вытащить устройство 2, и один раз промыли PBS. (4). Контрольную группу заменили на 2% сывороточную среду без везикул, а экспериментальную группу заменили на 2% сывороточную среду без везикул, содержащую экзосомы ($1,0 \times 10^9$ /мл), и выращивали в течение 24 часов и 48 часов. (5) Затем наблюдали за процессом миграции клеток под микроскопом и фотографировали.

8. Эксперимент по интернализации экзосом

Процесс с использованием РКН26 для отметки экзосом выглядит следующим образом. (1) Приготавливали раствор экзосом (100 мкл) с концентрацией 1×10^{11} /мл. (2) Затем добавляли экзосомы в 250 мкл Diluent C и осторожно перемешивали. (3). Брали новую пробирку EP и добавляли 2 мкл РКН26 к 250 мкл Diluent C. (4) Добавляли (2) в (3) и равномерно перемешивали. (5) Оставляли при комнатной температуре на 4 минуты и перемешивали пипеткой каждую 1 минуту. (6) Затем

добавляли равный объем 1% BSA, чтобы остановить окрашивание. (7) Концентрировали раствор с помощью ультрацентрифужных фильтров Amicon перед использованием. (8) Разбавляли концентрированные экзосомы посредством бессывороточной среды и в итоге приготовили раствор, содержащий $1,0 \times 10^9$ /мл экзосом. (9) После инокуляции хондроцитов в течение 4 часов добавляли экзосомы, меченные PKH26. Совместное выращивание проводили в течение 3, 6, 12, 24, 48, 72 часов. (10). Клетки фиксировали 4% PFA после связанной обработки. (11) Кроме того, дважды промывали PBS, каждый раз по 10 минут. (12) Добавили 100 мкл окрашивающего раствора DAPI и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут в темноте. (13) В итоге наблюдали и фотографировали с помощью конфокальной микроскопии

9. Построение модели повреждения хряща

Новозеландские кролики были предоставлены Центром животных Университета Нантонг. Они были разделены на 4 группы: контрольная группа, хирургическая группа, группа «хирургическое вмешательство + экзосомы с низкой дозой», группа «хирургическое вмешательство + экзосомы с высокой дозой», по 6 кроликов в каждой группе. Сначала внутримышечно вводили комбинацию медетомидина (20 мкг/кг), кетамина (5 мг/кг) и бупренорфина (0,03 мг/кг). Под наркозом изофлураном в бороздке бедренного блока коленного сустава сверлом на левой задней конечности кролику сделали костно-хрящевой дефект диаметром 4 мм и глубиной 3 мм. Закрывали разрез и шов слой за слоем. Более того, внутримышечно вводили пенициллин (50 000 ед/кг) в течение 3 дней подряд для предотвращения инфекции и трамадол 2 мг/кг для обезболивания. 300 мкл экзосом различной концентрации (низкая доза: $1,0 \times 10^{10}$ /мл; высокая доза: $5,0 \times 10^{10}$ /мл) вводили в полость сустава один раз в неделю, всего 4 процедуры.

10. Парафиновый срез

В конце эксперимента кроликов подвергали эвтаназии, извлекали целые

коленные суставы и фиксировали параформальдегидом в течение 24 часов. После декальцинации 10% EDTA (pH 7,4) в течение 2-3 месяцев коленные суставы залили в парафин и нарезали на части толщиной 5 мкм. Парафиновые срезы депарафинизировали до воды: срезы помещали в ксилол (I) на 20 минут, ксилол (II) на 20 минут, абсолютный этанол (I) на 5 минут, абсолютный спирт (II) на 5 минут, 75% этанол на 5 минут, затем промывали водопроводной водой.

11. Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E)

Окрашивали семенную жидкость гематоксилином (60°C) в течение 30-60 секунд, смывали гематоксилиновую семенную жидкость проточной водой 5-10 секунд, промывали 1% этанолом соляной кислоты 1-3 секунд, слегка промывали водой 1-2 секунд и возвращали синий цвет в течение 5-10 секунд. Затем промывали проточной водой 15-30 секунд, окрашивали 0,5% раствором эозина 30-60 секунд, отмывали дистиллированной водой 1-2 секунд, 80% этанолом в течение 1-2 секунд, 95% этанолом в течение 1-2 секунд, абсолютным спиртом в течение 1-2 секунд, ксилолом (I) 2-3 секунд, ксилолом (II) 2-3 секунд. Нейтральное крепление резинки.

12. Окрашивание сафранином O/Fast Green

Окрашивание Fast Green: помещали срезы в раствор для окрашивания Fast Green на 5-10 минут, смывали излишки красящего раствора, пока хрящ не станет бесцветным, замачивали в растворе для дифференцировки и промывали тридистиллированной водой. Окрашивание сафранином: срезы погружали в раствор для окрашивания сафранином на 15-30 с и быстро обезвоживали абсолютным этанолом. Прозрачная герметизация: прозрачный раствор ксилола в течение 5 минут и нейтральная резиновая герметизация. Затем выполняли микроскопическое исследование, получение и анализ изображений.

13. Оценка восстановления хряща

Повреждение хряща оценивали и анализировали в соответствии со

стандартом Международного общества по восстановлению хрящей (International Cartilage Repair Society, ICRS).

Супернатант культуры мезенхимальных стволовых клеток костного мозга собирали для экстракции экзосом. Сначала клеточный дебрис в супернатанте удаляли путем центрифугирования, затем полученный супернатант фильтровали и экстрагировали экзосомы с помощью коммерческого набора для экстракции экзосом (фиг. 1a). Тело экскреции идентифицировали. Во-первых, экстрагированные экзосомы наблюдали с помощью электронного микроскопа, и было обнаружено, что экстрагированные экзосомы имеют типичную форму экзосом, то есть чашеобразные везикулы с двойной мембраной (фиг. 1b). Последующий анализ с помощью трекера наночастиц показал, что средний диаметр экстрагированных экзосом составлял 131,20 нм, а концентрация — $1,2 \times 10^{11}$ частиц/мл (фиг. 1c). Обнаружение белка показало, что предложенные экзосомы экспрессировали типичные белки экзосом, включая CD81, TSG10, Flotillin 1, а актин не экспрессировался (фиг. 1d). Наконец, авторы исследовали способность предоставленных экзосом к интернализации. Результаты показали, что экзосомы культивировались совместно с хондроцитами и оказались интернализированными (фиг. 1e). Приведенные выше результаты показывают, что внеклеточные везикулы, извлеченные из супернатанта мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, являются экзосомами.

Более того, функциональные эксперименты показали, что предлагаемые экзосомы могут улучшать жизнеспособность хондроцитов (фиг. 2a), способствовать пролиферации клеток (фиг. 2b) и повышать способность к перемещению клеток (фиг. 3a, b). Для определения процессинга *in vivo* были проведены анализы кинетики интернализации экзосом. Результаты показали, что экзосомы можно было наблюдать в клетках после совместного выращивания с хондроцитами в течение 3 часов. Кроме того, количество экзосом в клетках

постепенно увеличивалось с увеличением времени обработки, а пик интернализации появлялся через 72 часа после обработки (фиг. 4а, b). В эксперименте *in vivo* использовали модель дефекта суставного хряща коленного сустава задней конечности кролика, а приготовленные экзосомы вводили в полость сустава в общей сложности 4 инъекции. Затем было проведено морфологическое исследование для анализа восстановления хряща (фиг. 5а). Наблюдение за общей морфологией коленных суставов кроликов показало, что дефекты суставного хряща коленных суставов кроликов в хирургической группе все еще были хорошо видны. После лечения экзосомами повреждения хряща значительно восстановились, а группа с высокой дозой восстановилась лучше (фиг. 5b). Результаты окрашивания гематоксилин-эозином также показали, что обработка экзосомами может значительно способствовать восстановлению дефектного хряща (фиг. 5с). Результаты окрашивания зеленым сафранином показали, что дефект коленного суставного хряща у кроликов в хирургической группе не улучшился. Однако обработка экзосомами значительно улучшала регенерацию дефектного хряща (фиг. 6а). Используя стандарт, разработанный Международным обществом хрящей для оценки, лечение экзосомами может значительно увеличить оценку. Согласно результатам эксперимента, оценка группы экзосом с высокой дозой лучше, чем у группы с низкой дозой (фиг. 6b).

20

Формула изобретения

1. Применение экзосом мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при получении лекарственных препаратов для лечения заболеваний суставного хряща, при этом экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга продуцируются средой, стимулирующей мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, после пассирования из культуральной среды экзосомы выделяют из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, причем мезенхимальные стволовые клетки костного мозга получают из костного мозга подвздошной кости или бедренной кости.

2. Применение по пункту 1, представляющее собой любое из следующего:

применение при приготовлении препаратов для улучшения жизнеспособности хондроцитов;

применение при приготовлении препаратов для стимулирования пролиферации хондроцитов;

применение при приготовлении препаратов для стимулирования перемещения хондроцитов;

применение при приготовлении лекарств для восстановления дефекта хряща.

3. Применение по пункту 1, отличающееся тем, что описанная питательная среда является полной питательной средой.

4. Применение по пункту 1, отличающееся тем, что условия выращивания мезенхимальных стволовых клеток костного мозга составляют 37°C, 5% CO₂.

5. Применение по пункту 1, отличающееся тем, что костный мозг вносят в полную среду путем продувки и перемешивания, затем помещают в инкубатор для выращивания, на третьи сутки среду меняют наполовину, а на шестой день среду полностью меняют, затем через каждые 2 дня меняют среду до тех пор, пока

клетки не вырастут на 80-90%, и переходят к поколению P1, после трехразового пассирования получают первичные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга.

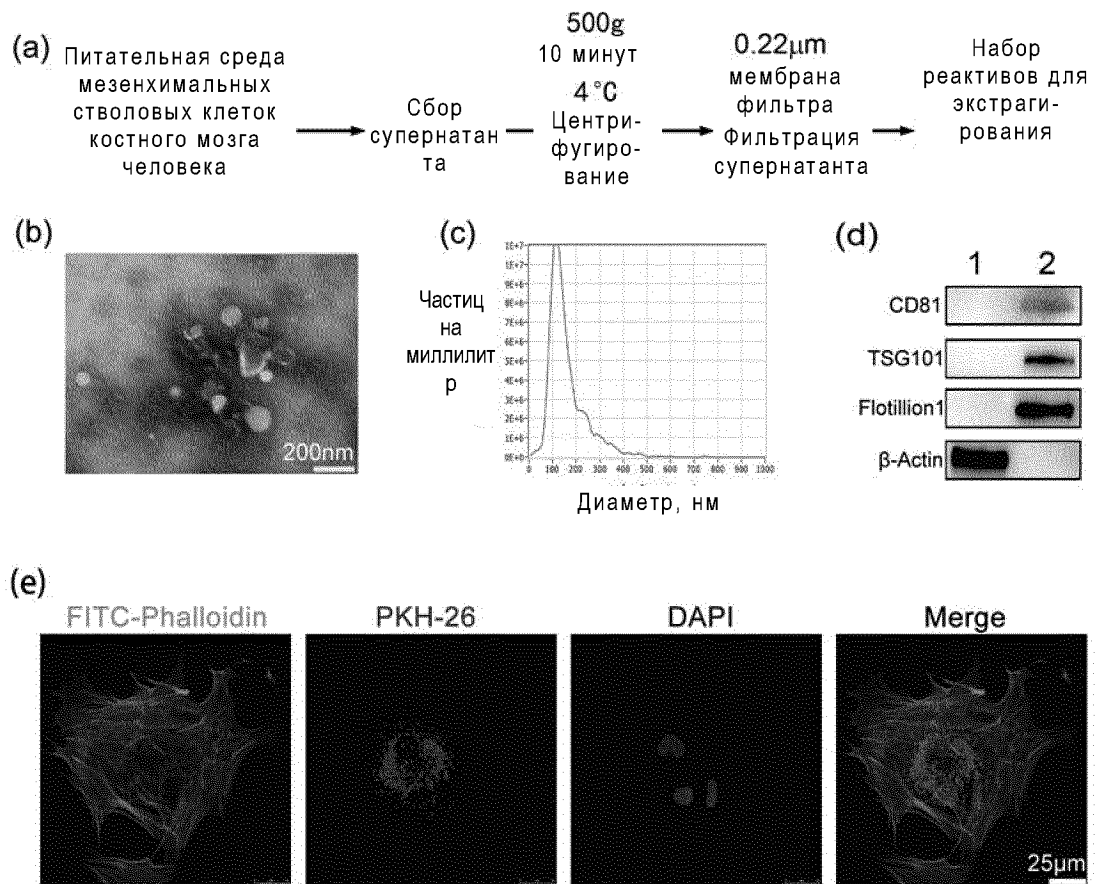
6. Применение по пункту 1, отличающееся тем, что при культивировании (выращивании) мезенхимальных стволовых клеток костного мозга клетки дорастают до экспоненциальной фазы роста, а питательную среду отбрасывают, после промывания PBS заменяют его 2% сывороткой без пузырьков для выращивания до тех пор, пока клетки не вырастут до 80-90%, затем собирают супернатант (надосадочная жидкость) и используют фильтрат для экстракции экзосом.

7. Применение по пункту 1, отличающееся тем, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток костного мозга собирают с помощью аффинной мембранной фильтрации на спин-колонке.

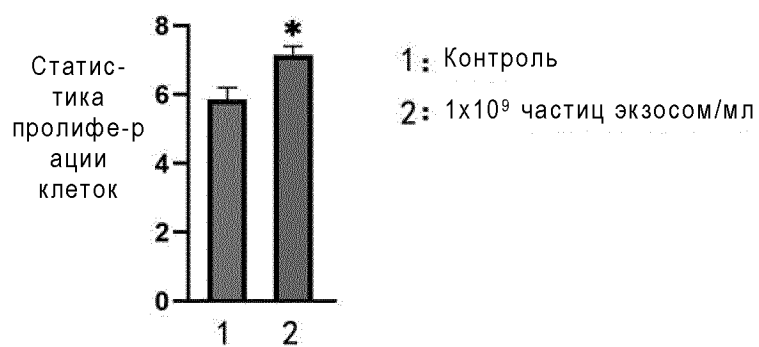
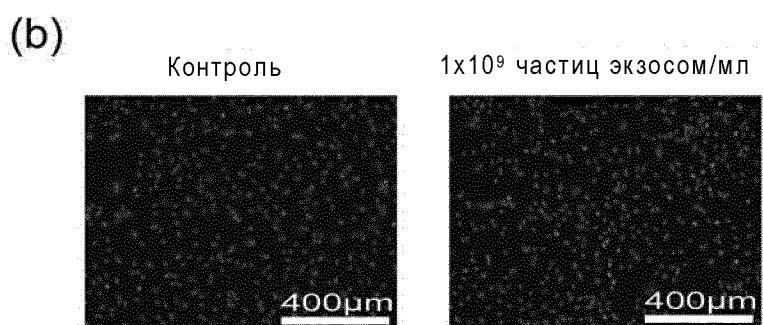
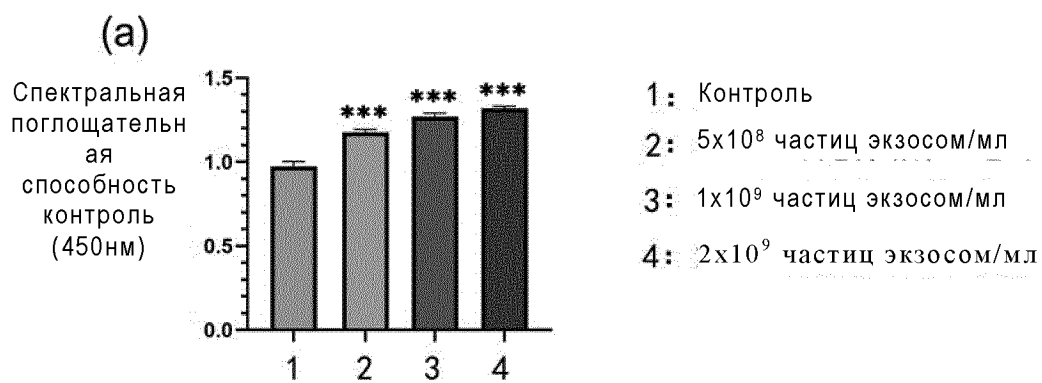
8. Применение по пункту 6, отличающееся тем, что в надосадочную жидкость после фильтрации добавляют равный объем ХВР демпфирующей жидкости, после смешивания добавляют его в спин-колонку с аффинной мембраной для обработки, а экзосомы, адсорбированные на колонке, элюируют (очищают) буфером ХЕ.

9. Применение по пункту 8, отличающееся тем, что фильтрацию выполняют через мембранный фильтр 0,2 мкм.

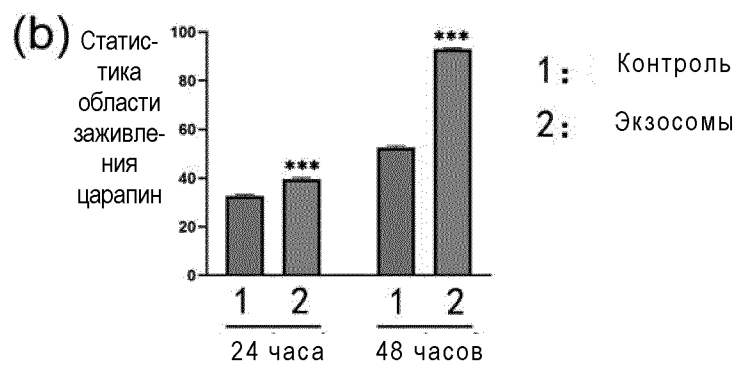
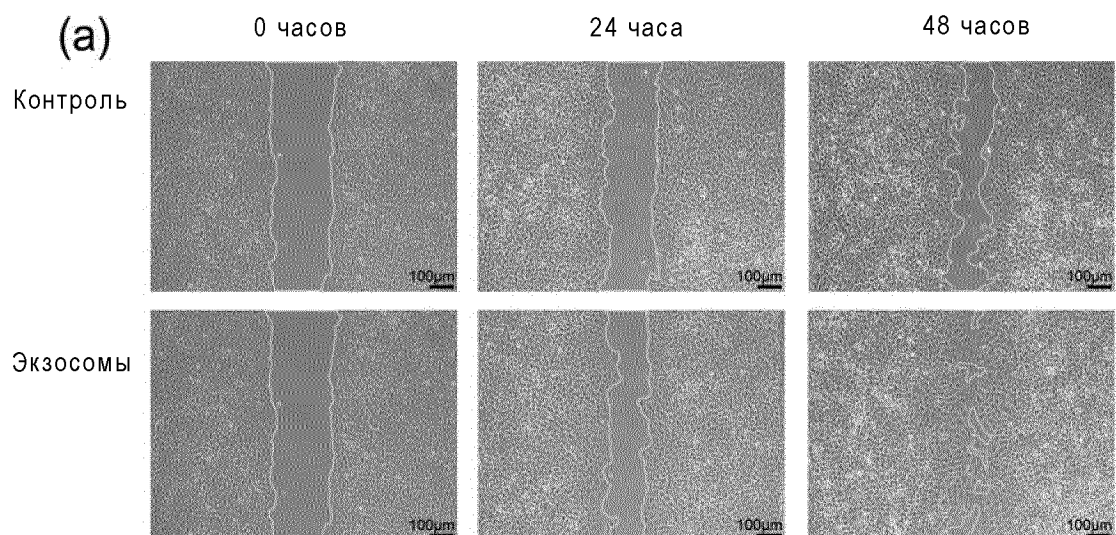
10. Применение по пункту 8, отличающееся тем, что после перемешивания добавляют в аффинную мембрану спин-колонки для обработки и центрифугируют при 500 грамм в течение 1 минуты.



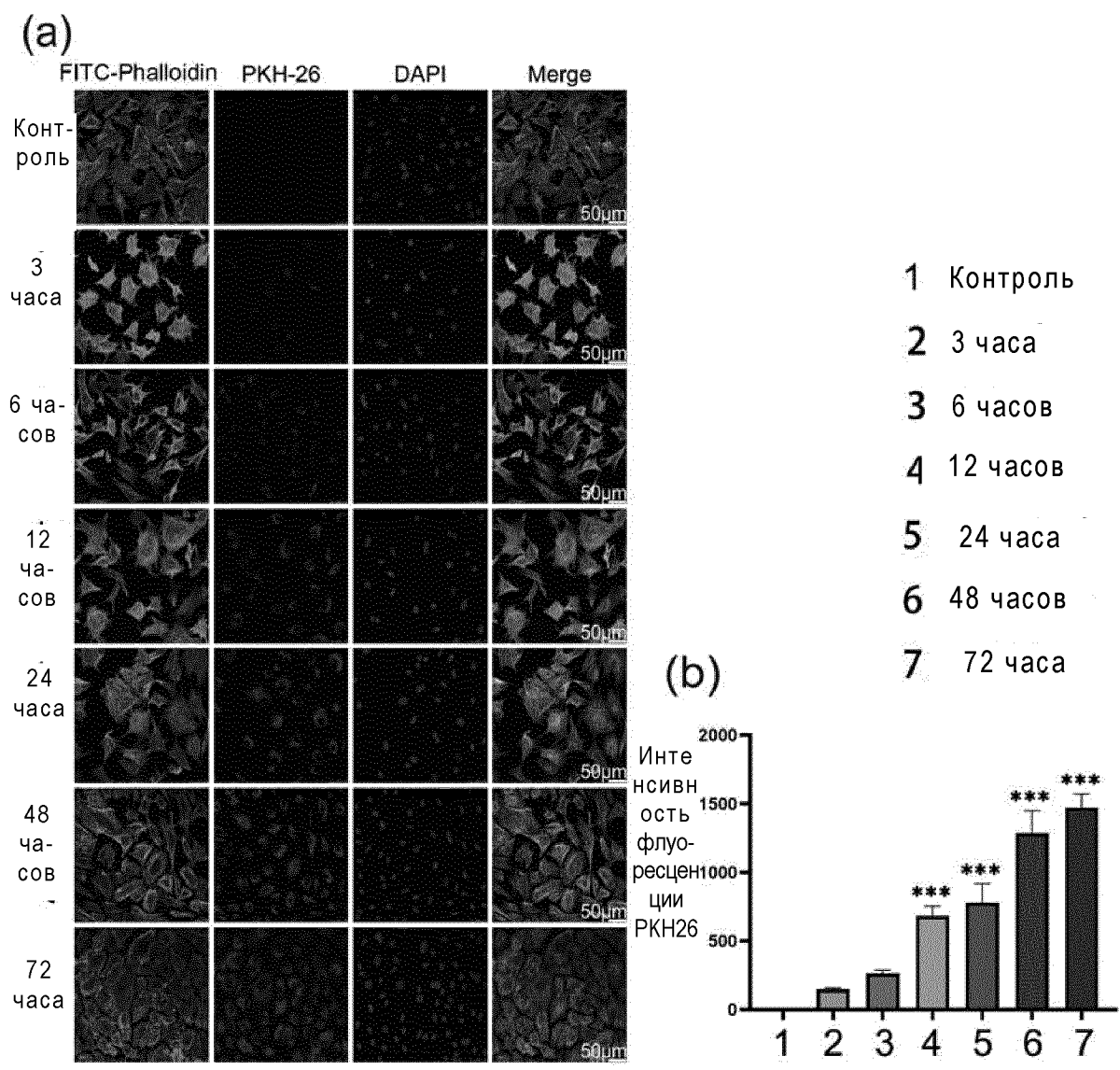
Фиг. 1



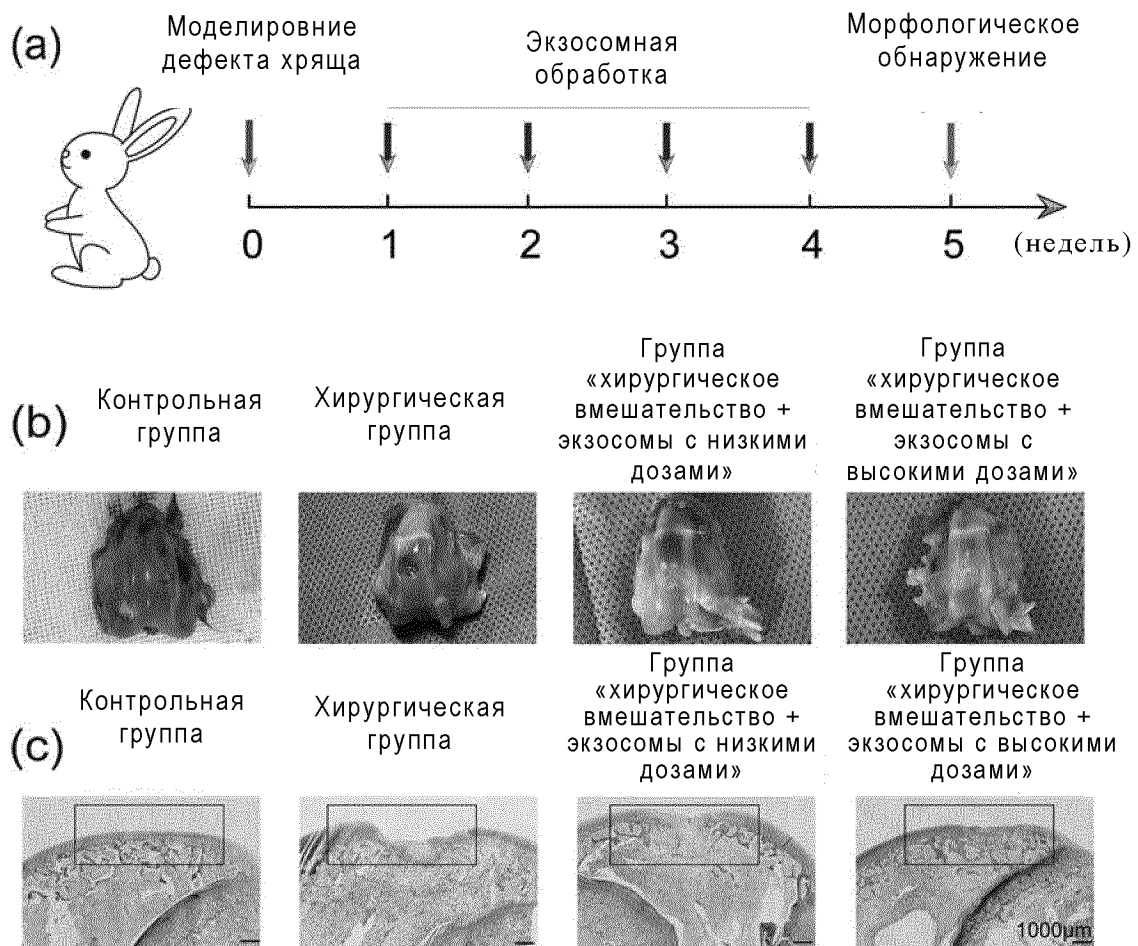
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

